

МРНТИ 34.27.19, 34.27.39,65.63.35, 62.09.39

<https://doi.org/10.26577/eb.2021.v87.i2.08>

М.К. Иманбаева^{1*}, **Р.А. Арынова²**, **Ж.К. Масалимов¹**,
А.Ю. Просеков³, **Г. Серикбай²**

¹Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Нур-Султан

²Астанинский филиал ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности», Казахстан, г. Нур-Султан

³Кемеровский государственный университет, Россия, г. Кемерово

*e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru

СОЗДАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЛАКТОЗООУТИЛИЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

На сегодняшний день 60% населения Казахстана страдают гиполактазией. Кроме этого, производство безлактозных кисломолочных продуктов на рынке Казахстана наблюдается в незначительном количестве. В связи с этим, цель настоящего научного исследования заключается в разработке закваски как пробиотического биопрепарата, созданной на основе молочнокислых бактерий, выделенных из казахский традиционных продуктов питания. Практическая значимость исследования заключается в возможности производить безлактозные кисломолочные продукты в промышленных условиях, на основе разработанной технологии. В качестве закваски использовались штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*. Проведенные нами ранее исследования показали, что лактобактерии обладают лактозуютилизующими свойствами. Генетическую идентификацию бактерий проводили на основе гена 16S rRNA, применяли периодическое культивирование при различных диапазонах NaCl, pH. Эксперименты по динамике роста изучали в зависимости от времени культивирования. Исследования показали, что *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* развиваются в кислой среде pH<7. Селективной средой для размножения и развития являются благоприятными, где концентрация соляной кислоты составляет около 5%. Применности полученных результатов исследований актуальна для микробиологической, биотехнологической и молочной промышленности. Практическое значение итогов проведенной работы заключается в импортозамещении дорогостоящих пробиотических препаратов. Разработанный пробиотик по ценовому предложению дешевле зарубежных аналогов, так как создана на основе микроорганизмов, выделенных на территории Республики Казахстан.

Ключевые слова: периодическое культивирование, лактобактерии, безлактозная закваска.

M.K. Imanbayeva¹, R.A. Arynova², Zh.K. Masalimov¹,
A.Yu. Prosecov³, G. Serikbay²

¹L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Nur-Sultan

²Astana branch Limited Liability Partnership Kazakh research institute of processing
and food industry, Kazakhstan, Nur-Sultan

³Kemerovo state university, Russia, Kemerovo

* e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru

Creation of a probiotic biological product based on lactose-utilizing microorganisms

Today 60% of the population of Kazakhstan suffers from hypolactasia. In addition, the production of lactose-free fermented milk products in the Kazakhstan market is observed in an insignificant amount. In this regard, the purpose of this scientific research is to develop a starter culture as a probiotic preparation based on lactic acid bacteria isolated from Kazakh traditional food products. The practical significance of the research lies in the ability to produce lactose-free fermented milk products in an industrial environment, based on the developed technology. Strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* were used as a starter culture. Our earlier studies have shown that lactobacilli have lactose-utilizing properties. Genetic identification of bacteria was carried out on the basis of the 16S rRNA gene; batch cultivation was used at different ranges of NaCl, pH. Experiments on the dynamics of growth were studied depending on the time of cultivation. Studies have shown that *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* develop in an acidic pH<7 environment. Selective breeding and development media are favorable, where the concentration of hydrochloric acid is about 5%. The

applicability of the research results obtained is relevant for the microbiological, biotechnological and dairy industries. The practical significance of the results of this work lies in the import substitution of expensive probiotic preparations. The developed probiotic is cheaper than foreign counterparts at the price offer, since it is created on the basis of microorganisms isolated in the territory of the Republic of Kazakhstan.

Key words: batch culture, lactobacilli, lactose-free starter culture.

М.К. Иманбаева¹, Р.А. Арынова², Ж.К. Масалимов¹,
А.Ю. Просеков³, Г. Серикбай²

¹А.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

²Астана филиалы ЖШС «Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері ғылыми-зерттеу институты», Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

³Кемерово мемлекеттік университеті, Ресей, Кемерово қ.

*e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru

Лактозаны жоятын микроорганизмдер негізінде пробиотикалық биопрепаратын өнімді құру

Бүгінгі күні Қазақстан халқының 60% гиполактазиямен ауырады. Сонымен қатар, Қазақстан нарығында лактозасыз ашытылған сүт өнімдерінің өндірісі шамалы мөлшерде байқалады. Осыған орай, осы ғылыми зерттеудің мақсаты – қазақтың дәстүрлі тағам өнімдерінен оқшауланған сүт қышқылды бактерияларға негізделген пробиотикалық препарат ретінде стартерлік дақылдарды дамыту. Зерттеудің практикалық маңыздылығы дамыған технологияға негізделген өндірістік жағдайда лактозасыз ашыған сүт өнімдерін шығару мүмкіндігінде. Стартер дақылы ретінде *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* штамдары қолданылды. Біздің алдыңғы зерттеулеріміз лактобактериялардың лактозаны қолданатын қасиеттері бар екенін көрсетті. 16S rRNA генінің негізінде бактериялардың генетикалық идентификациясы жүргізілді; NaCl, рН әр түрлі диапазонында топтамалық өсіру қолданылды. Өсу уақытына байланысты өсу динамикасы бойынша тәжірибелер зерттелді. Зерттеулер *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* рН<7 қышқыл ортада дамитынын көрсетті. Селективті өсіру және дамыту орталары қолайлы, мұнда тұз қышқылының концентрациясы шамамен 5% құрайды. Алынған зерттеу нәтижелерінің қолданылуы микробиологиялық, биотехнологиялық және сүт өнеркәсібі үшін маңызды. Осы жұмыс нәтижелерінің практикалық маңыздылығы қымбат пробиотикалық препараттарды импортпен алмастыруда. Әзірленген пробиотик шетелдік аналогтарға қарағанда баға бойынша арзан, өйткені ол Қазақстан Республикасының аумағында оқшауланған микроорганизмдер негізінде жасалады.

Түйін сөздер: мерзімді өсіру, лактобактериялар, лактозасыз ашытқы.

Введение

Гиполактазия – характеризуется нарушением абсорбции молочного сахара лактозы, после приема лактозосодержащих молочных продуктов [1]. Когортное исследование по рациону питания выявило взаимосвязь расстройства желудочно-кишечного тракта и низкой активностью расщепления молочного сахара (лактозы). Симптомами, которого являются боль в животе, диарея, потеря веса [2].

Как известно молоко и молочные продукты являются источниками Са, К, различных групп витаминов таких как: D, В. Люди страдающие гиполактазией, сталкиваются с дефицитом данных микро и макроэлементов [3]. Группой ученых был проведен мета-анализ, где изучали сыворотку крови людей страдающих гиполактазией. Было установлено, что низкий показатель витамина D связано со сни-

женной минеральной плотности костной ткани [4]. Также была обнаружена, положительная корреляция с болезнью пищеварительной системы и частотой переломов [5,6,7]. В связи с тем, что воспалительные заболевания кишечника и снижение плотности костей связаны с гиполактазией. Ученые предлагают использовать пробиотики на основе консорциумов лактобактерий с целью уменьшения симптомов непереносимости лактозы [8].

Ряд исследований показал, что определенные штаммы молочнокислых бактерий, возможно использовать в пробиотических целях в качестве пищевых добавок, у пациентов с непереносимостью лактозы. Так как микроорганизмы проявляли специфическую активность к β-галактозидазе [9]. Пробиотики определяются как живые микроорганизмы, полезные для здоровья при употреблении в пищу с высоким количеством жизнеспособных клеток. Лактобак-

терии наиболее часто используются в качестве пробиотиков [10,11]. Многие ученые из различных стран выделяют новые молочнокислые бактерии с функциональными свойствами из естественных источников, такие как традиционные молочнокислые ферментированные продукты питания. Выбор в качестве пробиотического микроорганизма основывается на нескольких исследованиях: устойчивости к желчным солям, устойчивости к низкому или высокому рН, подвергают адгезии, моделирование условий желудочно-кишечного тракта и способности иметь высокую жизнеспособность [12].

В своих исследованиях ряд ученых обнаружили определенные штаммы молочнокислых бактерий, ферментирующих лактозу, таких как *Faecaibacterium*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* [13].

На сегодняшний день, все больше исследований направлено на создание функциональных продуктов питания для людей страдающих гиполактазией. Так группа ученых разработали безлактозный функциональный йогурт, ферментированный пробиотическими культурами [14]. Другая группа ученых применяли метод хромогенного культивирования. В процессе совместного культивирования различных ассоциаций молочнокислых бактерий. На основе подсчета жизнеспособных штаммов лактобактерий в ферментированном молоке селективно выбранных на основе дифференциальной активности β -галактозидазы и β -глюкозидазы [15].

Польза ферментированных продуктов заключается в изменении микробиоты желудочно-кишечного тракта, что оказывает положительное влияние по предотвращению остеопороза и других заболеваний ассоциированных с гиполактазией [16].

Благодаря современным методам исследования, сегодня доступные диагностические методы основанные на нескольких подходах, включая тест на лактозное дыхание (LBT), тест на толерантность к лактозе (LTT), генетический тест и оценку активности лактазы в образцах биопсии тощей кишки [17].

Согласно статистическим данным, самый высокий показатель встречаемости данного заболевания зафиксировано в странах Юго-Восточной Азии от 15% до 100%, Северной Америке 79%, Латинская Америка 51%, Европейские страны от 5% до 50% [18].

На сегодняшний день встречаемость гиполактазии в Казахстане составляет 60 %. В свя-

зи с этим разработка безлактозной закваски на основе штаммов выделенных из традиционных казахских молочных продуктов питания является актуальной. Полученные результаты исследований могут применяться в таких отраслях как: микробиологическая, биотехнологическая и молочная промышленность. Разрабатываемая технология имеет социальный и экономический эффект. Основной рынок безлактозных молочных продуктов экспортируется из стран ближнего и дальнего зарубежья. Таким образом, итогов проведенной работы заключается в импортозамещении дорогостоящих пробиотических препаратов. Разработанный пробиотик по ценовому предложению дешевле зарубежных аналогов.

Материалы и Методы

Выделение и изучение культурально-морфологических свойств молочнокислых бактерий

Для получения чистых культур из жидких и полужидких гомогенных продуктов (кумыс, айран и сметана) был использован метод десятичных разведений с последующим пересевом на твердую питательную среду (MRS, HiMedia), которая является селективной по отношению к молочнокислым бактериям [19]. Твердые продукты питания (творог, масло, курт) растирали ступкой до однородной кашеобразной массы, после чего также получали разведения и производили посев газоном на чашки. Чашки помещали в термостат на 2-е суток при 37 °С. Отбор и определение принадлежности выделенных изолятов к МКБ проводили окраской по Грамму, подвижности, и микроскопии мазков [20].

Генетическая идентификация бактериальных культур на основе гена 16S rRNA

Выделение ДНК проводили методом, описанным Kate Wilson, который позволяет эффективно выделять ДНК из грамтрицательных и грамположительных культур.

Аmplификация фрагмента 16S rRNA гена для бактерий. Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами [21] 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R- 5' ggACTACCAgggTATCTAAT в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 25 нг ДНК, 1 Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплифи-

кации включала длительную денатурацию 95 °С в течение 3 минут; 32 цикла: 95 °С – 30 секунд, 55 °С- 40 секунд, 72 °С – 60 секунд; заключительная элонгация 10 минут при 72 °С. ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Определение нуклеотидной последовательности. Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) [22].

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Полученную нуклеотидную последовательность сопоставляли с нуклеотидными последовательностями международных баз данных.

Определение оптимального диапазона кислотности, концентрации NaCl при температуре 37 °С при периодическом культивировании

Биомассу культур микроорганизмов культивируют в жидкой питательной среде MRS при t 25 °С на шейкере в течение 72, 120, 168 часов. Затем готовят 9 пробирок с автоклавированной стерильной дистиллированной водой объемом 9 мл. Для посева на плотные питательные среды производятся из разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:10000 и т.д [23]. Свежеприготовленную агарированную питательную среду охлаждают до 48–50 °С. Далее ровным слоем распределяя по поверхности стерильной чашки Петри толщиной 3–5 мм. Стерильной пипеткой вносят 12 мл исследуемой культуры из соответствующего разведения, предварительно перемешанного. Распределение микроорганизмов осуществляется стерильным шпателем. При посеве из разных разведений применяют новую стерильную пипетку. Необходимо осуществлять 2 – параллельных посева. Чашки Петри помещают в термостат, чашками вниз, устанавливая оптимальную температуру для культивирования исследуемых микроорганизмов [24].

Далее 100 мл свежеприготовленной жидкой питательной среды MRS бульон стерилизован-

ной при t 120 °С под давлением 1А в автоклаве «Стерилизатор паровой ВК- 75-01» в течение часа. Затем в стерилизованные питательные среды в ламинар боксе «LAMSYSYSTEM» добавляли NaOH (гидроксид натрия) для увеличения диапазона pH, HNO₃ (азотную кислоту) для уменьшения диапазона pH. Диапазон pH жидкой питательной среды анализировали на pH-метром Mettler Toledo SevanCompact. Культивирование осуществлялось при температуре 25 °С, в колбах объемом 250 мл на шейкере в течение 3 суток (72 часа), 5 суток (120 часов), 7 суток (168 часов). Эксперимент осуществлялся в трех повторностях [19].

Затем в стерилизованные жидкие питательные среды MRS бульон в ламинар боксе «LAMSYSYSTEM» добавляли 2 гр. NaCl, 5 гр. NaCl, 7 гр. NaCl. Далее добавлял маточную культуру лактобактерий *Lactobacillus acidophilus* в концентрации 5% от общего объема питательной среды. Культивирование осуществлялось при температуре 25 °С, в колбах объемом 250 мл на шейкере в течение 3 суток (72 часа), 5 суток (120 часов), 7 суток (168 часов). Для обработки полученных статистических данных использовали: Чашечный метод количественного учета микроорганизмов. Метод Коха.

Общую микробную обсемененность рассчитывают по количеству выросших колоний т.е. количество КОЕ в 1 мл определяли по формуле:

$$M = \frac{a \times 10n}{V} \quad (1)$$

где, а – количество выросших колоний; 10n – разведение; V – посевная доза (0,1мл) [25].






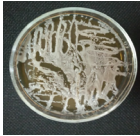
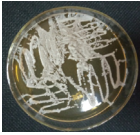

Результаты и Обсуждения

Выделение и изучение культурально-морфологических свойств молочнокислых бактерий

Коллекция чистых молочнокислых бактерий была выделена из казахских традиционных кисломолочных продуктов питания таких как: айран, кумыс, шубат, иримшик, курт, домашнее масло. Согласно таблице 1 штаммы отбирались согласно следующим признакам, характерным для молочнокислых бактерий: однородные колонии белого или беловато-молочного цвета с ровными краями и выпуклой поверхностью. Изолированные отдельно стоящие культуры, возможно, было получить на 3 или 4ом пересеве.

Таблица 1 – Накопление чистой культуры микроорганизмов выделенных из продуктов домашнего приготовления

Посев	Результаты пересева
Микроорганизмы выделенные из кумыса	
	 Форма круглая с гладким краем, поверхность матовая, профиль плоский. Средние колонии диаметром 4 мм, имеют белый цвет. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.
Микроорганизмы выделенные из айрана	
	 Форма круглая с волнистым краем поверхность матовая, изогнутый профиль. Однородная структура, имеющая мягкую консистенцию. Колонии средние диаметром 3 мм, имеет белый цвет.
Микроорганизмы выделенные из шубата	
	 Форма круглая с гладким краем, поверхность матовая, профиль плоский. Средние колонии диаметром 4 мм, имеют белый цвет. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.
Микроорганизмы выделенные из иримшик	
	 Форма округлая с неправильными краями, профиль плоский поверхность колонии блестящее, средние колонии диаметром 3 мм, имеет серо-белого цвета. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.
Микроорганизмы выделенные из домашнего молока	
	 Форма круглая, края волокнистые, профиль плоский, колонии блестящие, мелкие точечные диаметром 1 мм. Однородная структура. Имеет хрупкую консистенцию, рассыпающиеся при прикосновении петлей.
Микроорганизмы выделенные из айрана	
	 Форма круглая с валиком по краю, края и поверхность гладкие, профиль изогнутый, матовый, белого цвета. Диаметр 4 мм.

Посев	Результаты пересева
Микроорганизмы выделенные из курта	
	 <p>Овальной или круглой формы, поверхность гладкая, профиль плоский, блестящая, белого цвета. Диаметр 3 мм.</p>
	
	 <p>Форма круглая, поверхность гладкая, профиль плоский, блестящий, белого цвета. Диаметр 6 мм.</p>
Микроорганизмы выделенные из ирмшик	
	
	<p>Круглая форма, Форма круглая, края волокнистые, профиль плоский, колонии блестящие, средние колонии диаметром 3 мм, белого цвета. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.</p> 
	<p>Форма круглая с гладким краем, поверхность блестящая, профиль плоский. Средние колонии диаметром 2 мм, имеют белый цвет. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.</p>
Микроорганизмы выделенные из масло (домашнее)	
	<p>Форма круглая с валиком по краям, края волнистые, поверхность шероховатая, матовая, белого цвета. Диаметр 5 мм</p>

Генетическая идентификация бактериальных культур на основе гена 16S rRNA

В результате генетической идентификации с помощью нуклеотидной последовательности на основе гена 16S rRNA, было установлено, что 13 полученных штаммов молочнокислых бактерий относятся к *Enterococcus* и *Lactobacillus*. Результаты генетической идентификации представлены в таблице 2.

Определение оптимального диапазона кислотности, концентрации NaCl при температуре 37 С° при периодическом культивировании

В качестве объектов, входящих в состав закваски для производства безлактозных кисломолочных продуктов были использованы штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*. В процессе периодического культивирования

определены оптимальные диапазоны кислотности (рН), солёности среды и температурного режима объектов исследования.

Обращая внимание на мутность жидкой питательной среды можно визуально диагностировать положительный процесс культивирования *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* на 3-ие сутки (72 часа), 5-ые сутки (120 часов), 7-ые сутки (168 часов). Таким образом, в колбах, где проводили культивирование в жидких питательных средах MRS, отмечается помутнение и пена. Что свидетельствует о положительной динамике роста *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

На 72 сутки были взяты микроорганизмы из разведений под пробирками № 6,7,8. При посадке на 120 сутки из пробирок № 5,6,7, затем на 168 сутки из пробирок № 4,5,6 (рисунок 1).

Таблица 2 – Результаты генетической идентификации

Условные обозначения	Наименование	Субстрат выделения	% идентичности
P 1	<i>Enterococcus thailandicus</i>	шубат	99,84
P 2	<i>Enterococcus lactis</i>	кумыс	100
P 3	<i>Enterococcus durans</i>	иримшик	99,68
P 4	<i>Enterococcus faecium</i>	айран	99,54
P 5	<i>Lactobacillus zeae</i>	домашнее масло	100
P 6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	кумыс	100
P 7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	курт	99,48
P 8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	шубат	99,65
P 9	<i>Lactobacillus gorillae</i>	айран	100
P 10	<i>L. reuteri</i>	шубат	99,59
P 11	<i>L. johnsonii</i>	иримшик	100
P 12	<i>L. helveticus</i>	курт	99,74
P 13	<i>L. curvatus</i>	айран	99,81



Рисунок 1 – Приготовление разведения для периодического культивирования

Согласно описанному процессу, проведенные исследования дали возможность установить высокий, низкий титр клеток в различных условиях среды (диапазона кислотности, солёности и температурного режима).

Определено, что на 72 часу развития штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* показали незначительное число образовавшихся колоний. Данное явление связано с адаптацией вносимых бактерий в питательные среды с за-

данными условиями и вхождением микроорганизмов в лаг-фазу своего роста.

Обратив внимание на количественный показатель КОЕ/мг возможно сделать заключение что, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* имеют максимальное значение на 5-ые сутки (120 часов). Биомасса бактерий с низким титром клеток выявлена на 168 сутки.

В процессе периодического культивирования определены оптимальные диапазоны кислотности (рН), концентрация соляной кислоты и выход биомассы при культивировании температурном режиме соответствующему 37 С°.

Полученные данные будут необходимы для получения жидкой и сухой формы закваски для производства безлактозных кисломолочных продуктов. На основе, живых культур *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

Как известно, основным показателем для естественного роста бактерий является реакция среды. В результате изменения кислотности в критическую сторону наблюдается снижение показателей жизнедеятельности штаммов микроорганизмов. Несмотря на другие оптимальные условия окружающей среды.

В нашем исследовании, был изучен процесс динамики роста *Lactobacillus acidophilus* и

Enterococcus faecium в MRS питательной среде, имеющий различный диапазон кислотности рН 5, 6,4, 8,5.

Согласно рисунку 2 максимальная динамика роста *Lactobacillus acidophilus* наблюдается на 5-ые сутки (120 часов), КОЕ/мг $7,8 \times 10^8$, где, установлен оптимальный уровень кислотности среды (рН), который имеет показатель 5. В диапазоне рН 6,4 – 8,5 по сравнению с рН 5 имеют меньшую степень роста.

Таким образом, было определено, что кислые среды благоприятно влияют на рост *Lactobacillus acidophilus*, чем нейтральные и щелочные питательные среды.

Наиболее благоприятный уровень кислотности для энтерококков *Enterococcus faecium* является рН 6,4. Где, также наблюдается логарифмический рост. При этом на 3-ие сутки (72 часа) зафиксированных КОЕ/мг $5,5 \times 10^9$, максимальное число КОЕ/мг $5,8 \times 10^8$ обнаружено также на 120 сутки. На 7-ые сутки КОЕ/мг $3,8 \times 10^7$, что свидетельствует о снижении показателей жизнедеятельности микроорганизма, приводящий к уменьшению динамики роста *Enterococcus faecium*. Полученные данные свидетельствуют о том, что для *Enterococcus faecium* развивается в кислой среде (рН <7).

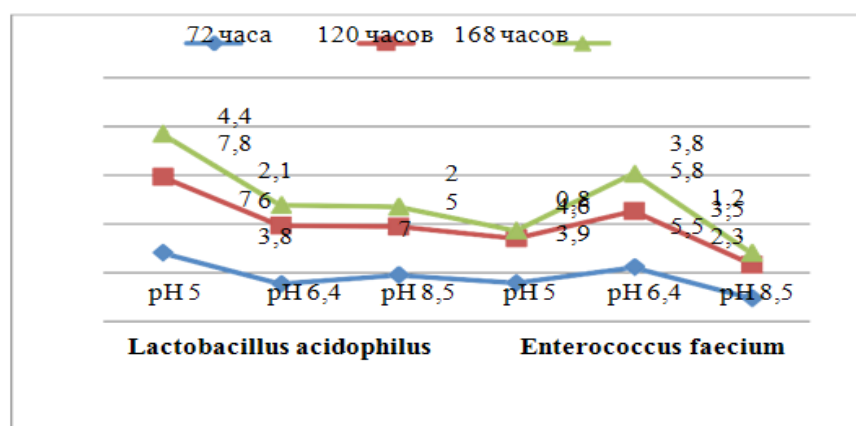


Рисунок 2 – Оптимальные диапазоны кислотности (рН)

Выживаемость и динамика роста пробиотических микроорганизмов в кислых условиях среды являются ключевым фактором. Исследования по культивированию *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* в селективной среде с концентрацией NaCl 2%, 5%, 7%.

Штаммы благоприятно развиваются в питательной среде имеющий коэффициент солёности

в 5% (рисунок 3). На 120 сутки культивирования объектов исследования, может характеризоваться как экспоненциальная фаза роста. Так как *Lactobacillus acidophilus* имеет $6,7 \times 10^8$ КОЕ/мг, *Enterococcus faecium* 4×10^8 КОЕ/мг. Культивируемые микроорганизмы по мере приближения к стационарной фазе (168 часов) показывает снижение роста по сравнению с 120 часами культивирования

ния. *Lactobacillus acidophilus* от 6,7 КОЕ/мг (120 ч) до 4,3 КОЕ/мг (168 ч), *Enterococcus faecium* от 4×10^8 КОЕ/мг (120 ч) до $2,5 \times 10^7$ КОЕ/мг (168 ч).

Полученные данные периодического культивирования при установленном температурном режиме соответствующему 37°C.

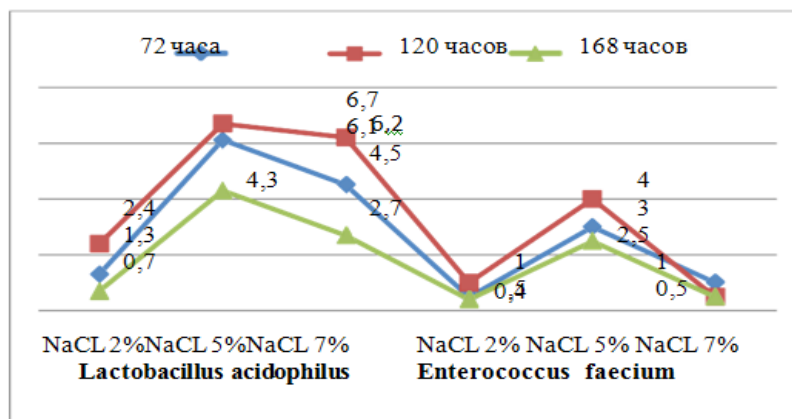


Рисунок 3 – Оптимальные диапазоны концентрация соляной кислоты (NaCl)

Известно, что главным фактором для культивирования микроорганизмов важную роль играет температурный режим. Нормальная температура желудочно-кишечного тракта составляет 37°C. Культивирование *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* при температуре 37°C осуществлялось также в течение 72, 120 и 168 часов.

Было установлено, что логарифмическое увеличение численности культуры зафиксировано до стационарной фазы роста на 5-ые сутки при периодическом культивировании. Численность *Lactobacillus acidophilus* с $5,5 \times 10^9$ КОЕ/мг (72 часа) увеличивалось до $6,8 \times 10^8$ КОЕ/мг (120 часа), *Enterococcus faecium* имеет аналогичную тенденцию к максимальному росту колоний от 72 часов $1,9 \times 10^9$ КОЕ/мг до 120 часов $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мг. К 168 часам (7 сутки) указывают на снижение колониеобразующих единиц.

Заключение, выводы

В рамках реализации проекта «Технология производства безлактозных кисломолочных продуктов» в лаборатории «Микробиология и биотехнология» проведены исследования по изучению динамики роста с целью создания пробиотического биопрепарата на основе лактозутилизующих микроорганизмов.

В результате на основании проведенных нами исследований была создана коллекция из 13 штаммов молочнокислых бактерий выделенных из казахских домашних традиционных

кисломолочных продуктов. Определена генетическая идентификация лактобактерий и изучены культурально-морфологические свойства.

Установлен оптимальный показатель кислотности среды (pH) для *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* является кислая среда. *Lactobacillus acidophilus* – pH 5, *Enterococcus faecium* – pH 6,4.

Наиболее благоприятной средой для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* является среда, имеющая концентрацию соляной кислоты около 5%.

На выращенной питательной среде MRS-агара с концентрацией соляной кислоты (NaCl) – 2% и 7% рассматриваемые изоляты бактерий *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, показали плохой рост на 3ий, 5ый и 7ый сутки.

Перечисленные исследования способствовали определению оптимумов, различных диапазонов кислотности, солёности, при которых выявляются максимальный рост и выход биомассы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

На основе полученных данных были установлены параметры культивирования на ферментере для получения безлактозной закваски в жидкой форме. Проведенные исследования способствуют разработки безлактозной закваски в порошкообразном и жидком виде.

На данном этапе ведутся работы по внедрению и применению полученной безлактозной закваски в производство.

Конфликт интересов

Все авторы ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Благодарности

Авторы статьи благодарны профессору, доктору биологических наук Арыновой Райхан Ахметовне за руководство над научно-исследовательским проектом «Технология производства безлактозных кисломолочных продуктов» за ценные рекомендации по выполнению данного проекта.

Источники финансирования

Исследовательская работа проводилась в рамках научно-технической программы (НТП) № BR05236766 «Создание продуктов здорового питания с функциональной направленностью на основе сельскохозяйственного сырья» по приоритетному направлению «Наука о жизни и здоровье» на 2018 -2020 годы по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 101 «Программно-целевого финансирования субъектов научной и/или научно-технической деятельности» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- 1 Yang J., Fox M., Cong Y. Lactose intolerance in irritable bowel syndrome patients with diarrhoea: the roles of anxiety, activation of the innate mucosal immune system and visceral sensitivity // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 9. – P. 302-311.
- 2 Wasuwanich P., Choudry H., Ingviya T., Scheimann O., Karla J., Yeung A., Karwowski C., Billet S., Buford N. A retrospective study on the association of gastrointestinal symptoms in children with low lactase activity and low activity of other disaccharidases. // *BMC Gastroenterology.* – 2020. – Vol. 12. – P. 294 – 306.
- 3 Savaiano DA., Ritter AJ., Klaenhammer TR., James GM., Longcore AT., Chandler JR. Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galacto-oligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial // *Nutr J.* – 2013. Vol. 11. – P. 267 – 278.
- 4 Mądry E., Krasinśka B., Drzymala-Czyż S., Sands D., Lisowska A., Grebowiec P. Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. // *Eur J Hum Genet.* – 2012. – Vol. 10. P. 109–119.
- 5 Fedota O., Babalian V., Ryndenko V., Belyaev S., Belozorov I. Lactose tolerance and risk of multifactorial diseases on the example of gastrointestinal tract and bone tissue pathologies // *Georgian medical news Issue.* – 2020. – Vol. 12. – P. 243 – 255.
- 6 Lomer M., Parkes G., Sanderson J. Lactose intolerance in clinical practice—myths and realities // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 15. – P. 103 – 118.
- 7 Suchy FJ., Brannon PM., Carpenter TO. National institutes of health consensus development conference: Lactose intolerance and health // *Ann Intern Med.* – 2010. Vol. – 8. – P. 792-800.
- 8 Ratajczak A., Rychter A., Zawada A., Dobrowolska A., Kazmierczak I. Lactose intolerance in patients with inflammatory bowel diseases and dietary management in prevention of osteoporosis // *Nutrition.* – 2020. – Vol. 12. – P. – 139- 151.
- 9 Fassio F., Facioni MS., Guagnini F. Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives // *Nutrients.* – 2018. – Vol. 15. – P. 187 – 202.
- 10 Meidustria T.R., Sembiring L., Rahayu E.S., Haedar N., Dwyana Z. Survival of *Lactobacillus plantarum* dad 13 in probiotic cheese making // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* – 2020. – Vol. 15. – P. 120-135.
- 11 Escobar-Ramírez M.C., Ordaz J.J., Escorza-Iglesias V.A., Rodríguez-Serrano G.M., Contreras-López E., Ramírez-Godínez J., Castañeda-Ovando A., Morales-Estrada A.I., Felix-Reyes N., González-Olivares L.J. *Lactobacillus pentosus* AB-HEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage // *Rev Argent Microbiol.* – 2020. – Vol. 9. –P. 305 – 314.
- 12 Larissa P., Margalho N., Genesy P., Jorge Deise A. P., Noleto Christian E., Júlia S., Marcos F. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: from screening to in product approach. // *Microbiol Res.* – 2021. – Vol. 15. – P. 242 – 254.
- 13 Azcarate-Peril MA., Ritter AJ., Savaiano D. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 15. – P. 114 – 129.
- 14 Ulisa Pachekreapol U., Somboonchai N., Krimjai W. Physicochemical, rheological, and microbiological properties of lactose-free functional yogurt supplemented with fructooligosaccharides // *J Food Process Preserv.* – 2020. – Vol. 15. – P. 150 – 165.
- 15 Galat A., Dufresne J., Combrisson J., Thépaut J., Boumghar-Bourtchai L., Boyer M., Fourmestreaux M. Novel method based on chromogenic media for discrimination and selective enumeration of lactic acid bacteria in fermented milk products // *Food Microbiol.* – 2016. – Vol. 10. – P. 163- 173.
- 16 Rizzoli R., Biver E. Effects of Fermented Milk Products on Bone // *Calcif Tissue Int.* – 2018. – Vol. 12. P. – 102-114.
- 17 Borghini R., Donato G., Alvaro D., Picarelli A. New insights in IBS-like disorders: Pandora's Box has been opened; re-view // *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* – 2017. – Vol. 10. P. – 79-89.
- 18 Scrimshaw NS., Murray EB. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance // *Am J Clin Nutr.* – 2015. – Vol. 15. – P. 107-122.
- 19 Егорова Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии // МГУ. – 1995. – С. 186 – 198
- 20 Нетрусова А.И. Практикум по микробиологии // Академия. – 2005. – С. 119 – 129.
- 21 Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M. et al. Outbreak of Infection With *Acinetobacter* Strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit // *Infection control and hospital epidemiology.* – 2006. – Vol. 27. – P. 397 – 424.

- 22 Werle E., Schneider C., Renner M. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4376.
- 23 Егорова Н.С. Микробиология // Высшая школа. – 1989. – С. 321 – 376.
- 24 Евсеев В. Лабораторный практикум микроорганизмов // Курган. – 2008.- С. 131 – 143.
- 25 ГОСТ 26809-86 "Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу" // Стандартинформ. – 2010. С. 10 – 258.

References

- 1 Yang J., Fox M., Cong Y. Lactose intolerance in irritable bowel syndrome patients with diarrhoea: the roles of anxiety, activation of the innate mucosal immune system and visceral sensitivity // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 9. – P. 302-311.
- 2 Wasuwanich P., Choudry H., Ingviya T., Scheimann O., Karla J., Yeung A., Karwowski C., Billet S., Buford N. A retrospective study on the association of gastrointestinal symptoms in children with low lactase activity and low activity of other disaccharidases. // *BMC Gastroenterology.* – 2020. – Vol. 12. – R. 294 – 306.
- 3 Savaiano DA., Ritter AJ., Klaenhammer TR., James GM., Longcore AT., Chandler JR. Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galacto-oligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial // *Nutr J.* – 2013. Vol. 11. – P. 267 – 278.
- 4 Mądry E., Krasieńska B., Drzymała-Czyż S., Sands D., Lisowska A., Grebowiec P. Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. // *Eur J Hum Genet.* – 2012. – Vol. 10. R. 109–119.
- 5 Fedota O., Babalian V., Ryndenko V., Belyaev S., Belozorov I. Lactose tolerance and risk of multifactorial diseases on the example of gastrointestinal tract and bone tissue pathologies // *Georgian medical news* Issue. – 2020. – Vol. 12. – R. 243 – 255.
- 6 Lomer M., Parkes G., Sanderson J. Lactose intolerance in clinical practice—myths and realities // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 15. – P. 103 – 118.
- 7 Suchy FJ., Brannon PM., Carpenter TO. National institutes of health consensus development conference: Lactose intolerance and health // *Ann Intern Med.* – 2010. Vol. – 8. – P. 792-800.
- 8 Ratajczak A., Rychter A., Zawada A., Dobrowolska A., Kazmierczak I. Lactose intolerance in patients with inflammatory bowel diseases and dietary management in prevention of osteoporosis // *Nutrition.* – 2020. – Vol. 12. – R. – 139- 151.
- 9 Fassio F., Facioni MS., Guagnini F. Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives // *Nutrients.* – 2018. – Vol. 15. – R. 187 – 202.
- 10 Meidustria T R., Sembiring L., Rahayu E S., Haedar N, Dwyana Z. Survival of *Lactobacillus plantarum* dad 13 in probiotic cheese making // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* – 2020. – Vol. 15. – R. 120-135.
- 11 Escobar-Ramírez M.C., Ordaz J.J., Escorza-Iglesias V.A., Rodríguez-Serrano G.M., Contreras-López E., Ramírez-Godínez J., Castañeda-Ovando A., Morales-Estrada A.I, Felix-Reyes N., González-Olivares L.J. *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage // *Rev Argent Microbiol.* – 2020. – Vol. 9. –R. 305 – 314.
- 12 Larissa P., Margalho N., Genesy P., Jorge Deise A. P., Noletto Christian E., Júlia S., Marcos F. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: from screening to in product approach. // *Microbiol Res.* – 2021. – Vol. 15. – P. 242 – 254.
- 13 Azcarate-Peril MA., Ritter AJ., Savaiano D. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 15. – R. 114 – 129.
- 14 Ulisa Pachekrepapol U., Somboonchai N., Krimjai W. Physicochemical, rheological, and microbiological properties of lactose-free functional yogurt supplemented with fructooligosaccharides // *J Food Process Preserv.* – 2020. – Vol. 15. – R. 150 – 165.
- 15 Galat A., Dufresne J., Combrisson J., The'paut J., Boumghar-Bourthai L., Boyer M., Fourmestreaux M. Novel method based on chromogenic media for discrimination and selective enumeration of lactic acid bacteria in fermented milk products // *Food Microbiol.* – 2016. – Vol. 10. – R. 163- 173.
- 16 Rizzoli R., Biver E. Effects of Fermented Milk Products on Bone // *Calcif Tissue Int.* – 2018. – Vol. 12. R. – 102-114.
- 17 Borghini R., Donato G., Alvaro D., Picarelli A. New insights in IBS-like disorders: Pandora's Box has been opened; re-view // *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* – 2017. – Vol. 10. R. – 79-89.
- 18 Scrimshaw NS., Murray EB. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance // *Am J Clin Nutr.* – 2015. – Vol. 15. – P. 107-122.
- 19 Егорова Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии // МГУ. – 1995. – С. 186 – 198
- 20 Нетрусова А.И. Практикум по микробиологии // Академия. – 2005. – С. 119 – 129.
- 21 Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M. et al. Outbreak of Infection With *Acinetobacter* Strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit // *Infection control and hospital epidemiology.* – 2006. – Vol. 27. – P. 397 – 424.
- 22 Werle E., Schneider C., Renner M. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4376.
- 23 Егорова Н.С. Микробиология // Высшая школа. – 1989. – С. 321 – 376.
- 24 Евсеев В. Лабораторный практикум микроорганизмов // Курган. – 2008.- С. 131 – 143.
- 25 ГОСТ 26809-86 "Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу" // Стандартинформ. – 2010. С. 10 – 258.