УДК 637.146.21:579.872.07

И.С. Хамагаева, И.В. Бояринева, Н.Ю. Потапчук

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМБИНИРОВАННОЙ ЗАКВАСКИ

В статье представлены результаты исследований пробиотических свойств симбиотической закваски на основе кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий. Установлено, что при введении пропионовокислых бактерий в консорциум микроорганизмов кефирной грибковой закваски повышается не только антимутагенная, но и антагонистическая и витаминобразующая активность комбинированной закваски.

Пропионовокислые бактерии, кефирная грибковая закваска, антимутагенная активность, антибиотики, витамины, пробиотические свойства.

Введение

В последние годы концепция оздоровления человека и предупреждения старения организма путем включения в рацион кисломолочных продуктов развивается в направлении определения звеньев механизма, которые в целом характеризуются как пробиотическое воздействие [1, 2].

Взаимосвязь макроорганизма и его микрофлоры очень велика. Нормальная микрофлора влияет на структуру слизистой оболочки кишечника и ее адсорбционную способность, участвует в обмене жирных кислот, метаболизме липидов, желчных кислот, билирубина, водно-солевом и газообмене. Микроорганизмы желудочно-кишечного тракта совершают ряд ферментативных реакций, синтезируют витамин К, витамины группы В, никотиновую, фолиевую и пантотеновую кислоты [3, 4].

Недостаток представителей здоровой микрофлоры вызывает ослабление как клеточных, так и гуморальных факторов иммунологической защиты. Нормальная микрофлора благодаря выраженной антагонистической активности предохраняет организм от внедрения патогенной флоры.

Дисбаланс микробной экологии человека приводит к тяжелым заболеваниям как желудочно-кишечного тракта, так и организма в целом. В связи с этим актуальной является разработка продуктов, обладающих пробиотическими свойствами.

В настоящее время достаточно фактических данных, свидетельствующих о наличии пробиотических свойств у пропионовокислых бактерий.

Пропионовокислые бактерии не перевариваются в желудочно-кишечном тракте людей, устойчивы к действию желчных кислот и выдерживают низкую (pH 2.0) кислотность желудка. Они ингибируют активность р-глюкуронидазы, азаредуктазы и нитроредуктазы – ферментов, образуемых кишечной микрофлорой и вовлекаемых в образование мутагенов, канцерогенов и промоторов роста опухолей [5].

Классические пропионовокислые бактерии образуют ряд белковых бактериоцинов. Штаммы *Propionibacterium thoenii* и *Propionibacterium jensenii* образуют термоустойчивые белки, ингибирующие ряд грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжей и плесеней [6, 7].

Экспериментальные и клинические испытания пропионовых бактерий показали иммуномодулирующую, антивирусную активность в клинических исследованиях, что связывают с активацией моноцитмакрофаговой системы, индукцией синтеза интерферона и активацией киллерных клеток [6, 8].

Пагубное действие на организмы радиационных излучений и химических мутагенов связано с возникновением свободных радикалов. Потенциальными биологическими мишенями для радикальной атаки служат липиды, белки, нуклеиновые кислоты. Свободные радикалы часто вовлекаются в активацию многих типов прокарциногенов и промутагенов, превращая их в карциногены и мутагены и связывая эти активированные формы с ДНК. Пропионовокислые бактерии служат источником ряда веществ, предотвращающих данные негативные реакции в организме [9].

В ряде исследований показана высокая антимутагенная активность пропионовокислых бактерий, которая коррелирует с накоплением в среде тиоловых соединений. Максимальная антимутагенная активность соответствует максимальной аккумуляции в среде тиолов. Антимутагенная защита пропионовых бактерий не только способствует сохранению собственного генотипа, но и может быть использована для стабилизации генотипов и микробных ферментаций других организмов.

Исследования последних лет показывают, что в пробах содержимого кишечника долгожителей наряду с дрожжевой микрофлорой определяется наличие и видовой состав молочнокислых бактерий. Оказалось, что повышение содержания в кишечнике долгожителей коррелирует с высоким количеством молочнокислых бактерий [10].

Антагонизм молочнокислых бактерий обусловлен способностью образовывать специфические антибиотические вещества: *S. Lactis* – низина, *S. Cremoris* – диплококкцина, *L. Acidohilus* – ацидофилина и лактоцидина, *L. Plantarum* – лактолина, *L. Brevis* – бревина и др.

Антибиотики, являясь специфическими продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, обладают высокой физиологической активностью по отношению к определенным патогенным группам, вирусам или злокачественным опухолям, задерживая их рост или полностью подавляя их развитие.

Установленная в последние годы способность молочнокислых бактерий стимулировать образование интерферона и выводить радионуклеиды позволяет говорить о необходимости получения высокопродуктивных штаммов, обладающих биосинтетическими свойствами, особенно физиологической активностью и антагонизмом, положительно влияющих на состояние здоровья человека и играющих важную роль в создании фермента долголетия [11].

При разработке продуктов нового поколения предлагается использовать микроорганизмы, способные оказывать положительное влияние на иммунную систему человека. В связи с этим большой интерес представляет применение таких эффективных иммуностимулирующих средств, как кефир.

Высокая питательная ценность кефира объясняется главным образом тем, что в нем белки молока находятся в более усвояемой форме, чем в натуральном молоке. Пептонизация белков молока в процессе сквашивания вызывается молочной кислотой, образующейся в кефире, и ферментами, выделяемыми молочнокислыми бактериями, и отчасти дрожжами. По мере протекания молочнокислого и спиртового брожения количество продуктов распада белков увеличивается [12]. Наличие молочнокислых бактерий и дрожжей с их способностью синтезировать антибиотики и витамины дополняет высоколечебное и диетическое значение кефира [11]. Особенно часто кефир применяется при хронических расстройствах пищеварительной деятельности под влиянием различных заболеваний желудочно-кишечного тракта: стимулирует выделение пищеварительных соков, нормализует моторную функцию пищеварительного тракта, возбуждает аппетит. Нередко люди, страдающие аллергией к молоку, хорошо переносят кефир [13].

Целью данной работы является создание консорциума микроорганизмов кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий и изучение пробиотических свойств полученной комбинированной закваски.

Сочетание микрофлоры кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий позволит повысить пробиотические свойства кисломолочных продуктов.

Объекты и методы исследований

Экспериментальные исследования проводились на кафедре «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров» проблемной научно-исследовательской лаборатории Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления.

Объектами исследований служили штаммы пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermanii* КМ 186, *Propionibacterium freudenreichii subsp. Freudenreichii* АС-2500, *Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermanii* АС-2503 и кефирная грибковая закваска. Штаммы пропионовокислых бактерий получены из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (Москва), активизированы биотехнологическим способом, разработанным в Восточно-Сибирском государственном технологическом университете.

Основные физико-химические и микробиологические показатели сырья, заквасок и кисломолочных продуктов определяли стандартными и общепринятыми в исследовательской практике методами.

Антимутагенную активность определяли по тесту Эймса, антибиотическую активность – методом последовательных разведений по М.С. Полонскому. Количество витамина B_6 определяли микробиологическим методом. Выделение витамина B_6 в свободной форме достигается автоклавированием образца с растворами серной и соляной кислот различной концентрации при различном давлении и продолжительности обработки. Для этой цели применяют также папаин, такадиастазу, кларазу [14], ферментный препарат из гриба *Aspergillus oryzae* [15].

Результаты и их обсуждение

Рост и метаболическая активность бактерий служат фундаментальными факторами для получения биомассы и промышленно ценных продуктов. К этим факторам следует добавить еще одно важное свойство бактерий – биосинтез соединений, обладающих антимутагенным и антиканцерогенным действием.

Под антимутагенезом понимают снижение частоты спонтанной и индуцированной мутации. Антимутагены регулируют скорость спонтанных мутаций, стабилизируют мутационный процесс [9, 16].

В целом проблема антимутагенеза и антимутагенных свойств бактерий имеет большое будущее, ибо включает в себя как вопросы здоровья людей, так и фундаментальные вопросы биологии.

Изучение антимутагенеза важно именно в отношении тех бактерий, которые используют при изготовлении пищевых продуктов. Бактерии-пробиотики как источники антибиомутагенов или десмутагенов могут быть использованы для предобработки пищевых продуктов с целью нейтрализации мутагенных (канцерогенных) веществ.

Пропионовокислые бактерии известны выраженным антимутагенным действием. Поскольку в естественных условиях микроорганизмы постоянно подвергаются действию мутагенов, у них сформировался эндогенный и экзогенный защитные механизмы: у всех живых существ образуются молекулы, способные к осуществлению антимутагенеза. Антимутагены пропионовокислых бактерий повышают активность ферментных систем, участвующих в детоксикации поступающих в клетку веществ, оказывая влияние на окислительно-восстановительный потенциал организма, эти процессы приводят к снижению мутаций [17]. Однако антимутагенез кефирных грибков до сих пор не изучен. В связи с этим была исследована антимутагенная активность комбинированной закваски. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

Определение антимутагенной активности комбинированной закваски

Вид микроорганизмов	Время культивирования, ч	Среднее число ревертантов на чашку	Ингибирование, %
Кефирная грибковая закваска	48	885	30,0
Пропионовокислые бактерии *Pr. Shermanii* КМ 186	48	502	47,2
Комбинированная закваска	48	532	57,8

В результате экспериментальных исследований установлено, что кефирная грибковая закваска обладает достаточно высокой антимутагенной активностью в отношении мутагенеза, индуцируемого 4-нитрохинолин-N-оксидом. Следует отметить, что степень ингибирования на 17 % ниже, чем у пропионовокислых бактерий. Наиболее сильное ингибирующее действие обнаружено у комбинированной закваски. Вероятно, более высокая антимутагенная активность комбинированной закваски объясняется тем, что микроорганизмы закваски синтезируют значительные количества антиокислительных ферментов: супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы. Одновременное присутствие этих ферментов позволяет клетке удалять супероксидные и пероксидные радикалы, образованные в окислительных реакциях [18].

Таким образом, установлено, что кефирная грибковая закваска обладает выраженной антимутагенной активностью. Кроме того, введение пропионовокислых бактерий в консорциум микроорганизмов кефирной грибковой закваски повышает антимутагенные свойства комбинированной закваски.

Биологические свойства молока и молочных продуктов в значительной степени обусловливаются специфическим действием молочнокислых бактерий, которое проявляется в характере взаимоотношений между ними и в антагонистическом влиянии на постороннюю микрофлору [19].

Результаты исследований ряда авторов [20, 21] показывают, что антагонистическая активность является не только видовым, но и специфическим штаммовым признаком. В связи с этим особого внимания заслуживают исследования, направленные на изучение антибиотической активности закваски. Полученные данные сведены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, при раздельном культивировании компонентов комбинированной закваски наиболее выраженной антибиотической активностью по отношению к *E. Coli* I_{53} и *S. Sonnei* 2848 обладает кефирная грибковая закваска, несколько меньшей – пропионовокислые бактерии.

Таблица 2

Антибиотическая активность заквасок

Вид закваски	Рост бактерий в разведениях			
	E. coli I_{53}		*S. sonnei* 2848	
	Отсутствие роста	Торможение роста	Отсутствие роста	Торможение роста
Пропионовокислые бактерии *Pr. Shermanii* КМ 186	1:4	1:16	1:8	1:32
Кефирная грибковая закваска	1:4	1:32	1:4	1:64
Комбинированная закваска	1:8	1:64	1:16	1:128

Важно подчеркнуть высокую антибиотическую активность комбинированной закваски в сравнении с отдельными культурами. Бактерицидное действие комбинированной закваски по отношению к *E. Coli* проявлялось в разведении 1:8, а к *S. Sonnei* 1:16. Бактериостатическое действие закваски по отношению к этим культурам отмечено в разведениях 1:16 и 1:128 соответственно.

Таким образом, установлено, что комбинированная закваска обладает выраженной антибиотической активностью по отношению к патогенной микрофлоре.

Изучение пробиотических свойств комбинированной закваски наряду с другими показателями предусматривает получение данных о содержании в ней витаминов.

Молоко является хорошим источником витаминов. Известно, что содержание витаминов может значительно изменяться в процессе технологической обработки и при хранении пищевых продуктов. В связи с этим практическое решение основных проблем в области получения высококачественных продуктов питания невозможно без осуществления контроля за качественным и количественным содержанием в них витаминов.

Из всех технологических операций при производстве молочных продуктов на изменение содержания витаминов наибольшее влияние оказывает термическая обработка. По мнению ряда исследователей, тепловая обработка приводит к уменьшению большинства витаминов (и тем в большей степени, чем выше температура и продолжительность выдержки). Однако последующая ферментация молока может привести к увеличению содержания витаминов [22, 23].

Нами изучено изменение тиамина, рибофлавина и витамина B_6 в процессе производства кефирного продукта. Поскольку при производстве кефирного продукта используется комбинированная закваска, проводили сравнительные исследования содержания витаминов при сквашивании молока кефирной гриб-

ковой закваской и комбинированной закваской. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Содержание витаминов в молочных продуктах

Молоко	Количество витаминов, мкг/кг		
	Тиамин (витамин B_1)	Рибофлавин (витамин B_2)	Пиридоксин (витамин B_6)
Молоко пастеризованное	317±0,41	1358±0,25	263±0,32
Молоко, сквашенное кефирными грибками	375±0,15	1741±0,11	315±0,17
Молоко, сквашенное пропионовокислыми бактериями	391±0,32	1795±0,19	332±0,12
Молоко, сквашенное комбинированной закваской	420±0,52	1835±0,27	367±0,25

В ходе исследований установлено, что в готовом продукте, выработанном как с использованием кефирной грибковой закваски, так и с использованием комбинированной закваски, содержание тиамина, рибофлавина и витамина B_6 возрастает. Результаты исследований, представленные в табл. 3, показывают, что в результате введения пропионовокислых бактерий в кефирную грибковую закваску в кефирном продукте увеличивается содержание витаминов группы В.

Выводы

1. В результате проведенных исследований установлено, что введение пропионовокислых бактерий в состав консорциума кефирной грибковой закваски повышает пробиотические свойства комбинированной закваски.

2. Выявлено, что консорциум микроорганизмов пропионовокислых бактерий и кефирной грибковой закваски обладает выраженной антимутагенной активностью.

3. Разработанная ассоциация микроорганизмов отличается высокой антибиотической и витаминообразующей активностью.

Список литературы

1. Воробьев, А.А. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины / А.А. Воробьев и др. // Вестн. Росс. АМН. – 1997. – С. 3–7.

2. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. – М.: Грантъ, 1998. – 286 с.

3. Коршунов, В.М. Проблемы регуляции микрофлоры кишечника // Микробиология. – 1995. – № 3. – С. 48–53.

4. Позняковский, В.Н. Гигиенические основы питания. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 447 с.

5. Воробьева, Л.И. Поиск пропионовокислых бактерий в кишечнике человека // Микробиология, эпидемиология, иммунология. – 1987. – № 2. – С. 7–11.

6. Воробьева, Л.И. Пропионовокислые бактерии. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 288 с.

7. Vorobjeva, L.I., Alekseeva M.A., Vorobjeva N.V. Characteristics of newly isolated strains of propionic acid bacteria // Proc 4 th Conf. Of the E.A.C. Udine. Italy, 1990. – P. 20.

8. Vorobjeva, L.I. Et al. Antimutagenicity of propionic acid bacteria // Mutat. Res. 1991. – Vol. 251. – № 6. – P. 233–239.

9. Воробьева, Л.И. Антимутагенность пропионовокислых бактерий / Л.И. Воробьева и др. // Гигиенические последствия загрязнения окружающей среды мутагенными факторами. – Самарканд, 1990.

10. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е.И. Квасников, И.Ф. Щелокова; отв. Ред. В.В. Смирнов; АН УССР. Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного. – Киев: Наук. Думка, 1991. – 328 с.

11. Квасников, Е.И. Изучение нормальной микрофлоры пищеварительного тракта долгожителей Абхазии / Е.И. Квасников и др. // Феномен долгожительства. – М., 1982. – С. 111–116.

12. Микробиологические основы молочного производства: справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина; под ред. Я.И. Костина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

13. Гурвич, М.М. Диетолог отвечает на вопросы. – М.: Медицина, 1988. – С. 97.

14. Storwich, C.A., J. McLeod Peters. Methods for the determination of vitamin B_6 in biological materials // Vitamins and Hormones. – 1964. – V. 22. – P. 833–852.

15. Степанова, Е.Н. Определение витамина B_6 в пищевых продуктах микробиологическим методом // Методы оценки и контроля витаминной обеспеченности населения. – М.: Наука, 1984. – С. 154–158.

16. Nishioka, H., Nunoshiba T. Role of enzymes in antimutagenesis of human saliva and serum // Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. N.Y.; London, 1986. – P. 143–151.

17. Воробьева, Л.И. Антимутагенность пропионовокислых бактерий / Л.И. Воробьева и др. // Микробиология. – 1991. – Т. 60. – № 6. – С. 83–89.

18. Крючкова, И.В. Влияние микрофлоры комбинированной закваски на популяцию пропионовокислых бактерий // Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности: материалы II Междунар. науч.-практ. конф. – СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2005. – С. 238.

19. Хамагаева, И.С. Научные основы биотехнологии кисломолочных продуктов для детского и диетического питания: монография. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 279 с.

20. Антибиотически активные молочнокислые бактерии в производстве продуктов гарантированного качества / С.Н. Карликанова, Э.Т. Климова, С.Е. Виноградская. – М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1983. – 50 с.

21. Gilliland, S.E. And Speck M.L. Antagonistic action of Lacto-bacillus acidophilus towards intestinal and food-borne pathogens in associative cultures // J. Food Protection. – 1987. – Vol. 40. – P. 820–823.

22. Хамагаева, И.С. Влияние пересадок на витаминобразующую способность пропионовокислых бактерий / И.С. Хамагаева, И.В. Крючкова // Новые экологобезопасные технологии для устойчивого развития регионов Сибири: материалы Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – Т. 2. – С. 234.

23. Крючкова, И.В. Исследование витаминобразующей способности комбинированной закваски на основе кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий // Инновационные технологии в создании продуктов питания нового поколения: материалы Всероссийской науч.-практ. конф. – Краснодар: Изд-во Технического университета, 2005. – С. 116.

ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления»,
670013, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в.
Тел./факс: (3012) 43-14-15
e-mail: office@esstu.ru

SUMMARY

I.S. Khamagaeva, **I.V. Boyarineva, N.Y. Potapchuk**

THE STUDY OF PROBIOTIC PROPERTIES OF COMBINED STARTER

The results of studies on probiotic properties of symbiotic starter based on kefir fungal starter and propionic acid bacteria are given. It was established that the introduction of propionic acid bacteria into the consortium of microorganisms of kefir fungal starter increases antimutagenic as well as antagonistic and vitamin forming activity of combined starter.

Propionic acid bacteria, kefir fungal starter, antimutagenic activity, antibiotics, vitamins, probiotic properties.

The East-Siberia State university of Technology and management
40v, Kluchevskaya street, Ulan-Ude, 670013, Russia
Phone/Fax: (3012) 43-14-15
e-mail: office@esstu.ru