УДК 602.4: 573.4/573.458 https://doi.org/10.21603/1019-8946-2023-6-1

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ КОНСОРЦИУМОМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ*

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Екатерина Анатольевна Пожидаева, канд. техн. наук, доцент кафедры
E-mail: katerina-77707@mail.ru
Евгений Сергеевич Попов, д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой
E-mail: e_s_popov@mail.ru
Яна Алексеевна Дымовских, студент
E-mail: dymovskih.yana@yandex.ru
Мария Сергеевна Гребенникова, студент
E-mail: mary.bazaeva@mail.ru
Юлия Викторовна Дурова, студент
E-mail: durova525@mail.ru
Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж

В развитии пищевых технологий актуальным направлением является расширение возможности применения естественных полисахаридов, являющихся продуктами жизнедеятельности пробиотических микроорганизмов, образующихся в процессе синтеза биомассы. Они повышают адгезионную активность лакто- и бифидобактерий на слизистых поверхностях желудочно-кишечного тракта и способствуют формированию антиканцерогенных, противовирусных и иммуномодулирующих свойств пробиотических продуктов. Известно, что синтез влагосвязывающих метаболитов пробиотическими микроорганизмами активируется при неблагоприятных условиях для роста биомассы. В работе проведены экспериментальные исследования активности синтеза экзополисахаридов консорциумом пробиотических микроорганизмов на основе *Str. thermophiles, B. bifidum, B. longum, B. adolescentis, B. breve, L. acidophilus, L. plantarum, L. fermentum*. Изучены температурные режимы культивирования на основе комбинирования этапов оптимальных и неоптимальных условий для развития микроорганизмов, соответствующих варьированию температуры в диапазоне более высоких (47 ± 2) °C или более низких значений (32 ± 2) °C, с целью интенсификации синтеза влагосвязывающих метаболитов полисахаридной природы. Установлена возможность достижения концентрации молочной кислоты, достаточной для кислотной коагуляции белков культивируемой смеси, концентрации пробиотических микроорганизмов на уровне не менее 10^8 КОЕ/г. Приведены результаты исследований оптической плотности в диапазоне 632–643 А и концентрации экзополисахаридов для образцов биомасс консорциума лакто- и бифидобактерий в пределах и 87,5–89,5 мкг/мл (соответственно 273–277 А и 37,5–38,5 мкг/мл в контрольном образце). Установлено, что максимальная активность синтеза влагосвязывающих метаболитов соответствует двухстадийному процессу культивирования при температурных воздействиях (32 ± 2) °C (4–5 ч), (40 ± 2) °C (4–5 ч) с последующим охлаждением до (4 ± 2) °C.

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, микробные метаболиты, полисахариды

ВВЕДЕНИЕ

С развитием концепций здорового питания, повышенное внимание мировых научных сообществ сосредоточено на возможностях обогащения пищевых продуктов биологически активными агентами и соединениями, в частности продуктами метаболизма пробиотических микроорганизмов. Пищевые системы, содержащие молочнокислые и пробиотические микроорганизмы, а также продукты их метаболизма, белкового и углеводного происхождения, также находят эффективное применение в различных областях медицины. Известно, что экзополисахариды повышают адгезионную активность лакто- и бифидобактерий на слизистых поверхностях желудочнокишечного тракта, способствуют формированию антиканцерогенных, противовирусных и иммуномодулирующих свойств пробиотических продуктов [1, 2].

В настоящее время зафиксировано расширение ассортимента биопродуктов, что, в свою очередь, вызывает необходимость соответствия требованиям логистических мероприятий, посредством включения в состав различных пищевых добавок, позволяющих улучшить реологические показатели, пролонгировать срок годности, исключить возможность синерезиса. Для улучшения потребительских свойств продуктов питания в пищевых технологиях применяют функционально необходимые элементы. Метаболиты лакто- и бифидобактерий являются эффективной альтернативой применяемым пищевым добавкам, так как их получение основано на естественном процессе культивирования биомассы, что исключает полную или частичную необходимость проведения дополнительных технологических опера-

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00256, https://rscf.ru/project/23-26-00256/

ций по введению в состав пищевых систем различных стабилизаторов структуры. Применение микробных метаболитов позволяет не только улучшить потребительские свойства продуктов питания, но и расширить их функциональные свойства [3, 4]. Синтез экзополисахаридов молочнокислыми микроорганизмами способствует интенсификации ферментации молока, сокращению времени образования сгустка, улучшению реологических и структурно-механических свойств пищевых систем, биосинтезу самих бактерий и их метаболитов – аминокислот, короткоцепочечных жирных кислот, витаминов, ферментов [5, 6]. Ранее было установлено, что синтез влагосвязывающих метаболитов пробиотиками активируется при неблагоприятных условиях для роста биомассы [7].

Цель исследования заключается в изучении влияния комбинированных температурных режимов культивирования консорциума лакто- и бифидобактерий на интенсивность биосинтеза полисахаридов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

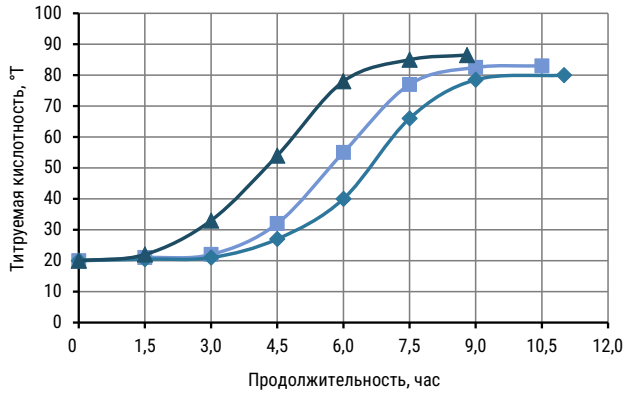
Объектом исследований являлся консорциум лакто- и бифидобактерий *Streptococcus thermophiles, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum* со следующими показателями:
– количество молочнокислых бактерий (КОЕ), в 1 г, не менее 5,0 млрд;
– количество термофильных стрептококков в 1 г, не менее 1,0 млн;
– лактобактерий в 1 г, не менее 3,0 млрд; бифидобактерий, в 1 г, не менее 3,0 млрд.

Активизированные культуры вносили в питательную среду – молоко коровье. Интервал измерения титруемой и активной кислотности составил 19–86 °Т и 4,3–6,3 ед. pH соответственно. Культивирование проводили при различных режимах: опыт 1 – температура (47 ± 2) °С, продолжительность 4–5 ч, охлаждение до (40 ± 2) °С, выдержка 4–5 ч с последующим охлаждением до (4 ± 2) °С; опыт 2 – температура (32 ± 2) °С, продолжительность 4–5 ч, подогрев до (40 ± 2) °С, выдержка 4–5 ч с последующим охлаждением до (4 ± 2) °С; опыт 3 (контроль) – температура (40 ± 2) °С, продолжительность 8–10 ч с последующим охлаждением до (4 ± 2) °С.

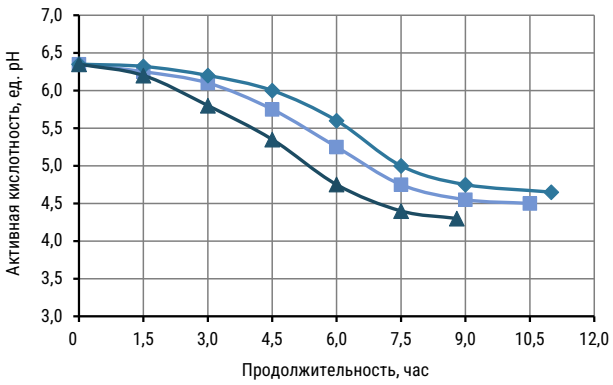
В ходе культивирования контролировали титруемую и активную кислотность среды, процесс осуществляли до замедления роста значений кислотности. Концентрацию клеток биомассы пробиотических микроорганизмов определяли путем высева на чашки Петри, с агаризованной средой МРС для лакто- и бифидобактерий, с последующим подсчетом колоний.

Для определения концентрации экзополисахаридов в биомассах консорциума пробиотических микроорганизмов применяли фенол-серный метод [8]. Данный метод основан на осаждении белков молока и отделении минеральных солей с последующим определением в полученном растворе оптической плотности с помощью фотометра КФК – 3 (АО «Загорский оптико-механический завод») при длине волны – 490 нм.

На рисунке предствлены результаты процесса культивирования пробиотических микроорганизмов при различных комбинированных температурных режимах.



а



б

Рисунок. Изменение титруемой (*а*) и активной (*б*) кислотности в молочных системах при различных режимах культивирования: 1 – 47 ± 2 °С; 2 – 32 ± 2 °С, 3 (контроль) – 40 ± 2 °С

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что процесс достижения целевых значений титруемой и активной кислотности при неоптимальных температурных режимах замедляется. Кислотность начинает меняться интенсивно через 2,5–3,0 ч от начала процесса в опытных образцах и через 1,5–2,0 ч в контрольном образце, что свидетельствует о более быстром переходе системы из лаг-фазы в экспоненциальную при соблюдении оптимальной температуры культивирования (40 ± 2) °С. Количество активных клеток пробиотических микроорганизмов достигает 10^2–10^3 КОЕ/г и соответствует реализации лаг-фазы культивирования бактериальной биомассы. Диапазон возрастания титруемой кислотности составляет 19–30 °Т, pH – 5,5–6,3 ед.

Завершение экспоненциальной фазы развития микроорганизмов, протекающей при оптимальной температуре, в опытных образцах зафиксировано по истечении 8 ч культивирования, в контрольном – через 6 ч. Титруемая и активная кислотность в опытных образцах возросла до 80–82 °Т и pH до 4,5–4,7, в контроле – до 86 °Т и 4,3 ед. соответственно. По окончании культивирования концентрация пробиотических микроорганизмов в опытном и контрольном образцах достигла 10^8 КОЕ/г. Такие данные свидетельствуют о наличии достаточной для достижения требуемого уровня титруемой и активной кислотности с точки зрения коагуляции белков культивируемой смеси, метаболической активности пробиотических микроорганизмов при данных условиях.

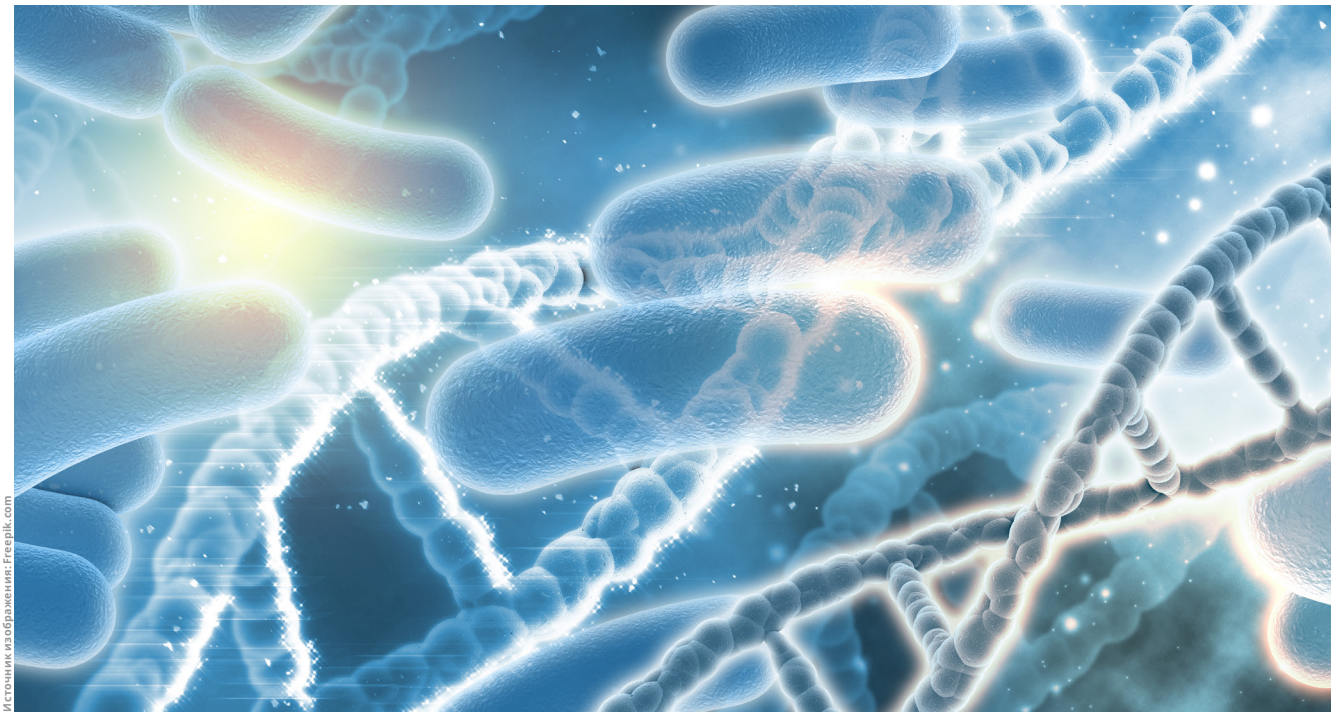
Таблица

Концентрация экзополисахаридов в растворах опытных образцов биомасс пробиотических микроорганизмов

Режим культивирования	Концентрация экзополисахаридов, мкг/мл		
	Повторность 1	Повторность 2	Повторность 3
1	87,5 ± 2,0	88,0 ± 2,0	88,0 ± 2,0
2	89,5 ± 2,0	89,0 ± 2,0	89,5 ± 2,0
3 (контроль)	37,5 ± 2,0	38,5 ± 2,0	38,0 ± 2,0

Результаты экспериментальной работы позволяют сделать вывод, что применяемые режимы культивирования опытных образцов консорциума пробиотических микроорганизмов позволяют достичь требуемого микробного числа не менее 10^8 КОЕ/г. Установлено, что показатели оптической плотности растворов экзополисахаридов варьируются в диапазоне 632–643 А для опытных образцов 1 и 2, 273–277 А в контрольном образце. На основе данных оптической плотности раствора D-глюкозы построена калибровочная кривая, позволяющая идентифицировать концентрацию экзополисахаридов в растворах (см. табл.).

На основе полученных данных установлено, что концентрация экзополисахаридов для опытных образцов биомасс лакто- и бифидобактерий варьируется в диапазоне 87,5–89,5 мкг/мл, в контрольном образце составляет 37,5–38,5 мкг/мл.



Источник изображения: Freepik.com

ВЫВОДЫ

Таким образом, показана возможность достижения концентрации молочной кислоты, достаточной для кислотной коагуляции белков культивируемой смеси, формирования устойчивого однородного геля, характерного для традиционных кисломолочных продуктов при культивировании в диапазоне более высоких (47 ± 2) °С или более низких значений (32 ± 2) °С температур, характерных для развития пробиотических микроорганизмов. Концентрация пробиотических микроорганизмов в опытных образцах составляла не менее 10^8 КОЕ/г. Выявлены величины оптической плотности и концентрации экзополисахаридов биомасс консорциума пробиотических микроорганизмов, которые соответственно варьируются в диапазоне 632–643 А и 87,5–89,5 мкг/мл для опытных образцов 1 и 2. Аналогичные величины для контрольного образца составили 273–277 А и 37,5–38,5 мкг/мл. Подтверждена перспективность применения двухстадийного процесса культивирования консорциума пробиотических микроорганизмов, обеспечивающего повышенный синтез метаболитов. Выявлено, что наиболее эффективным режимом культивирования, обеспечивающем максимальный синтез экзополисахаридов, является режим 2 со следующей последовательностью температурных воздействий: (32 ± 2) °С (4–5 ч), (40 ± 2) °С (4–5 ч) с последующим охлаждением до (4 ± 2) °С. Полученные результаты позволяют констатировать наличие экзополисахаридной активности исследуемого консорциума пробиотических микроорганизмов. ■

Effect of Cultivation Temperature on Exopolysaccharide Synthesis by Microbial Probiotic Consortium

Ekaterina A. Pozhidaeva, Evgeny S. Popov, Yana A. Dymovskikh, Maria S. Grebennikova, Julia V. Durova
Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh

ORIGINAL ARTICLE

In the development of food technologies, an urgent direction is the expansion of the possibility of using natural polysaccharides, which are vital products of probiotic microorganisms formed in the process of biomass synthesis, which increase the adhesion activity of lacto- and bifidobacteria on mucous surfaces of the gastrointestinal tract and contribute to the formation of anticancerogenic, antiviral and immunomodulatory properties of probiotic products. It is known that the synthesis of water-binding metabolites by probiotic microorganisms is activated under adverse conditions for biomass growth. Experimental studies of the activity of synthesis of exopolysaccharides by a consortium of probiotic microorganisms based on *Str. thermophiles, B. bifidum, B. longum, B. adolescentis, B. breve, L. acidophilus, L. plantarum, L. fermentum*. The temperature modes of cultivation have been studied on the basis of combining the steps of optimal and suboptimal conditions for the development of microorganisms corresponding to temperature variation in the range of higher (47 ± 2) °C or lower (32 ± 2) °C in order to intensify the synthesis of water-binding metabolites of polysaccharide nature. It is possible to achieve lactic acid concentration sufficient for acid coagulation of the cultured mixture proteins, probiotic microorganism concentration at the level of not less than 10^8 CFU/g. The results of optical density studies in the range 632–643 A and exopolysaccharide concentrations for biomass samples of the consortium of lacto- and bifidobacteria within the range and 87,5–89,5 mg/mL (273–277 A and 37,5–38,5 mg/mL in the control sample, respectively) are presented. The maximum activity of synthesis of moisture-binding metabolites was found to correspond to a two-stage cultivation process at temperature (32 ± 2) °C (4–5 hours), (40 ± 2) °C (4–5 hours), followed by cooling to (4 ± 2) °C.

Keywords: probiotic microorganisms, microbial metabolites, polysaccharides

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Rajoka, M. S. R.** *Lactobacillus exopolysaccharides*: new perspectives on engineering strategies, physiochemical functions and immunomodulatory effects on host health/ M. S. R. Rajoka, Y. Wu, H. M. Mehwish [et al.] // Trends in Food Science and Technology. 2020. Vol. 103. P. 36–48. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.003
2. **Reale, A.** Tolerance of *Lactobacillus casei*, Lactobacillus paracasei and *Lactobacillus rhamnosu*s strains to stress factors encountered in food processing and in the gastrointestinal tract / A. Reale, T. Di Renzo, F. Rossi [et al.] // LWT-Food Science and Technology. 2015. Vol. 60. P. 721–728. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.022
3. **Korcz, E.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry / E. Korcz, L. Varga // Trends in Food Science and Technology. 2021. Vol. 110. P. 375–384. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014
4. **Silva, L. A.** Exopolysaccharides produced by L*actobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry / L. A. Silva, J. H. P. Lopes Neto, H. R. Cardarelli // Annals of Microbiology. 2019. Vol. 69. P. 321–328. https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9
5. **Хамагаева, И. С.** Создание консорциума пробиотических микроорганизмов с высокой биохимической активностью и экзополисахаридным потенциалом / И. С. Хамагаева, С. Н. Хазагаева, Н. А. Замбалова // Вестник ВСГУТУ. 2014. № 1 (46). С. 97–102.
6. **Родионова, Н. С.** Дифференциально-термический анализ в оценке экзополисахаридной активности консорциумов пробиотических микроорганизмов / Н. С. Родионова, Е. С. Попов, [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. № 4 (27). С. 95–105.
7. **Полукаров, Е. В.** Выделение экзополисахаридов *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* при различных условиях культивирования / Е. В. Полукаров, Л. В. Карпунина, Д. А. Жемеричкин // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н. И. Вавилова. 2009. №. 4. С. 20–23.
8. **Абрамова, А. А.** Разработка закваски для йогурта, обладающей низкой постокислительной активностью и продуцирующей экзополисахариды: дис. канд. техн. наук / А. А. Абрамова. Москва. 2013. 134 с.