

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ СИНБИОТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА БИФИДОБАКТЕРИЙ

Е.П. Каменская, М.В. Обрезкова, Е.Е. Базеева

*Одним из приоритетных направлений пищевых технологий является создание продуктов, обладающих лечебно-профилактическим и функциональным действием, в частности кисломолочных симбиотических продуктов, сочетающих в себе сложные компоненты направленного действия – пробиотики и пребиотики. Цель работы – исследование взаимодействия штаммов различных видов бифидобактерий для получения на их основе консорциума с новыми биотехнологическими свойствами и создание синбиотического кисломолочного продукта с высоким титром бифидобактерий. Объектами исследований были выбраны штаммы *Bifidobacterium bifidum* 791, *Bifidobacterium longum* 379 М, *Bifidobacterium adolescentis* МС-42. При оценке качества в работе применяли общепринятые методы исследований. Установлено, что оптимальным соотношением штаммов *B. bifidum* 791, *B. longum* 379 М, *B. adolescentis* МС-42 в составе комбинированной закваски является 1:1:2. Диско-диффузионным методом проведен анализ устойчивости консорциума к 23 антибиотикам разных поколений и спектров действий. Наибольшая устойчивость отмечена к бета-лактамам антибиотикам, бактерицидная активность которых обусловлена ингибированием синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Также изучено влияние различных концентраций пребиотиков полисахаридной природы (пектина и инулина) на изменение количества жизнеспособных клеток бифидобактерий. Показано, что синбиотический кисломолочный продукт на основе подобранного консорциума бифидобактерий с внесением 2,5 % пектина может быть рекомендован для профилактики и коррекции нарушений дисбаланса кишечной микрофлоры, а также поддержания неспецифической резистентности организма.*

*Ключевые слова: бифидобактерии, штаммы, антибиотики, консорциум, пробиотики, пребиотики, пектин, инулин, синбиотический кисломолочный продукт, резистентность.*

В настоящее время одним из приоритетных направлений в развитии пищевых технологий является создание продуктов функционального назначения, способных оказывать определенное регулирующее воздействие как на организм в целом, так и на его определенные системы и органы. При этом все большую актуальность приобретают работы, связанные с производством синбиотических кисломолочных биопродуктов, сочетающих в себе сложные компоненты направленного действия – пробиотики и пребиотики. Применение синбиотиков является наиболее эффективным путем нормализации микрофлоры кишечника человека, поскольку позволяет не только дополнительно вводить пробиотические микроорганизмы, а также избирательно стимулировать рост и активизировать метаболизм индигенной микрофлоры, в частности лакто- и бифидобактерий [1, 2].

К наиболее многочисленной группе представителей нормальной микрофлоры кишечника человека относят бифидобактерии, обладающие выраженными пробиотическими

свойствами и большим биотехнологическим потенциалом. Эти бактерии участвуют в синтезе ряда витаминов группы В: В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>9</sub>, витамина К, аминокислот, органических кислот, полисахаридов, оказывают антагонистическое действие по отношению к условно-патогенной и патогенной микрофлоре, обладают уникальными антимутагенными и иммуностимулирующими свойствами. Именно бифидобактериям принадлежит ведущая роль в нормализации дисбаланса кишечной микрофлоры и поддержании неспецифической резистентности организма. Поэтому, благодаря своим уникальным свойствам и благотворному влиянию на организм человека в целом, бифидобактерии стали объектом многочисленных исследований [3–5].

Основными принципами биотехнологии бифидосодержащего продукта являются: подбор сырья, селекция микроорганизмов, создание консорциума и набор перспективных бифидогенных факторов. В качестве основных видов пребиотических соединений для избирательной стимуляции роста и биологической

активности бифидобактерий применяют, аминокислоты, ненасыщенные жирные кислоты, витамины, волокна полисахаридной природы, олигосахариды, растительные и микробные экстракты, пептиды и др. [5–7].

Как известно, включение в продукт сочетания монокультур более эффективно, чем их отдельное использование, поскольку в процессе симбиоза микроорганизмов происходит взаимная стимуляция их роста за счет синтеза различных метаболитов, а также более интенсивная ферментация лактозы до молочной кислоты.

В связи с этим, целью данной работы являлось исследование взаимодействия штаммов различных видов бифидобактерий для получения на их основе консорциума с новыми биотехнологическими свойствами и создание синбиотического кисломолочного продукта с высоким титром бифидобактерий.

Для получения пробиотического микробного консорциума были выбраны следующие штаммы бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* 791, *Bifidobacterium longum* 379 M, *Bifidobacterium adolescentis* MC-42, источники которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Источники штаммов бифидобактерий

Штамм бифидобактерий	Наименование и производитель препарата
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 791	Пробиотик «Бифидумбактерин», ФГУП НПО «Микроген»
<i>Bifidobacterium longum</i> 379 M	Жидкий концентрат бифидобактерий, ООО «Пропионикс»
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> MC-42	Пробиотик «Биовестин», ООО «Био-Веста»

Определение титруемой кислотности закваски и кисломолочного продукта проводили титриметрическим методом [8]. По показателю титруемой кислотности устанавливали количество синтезируемых бифидобактериями кислот, образовавшихся кислых солей и свободных кислотных групп, которые в свою очередь влияют на скорость образования сгустка и его консистенцию. Метод основан на нейтрализации продуктов раствором едкого натра в присутствии индикатора фенолфталеина. Активность ферментации определяли по сроку образования сгустка. Определение активной кислотности проводили потенциометрическим методом с помощью универсального ионометра ЭВ-74 для определения степени диссоциации белковых веществ и накопления продуктов гидролиза молочного жира под действием кислот, продуцируемых бифидобактериями. Степень синергизма устанавливали по количеству сыворотки, отделившейся при центрифугировании 10 см<sup>3</sup> разрушенного сгустка. Количественный учет бифидобактерий проводили на плотной кукурузно-лактозной среде, методом предельных разведений [9]. Органолептические показатели определяли после выдерживания проб при температуре плюс 4 °С в течение 20 часов.

Известно, что между различными штаммами бактерий возможен синергизм, поэтому на начальном этапе исследования изучались взаимоотношения данных штаммов в консорциуме. Для этого определяли лучшую комбинацию штаммов бифидобактерий путем срав-

нения органолептических и биотехнологических показателей их различных соотношений. Для определения сочетаемости штаммов бифидобактерий в 100 см<sup>3</sup> стерильного обезжиренного молока вносили 2 % исследуемой комбинации бифидобактерий с концентрацией клеток не менее 10<sup>9</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и термостатировали до образования сгустка при температуре плюс 37 °С. Параллельно исследовали отдельные монокультуры, входившие в комбинацию. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что все исследуемые образцы заквасок обладали достаточно хорошими органолептическими и биотехнологическими свойствами. При совместном культивировании исследуемых штаммов бифидобактерий было отмечено, что они не проявляли антагонистической активности по отношению друг к другу. При этом наблюдались симбиотические взаимодействия, которые выражались в сокращении времени ферментации, увеличении количества жизнеспособных клеток, улучшении консистенции и внешнего вида заквасок по сравнению с чистыми культурами. Также, было установлено, что оптимальным соотношением штаммов *B. bifidum* 791, *B. longum* 379 M, *B. adolescentis* MC-42 в составе комбинированной закваски является – 1:1:2, поскольку данный образец обладал лучшей ферментативной активностью, характеризовался наименьшим отделением сыворотки от сгустка и содержал высокое количество жизнеспособных клеток – 1,6×10<sup>10</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>.

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ СИНБИОТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА БИФИДОБАКТЕРИЙ

Таблица 2 – Основные органолептические и биотехнологические характеристики заквасок

Показатель	Характеристика заквасок							
	V. bifidum	V. longum	V. adoles- centis	Варианты комбинированных заквасок				
				1:1:1	1:2:1	1:1:2	2:2:1	2:1:2
Консистенция и внешний вид	В меру вязкая, сгусток плотный	Слабовязкая, сгусток дряблый	Слабовязкая, сгусток дряблый	Однородная, вязкая, сгусток плотный				
Вкус и запах	Чистый, кисломолочный							
Цвет	Молочно-белый, равномерный по всей массе							
Активность ферментации, ч	54±3	47±3	53±3	31±3	30±3	28±3	30±3	31±3
Титруемая кислотность, °Т	60±1	63±2	64±1	75±2	81±2	79±2	80±2	76±2
Активная кислотность, ед. рН	4,40±0,1	4,33±0,1	4,16±0,1	4,12±0,1	3,95±0,1	3,94±0,1	3,91±0,1	4,04±0,1
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см <sup>3</sup>	2,5×10 <sup>9</sup>	4×10 <sup>9</sup>	3×10 <sup>9</sup>	1,37×10 <sup>10</sup>	1,25×10 <sup>10</sup>	1,6×10 <sup>10</sup>	1,35×10 <sup>10</sup>	1,3×10 <sup>10</sup>
Степень синерезиса, см <sup>3</sup>	5,0±0,2	5,4±0,2	6,0±0,1	5,0±0,1	5,4±0,1	4,7±0,1	5,0±0,2	4,9±0,1

При производстве синбиотических кисломолочных продуктов функционального и лечебно-профилактического назначения немаловажное значение на этапе подбора культур бифидобактерий в состав заквасок придается такому свойству как устойчивость к антибиотикам.

Из литературных источников известно, что уже в процессе лечения антибиотиками совместное их применение с антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов способствует эффективному восстановлению микробиоценоза кишечника. Поэтому на следующем этапе исследования проводился анализ устойчивости консорциума к 23 антибиотикам разных поколений и спектров действий, относящимся к 7 группам антибактериальных препаратов с использованием диско-диффузионного метода [10]. Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии антибиотика из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация антибиотика превышает минимальную предельную концентрацию.

Исследуемый консорциум микроорганизмов выращивали на плотной питательной среде ГМК-1, в которую вносили 1 см<sup>3</sup> инокулята, далее после аппликации бумажных дисков с различными концентрациями антибио-

тиков в чашки Петри, их инкубировали в термостате в течение суток при температуре плюс 35 °С. После окончания инкубации отмечали образование зон подавления роста исследуемых микроорганизмов вокруг дисков и проводили замеры диаметров зон задержки роста. Результаты исследований приведены в таблице 3.

Из представленных данных таблицы 3 видно, что к 48 % всех изученных антибиотиков консорциум, состоящий из различных штаммов бифидобактерий *V. bifidum*, *V. longum*, *V. adolescentis* в соотношении 1:1:2, оказался устойчивым, а к 13 % имел промежуточный тип устойчивости. Наибольшая устойчивость (к 9 из 10 антибиотиков) была отмечена к бета-лактамам антибиотикам, бактерицидная активность которых обусловлена ингибированием синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Устойчивость к антибиотикам у изучаемых штаммов бифидобактерий в составе консорциума, вероятно, обусловлена наличием у них определенных механизмов природной резистентности, например, наличием в плазмиде маркеров устойчивости к антибиотикам, а также специфическими мутационными изменениями белков клеточной стенки и приобретением новой генетической информации в клетках микроорганизмов за счет конъюгационного переноса плазмид.

Таблица 3 – Чувствительность консорциума бифидобактерий к антибиотикам

Название антибиотика	Содержание антибиотика в диске, мкг	Диаметр зоны ингибирования роста, мм	Интерпретация значений
<i><b>БЕТА-ЛАКТАМЫ</b></i>			
Азлоциллин	75	8	резистентный
Ампициллин	10	-	резистентный
Амоксициллин	20	11	резистентный
Амоксициллин и клавулановая кислота	30	8	резистентный
Имипинем	10	18	чувствительный
Цефаклор	30	-	резистентный
Бензилпенициллин	10 Ед	-	резистентный
Оксациллин	1	-	резистентный
Цефазолин	30	12	резистентный
Пиперациллин	100	16	резистентный
<i><b>АМИНОГЛИКОЗИДЫ</b></i>			
Гентамицин	10	20	чувствительный
Стрептомицин	30	28	чувствительный
Неомицин	30	20	промежуточный
Амикацин	30	30	чувствительный
<i><b>ТЕТРАЦИКЛИНЫ</b></i>			
Тетрациклин	30	20	чувствительный
Доксициклин	30	24	чувствительный
<i><b>ГЛИКОПЕПТИДЫ</b></i>			
Ванкомицин	30	15	промежуточный
<i><b>МАКРОЛИДЫ И ЛИНКОЗАМИДЫ</b></i>			
Линкомицин	15	18	резистентный
Олеандомицин	15	21	чувствительный
Эритромицин	15	30	чувствительный
Азитромицин	15	30	чувствительный
<i><b>НИТРОФУРАНЫ</b></i>			
Фурагин	300	18	промежуточный
<i><b>ПОЛИМЕКСИНЫ</b></i>			
Полимиксин	300	8	резистентный

Известно, что бифидобактерии, обитающие в желудочно-кишечном тракте, где имеются готовые питательные вещества, в процессе эволюции утратили способность к синтезу первичных метаболитов. Поэтому для активизации их роста и с целью создания кисломолочных продуктов с высоким титром бифидобактерий, особенно при ферментации молока требуется дополнительное внесение различных пищевых добавок с выраженными пребиотическими свойствами. Поэтому в дальнейшей работе было изучено влияние различных концентраций полисахаридов: пектина (2 %, 2,5 %, 3 %) и инулина (2 %, 2,5 %, 3 %) на изменение количества жизнеспособных клеток бифидобактерий. В опытные образцы со стерильным обратом вносили 5 % инокулята комбинированной закваски,

различные концентрации пектина и инулина, а затем инкубировали при температуре плюс 37 °С до появления сгустка. Контролем служил образец без внесения пребиотиков. Динамика роста титра бифидобактерий пробиотического консорциума в присутствии различных концентраций пектина и инулина представлена на рисунке 1.

В ходе исследований было установлено, что внесение в питательные среды на молочной основе, таких пребиотиков как пектин и инулин в концентрациях 2,5 % позволяет максимально стимулировать развитие изучаемого консорциума, что выражается в повышении титра бифидобактерий и сокращении времени ферментации в среднем в два раза.

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ СИНБИОТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА БИФИДОБАКТЕРИЙ

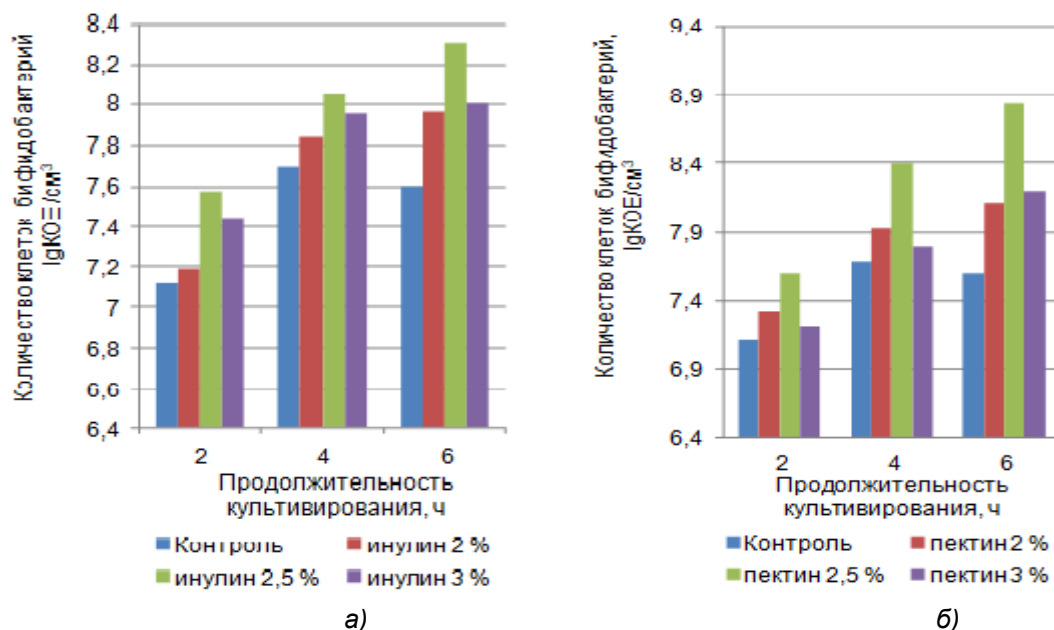


Рисунок 1 – Изменение количества клеток бифидобактерий в процессе ферментации с пектином (а), с инулином (б)

Таблица 4 – Основные качественные показатели синбиотических кисломолочных продуктов

Показатель	Продукт с содержанием пектина 2,5 %	Продукт с содержанием инулина 2,5 %	Образец без внесения пребиотика
Консистенция и внешний вид	Однородная, в меру вязкая, сгусток плотный	Жидкая, сгусток дряблый	В меру вязкая, сгусток плотный
Вкус и запах	Чистый, кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Чистый, кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Чистый, кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Светло-кремовый, равномерный по всей массе	Молочно-белый, равномерный по всей массе	Молочно-белый, равномерный по всей массе
Титруемая кислотность, °Т	88±2	68±2	64±2
Активная кислотность, ед.рН	5,30±0,1	5,24±0,1	5,20±0,1
Количество жизнеспособных клеток бифидобактерий, КОЕ/см <sup>3</sup>	3,5×10 <sup>9</sup>	2,0×10 <sup>9</sup>	1,0×10 <sup>7</sup>

На заключительном этапе исследования были получены опытные образцы синбиотических кисломолочных продуктов с использованием консорциума штаммов *B. bifidum* 791, *B. longum* 379 M, *B. adolescentis* MC-42 в соотношении 1:1:2 и с внесением оптимальных концентраций пребиотиков инулина (2,5 %) и пектина (2,5 %). Основные качественные показатели синбиотических кисломолочных продуктов представлены в таблице 4.

Сопоставляя результаты исследований

органолептических и биотехнологических свойств синбиотических продуктов, включающих в себя пребиотики пектин и инулин в концентрации 2,5 %, можно заключить, что внесение бифидогенных волокон способствует изменению качественных характеристик готового продукта. В частности, в обоих опытных образцах отмечается увеличение на порядок количества клеток бифидобактерий, сокращается время ферментации, и увеличивается показатель титруемой кислотности.

Лучшими органолептическими свойствами обладал образец с пектином. Он имел однородную, в меру вязкую консистенцию и плотный сгусток, в отличие от образца с инулином, в котором консистенция к концу ферментации оставалась жидкой, и образовывались хлопья.

Таким образом, полученный в ходе исследований синбиотический кисломолочный продукт на основе подобранного консорциума бифидобактерий, с внесением 2,5 % пектина, полностью соответствовал требованиям ГОСТ 32923–2014 [11]. Данный напиток обладал высоким титром бифидобактерий, улучшенными потребительскими и биотехнологическими свойствами и может быть рекомендован для профилактики и коррекции нарушений дисбаланса кишечной микрофлоры, а также поддержания неспецифической резистентности организма.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюхова, С.И. Использование пробиотиков и пребиотиков в биотехнологии производства биопродуктов: монография / С.И. Артюхова, Ю.А. Гаврилова. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2010. – 112 с.
2. Етепнева, Т.В. Исследование возможности использования консорциума пропионовокислых и молочнокислых бактерий в биотехнологии производства синбиотического кисломолочного продукта / Т.В. Етепнева, Е.П. Каменская // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности». – Алт. гос. тех. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. тех. ун-та, 2013. – С. 410–413.
3. Янковский, Д.С. Получение пробиотически ценных штаммов бифидобактерий / Д.С. Янковский, Г.С. Дымент, Е.П. Потребчук // Здоровье женщины. – 2008. – № 1. – С. 216–222.
4. Базеева, Е.Е. Изучение влияния бифидогенных факторов на прирост биомассы бифидобактерий / Е.Е. Базеева, Е.П. Каменская // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности». – Алт. гос. тех. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. тех. ун-та, 2016. – С. 445–448.
5. Bărăscu, E. Growth rate of bifidobacteria in milk supplemented with yeast extract and wheat germs / E. Bărăscu, M. Iordan, J. Ciurac. – 2007. – № 8. – P. 42–46.
6. Лаптев, С.В. Химия, микробиология и экспертиза молока и молочных продуктов: учебное по-

собие / С.В. Лаптев, Н.И. Мезенцева, Е.П. Каменская. – Бийск: Изд-во Алт. гос. тех. ун-та, 2009. – 237 с.

7. Дроздов, Р.А. Оптимизация рецептуры пробиотического кисломолочного напитка с добавлением пищевых волокон топинамбура / Р.А. Дроздов, М.А. Кожухова, Т.В. Бархатова [и др.] // Ползуновский вестник. – 2016. – № 4. – Т. 2. – С. 4-11.

8. ГОСТ 3624-92 Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – Введ. 1994-01-01. – М.: Стандартинформ, 2009. – 7 с.

9. МУК 4.2.999-00. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах. / Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию». – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – С. 55–68.

10. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

11. ГОСТ 32923–2014 Продукты кисломолочные, обогащенные пробиотическими микроорганизмами. Технические условия. – Введ. 2016-01-01. – М.: Стандартинформ, 2015. – 14 с.

**Каменская Елена Петровна**, к.б.н., доцент, доцент кафедры технологии броидильных производств и виноделия ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 656038, Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, 46, e-mail: ekat2007@yandex.ru, тел.: 8-905-927-2709.

**Обрезкова Марина Викторовна**, к.т.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (БТИ АлтГТУ), 659305, Россия, г. Бийск, ул. имени Героя Советского Союза Трофимова, 27, e-mail: obrezkova1962@mail.ru, тел.: (3854)43-53-05.

**Базеева Евгения Евгеньевна**, магистрант кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (БТИ АлтГТУ), 659305, Россия, г. Бийск, ул. имени Героя Советского Союза Трофимова, 27, e-mail: bazeew@mail.ru, тел.: (3854)43-53-05.