УДК 637.146:664.292
https://doi.org/10.21603/1019-8946-2023-5-5

Антипатогенные свойства заквасочной микрофлоры в присутствии пектиновых олигосахаридов

Марина Васильевна Каледина, канд. техн. наук, доцент
Анна Николаевна Федосова, канд. биол. наук, доцент
Дарья Александровна Литовкина, технолог
Виктория Петровна Витковская, канд. с.-х. наук
Инна Алексеевна Байдина, канд. с.-х. наук, доцент
Белгородский государственный аграрный университет им. В. Я. Горина
E-mail: kaledinamarina@yandex.ru

Антипатогенная активность является неотъемлемой частью основных характеристик ферментированных продуктов функционального назначения на основе бифидо- и лактобактерий. Пектиновые олигосахариды являются перспективными пребиотическими компонентами для микрофлоры кисломолочных напитков, поскольку обладают потенциальным синергетическим эффектом. В условиях in vitro был изучен антибактериальный эффект традиционно используемых в молочной промышленности заквасок против патогенных штаммов Escherichia coli EPEC, Escherichia coli VTEC и Staphylococcus aureus в присутствии олигосахаридов пектина. Экспериментально доказано, что пектиновые олигосахариды подходят для использования в качестве пребиотика для бифидосодержащих продуктов, они положительно влияют на метаболизм пробиотических культур, усиливают антипатогенную активность и не подавляют рост других заквасочных культур.
Ключевые слова: *кисломолочные напитки, патогены, антибактериальная активность, пектиновые олигосахариды.*

Kaledina M. V., Fedosova A. N., Litovkina D. A., Vitkovskaya V. P., Baidina I. A. Anti-pathogenic properties of the starter microflora in presence of pectin olygosacharides
Belgorod State Agricultural University named after V. Gorin

Anti-pathogenic activity is an integral part of the main characteristics of fermented functional products based on bifidobacteria and lactobacilli. Pectin oligosaccharides are promising prebiotic components for the microflora of fermented milk drinks, since they have a potential synergistic effect. The antibacterial effect of starter cultures traditionally used in the dairy industry against pathogenic strains of Escherichia coli EPEC, Escherichia coli VTEC and Staphylococcus aureus in the presence of pectin oligosaccharides was studied in vitro. It has been experimentally proven that pectin oligosaccharides are suitable for use as a probiotic for bifid-containing products, they positively affect the metabolism of probiotic cultures, enhance anti-pathogenic activity and do not inhibit the growth of other starter cultures.
Key words: *fermented milk drinks, pathogens, antibacterial activity, pectin oligosaccharides.*

Современный рынок отечественных функциональных продуктов, несмотря на многолетние исследования, только начинает зарождаться. В российских реалиях концепция здорового образа жизни через питание появилась относительно недавно. Отечественным перерабатывающим предприятиям, которые производят продукты традиционного массового потребления, достаточно сложно перестраиваться на новый ассортимент, а внедрение инновационных технологий связано с серьезными рисками. Производители преимущественно включают в ассортимент наименования социально-значимой продукции, что не дает отечественным продуктам функционального питания решающего преимущества на рынке.

Другим фактором, ограничивающим расширение рынка функциональных продуктов, является проблема с функциональными ингредиентами, поскольку значительная доля заквасок (включая пробиотики, пребиотики), витаминно-минеральных премиксов и других пищевых добавок представлены на российском рынке иностранными производителями. Вынужденный реэкспорт функционально-технологических ингредиентов решает проблему только частично и временно. Вполне очевидно, что для независимости от импорта необходимо собственное производство и функциональных ингредиентов, и функциональных продуктов.

Основная задача заключается в увеличении выпуска линеек уже имеющихся видов пищевых продуктов, которые должны отвечать тенденциям здорового питания, требованиям качества и безопасности. Для этого необходимо расширять производство молочных продуктов, обогащенных пробиотическими культурами и/или пребиотическими веществами [3].

Использование про- и пребиотиков продолжает интенсивно развиваться. Ученые и клиницисты часто затрагивают тему проблематичности эффективности пробиотических продуктов питания, указывая, что даже при длительном применении их положительное пробиотическое действие носит транзитный характер. Чтобы пробиотические бактерии заселили биотоп, им необходимо совершить пассаж по ЖКТ, преодолевая кислотный барьер и действие желчных кислот, до места назначения (толстый отдел кишечника). Такую способность обеспечивает только использование пробиотических штаммов с доказанной устойчивостью к агрессивным средам верхних отделов ЖКТ. Помимо этого, должны быть дополнительные благоприятные условия для роста поступивших в кишечник пробиотических культур: наличие питательной среды (пребиотиков) и достаточное количество коферментных факторов (витаминов, микроэлементов), чтобы функционировало энергообеспечение микробных клеток.

Ряд ученых рекомендуют использовать метод протекции, основанный на активации роста собственной полезной микрофлоры за счет использования в пищу пребиотических веществ, которые способствуют развитию полезной микрофлоры кишечника. В качестве пребиотических добавок-стимуляторов применяются лактулоза, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, пектины, хитозан и его производные и т. д., обладающие широким спектром положительных эффектов на организм человека. Бифидогенные вещества могут использоваться как самостоятельно, так и в сочетании с

пробиотическими микроорганизмами для более продолжительного их действия.

Пектиновые олигосахариды (ПОС) совсем недавно были выявлены в медицинских исследованиях как вещества, обладающие специфическим лечебным действием, их выделяют и включают в состав лекарственных средств. Использование ПОС в качестве пребиотиков в пищевой промышленности является новым направлением и находится в стадии начального изучения [2, 7, 8]. Комбинирование пробиотических продуктов с олигосахаридами пектина, приводящее к выраженному синбиотическому эффекту, относится к перспективным направлениям производства молочных функциональных продуктов.

Антипатогенная активность является неотъемлемой частью основных характеристик продукта функционального назначения на основе бифидо- и лактобактерий. В связи с этим в условиях *in vitro* был изучен антибактериальный эффект традиционно использующихся в молочной промышленности заквасок.

Цель исследования — изучить влияние пектиновых олигосахаридов на антагонистическую активность заквасочной микрофлоры против патогенных штаммов энтеробактерий и золотистого стафилококка.

Объекты и методы исследования. Эксперименты проводились на базе испытательной лаборатории Белгородского ГАУ, зарегистрированной в государственном реестре России, соответствующей требованиям ГОСТ ISO/IEC 17025–2019, аккредитованной в системе аккредитации аналитических лабораторий.

В условиях *in vitro* был изучен антибактериальный эффект заквасочных культур по отношению к коллекционным тест-культурам *Escherichia coli EPEC 8621, VTEC 12900VT, Staphylococcus aureus 8632*. Опытные образцы изготавливали с использованием лабораторных заквасок, полученных из лиофилизированных концентратов (ФГБНУ «Экспериментальная биофабрика», г. Углич) на стерилизованном (121±1 °С, 18±2 мин) обезжиренном молоке, соответствующем требованиям ГОСТ 31658–2012. Пектиновые олигосахариды получали путем гидролиза 2 % раствора яблочного пектина ферментом Lallzyme C–Max (Lallemand Oenology, Китай). Гидролиз осуществляли при 35 °С в течение 2 ч с последующей тепловой инактивацией фермента. В молоко вносили 10 % раствора пектиновых олигосахаридов и пастеризовали при 95–98 °С в течение 5–8 мин. Контролем были образцы без добавления ПОС. После охлаждения до оптимальной для развития микрофлоры температуры вносили расчетное количество активной закваски (5 %) и образцы помещали в термостат до достижения оптимальной кислотности сгустка (табл. 1).

Таблица 1

Закваски и параметры сквашивания кисломолочных напитков

Вид закваски	Состав микрофлоры	Температура сквашивания, °С	Титруемая кислотность, °Т
Бифилакт-про	*Lactococcus lactis subsp. diacetilactis* (Д) *Streptococcus thermophilus* (вязкий) (Тс) *Propionibacterium freudenreichii* (ППф) *Bifidobacterium bifidum* и/или *B. longum*, и/или *B. adolescentis* (БФ)	37–38	70–80
БК-Углич-АВ	*Lactobacillus acidophilus* (вязкая) (Па)	37–38	80–90
БК-Углич-СМУ	*Lactococcus lactis subsp. lactis* (Л) *Lactococcus lactis subsp.* cremoris (К) *Lactococcus lactis subsp. diacetilactis* (Д) *Acetobacter aceti* (Аа)	28–32	60–65

Таблица 2

Питательные среды, используемые в эксперименте

Энтеропатогенные микроорганизмы	Жидкая питательная среда	Твердая питательная среда
Escherichia coli	Трептон-соя	Мак Конкей агар № 3
Staphylococcus aureus	Трептон-соя	Манитол-солевой агар

Ингибирующую активность образцов в отношении энтеропатогенных бактерий определяли методом развивающихся смешанных популяций в сравнении с ростом тест-штаммов в монокультурах [6] с последующим высевом на питательные среды для количественного учета (ГОСТ 32901–2014, ГОСТ 30347–2016). Патогенные штаммы культивировали в питательной среде при 37 °С в течение 18 ч. Далее к 9 мл соответствующей среды добавляли 1 см^3 ферментированного образца молочнокислых культур и 0,1 см^3 культуры патогенных микроорганизмов. Контроль включал 1 см^3 стерильной воды вместо молочнокислых культур. Затем образцы инкубировали 24 ч при 37 °С. Готовили серию разведений и жизнеспособные популяции определяли путем посева образцов через 0, 3, 9 и 24 ч на соответствующий агар (табл. 2). Чашки Петри с посевом микроорганизмов инкубировали 48 ч при 37 ° С. В конце инкубационного периода подсчитывали выросшие колонии.

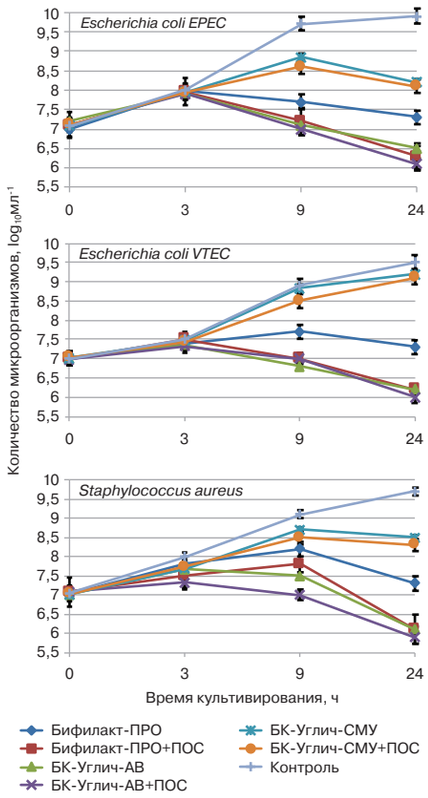
Эксперимент выполнен в трехкратной повторности. Погрешность измерений оценивали по нормальному закону распределения ошибок (закону Гаусса) определением среднеквадратичного отклонения усредненного результата от истинного значения.

Результаты и их обсуждение. Динамика изменения численности патогенной бактериальной микрофлоры приведена на рисунке.

Активное подавление роста энтеропатогенных бактерий для всех видов кисломолочных образцов наблюдалось после 9 ч совместного культивирования. Причем интенсивность зависела как от состава закваски, так и от наличия бифидогенного фактора в виде пектиновых олигосахаридов.

Отмечено снижение активной кислотности жидкой питательной среды от первоначального уровня 7,0±0,05 ед. pH. При этом активная кислотность снижалась уже после 3 ч совместного культивирования (табл. 3).

Наиболее выраженная антибактериальная активность наблюдалась в образце на основе ацидофильной палочки (закваска БК-Углич-АВ), причем введение олигосахаридов пектина не оказывало существенного влияния на усиление этого свойства. Опытный образец на основе концентрата БК-Углич-СМУ практически не влиял на рост *E. coli* VTEC и из всех кисломолочных культур проявил наименее выраженный антипатогенный эффект. Образец с закваской БК-Бифилакт-ПРО показал высокую подавляющую способность против всех



Динамика роста штаммов патогенных бактерий при совместном культивировании с опытными образцами

тестируемых патогенных микроорганизмов. Наличие олигосахаридов пектина усиливало антипатогенное свойство.

Антипатогенная активность является результатом действия широкого спектра антибактериальных соединений всего сообщества культур закваски. В их число входят молочная, уксусная, бензойная и другие кислоты, этанол, углекислый газ, диацетил, пероксид водород и особые пептиды (бактериоцины) [6].

Протонодонорные катаболиты (молочная, уксусная и другие кислоты) подавляют рост кишечных патогенов в среде *in vitro* [5]. Однако, как показали результаты исследований, указанный факт не является единственным в проявлении антибактериального эффекта. Так, снижение pH в культуральных средах наблюдалось через 3 ч после начала ферментации, а антибактериальный эффект проявился только через 9 ч совместного культивирования. Еще одним фактом является то, что кислую среду практически невозможно сохранить в условиях толстой кишки, где за счет секреции гидрокарбоната натрия

Таблица 3

Активная кислотность среды через 24 ч совместного культивирования

Вид закваски	Чистые культуры заквасок			Пектиновые олигосахариды		
	Escherichia coli		*S. aureus*	*Escherichia coli*		*S. aureus*
	EPEC	VTEC		EPEC	VTEC	
Бифилакт-про	6,11±0,03	6,53±0,05	5,91±0,03	5,89±0,02	6,11±0,04	5,71±0,06
БК-Углич-АВ	6,09±0,01	6,37±0,08	5,7±0,02	5,91±0,03	6,05±0,03	5,75±0,07
БК-Углич-СМУ	6,75±0,06	6,85±0,04	6,98±0,05	6,71±0,03	6,79±0,05	6,81±0,05

поддерживается слабощелочная реакция, следовательно, кроме кислотного существуют другие механизмы, объясняющие антипатогенные свойства молочнокислых бактерий.

Известно, что расщепление пищевых волокон в желудочно-кишечном тракте происходит под действием ферментов микрофлоры кишечника с образованием короткоцепочечных жирных кислот, в основном уксусной, пропионовой и масляной, реже — валериановой и изовалериановой. Толстого кишечника из углеводов могут достичь только пищевые волокна либо вещества, относящиеся к пребиотикам, которые не перевариваются в верхних отделах кишечного тракта и избирательно гидролизуются сахаролитической микрофлорой. Включение адаптированных штаммов бифидобактерий в состав микрофлоры закваски дает схожий эффект при сбраживании длинноцепочечных углеводных субстратов *in vitro* [4]. Низкомолекулярные метаболиты сахаролитической микрофлоры, и в первую очередь короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), обладают заметным бактериостатическим эффектом. Они способны ингибировать рост сальмонелл, дизентерийных шигелл, многих грибов. Таким образом, усиление бактериостатического действия бифидосодержащего образца в присутствии пектиновых олигосахаридов закономерно.

Подавление роста патогенов молочнокислыми бактериями предположительно усиливается их способностью образовывать пероксид водорода. Биосинтез происходит в фазе активного размножения культур преимущественно молочнокислых палочек. Наиболее активно образует пероксид водорода ацидофильная палочка — главная молочнокислая пробиотическая культура кишечника. Кишечные патогены и вирусы (в отличие от молочнокислых бактерий) относятся к каталазоположительным культурам. Каталаза является железосодержащим ферментом, обладает субстратной специфичностью к пероксиду водорода. В процессе катализа происходит окисление железа, входящего в структуру фермента, а при разложении образуются высокоактивные радикалы гидроксила (реакция Фентона), разрушающие целостность мембран патогенных клеток, приводя к их гибели.

Микроорганизмы вида *L. acidophilus* относятся к группе гомоферментативных лактобацилл. Метаболизм сахаров у видов бактерий этой группы происходит по гликолитическому пути расщепления глюкозы по схеме Эмбдена-Мейергофа-Парнаса [1]. Рост культур осуществляется главным образом за счет высокой β-галактозидазной активности и последующего сбраживания глюкозы, образующейся при гидролизе лактозы. Поэтому присутствие в молочной среде пектиновых олигосахаридов не оказывало никакого действия на метаболическую активность ацидофильной палочки и, как следствие, на ее антимикробные свойства.

Еще одним важным компонентом, позволяющим проявлять высокую антимикробную способность, являются бактериоцины — низкомолекулярные катионозаряженные пептиды. Бактериоцины способны не только нарушать проницаемость клеточных мембран, но и разрушать их. На основании физико-химических свойств, аминокислотного состава, способов выведения, а также антимикробного спектра действия бактериоцины разделяют на три класса. Одним из самых известных и изученных является низин, который относится к первому классу бактериоцинов. Он образуется в результате жизнедеятельности *Lactococcus lactis*. Данный бактериоцин считается безвредным, имеющим высокую ферментативную и антимикробную активность. Он давно служит объектом фундаментальных исследований по созданию новых активных пробиотиков и биологических консервантов [5]. Предположительно именно низин обеспечивает антипатогенный

эффект ферментированных образцов, в состав закваски которых входили молочнокислые микроорганизмы *L. lactis*. Однако антибактериальный эффект заквасочной микрофлоры на основе данных видов микроорганизмов в присутствии пептидов олигосахаридов практически не изменяется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

• Считается, что пребиотики избирательно усваиваются полезными микроорганизмами и оказывают положительное влияние на здоровье. Использование комбинации про- и пребиотиков в форме синбиотического компонента должно привести к более благоприятному воздействию на организм человека, чем использование этих компонентов по отдельности. Кроме того, пребиотический компонент должен способствовать росту и активности пробиотических штаммов.

• Присутствие пектиновых олигосахаридов в целом не имело значительного влияния на антибактериальный эффект исследуемой заквасочной микрофлоры кисломолочных культур против *Escherichia coli* EPEC, *Escherichia coli* VTEC и *Staphylococcus aureus*. При этом антибактериальный эффект заквасок, включающих дополнительно бифидобактерии, усиливался.

• Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод, что пектиновые олигосахариды могут использоваться в качестве пребиотика для бифидосодержащих продуктов. Они активируют метаболизм пробиотических культур и усиливают антагонистическую активность в отношении патогенов. В то же время пектиновые олигосахариды не будут оказывать негативного влияния на антибактериальный эффект лактококков и ацидофильной палочки, что позволяет их применять как функциональный ингредиент в рецептурах кисломолочных продуктов нового поколения. МП

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Беспоместных, К. В.** *Изучение влияния состава питательной среды на изменение биохимических и морфологических свойств штаммов лактобацилл/К. В. Беспоместных// Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16600*

2. **Донченко, Л. В.** *Современные особенности пектинопрофилактики/Л. В. Донченко, Д. О. Ластков, А. Ю. Коханный [и др.]// Сахар. 2022. № 9. С. 38–42.*

3. **Огнева, О. А.** *Разработка рецептур комбинированных продуктов с функциональными свойствами/О. А. Огнева, Н. С. Безверхая// Новые технологии. 2021. № 17 (1). С. 64–69.*

4. **Седакова, В. А.** *Исследование динамики образования короткоцепочечных жирных кислот при действии бифидо- и лактобактерий на пищевые волокна in vitro/В. А. Седакова, А. В. Клебанов, Н. А. Клебанова [и др.]// Вестник фармации. 2016. № 1 (71), 2016. С. 33–39.*

5. **Сультимова, Т. Д.** *Бактериоцины молочнокислых бактерий/Т. Д. Сультимова, Е. В. Захаров// Вестник ВСГУТУ. 2016. № 2. С. 41–47.*

6. **Śliżewska, K.** *The In Vitro Analysis of Prebiotics to Be Used as a Component of a Synbiotic Preparation/K. Śliżewska, A. Chlebicz-Wójcik// Nutrients. 2020. Apr 30; 12 (5):1272. doi: 10.3390/nu12051272.*

7. **Babbar, N.** *Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits/N. Babbar, W. Dejonghe, M. Gatti [et al.]// Crit. Rev. Biotech. 2016; 36:594–606. doi: 10.3109/07388551.2014.996732.*

8. **Wilkowska, A.** *Structurally different pectic oligosaccharides produced from apple pomace and their biological activity in vitro/A. Wilkowska, A. Nowak, A. Chrobot-Antczak [et al.]// Foods. 2019; 8:365.*