

УДК 637.146.33.03 (047.31)(476)

*И.В. Кирик, А.Н. Казак, С.Л. Василенко, к.б.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## **ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* И *LACTOBACILLUS FERMENTUM* ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИХ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

*(Поступила в редакцию 7 апреля 2016 г.)*

*Исследованы физиолого-биохимические и промышленно-ценные свойства коллекционных штаммов *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus fermentum*; разработана среда для промышленного культивирования бактерий, определено влияние дозы инокуляции посевного материала на время культивирования бактерий *L. rhamnosus* и *L. fermentum*.*

**Ключевые слова:** *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, питательная среда, культивирование, оптическая плотность.

**Введение.** В последнее время особое внимание привлекают бактерии *L. rhamnosus* и *L. fermentum*. Указанные микроорганизмы обладают иммуноукрепляющими свойствами, в частности, улучшают клеточный фагоцитоз и активность натуральных клеток-киллеров, способствуют улучшению переносимости прививок при противогриппозной вакцинации [1].

Бактерии *L. rhamnosus* и *L. fermentum* используют в качестве пробиотической микрофлоры для производства различных продуктов, они являются технологически-необходимыми компонентами заквасок для производства таких продуктов как, например, ферментативные сыры, для улучшения рисунка и вкуса или устранения кормового привкуса.

Бактериальные закваски *L. rhamnosus* и *L. fermentum* используются и в других отраслях перерабатывающей промышленности, в частности, в составе биологических консервантов при силосовании различного растительного материала, а также при производстве хлебобулочных и мясных изделий.

Целью работы являлось изучение промышленно-ценных свойств коллекционных штаммов *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus fermentum*, а также на основе физиолого-биохимических характеристик разработка подходов для их промышленного культивирования.

**Состояние вопроса.** В настоящее время одним из перспективных и востребованных направлений микробиологии является поиск новых штаммов молочнокислых бактерий для создания на их основе различных препаратов и новых ферментированных (или обогащенных) продуктов. Одними из таких штаммов, которые в последнее время начали активно исследоваться для использования в различных перерабатывающих отраслях агропромышленного комплекса, являются штаммы *L. rhamnosus* и *L. fermentum*.

Одним из направлений исследований этих штаммов является их использование в качестве пробиотиков.

Во всем мире на потребительском рынке постоянно возрастает доля реализации продуктов и препаратов с пробиотическими свойствами. Это свидетельствует об увеличении интереса и спроса населения разных стран к пробиотикам и их действию на организм человека.

Эпидемиологические и статистические исследования, проведенные в Беларуси в течение последних лет, свидетельствуют о неуклонном росте числа заболеваний, связанных непосредственно или косвенно с проблемами питания. Заболевания желудочно-кишечного тракта занимают одно из первых мест по распространенности. Кишечный дисбактериоз наблюдается практически у всех людей (80–90%), имеющих заболевания пищеварительного тракта.

В терапии инфекционных заболеваний используют антибиотики и химиопрепараты, которые влияют на рост и жизнеспособность патогенных микроорганизмов, но их эффективность часто бывает недостаточной [2].

Для коррекции состава кишечной микрофлоры применяют пробиотики, которые, попадая в организм в определенных количествах, оказывают благотворный эффект на здоровье человека [1].

Поиск и изучение свойств различных культур показали, что лучшие результаты показывают штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, выделенные из организма человека. Такие штаммы обладают выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также в отношении других видов и даже родственных штаммов лактобацилл. Лактобациллы обладают устойчивостью к действию лизоцима, а некоторые штаммы *L. fermentum* даже продуцируют лизоцим, что в сочетании с лизоцимом слизистой оболочки кишечника способствует устойчивости последней к действию патогенной микрофлоры [3, 4]. Лактобациллы влияют на метаболизм, иммунитет, процессы регенерации, оказывают противоопухолевое действие, снижают содержание холестерина, осуществляют синтез аминокислот, ферментов, витаминов, восполняют дефицит белков животного происхождения, ускоряют процессы переваривания пищи, усвоения питательных веществ. А главное, обеспечивают колонизационную резистентность к патогенным микроорганизмам и способствуют поддержанию гомеостаза в организме человека и животных. Благодаря способности данных бактерий продуцировать витамины как побочные продукты клеточного метаболизма, происходит обогащение организма человека витаминами группы В, биотином, РР, фолиевой кислотой, викасолом, токоферолом, аскорбиновой кислотой и рядом других. Все это позволяет использовать лактобациллы для профилактики и лечения дисбиозов и инфекционных заболеваний, дизентерии, псевдомембранозного колита, язвенной болезни, связанной с наличием хеликобактерий, кампилобактериоза, анаэробного вагиноза, стоматита, энтеровирусных инфекций [1].

Наиболее изученными штаммами в настоящее время являются:

- *L. casei* ATCC 53103 (синонимы: *L. rhamnosus* GG и LGG<sup>®</sup>), выделен из кишечника здорового человека в 1983 и запатентован в 1985 году Шервудом Горбачом и Барри Голдиным. Данный штамм является устойчивым к воздействию кислоты желудочного сока и желчи и, поэтому, после перорального введения бактерии достигают толстой кишки живыми. Штамм эффективен при диареях, энтероколитах у детей и взрослых, обладает широким спектром антагонистической активности, стимулирует местный иммунитет [5].

- *L. rhamnosus* GR-1, выделенный из дистальных отделов уретры здоровых женщин канадскими учеными А.В. Bruce и G. Reid в 1980 году. Этот штамм обладает высокими адгезивными свойствами в отношении вагинальных эпителиоцитов. Штамм *L. rhamnosus* GR-1 обладает способностью продуцировать бактерициноподобные вещества и устойчив к спермицидам. Штамм сохраняет жизнеспособность после прохождения через желудочно-кишечный тракт и способен успешно колонизировать урогенитальную зону, вытесняя при этом патогенную микрофлору [6].

- *L. fermentum* 90-Ts-4, входящий в состав препарата «Лактобактерин». Он агглютинируется в присутствии конканавалина-А и обладает высокими адгезивными

свойствами к влагалищному эпителию. Штамм проявляет низкую антагонистическую активность по отношению к патогенным микроорганизмам. Учитывая особенности адгезии этого штамма, его используют для профилактики и лечения дисбиоза влагалища, в частности бактериального вагиноза [7].

- *L. fermentum* AD1, выделенный из фекалий собаки. При введении в организм животных он способствует увеличению количества лактобацилл, стимулирует фагоцитарную активность лейкоцитов у теплокровных животных и птицы. Этот штамм обладает высокой адгезивностью, которая максимально проявляется к клеткам кишечника животных [8].

С использованием бактерий *L. rhamnosus* было разработано лечебно-профилактическое средство «Бионорм», высокоэффективное при лечении дисбактериоза, дисфункциях кишечника, энтероколитах, кишечных инфекциях, гепатитов, цистита, аллергических поражений кожи и слизистых, воспалительных заболеваний органов дыхания, сахарного диабета, гнойно-воспалительных и других заболеваний [9].

При использовании композиции с содержанием *L. rhamnosus* происходит нормализация патологического липидного профиля людей, где указанный липидный профиль содержит лизофосфолипид и/или липид церамид/сфингомиелинового каскада [10]. Разработана молекулярная основа для терапевтического применения пробиотиков для опосредованных воспалением кишечных нарушений. Из *L. rhamnosus* GG (LGG) было выделено и очищено два новых белка р75 и р40, которые, как было продемонстрировано, активизируют гомеостаз кишечного эпителия через специфические сигнальные пути. Эти открытия позволяют предположить, что пробиотики могут быть применимы для цитокин-опосредованных желудочно-кишечных заболеваний, так как они ингибировали цитокин-индуцируемый апоптоз клеточного эпителия, и значительно снижали TNF-индуцированное повреждение эпителия толстой кишки [11].

С использованием бактерий *L. rhamnosus* показаны хорошие результаты при лечении диареи у детей и предупреждении детской аллергии. Данные микроорганизмы имеют уникальную способность – находясь в кишечнике они преобразовывают жирные кислоты в конъюгированную линолевую кислоту, благодаря которой жир превращается в энергию, что, в свою очередь, способствует снижению веса. При этом линолевая кислота микробного происхождения не имеет побочных эффектов и отрицательного влияния на печень и кишечник [12].

Бактерии *L. fermentum* способны синтезировать антибактериальные соединения (показана их высокая антагонистическая активность в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов), перекиси и молочную кислоту, способствуют выработке лизоцима, а также моделируют образование противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и снижают уровень медиаторов воспаления ИЛ-2, -5, -6, а также фактора некроза опухолей ФНО- $\alpha$  [13]. Эффективность использования адаптированных молочных смесей с включением лактобактерий (*L. fermentum*) для вскармливания детей первого года жизни была подтверждена в контролируемых клинических испытаниях [13].

С использованием бактерий *L. rhamnosus* в Российской Федерации производят пробиотические напитки «Иммунеле» и «Активия», а компания Нестле производит сухие адаптированные молочные смеси с пробиотиками NAN<sup>®</sup> 2, NAN<sup>®</sup> 3 для питания детей различного возраста. В США производят кисломолочные и соевые напитки Lifeway Kefir. Штамм LGG (ATCC 53103) используется для изготовления йогуртов, фруктовых творожков и кисломолочных кефирных продуктов Био Баланс (Россия), йогуртов и кисломолочных продуктов GEFILUS (Финляндия), спредов (мягкого масла, маргарина) Lätta (Германия, Швеция), йогуртов Aktifit (Швейцария), молока Avonmore Milk Plus и кисломолочного напитка Everybody (Ирландия).

Штаммы LGG и Lc705 — для кисломолочных продуктов Gefilus Max (Финляндия)

С использованием указанных микроорганизмов производят биопродукт «BioMatrix» (Россия), микробиологический состав которого максимально приближен к физиологической норме здорового человека, а также детское питание, в частности сухие молочные смеси HiPP «Combiotic 1, 2, 3» ® (Германия).

Помимо изготовления пробиотических ферментированных и сухих молочных продуктов бактерии *L. rhamnosus* и *L. fermentum* используются и в других отраслях перерабатывающей промышленности.

Так, компании Chr. Hansen (Дания), CSK (Нидерланды), Danisco (США), BioChem (Италия) и др. изготавливают закваски на основе бактерий *L. rhamnosus* и *L. fermentum* как для использования в качестве дополнительных культур, предназначенных для обогащения продуктов пробиотической микрофлорой, так и для регулирования микробиологических процессов при изготовлении продукции на предприятиях АПК.

Компанией BioChem s.r.l. (Италия) производятся бактериальные закваски содержащие бактерии *L. rhamnosus* и *L. fermentum*. Бактерии *L. fermentum* используются в качестве дополнительной культуры при производстве ферментативных сыров, которые прессуются из пласта с большими глазками и выраженным ароматом (типа Эдам). Использование бактериальной закваски, содержащей *L. fermentum*, совместно с базовой бактериальной закваской при производстве сыров голландской группы придает сыру хороший сырный вкус и улучшает рисунок. Использование бактериальной закваски на основе бактерий *L. rhamnosus* совместно с кислотообразующей основой способствует элиминации кормового привкуса и запаха, а также препятствует развитию патогенной микрофлоры, увеличивает срок годности и вкус конечного продукта.

Еще одним направлением использования бактерий *L. rhamnosus* и *L. fermentum* является их применение в промышленном хлебопечении для предотвращения пороков хлеба и сохранения высоких органолептических свойств (вкуса, цвета, аромата) хлеба, улучшения физико-химических показателей качества хлебобулочных изделий (пористости, удельного объема), а также предотвращения развития картофельной болезни в хлебобулочных изделиях из пшеничной муки также используют культуры *L. rhamnosus* и *L. fermentum* [14]. В Республике Беларусь в целях предупреждения и борьбы с картофельной болезнью пшеничного и ржано-пшеничного хлеба используют комплексные молочнокислые закваски, содержащие в своем составе *L. fermentum*. Подкисление среды молочной кислотой, выделяемой указанными микроорганизмами при развитии в процессе брожения, способствует повышению ферментативной активности дрожжей, ускоряет созревание теста перед разделкой, не допуская развития в нем посторонней микрофлоры. Продукция молочной кислоты микроорганизмами при изготовлении хлебобулочных изделий способствует повышенной стойкости их к черствению.

Еще одним направлением использования данных культур является их применение при изготовлении силоса высокого качества. Культуры *L. rhamnosus* и *L. fermentum* должны подавлять рост нежелательной микрофлоры, быть способными за счет синтеза молочной кислоты быстро понижать уровень pH и выдерживать воздействие повышенных температур. Использование *L. rhamnosus* в качестве компонента биологического консерванта позволяет уменьшить степень деградации белка в силосуемом сырье. Компания Schaumann (Германия) производит биоконсерванты BonSilage и BonSilage-PLUS, содержащие бактерии *L. rhamnosus*, которые применяют для быстрого подкисления силосуемого сырья молочной кислотой, контролируемого образования уксусной кислоты, эффективного вытеснения нежелательной микрофлоры. Исследования, проведенные специалистами компании, показали, что при кормлении крупного рогатого скота силосами,

полученными с использованием биологических консервантов содержащими *L. rhamnosus*, в получаемом молоке увеличивается количество молочного жира и молочного белка.

В качестве компонента для силосования используются и бактерии *L. fermentum*. В частности показана возможность применения данного вида лактобацилл при силосовании сырья с содержанием сухих веществ 29–46% [15].

Штаммы *L. rhamnosus* и *L. fermentum* могут использоваться при производстве широкого круга продуктов и должны, соответственно, удовлетворять определенным требованиям, для получения качественной и безопасной продукции. При использовании указанных бактерий в качестве пробиотиков человека и животных, а также в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, в частности при пероральном их введении, они должны выжить во время прохождения через желудочно-кишечный тракт (выдерживать низкое рН желудка, кислоты пищеварительной системы и т.д.), чтобы оказать свое пробиотическое действие [16]. При использовании их при изготовлении ферментированных пищевых продуктов, а также при силосовании, лактобациллы должны обладать антагонистическим действием на патогенов, нежелательных в том или ином технологическом процессе. При использовании лактобацилл для силосования растительного сырья, они должны быть устойчивыми к воздействию повышенных температур, так как в процессе силосования наблюдается разогрев силосуемой массы.

**Объекты и методы исследований.** В работе использовали штаммы из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий: 6 штаммов *Lactobacillus rhamnosus* (2637 TL-O, 2641 TL-O, 2642 TL-O, 2643 TL-O, 1190 ML-AF, 2593 ML-AF); 2 штамма *Lactobacillus fermentum* (2650 TL-O, 2652 TL-O); штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*; типовые штаммы кишечной палочки (*E. coli* W1495, *E. coli* 1019, *E. coli* J5-3); маслянокислые бактерии.

Культивирование микроорганизмов осуществляли в MRS-среде [17], содержащей 0,15% агара, или среде BOM-10 [18]. Инкубировали в термостате при  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . MRS-среду, содержащую NaCl, готовили согласно [18].

Для получения ( $16\pm 2$ ) часовых культур бактерий на среде MRS в 15 мл среды MRS вносили 0,1 мл культуры, выращенной на среде MRS. Инкубировали в термостате в течение ( $16\pm 2$ ) ч.

Для получения ( $16\pm 2$ ) часовых культур бактерий на среде BOM-10 в 10 мл стерильного восстановленного молока вносили 0,5 мл выращенной на среде MRS культуры. Инкубировали в термостате в течение ( $16\pm 2$ ) ч.

Измерение рН проводили по [19].

При определении способности бактерий расти в среде с различным содержанием NaCl по 50 мкл бактериальной суспензии клеток ( $16\pm 2$ ) часовой культуры вносили в 15 мл среды MRS, содержащей NaCl в концентрации – от 0,5% до 11% с шагом в 0,5%. Инкубировали в термостате в течение 48–72 ч. О толерантности бактерий к поваренной соли судили по наличию или отсутствию помутнения среды.

При определении способности бактерий расти при различном рН среды по 50 мкл бактериальной суспензии клеток ( $16\pm 2$ ) часовой культуры вносили в 15 мл среды MRS с определенной активной кислотностью (4,0 ед. рН или 4,4 ед. рН или 4,9 ед. рН или 5,1 ед. рН или 5,4 ед. рН или 7,0 ед. рН или 8,0). Инкубировали в термостате в течение 48–72 ч. О толерантности бактерий в отношении активной кислотности судили по наличию (отсутствию) помутнения среды.

Для изучения влияния температуры на рост и сквашивающую способность лактобацилл по 50 мкл бактериальной суспензии клеток ( $16\pm 2$ ) часовой культуры вносили в 15 мл среды MRS или в 10 мл BOM-10. Культивирование проводили при следующих температурных режимах:  $8^\circ\text{C}$ ,  $11^\circ\text{C}$ ,  $15^\circ\text{C}$ ,  $22^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $42^\circ\text{C}$ ,  $52^\circ\text{C}$ ,

58°C в течение 48–72 ч. О способности культур расти в среде или молоке при исследуемой температуре судили по помутнению среды MRS или образованию молочного сгустка в среде BOM-10.

Для определения антагонистической активности бактерий использовали метод отсроченного антагонизма [18].

Оптическую плотность суспензии бактерий определяли в пластиковых кюветах толщиной 1 см при длине волны 540 нм на спектрофотометре SOLAR.

Для определения оптимальной среды культивирования использовали промышленные среды: *среду №1* (согласно ТИ ВУ 100377914.563), *среду №2* (согласно ТИ ВУ 100377914.576), *среду №3* (согласно ТИ ВУ 10098867.233), *среду №3а* (готовили аналогично среде №3, за исключением добавления солодового экстракта), *среду №4* (готовили аналогично среде №3, за исключением добавления солодового экстракта и увеличением концентрации дрожжевого экстракта с 0,3% до 0,5%), *среду №7* (согласно ТИ ВУ 100098867.370), *среду №8* (согласно ТИ ВУ 100098867.368), *среду №9* (гидролизованное молоко готовили согласно ТИ ВУ 100377914.563), *среду №10* (готовили аналогично среде №9, за исключением того, что в готовый гидролизат перед стерилизацией добавили глюкозу в концентрации 3%).

Для определения скорости роста бактерий на различных питательных средах в качестве инокулята использовали 1 мл (1%)  $16 \pm 2$  ч бактериальной культуры лактобацилл, выращенной на среде MRS, которую вносили в 100 мл исследуемой среды, инкубировали в термостате при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течении 28 ч, периодически перемешивая суспензию бактериальных клеток. Через каждые 4 часа отбирали пробы объемом 5 мл и регистрировали изменение оптической плотности и pH.

Для определения дозы внесения посевного материала использовали  $16 \pm 2$  ч бактериальную культуру лактобацилл, выращенную в среде для ее культивирования, которая приготовлена в ферментере и отобрана в необходимом количестве. 1%, 3% или 5% выросшей бактериальной суспензии вносили в 7 л среды, инкубировали при непрерывной нейтрализации раствором NaOH. Через каждый час отбирали пробы по 5 мл и определяли изменение оптической плотности и расход нейтрализующего агента. Через каждые 3 часа делали высевы для определения количества бактериальных клеток.

**Результаты и их обсуждение.** Поскольку в большинстве случаев лактобациллы вводятся в организм человека в составе пищевых продуктов, в частности ферментированных молочных, интерес представляет сквашивающая активность исследуемых штаммов. Установлено, что все исследуемые культуры ферментировали цельное молоко в течении  $22 \pm 2$  ч, т.е. являлись слабыми кислотообразователями.

Определено влияние штаммов *L. rhamnosus* при совместной ферментации молока с активно-сквашивающей основой, состоящей из трех штаммов *Lactococcus lactis subsp. lactis*, на органолептические показатели ферментированного молока. Установлено, что все образцы, содержащие бактерии *L. rhamnosus*, сквашивали молоко через 5,5 ч и не ухудшали органолептических показателей ферментированного молока, т.е. бактерии *L. rhamnosus* не оказывали значительного влияния на сквашивающую способность штаммов лактококков, что делает их возможным использовать в комплексных бактериальных заквасках совместно с бактериями рода *Lactococcus*.

Изучена солеустойчивость лактобацилл на MRS-среде, содержащей NaCl в концентрации – от 5% до 11% (шаг 0,5%). Высокая устойчивость исследуемых микроорганизмов к поваренной соли дает возможным использовать их для изготовления заквасок, с использованием которых будет ферментировано сырье, содержащее соли в достаточно высокой концентрации (например, некоторые виды

сыров), а также при высоком осмотическом давлении со стороны окружающей среды (например, при силосовании). Установлена максимальная концентрация NaCl в среде MRS, при которой возможен рост исследуемых штаммов. Штаммы *L. fermentum* росли при содержании NaCl в MRS-среде до 6%. Высоким уровнем солеустойчивости обладали штаммы *L. rhamnosus*: 2593 ML-AF (рос при содержании соли в MRS-среде 8%), 1190 ML-AF и 2641 TL-O – при 8,5% NaCl, а культуры 2637 TL-O 2642 TL-O 2643 TL-O активно развивались при добавлении в среду 10% поваренной соли.

При исследовании лактобацилл на способность к росту в средах с различными значениями активной кислотности (4,0; 4,4; 4,9; 5,1; 5,4; 7,0 и 8,0) установлено, что все исследуемые штаммы способны расти и развиваться в средах с широким диапазоном значений активной кислотности от 8,0 до 4,0 единиц pH, за исключением штамма *L. fermentum* 2652 TL-O, для которого не наблюдали рост при снижении активной кислотности среды до 4,0 ед. pH.

При исследовании влияния температуры на рост и сквашивающую способность лактобацилл установлено, что все исследуемые штаммы способны расти и развиваться в диапазоне температур от +15°C до +42°C. При 8°C и 11°C рост клеток наблюдали только у бактерий *L. rhamnosus*. При 52°C отсутствовал рост у штаммов 1190 ML-AF и 2593 ML-AF. При 58°C отсутствовал рост всех исследуемых культур.

Важнейшей характеристикой пробиотических микроорганизмов является их антимикробная активность по отношению к различным патогенам. Антагонистические свойства молочнокислых бактерий обусловлены продукцией органических кислот (молочной, уксусной), пероксида водорода и образованием субстанций, схожих с антибиотиками. По мнению ряда исследователей, именно образование указанных органических кислот из углеводов приводит к снижению pH среды и предотвращает развитие других микроорганизмов [20].

Одним из наиболее распространенных возбудителей заболеваний ЖКТ человека и порчи молочных продуктов являются бактерии *Escherichia coli*, поэтому в первую очередь рассматривали антагонистические свойства исследуемых штаммов лактобацилл в отношении этих патогенов (таблица 1).

Таблица 1 – Антагонистическая активность лактобацилл

Штамм	Размер зоны задержки роста тест-культуры, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	маслянокислые бактерии
<i>L. rhamnosus</i> 2637 TL-O	27±2	8
<i>L. rhamnosus</i> 2641 TL-O	27±3	12
<i>L. rhamnosus</i> 2642 TL-O	27±3	11
<i>L. rhamnosus</i> 2643 TL-O	27±3	7
<i>L. rhamnosus</i> 1190 ML-AF	24±1	13
<i>L. rhamnosus</i> 2593 ML-AF	26±3	13
<i>L. fermentum</i> 2650 TL-O	20±4	0
<i>L. fermentum</i> 2652 TL-O	22±5	0

Источник: собственная разработка

Из таблицы 1 видно, что все исследованные штаммы проявляют высокую антагонистическую активность в отношении бактерий *E. coli*, формируя зону задержки роста кишечной палочки размером, превышающим 20 мм. Высокую антагонистическую активность в отношении кишечной палочки проявляли все шесть

исследованных штаммов *L. rhamnosus* (24–27 мм). Немного слабее подавляли рост кишечной палочки бактерии *L. fermentum* (20–22 мм).

При изучении антагонистической активности лактобацилл в отношении возбудителей маслянокислого брожения методом отсроченного антагонизма показано, что исследуемые штаммы *L. rhamnosus* подавляли рост возбудителей маслянокислого брожения с формированием зоны задержки роста от 7 до 13 мм, а культуры *L. fermentum* не обладали выраженным антагонизмом в отношении *Clostridium tyrobutyricum* (таблица 1).

Для определения наиболее оптимальной среды, для культивирования бактерий *L. rhamnosus* изучен характер роста шести штаммов на трех промышленных средах, в качестве контроля использовали среду MRS. О росте микроорганизмов судили по изменению оптической плотности культуры и pH среду культивирования.

Как видно из рисунка 1, при культивировании штамма *L. rhamnosus* 2593 ML-AF на трех промышленных средах наиболее близкий к контролю (на среде MRS), рост микроорганизмов наблюдали при его выращивании на промышленной среде №3.

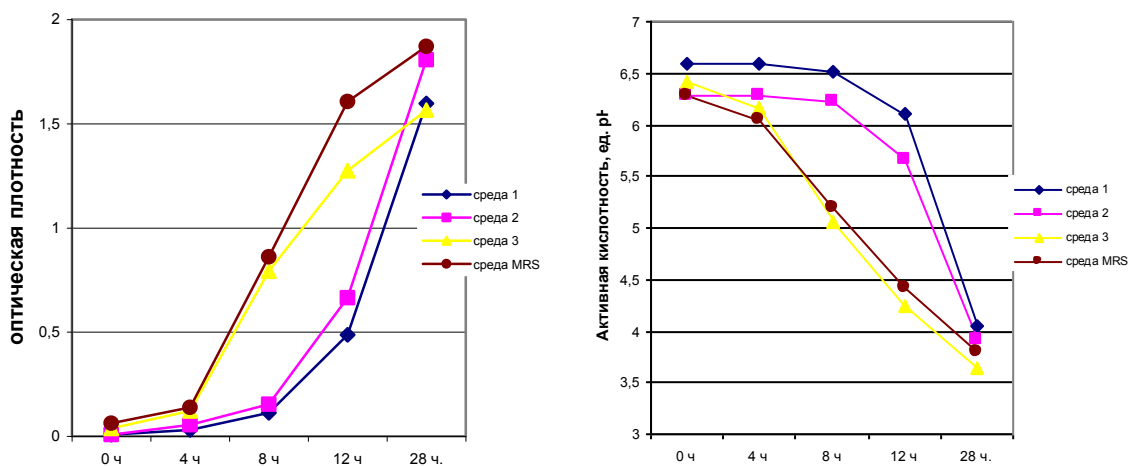


Рисунок 1 – Характеристика роста штамма *L. rhamnosus* 2593 ML-AF на промышленных средах  
Источник: собственная разработка

Аналогичная картина зарегистрирована и для остальных пяти исследуемых культур *L. rhamnosus*.

Таким образом, для дальнейших исследований отобрана среда №3, на которой при культивировании штаммов в течении 12 ч оптическая плотность культур и снижение активной кислотности среды были максимальными.

Для оптимизации состава среды проведено исследование влияния компонентов питательной среды – дрожжевого и солодового экстракта на рост и развития штаммов *L. rhamnosus*. Рост бактериальных культур исследовали на промышленной среде №3 (контроль), на аналогичной среде, но без добавления солодового экстракта (среда 3а), а также на среде без солодового экстракта, но с увеличением количества дрожжевого экстракта с 0,3% до 0,5% (среда 4) (рисунок 2).



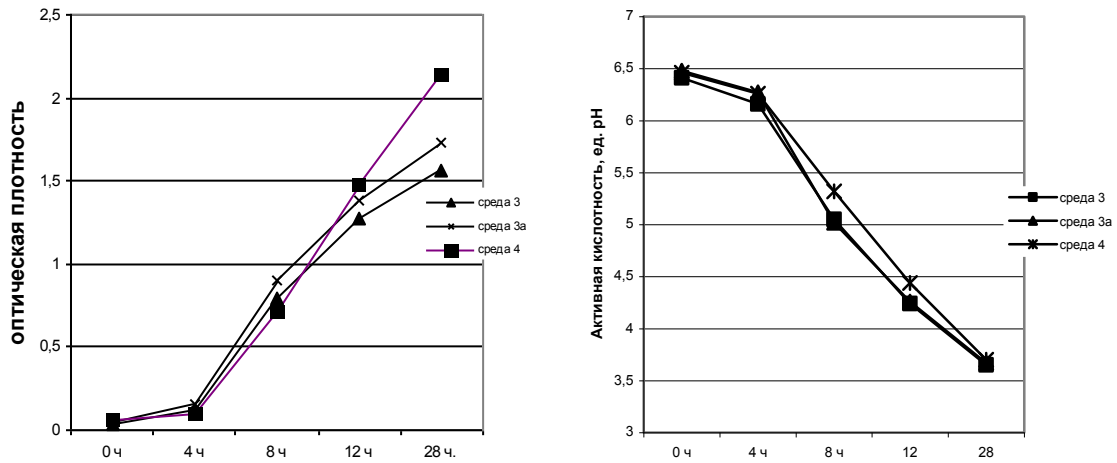


Рисунок 2 – Оптимизация среды для культивирования штамма *L. rhamnosus* 2593 ML-AF  
Источник: собственная разработка

Как видно из рисунка 2, наиболее активный рост и развитие штамма *L. rhamnosus* 2593 ML-AF происходило на среде, изготовленной на основе промышленной среды №3, но без солодового экстракта и увеличенным количеством дрожжевого экстракта (среда №4). Аналогичная картина зарегистрирована и для остальных пяти исследуемых культур *L. rhamnosus*.

Таким образом, определен состав питательной среды для культивирования *L. rhamnosus* в промышленных условиях.

Для определения наиболее оптимальной среды, для культивирования бактерий *L. fermentum* исследован рост двух штаммов на восьми промышленных питательных средах (в качестве контрольной среды использовали MRS). Скорость роста определяли по нарастанию оптической плотности бактерий и уменьшению активной кислотности в среде культивирования.

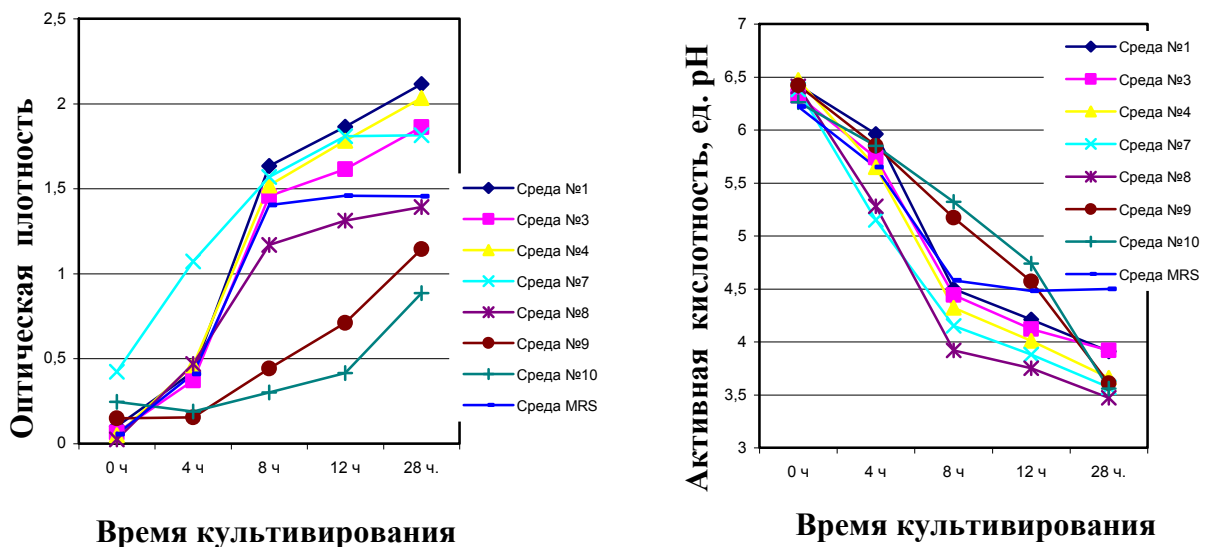


Рисунок 3 – Характеристика роста штамма *L. fermentum* 2650 TL-O на промышленных средах  
Источник: собственная разработка

Как видно из рисунка 3 наиболее оптимальными питательными средами для

культивирования штамма *L. fermentum* 2650 TL-О являются среды № 1 и №4: именно на них регистрировали наибольшую оптическую плотность за одинаковый промежуток времени. Аналогичная картина показана и для штамма *L. fermentum* 2652 TL-О. Поскольку рост штаммов на обеих средах практически идентичен, то для культивирования в промышленных условиях культур *L. fermentum* выбрана среда, содержащая в своем составе меньшее количество дорогостоящих компонентов (среда №4).

Одним из важных факторов, позволяющих осуществлять выращивание культур в промышленных условиях, является определение дозы вносимого посевного материала.

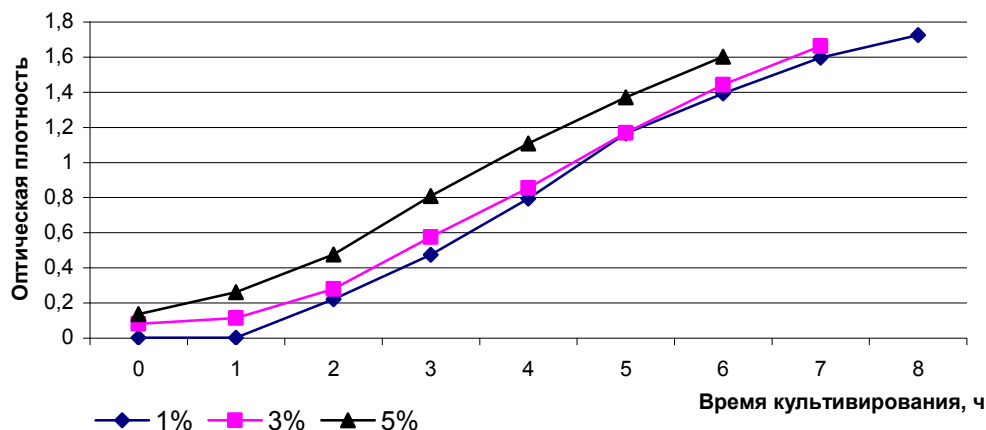


Рисунок 4 – Изменение оптической плотности культуральной жидкости при культивировании *L. rhamnosus* 2641 TL-О  
Источник: собственная разработка

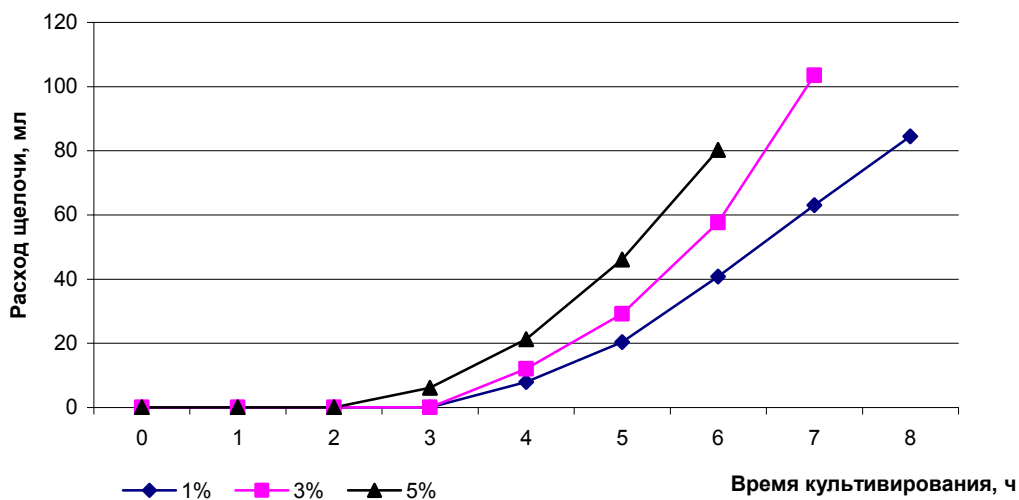


Рисунок 5 – Расход раствора NaOH на нейтрализацию культуральной жидкости при культивировании *L. rhamnosus* 2641 TL-О  
Источник: собственная разработка

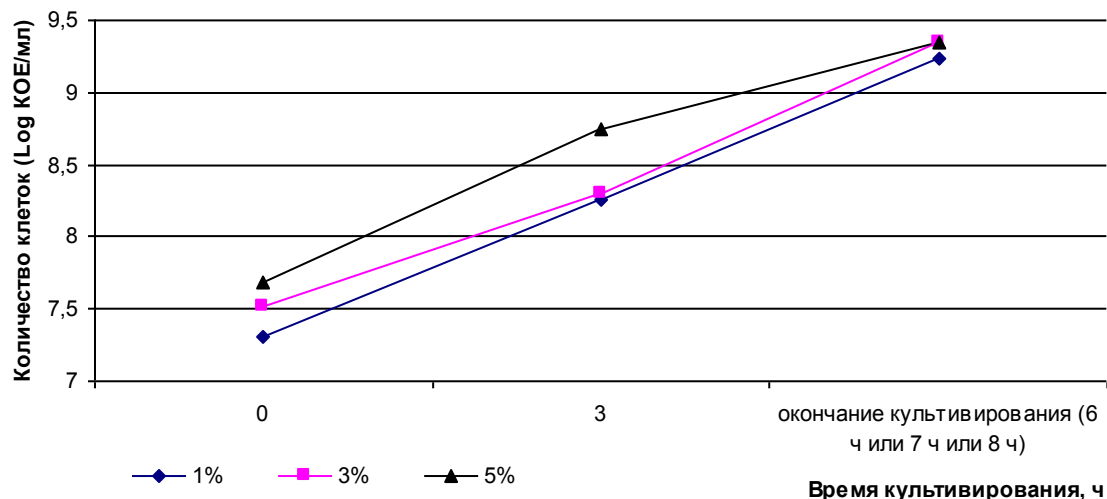


Рисунок 6 – Изменение количества клеток *L. rhamnosus* 2641 TL-O в процессе культивирования  
Источник: собственная разработка

Наращивание биомассы микроорганизмов проводили на лабораторном ферментёре BIOTRON LiFlus (Корея), использовали среду №4. Развитие культур контролировали по расходу нейтрализующего средства и нарастанию оптической плотности культуральной жидкости. Посевной материал вносили в исследуемом количестве (1%, 3% и 5% от объема питательной среды, соответственно, при проведении первой, второй и третьей экспериментальных выработок каждой культуры). Активную кислотность поддерживали путем непрерывной нейтрализации культуральной жидкости раствором гидроксида натрия (рисунки 4–9).

Как видно из рисунков 4–5, увеличение дозы инокуляции посевного материала с 1% до 3% сокращает время культивирования с 8 ч до 7 ч, а внесение 5% инокулята позволяет уменьшить время накопления биомассы до 6 ч, при этом в конце культивирования количество бактериальных клеток составило  $1,7 \times 10^9$ ,  $2,2 \times 10^9$ ,  $2,2 \times 10^9$  КОЕ/мл, соответственно, при инокуляции 1%, 3% или 5%.

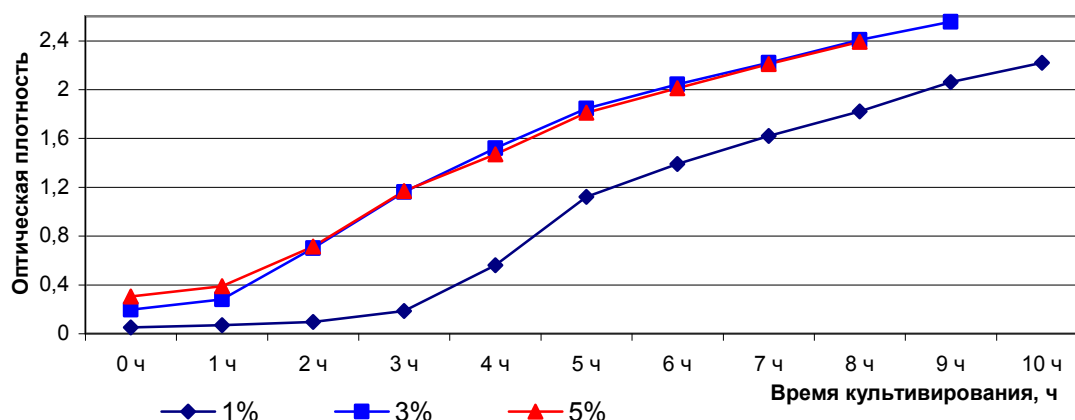


Рисунок 7 – Изменение оптической плотности культуральной жидкости при культивировании *L. fermentum* 2650 TL-O  
Источник: собственная разработка

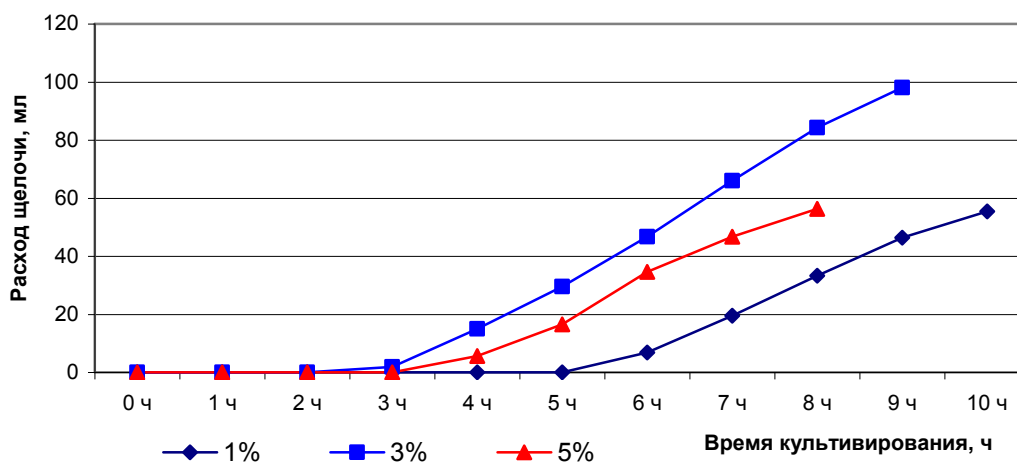


Рисунок 8 – Расход раствора NaOH на нейтрализацию культуральной жидкости при культивировании *L. fermentum* 2650 TL-O  
Источник: собственная разработка

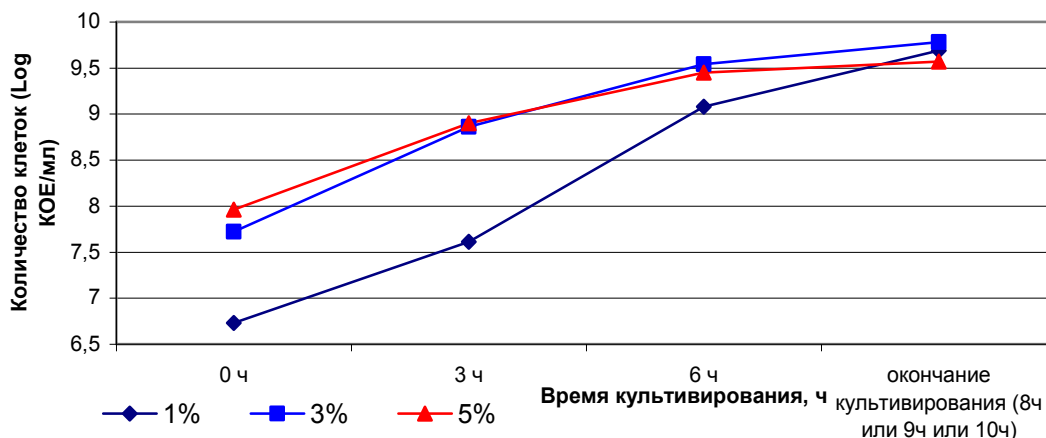


Рисунок 9 – Изменение количества клеток *L. fermentum* 2650 TL-O в процессе культивирования  
Источник: собственная разработка

Как видно из рисунков 7–9, увеличение дозы инокуляции посевного материала с 1% до 3% сокращает время культивирования с 10 ч до 9 ч, а внесение 5% инокулята позволяет уменьшить время накопления биомассы до 8 ч, при этом в конце культивирования количество бактериальных клеток составило  $4,95 \times 10^9$ ,  $5,98 \times 10^9$ ,  $3,7 \times 10^9$  КОЕ/мл, соответственно, при инокуляции 1%, 3% или 5%.

Таким образом, увеличение количества посевного материала приводит к сокращению времени культивирования бактерий *L. rhamnosus* и *L. fermentum*.

**Заключение.** Изучены промышленно-ценные свойства культур *L. rhamnosus* и *L. fermentum*. Установлено, что все исследуемые штаммы являются слабыми кислотообразователями. При изучении совместной ферментации молока бактериями *L. rhamnosus* совместно с лактококками, установлено, что исследуемые лактобациллы не оказывали значительного влияния на сквашивающую активность штаммов лактококков, что делает их возможным использовать в комплексных заквасках совместно с бактериями рода *Lactococcus*.

Определена устойчивость лактобацилл к NaCl при выращивании на среде MRS. Штаммы *L. fermentum* устойчивы к содержанию NaCl в среде MRS в

концентрации 6%, а штаммы *L. rhamnosus* в зависимости от вида способны расти в средах с содержанием соли от 8 до 10%.

При исследовании влияния pH среды на развитие лактобацилл при выращивании на среде MRS установлено, что все исследуемые бактерии развивались при активной кислотности среды от 4,0 до 8,0 единиц pH, за исключением штамма *L. fermentum* 2652 TL-O, для которого пороговая величина составила 4,4 единицы pH.

При изучении влияния температуры на развитие лактобацилл установлено, что в среде MRS все исследуемые штаммы способны расти в диапазоне температур от +15°C до +42°C. При 8°C и 11°C рост клеток наблюдали только у бактерий *L. rhamnosus*. При 52°C отсутствовал рост у штаммов *L. rhamnosus* 1190 ML-AF и 2593 ML-AF. При 58°C все исследуемые культуры не развивались.

При изучении антагонистической активности лактобацилл в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов установлено, все исследованные штаммы проявляют высокую антагонистическую активность в отношении бактерий *E. coli* – от 20±4 мм до 27±3 мм. Штаммы *L. rhamnosus* подавляли рост возбудителей маслянокислого брожения с формированием зоны задержки роста от 7 до 13 мм.

Разработаны среды для промышленного культивирования бактерий *L. rhamnosus* и *L. fermentum*.

Изучена зависимость времени культивирования от количества внесенного посевного материала. Установлено, что увеличение количества посевного материала приводит к сокращению времени культивирования бактерий *L. rhamnosus* и *L. fermentum*.

#### Список использованных источников

1. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание / Б.А. Шендеров // М.: Изд. Грантъ. 2001. 288 с.

Shenderov, B.A. Medicinskaja mikrobnaja jekologija i funkcional'noe pitanie. T. 3: Probiotiki i funkcional'noe pitanie [Medical microbial ecology and functional nutrition. Volume 3: Probiotics and functional nutrition] / B.A. Shenderov // М.: Izd. Grant. 2001. 288 s.

2. Яковлев, В.П. Рациональная антимикробная терапия. Том II. / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев // М: «Литера». 2003. 1008 с.

Jakovlev, V.P. Racional'naja antimikrobnaja terapija [Rational antimicrobial therapy]. Tom II. / V.P. Jakovlev, S.V. Jakovlev // М: «Litera». 2003. 1008 s.

3. Reid, G. Urogenital infections in women: can probiotics help? / G. Reid, A.W. Bruce // Postgrad. Med J. – 2003. – Vol.79, N 934. – P.428–32.

4. Ленцнер, А.А. Лактофлора и колонизационная резистентность / А.А. Ленцнер, Х.П. Ленцнер, М.Э. Микельсаар и др. // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, N 3. – С. 173–179.

Lencner, A.A. Laktoflora i kolonizacionnaja rezistentnost' [Lactoflora and colonization resistance] / A.A. Lencner, H.P. Lencner, M.Je. Mikel'saar i dr. // Antibiotiki i medicinskaja biotehnologija. – 1987. – Т. 32, N 3. – С. 173–179.

5. Gorbach, S.L. Lactobacillus strains and methods of selection / S.L. Gorbach, B.R. Goldin // Патент US 4839281 – 1989.

6. Hudault, S. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by Lactobacillus casei (strain GG) against Salmonella typhimurium C5 infection / S. Hudault, V. Liévin, M.F. Bernet-Camard, A.L. Servin // Appl. Environmental. Microbiol. – 1997. – Vol.63. – P.513–518

7. Рожкова, И.Ю. Предпосылки к использованию лактобактерина на основе штамма *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4 в гинекологической практике // И.Ю.

- Рожкова, Э.Г. Кравцов // Бюлл. exper. биол. и медицины. – 1999. – N 2. – С.234–236.
- Rozhkova, I.Ju. Predposylki k ispol'zovaniju laktobakterina na osnove shtamma *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4 v ginekologicheskoj praktike [Preconditions to using of lactobacterin that based on the strain *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4 in gynecology] // I.Ju. Rozhkova, Je.G. Kravcov // Bjull. jeksper. biol. i mediciny. – 1999. – N 2. – S.234–236.
8. Ленцнер, А.А. О способности лактобацилл микрофлоры человека продуцировать лизоцим / А.А. Ленцнер, Х.П. Ленцнер, М.А. Тоом // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1975. – № 8. – С. 77–81.
- Lencner, A.A. O sposobnosti laktobacill mikroflory cheloveka producirivat lizocim [About the ability of human microflora lactobacilli to produce lysozyme] / A.A. Lencner, H.P. Lencner, M.A. Toom // Zhurn. mikrobiol., jepidemiol. i immunobiol. – 1975. – № 8. – S. 77–81.
9. Stropfova, V. New probiotic strain *Lactobacillus fermentum* AD1 and its effect in Japanese quail / V. Stropfova, M. Marcinakova, S. Gancarcikova et al. // Vet. Med. Czech. – 2005. – Vol.50, N 9. – P. 415–420.
10. Каяндер, К. Новое применение пробиотиков / К. Каяндер, Р. Корпела // RU патент № 2497536. – 2012.
- Kajander, K. Novoe primenenie probiotikov [A new application of probiotics] / K. Kajander, R. Korpela // RU patent № 2497536. – 2012.
11. Yan, F. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth / F. Yan, H. Cao, T.L. Cover, R. Whitehead, M.K. Washington, D.B. Polk // Gastroenterol. – 2007. – Vol. 132, N 2. – P. 562–575.
12. Health benefits of taking probiotics. We take vitamins and minerals to safeguard our health. Should we also add a daily dose of bacteria? // Harvard Women's Health Watch. – 2005. – Vol. 12, N 9. – P. 6–7.
13. Maldonado, J. The human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* СЕСТ 5716 reduces the incidence of gastrointestinal and respiratory infections in infants. A randomised controlled trial comparing a GOS containing follow-on formula vs the same formula containing probiotic / J. Maldonado, F. Canabate, L. Sempere et al. // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. – 2012. – Vol. 54, N 1. – P. 55–61.
14. Калиева Н.М. Опыт работы ХБК "Аксай" - ведущего хлебопекарного предприятия Казахстана / Н.М. Калиева // Современные технологии и оборудование для хлебопекарного производства. – Минск, 2007. – С. 35–39.
- Kalieveva N.M. Opyt raboty HBK "Aksaj" – vedushhego hlebopekarnogo predpriyatija Kazahstana [Experience of KBC "Aksai" that is the leading bakery company in Kazakhstan] / N.M. Kalieveva // Sovremennye tehnologii i oborudovanie dlja hlebopekarnogo proizvodstva. – Minsk, 2007. – S. 35–39.
15. Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Lactobacillus fermentum* (NCIMB 30169) as a silage additive for all species / EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) / European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy // EFSA Journal. – 2014. – Vol. 12, №1. – 10 p.
16. Collins, J.K. Selection of probiotics trains for human applications / J.K. Collins, G. Thornton, G. O'Sullivan // Int. Dairy J. – 1998. – Vol. 8, – P. 487–490.
17. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.
18. Акбулатова, М.М. Солеустойчивость лактобацилл – основа использования штаммов в бактериальных концентратах для производства сыров / М.М. Акбулатова, С.Л. Василенко, Н.Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. Вып. 5. РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелешеня [и др.] – Минск, РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 2011. – С. 108–119.

Akbulatova, M.M. Soleustojchivost' laktobacill – osnova ispol'zovanija shtammov v bakterial'nyh koncentratih dlja proizvodstva syrov [Salt tolerance of lactobacilli is the base for strains using in bacterial starter cultures for cheese production] / M.M. Akbulatova, S.L. Vasylenko, N.N. Furik // Aktual'nye voprosy pererabotki mjasnogo i molochnogo syr'ja. Vyp. 5. RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti»; redkol.: A.V. Meleshchenja [i dr.] – Minsk, RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti», 2011. – S. 108–119.

19. Молоко. Метод измерения рН: ГОСТ 26781-85; введ. 20.12.85 № 4473. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2004.

Moloko. Metod izmerenija pH [Milk. Method of pH measuring]: GOST 26781-85; vved. 20.12.85 № 4473. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2004.

20. Тюрин, М.В. К механизму антагонистической активности лактобацилл / М.В. Тюрин, Б.А. Шендеров, Н.Г. Рахимова и др // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1989, № 2. – С. 3–8.

Tjurin, M.V. K mehanizmu antagonistscheskoj aktivnosti laktobacill [About the mechanism of Lactobacillus antagonistic activity] / M.V. Tjurin, B.A. Shenderov, N.G. Rahimova i dr // Zhurn. mikro-biol., jepidemiol. i immunobiol. – 1989, № 2. – S. 3–8.

*I. Kirik, A. Kazak, S. Vasylenko, N. Furik  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

## **STUDIES OF THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLUS RHAMNOSUS AND LACTOBACILLUS FERMENTUM BACTERIA TO ENSURE THEIR INDUSTRIAL CULTIVATION**

### **Summary**

*Physiological, biochemical and industrially-valuable properties of the collection strains of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus fermentum are investigated. The media for the industrial cultivation of bacteria is developed. The effect of inoculation dose of the seed material on the time of L. rhamnosus and L. fermentum bacteria cultivation was determined.*

**Keywords:** nutrition media, cultivation, optical density.