

МРНТИ 34.27.19

<https://doi.org/10.26577/bb106120268>**М.К. Иманбаева** 

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан

Медицинский университет Астана, Астана, Казахстан

e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru

ВАРИАНТЫ СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* ДЛЯ СОЗДАНИЯ БЕЗЛАКТОЗНОЙ ЗАКВАСКИ

В данном исследовании рассматриваются различные варианты смешения культур бактерий рода *Lactobacillus*, предназначенных для создания безлактозной закваски. Исследование подчёркивает значимость разработки пробиотических продуктов для людей с генетической или приобретенной лактазной недостаточностью. Методология исследования основывалась на анализе биосовместимости, кислотообразующей способности и жизнеспособности штаммов *Lactobacillus*, что позволило разработать безлактозную закваску на основе смешанных штаммов, выделенных из домашних кисломолочных продуктов Акмолинской области Казахстана. Результаты показали, что консорциум № 11, состоящий из штаммов *L. acidophilus* (LB13) и *L. rhamnoses* (LR12), является подходящим для разработки технологической схемы получения безлактозной закваски. Цель исследования заключается в апробации применения *L. acidophilus* и *L. rhamnoses* в качестве заквасочных культур для разработки технологической схемы получения безлактозной закваски. Практическая значимость работы заключается в использовании штаммов *L. acidophilus* и *L. rhamnoses* как природных лактозоутилизирующих молочнокислых организмов. Практическое значение работы состоит в возможности применения его результатов в пищевой промышленности с целью производства безлактозных кисломолочных напитков. Данная работа охватывает такие области научного знания, как микробиология, медицина и биотехнологии.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, лактосбраживающая закваска, пробиотик, непереносимость лактозы, смешанные культуры.

М.К. Imanbayeva

L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

Astana Medical University, Astana, Kazakhstan

*e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru

Variants of mixed cultures of bacteria of the genus *Lactobacillus* for creating a lactose-free starter

This study examines various options for mixed cultures of bacteria of the genus *Lactobacillus* to create a lactose-free starter. The study emphasizes the importance of developing probiotic products for people with genetic or acquired lactase deficiency. The research methodology was based on the analysis of biocompatibility, acid-forming capacity and viability of *Lactobacillus* strains, which made it possible to develop a lactose-free starter based on mixed strains isolated from homemade fermented milk products of the Akmola region of Kazakhstan. The results showed that consortium №11, consisting of *L. acidophilus* (LB13) and *L. rhamnoses* (LR12) strains, is suitable for developing a technological scheme for the production of lactose-free starter. The purpose of the study is to use *L. acidophilus* and *L. rhamnoses* as starter cultures to develop a technological scheme for the production of a lactose-free starter. The practical significance of the work lies in the use of strains of *L. acidophilus* and *L. rhamnoses* strains as natural lactose-utilizing strains. The practical significance of the results of the work lies in the possibility its results in the food industry in order to produce lactose-free fermented milk drinks. The contribution of this work covers areas of scientific knowledge such as microbiology, food industry, medicine and biotechnology.

Keywords: lactic acid bacteria, lacto-fermenting starter, probiotic, lactose intolerance, mixed culture.

М.К. Иманбаева

А.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан
Астана медицина университеті, Астана, Қазақстан
*e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru

Лактозасыз ашытқы дақылдарын құруға арналған *Lactobacillus* бактерияларының аралас нұсқалары

Бұл зерттеуде *Lactobacillus* туысына жататын бактерияларының әртүрлі мәдениеттерін араластыру арқылы лактозасыз ашытқы дайындау жолдары қарастырылады. Зерттеу генетикалық немесе жүре пайда болған лактаза тапшылығы бар адамдар үшін пробиотикалық өнімдерді әзірлеудің маңыздылығын атап өтеді. Зерттеу әдістемесі штамдардың биосәйкестілігін, қышқыл түзу қабілетін және тіршілікке қабілеттілігін талдауға негізделген. Бұл Қазақстанның Ақмола облысындағы үй жағдайында дайындалған ашытылған сүт өнімдерінен бөлінген аралас штамдар негізінде лактозасыз ашытқы жасауға мүмкіндік берді. Нәтижелер бойынша *LB. acidophilus* және *LB. rhamnoses* штамдарынан тұратын №11 консорциум-лактозасыз ашытқы өндірудің технологиялық сызбасын әзірлеуге ең қолайлы жол. Зерттеу жұмысының мақсаты *LB. acidophilus* және *LB. Rhamnoses* бактерияларын лактозасыз ашытқы өндірудің технологиялық схемасын әзірлеу үшін ашытқы мәдениеттері ретінде пайдалану. Жұмыстың практикалық маңыздылығы *LB. acidophilus* және *LB. rhamnoses* штамдарын табиғи лактозаны ыдырататын сүтқышқылды микроағзалар ретінде пайдалану қолайлығында. Зерттеу жұмыс нәтижелерінің практикалық маңыздылығы-тағам өнеркәсібінде лактозасыз сүт өнімдерін өндіруде қолдануға болады. Бұл жұмыс микробиология, тамақ өнеркәсібі, медицина және биотехнология сияқты білім салаларын қамтиды.

Түйін сөздер: сүт қышқылды бактериялар, лактоза ашытушы, пробиотик, лактозаға төзімсіздік, аралас мәдениеттер.

Введение

Около 70 % взрослого населения по всему миру сталкиваются с проблемой недостаточной активности фермента лактазы. Степень лактазной недостаточности значительно различается в зависимости от региона и страны. Причинами этого могут быть как генетические факторы, так и приобретенная недостаточность лактазы ввиду перенесенных заболеваний желудочно-кишечного тракта. В обоих случаях это является причиной непереносимости лактозы. Лечение данного состояния в основном заключается в снижении или исключении лактозы из рациона до полного исчезновения симптомов. Поэтому диетический подход имеет ключевое значение для управления состоянием пациента с лактозной непереносимостью. Эффективная стратегия включает безлактозную и низколактозную диету, пероральный прием фермента лактазы, а также адаптацию микробиома толстого кишечника с помощью определенных пробиотических штаммов, обладающих ферментативной активностью β-галактозидазы (Agarwal 2023).

Лактоза расщепляется в проксимальной части тонкого кишечника на глюкозу и галактозу с помощью фермента лактазы. Накопление непереваренной лактозы в тонком кишечнике способствует увеличению притока воды в кишечник,

что возникает на фоне заболеваний желудочно-кишечного тракта и возрастных изменений. Широкий ассортимент пробиотиков, пребиотиков, препаратов лактазы, а также ферментированных молочных продуктов и растительных напитков помогает облегчить симптомы непереносимости лактозы (Aili 2023).

Актуальность данной темы обусловлена тем, что в настоящее время существует множество технологических процессов, способствующих удалению лактозы из молочного продукта. Одним из них таких процессов является мембранная технология, которая позволяет получать безлактозный продукт с заданными физико-химическими свойствами. Также широко применяются методы ультрафильтрации, нанофильтрации. Молочнокислые продукты с низким содержанием лактозы, так же, как и безлактозные, могут быть получены ферментативным методом. Суть этого метода заключается в обращении к природным молочнокислым бактериям, которые обладают β-галактозидазой активностью. Это позволяет утверждать, что исследуемая тема является теоретически и практически значимой (Garate 2022).

Новизна представленного исследования определяется выбором заквасочных культур в целях оптимизации ферментативного процесса и повышения органолептических качеств совре-

менного продукта, имеющего высокую добавленную стоимость. Практическое применение пробиотически активных штаммов, способных утилизировать лактозу, позволит внедрить в производство полученную закваску для диетических молочных продуктов.

В недавних исследованиях, посвященных аналогичной теме, установлено, что колонии молочнокислых бактерий *Lactobacillaceae* способны к переработке лактозы в молочную кислоту. Широко представлено описание процесса продуцирования многочисленными молочнокислыми бактериями, включая распространённые *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, β -галактозидазы (Kable 2023).

Лактобактериям свойственно фенотипическое и генетическое разнообразие, что делает их ценными объектами для научных исследований. Эти микроорганизмы играют важную роль в сквашивании ввиду наличия у них способности гидролизировать экзополисахариды (Widyastuti 2021). В качестве объектов исследования были выбраны штаммы *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus acidophilus*.

Предметом исследования являются биосовместимость культур *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus acidophilus*, разработка различных вариантов смешения штаммов лактобактерий, а также анализ их жизнеспособности и кислотообразующей способности.

Zommaro M. было экспериментально доказано, что экзополисахариды, вырабатываемые пробиотическими штаммами, способны оказывать положительное физиологическое воздействие, в частности, снизить уровень холестерина и предотвратить образование в эпителиальных клетках тонкого кишечника патогенных биопленок благодаря своей высокой адгезионной способности (Zommaro 2023).

Фермент β -галактозидаза, обладающий гидролитическими и транслактозилирующими свойствами, может быть получен из различных источников: бактерий, грибов, дрожжей, растений, клеток животных, что потенциально может влиять на его свойства и эффективность. Учеными активно применяются различные источники β -галактозидазы (Kalathinathan 2023). В настоящее время на рынке РК наблюдается растущий спрос на пребиотики для детей и взрослых, нуждающихся в функциональных молочных продуктах для оздоровления или специального питания, что позволяет найти области применения в пищевой промышленности и удовлетворить

потребности населения в качественных товарах, имеющих конкурентную стоимость.

Род *Lactobacillus* часто используется технологами на производстве в качестве закваски или вспомогательной культуры благодаря своим пробиотическим свойствам, поскольку эти бактерии способствуют улучшению качества продуктов питания человека и поддерживают его здоровье. В процессе метаболизма *Lactobacillus* производят специфические вещества, такие как органические кислоты, углекислый газ, жирные кислоты и бактериоцины. Эти соединения способны воздействовать на флору тонкого кишечника, обладают и антимикробной активностью и, следовательно, высоким пробиотическим потенциалом (Sousa 2020).

Цель данного исследования – выявить биосовместимые варианты, жизнеспособные кислотообразующие штаммы лактобактерий, создать на их основе смешанный консорциум и разработать технологическую схему получения безлактозной закваски.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи и подходы:

- определение совместимости выделенных штаммов рода *Lactobacillus*;
- разработка нескольких вариантов консорциума;
- определение совместимых и несовместимых вариантов;
- изучение жизнеспособности совместимых вариантов;
- изучение кислотообразующей способности совместимых вариантов;
- определение оптимального консорциума из штаммов для будущей лактосбраживающей закваски;
- разработка технологической схемы.

В работе применялись микробиологические, биохимические и биотехнологические методы исследования.

В ходе экспериментальных исследований группой авторов под руководством Mohammed T. было также подтверждено, что бактерии рода *Lactobacillus*, выделенные из традиционных йогуртоподобных продуктов с высокой кислотностью, обладают пробиотическим потенциалом. Были изучены физиологические свойства лактобактерий, такие как гидрофобность, адгезивная способность, а также их способность к выработке гидролаз и экзополисахаридов. Изоляты показали снижение уровня холестерина, гидролиз лактозы и ингибирование патогенных микроор-

ганизмов. Полученные результаты подтверждают целесообразность использования бактерий рода *Lactobacillus* в пищевой промышленности и медицине (Mohammed 2020).

В исследованиях Li L.B. для разработки безлактозного йогурта была использована многоштаммовая закваска, состоящая из термофильных и нейтрофильных штаммов лактобактерий. Однако при соотношении 2:1 лактоза проявила большую эффективность по сравнению с другими образцами. Содержание лактозы значительно снижалось при температуре 37°C, когда гидролиз лактозы достигал 50 % (Li 2023).

В ходе экспериментов, проведенных научной группой Кауасан С., были определены кислотообразующие свойства заквасок, а также обнаружена повышенная подкисляющая способность штаммов лактобактерий. Также была изучена кинетика роста штаммов рода *Lactobacillus*, рассчитана максимальная удельная скорость их роста. На основе полученных данных авторы разработали новую закваску (Кауасан 2023).

Гипотеза данного исследования заключается в том, что натуральные пищевые добавки, в последние годы заслужившие популярность благодаря растущему интересу потребителей к безопасным и экологически чистым продуктам, смогут стать важной частью пищевой промышленности и производственного сектора экономики Казахстана. Результаты полученных исследований имеют не только практическую значимость, но и экономическую эффективность, поскольку молочные продукты играют ключевую роль в удовлетворении потребностей в питательных веществах. В рамках диеты с пониженным содержанием лактозы безлактозные заменители могут служить более доступной альтернативой дорогим безлактозным продуктам. Люди с лактазной недостаточностью часто вынуждены ограничивать потребление молочных продуктов, которые являются важными источниками кальция и способствуют здоровью костей. Как известно, диета с пониженным содержанием лактозы обходится конечному потребителю значительно дороже. Как отмечает Taeger, M., дополнительные расходы на молочные продукты составляют от 0,1 % до 5,1 % в месяц в зависимости от степени непереносимости лактозы. Наиболее экономически эффективным решением представляется переход на потребление безлактозного молока (Ibrahim 2021; Katoch 2022).

Полученные нами результаты исследований также коррелируют с результатами исследова-

ний авторов (Zhang 2020). Исследование показало, что совместное культивирование нескольких заквасочных культур обеспечивает более эффективное снижение уровня лактозы и ускорение метаболизма галактозы по сравнению с другими методами ферментации. Кроме этого, органолептический анализ показал, что ферментированный продукт оказался приемлемым для потребителей по внешнему виду, текстуре и вкусу.

Таким образом, разработка экономически эффективных продуктов является актуальной для дальнейших исследований. Лактоза является источником олигосахаридов в грудном молоке, обладающих пробиотическими свойствами. Тоса, М. отмечает, что употребление лактозы способствует более эффективному усвоению кальция, цинка и магния (Тоса 2022).

Лактобактерии традиционно используются в производстве кисломолочных продуктов. Несмотря на многочисленные исследования, эта тема все еще нуждается в дальнейшем изучении и является актуальной (Kocz 2021).

Молочные продукты могут содержать изомеры лактозы, такие как аллолактоза, эпилактоза и лактулоза, которые могут быть получены ферментативным путем или термической обработкой. Лактулоза применяется как слабительное и пребиотик. Наличие данных изомеров усложняет количественное определение лактозы в исследуемых образцах (Marvelous 2024).

Материалы и методы исследования

Оценка биосовместимости культур микроорганизмов для отбора совместимых между собой штаммов

Исследование биосовместимости активных в качестве пробиотиков и лактозоутилизирующих штаммов МКБ и дрожжей проводили методом совместного культивирования Глушановой Н. А. на плотной питательной среде (Глушанова 2005).

Суточную культуру наносили на поверхность плотной питательной среды бактериальной петлей диаметром 3 мм. После впитывания капли, отступив 1-2 мм от ее края, на поверхность той же среды наносили в том же объеме каплю другой испытуемой культуры, которая, растекаясь, примерно наполовину покрывала первую каплю.

В наложенной части культуры развиваются при взаимном присутствии, конкурируя друг с другом. После подсыхания второй капли чашки

с посевами переворачивали вверх дном и инкубировали при 37–39 °С.

Каждый опыт был поставлен дважды со смешанной комбинацией культур (для исключения влияния последовательности наложения капель на характер роста в зоне совместного культивирования). Контролем служили капли одной и той же культуры, наложенные друг на друга по описанной выше методике.

Учет результатов проводили через 24 и 48 часов после начала инкубации. При задержке роста одной из исследуемых культур взаимоотношения между ними рассматривались как антагонистические, а сами культуры относили в категорию бионесовместимых. Культуры считались биосовместимыми в случае обнаружения полного «слияния» пятен или усиления роста исследуемых штаммов в зоне совместного культивирования. Если одна из культур в зоне совместного культивирования «выходила наверх», подавляя рост второй культуры, независимо от последовательности нанесения, такой вариант расценивался как слабый антагонизм.

Наличие хорошо выраженной зоны угнетения (задержки роста) одной культуры по периферии пятна другой испытуемой культуры расценивалось как признак сильного антагонизма. Опыт проводился путем трехкратного повторения.

Метод определения максимального показателя жизнеспособности культур микроорганизмов

Оценка показателя ЖСП культур микроорганизмов проводилась методом Miles & Misra (Скородумов 2005).

Приготовление разведений: культуру смывали в отдельную пробирку питательным бульоном, подходящим для культуры; для приготовления разведений стерильную водопроводную воду или физиологический раствор разливали по 9 мл; в первую пробирку вносили 1 мл начальной взвеси – это 1-е разведение (10^{-1}); титрование проводили до 10^{-12} степени.

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата.

Посев в среду и регистрация результатов. Наружную заднюю часть чашки Петри разделяли на восемь равных секторов. На поверхность среды по секторам стерильной пипеткой (наконечником) наносили «капель» точно измерен-

ный объем бактериальной взвеси (20 мкл). Посевы на плотную среду проводили, как правило, из восьми последних разведений и осуществляли разными пипетками (наконечниками). Пипетку держали строго вертикально. Капли не растирали – можно было несколько увеличить их площадь, слегка покачивая чашку Петри. Посевы инкубируют и затем определяют количество выросших колоний. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, где происходила инкубация.

Подсчет клеток. Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле 1:

$$M = a \times 10^n \times V \times 50, \quad (1)$$

где M – количество клеток в 1 мл;

a – среднее число колоний при высевах разведения, из которого сделан посев;

10^n – коэффициент разведений;

V – объем суспензии, взятой для посева, в мл;

50 – коэффициент пересчета из мкл в мл.

Метод определения кислотообразующей активности (°Т)

Кислотообразующую активность МКБ и дрожжей определяли методом Тернера (Банникова 1987), по которому производят оценку количества титруемой молочной кислоты, накапливаемой бактериями в молоке за 17 часов. Для этого культуру засевают в обезжиренное молоко в соотношении 0,1 мл на 10 мл и ставят в термостат на 17 часов при 37 °С. После чего этот объем разбавляют 20 мл дистиллированной воды и добавляют 1-2 капли фенолфталеина. Титрование проводят раствором NaOH, результаты фиксируют появлением устойчивой розовой окраски и выражают в градусах Тернера, которые рассчитывают по формуле 3:

$$K = X \times 10 \quad (3)$$

где X – это количество NaOH в мл, который расходуется на титрование;

10 – коэффициент перевода в градусы.

Перед посевом обязательно нужно провести определение кислотности молока, так как могут иметься некоторые отклонения. Нормой являются показатели в 16–18 °Т.

Статистическая обработка между полученными средними значениями, осуществлялась

при помощи Independent Student's t-test (SPSS 23 IBM Corp., Armonk, New York, USA).

Результаты исследования и их обсуждение

Фактором возникновения вторичной лактазной недостаточности являются заболевания желудочно-кишечного тракта, что приводит к нарушению усвоения лактозы. Данное заболевание чаще проявляется в пожилом возрасте. Обобщенные результаты клинических и доклинических исследований показывают, что ферментация лактобактерий может повысить усвоение кальция и помочь в профилактике остеопороза (He 2024).

Joаquin Lozano и другими биологами также была собрана коллекция штаммов лактобактерий, выделенных из местных натуральных сывороточных заквасок. Прежде чем использовать

эти штаммы в качестве заквасок, ученые провели исследование их устойчивости к низкому рН и желчным солям, а также проанализировали их способность проходить через желудочно-кишечный тракт, основываясь на данных, полученных в ходе экспериментов *in vitro* (Lozano 2022).

В результате выделения из домашних молочных продуктов Акмолинской области были идентифицированы молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*. Было получено около 110 изолятов молочнокислых бактерий. Для разработки будущей безлактозной закваски выделенные штаммы были изучены на биосовместимость. В ходе проведенных исследований было разработано 16 вариантов консорциумов для будущей пробиотической безлактозной закваски на основе нескольких штаммов. Результаты по поиску совместимых культур представлены в таблице 1.

Таблица 1

Бионапитки на основе совместимых и несовместимых штаммов молочнокислых бактерий

Варианты пробиотической безлактозной закваски	Штаммы	Результаты совместимости
1	<i>L.rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	–
2	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. fermentum</i>	+
3	<i>L. gorillae</i> + <i>L. pentosaceus</i>	–
4	<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. fermentum</i>	–
5	<i>LB. acidophilus</i> + <i>L. paracasei</i>	+
6	<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. paracasei</i>	–
7	<i>L. paracasei</i> + <i>L. fermentum</i>	+
8	<i>L. gorillae</i> + <i>L. paracasei</i>	–
9	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i>	+
10	<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. acidophilus</i>	–
11	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. fermentum</i>	+
12	<i>L. acidophilus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	–
13	<i>L. fermentum</i> + <i>L. gorillae</i>	–
14	<i>L. paracasei</i> + <i>L. fermentum</i>	+
15	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. gorillae</i>	–
16	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. paracasei</i>	+

Согласно таблице 1 из представленных 16 вариантов бионапитков только 7 оказались совместимы. Совместимые варианты пробиотической безлактозной закваски представлены под номерами № 2 – *L. rhamnosus* и *L. fermentum*, № 5 – *L.*

acidophilus и *L. paracasei*, № 7 – *L. paracasei* и *L. fermentum*, № 9 – *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*, № 11 – *L. acidophilus* и *L. fermentum*, № 14 – *L. paracasei* и *L. fermentum*, № 16 – *L. rhamnosus* и *L. paracasei*.

Аналогичная работа была проведена авторами Facioni et.al, представившими обзор молочных продуктов без лактозы, помогающих людям с непереносимостью лактозы выбирать более подходящий продукт на рынке. Безлактозное коровье молоко доступно во многих странах в различных формах: сыры, йогурты и другие ферментативные продукты. Проведенные исследования доказали, что потенциальные 8 пробиотических бактерий – *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*,

Lactobacillus rhamnosus, *Saccharomyces boulardii* и *Streptococcus thermophilus* в ферментативных и неферментативных молочных продуктах могут быть использованы для уменьшения клинических симптомов лактозной непереносимости (Facioni 2020).

Для того, чтобы определить количественный выход биомассы исследуемых культур в консорциуме. Далее были изучены жизнеспособность штаммов лактобактерий при совместном культивировании. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Жизнеспособность совместимых молочнокислых бактерий в консорциуме смешанных культур

№	Штаммы	Жизнеспособность, КОЕ/мл
1 вариант консорциума из смешанных культур	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. fermentum</i>	4×10^6 КОЕ/мл
3 вариант консорциума из смешанных культур	<i>L. paracasei</i> + <i>L. fermentum</i>	3×10^6 КОЕ/мл
4 вариант консорциума из смешанных культур	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. paracasei</i>	3×10^6 КОЕ/мл
6 вариант консорциума из смешанных культур	<i>L. paracasei</i> + <i>L. fermentum</i>	5×10^6 КОЕ/мл
8 вариант консорциума из смешанных культур	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. paracasei</i>	4×10^6 КОЕ/мл
10 вариант консорциума из смешанных культур	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i>	5×10^6 КОЕ/мл
11 вариант консорциума из смешанных культур	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. fermentum</i>	4×10^6 КОЕ/мл

По результатам проведенных исследований 7 совместимых вариантов в результате совместного культивирования имели положительную динамику роста. Жизнеспособность варьировалась от 3×10^6 КОЕ/мл до 5×10^6 КОЕ/мл (таблица 2).

Похожие исследования были проведены со штаммом *Lactobacillus plantarum*. В ходе экспериментов оценивались жизнеспособность и активность в коммерческой жидкой питательной среде МРС после инокуляции. Полученный продукт хранился при температуре 4 °С, что обеспечивало высокую жизнеспособность клеток на протяжении 56 дней, при этом уровень молочной кислоты достигал 80 %. Этот метод производства молочных заквасок является экологически чистым и недорогим (Brizuela 2021).

Как известно, *Lactobacillus* – это группа молочнокислых бактерий, играющих важную роль в здоровье человека, особенно в формировании микробиоты и иммунной системы. Большинство исследований указывают на пользу *Lactobacillus* в качестве пробиотиков при взаимодействии с компонентами слизистой оболочки тонкого ки-

шечника, что способствует развитию иммунной системы (Heczko 2024).

Проведенные исследования авторов Mann, S и других показали, что бактерии рода *Lactobacillus* являются безопасными, так как они продемонстрировали ингибирующее действие на рост анаэробных условно-патогенных микроорганизмов. Кроме этого, эти бактерии обладают биологической активностью благодаря своей способности к клеточной адгезии (Mann 2021).

Так как потребители особое внимание уделяют органолептическим показателям, производители молочных продуктов без лактозы придают большое значение сенсорным характеристикам. Более популярным методом в фабричном производстве безлактозных кисломолочных продуктов является использование лактазы для гидролиза лактозы в галактозу и глюкозу. Используемая коммерческая лактаза вызывает неферментативное потемнение и «неприятные» привкусы, вызванные высвобождением пептидов и свободных аминокислот в процессе протектической активности. В связи с этим авторы утверждают, что использование лактозуоли-

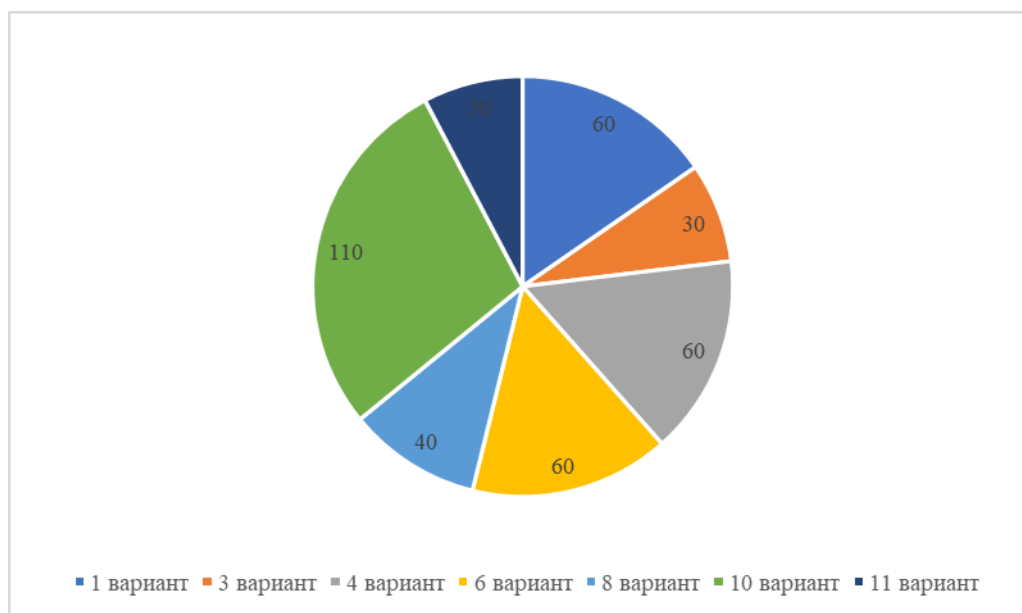
зирующих кисломолочных бактерий является наиболее надежным субстратом не только по пробиотическому действию, но по органолептическим показателям (Araújo 2022).

На основании вышеизложенного в данном исследовании была изучена кислотообразующая способность совместимых заквасочных

культур молочнокислых бактерий. Так как во время ферментации лактозы происходит выделение большого количества молочной кислоты, которое может влиять на органолептические свойства. Результаты исследования по кислотообразующей способности представлены на рисунке 1.

Рисунок 1

Кислотообразующая способность совместимых консорциумов (°Т)



Согласно данным рисунка 1 совместимые консорциумы имели различную кислотообразующую способность. Вариант консорциума № 2: *L. rhamnosus* и *L. Fermentum* – 30 °Т, №5: *L. acidophilus* и *L. Paracasei* – 60 °Т, №7: *L. paracasei* и *L. Fermentum* – 40 °Т, № 9: *L. acidophilus* и *L. rhamnosus* – 60 °Т, №14: *L. paracasei* и *L. Fermentum* – 60 °Т, №16: *L. rhamnosus* и *L. Paracasei* – 30 °Т. Наибольшую кислотообразующую способность имел вариант под номером 11: *L. acidophilus* и *L. Fermentum* – 110 °Т.

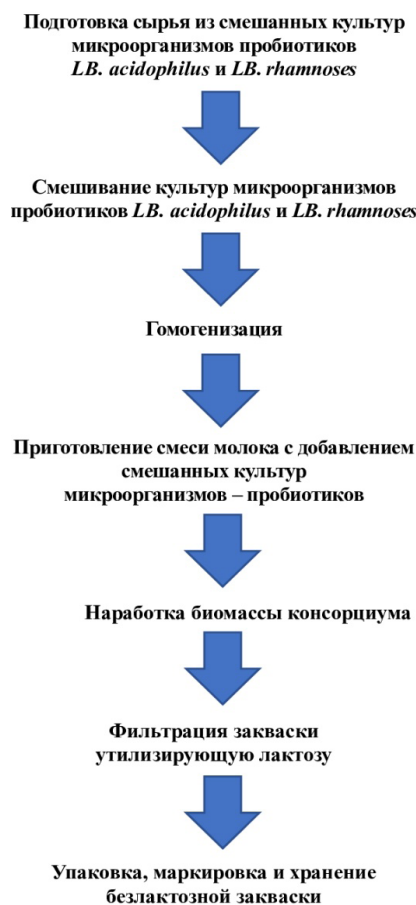
Исследования Ibrahim S.A. и др. показали, что переваривание лактозы и симптомы непереносимости лактозы могут быть улучшены с помощью пробиотиков, которые изменяют pH кишечника, экспрессируют β-галактозидазу и оказывают положительное влияние на кишечную активность и общую микробиоту толстой кишки за счет кислотообразующей способности. Во время ферментации лактазы присутствующая

в молочнокислых бактериях β-галактозидаза расщепляет неабсорбированную лактозу до глюкозы и галактозы, а затем всасывается в организм (Taeger 2021).

На основе полученных результатов текущего исследования выделенных штаммов молочнокислых бактерий была установлена совместимость вариантов консорциума из смешанных культур – № 2, № 5, № 7, № 9, № 11, № 14, № 16 и несовместимость – № 1, № 3, № 4, № 6, № 8, № 10, № 12, № 13, № 15 между собой. Все совместимые культуры обладали высокой жизнеспособностью до 5×10^6 КОЕ/мл. Наибольшей кислотообразующей способностью обладает вариант № 11 на основе штаммов *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*. В результате для объектов в качестве безлактозной закваски были выбраны штаммы *L. acidophilus* и *L. rhamnosus* и была разработана технологическая схема, представленная на рисунке 2.

Рисунок 2

Технологическая схема получения безлактозной закваски



1. Первый этап – подготовка сырья. Для бактериальной закваски в качестве основы было использовано пастеризованное молоко в объеме 1000 мл, предварительно прошедшее термическую обработку. В качестве консорциума был выбран вариант № 11, состоящий из чистых культур *L. acidophilus* и *L. rhamnoses*, которые были внесены в стерильное молоко в концентрации 500 мл.

2. Второй этап – смешивание. На этом этапе многостаммовую лактосбраживающую закваску на основе молочнокислых бактерий *L. acidophilus* и *L. rhamnoses* тщательно перемешивали в течение 15 минут со скоростью 150 об/мин при температуре 37 °С на шейкере (Innova 44R, США).

3. Третий этап – гомогенизация при температуре 55 °С, 16,5 МПа, что позволило улучшить консистенцию молока и снизить риск отделения сыворотки.

4. Четвертый этап – наработка биомассы лактосбраживающих штаммов *L. acidophilus* и *L.*

rhamnoses. Исследования проводилось в течение 60 минут до образования сгустка в ферментере Sartorius Biostat AMO Uni Vessel Glass 1L 230V. Оборудование оснащено системой контроля температуры, установленный температурный режим – 25 °С при 120 оборотах.

5. Пятый этап – фильтрация. Готовую лактосбраживающую закваску отфильтровывали через сито с диаметром ячеек 65 мм для удаления крупных сгустков.

6. Шестой этап – упаковка готового безлактозного молочного продукта в миллилитровую вакуумную пробирку или стеклянную тару.

7. Седьмой этап – разработка технологического регламента.

Полученная в данном исследовании закваска, состоящая из *L. acidophilus* и *L. rhamnoses*, имеющих пробиотические и лактозоутилизирующие свойства, предназначена для приготовления безлактозного молочного продукта. Для изготовления закваски 1-2 литра пастеризованного обезжиренного молока (2,5 %) доводили до температуры 95 °С, охлаждали до комнатной температуры (25 °С). Затем вносили 500 мл безлактозной закваски и тщательно размешивали. Полученную закваску отстаивали в холодильнике при температуре +5 °С в течение 8–12 часов. Через 8–12 часов наблюдалось образование плотного сгустка. Закваска была готова к употреблению. Рекомендуемая норма расхода составляла 500 мл безлактозной закваски на 1 литр молока. Срок годности закваски не превышал 36 часов при температуре +5 °С вдали от прямых солнечных лучей.

Аналогичное исследование, в котором осуществлялся ферментативный гидролиз лактозы, было проведено авторами Li и др. Нейтральная лактаза добавлялась в молоко во время перемешивания до полного гидролиза лактозы. Затем молоко пастеризовали при высоких температурах, чтобы предотвратить микробное загрязнение. Завершающим этапом была упаковка полученного продукта (Li 2023). В нашем исследовании использовались бактерии рода *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus rhamnoses*, так как лактобактерии являются наиболее богатым источником β-галактозидазы.

Коллективом авторов Abdella M. также проведено исследование по иммобилизации β-галактозидазы в лимонной цедре и гранулах альгината, также и в свободной форме β-галактозидазы. В ходе исследования иммобилизованный фермент показал устойчивость

к температуре 50 °С и рН 5,0, а также высокую стабильность при хранении при 4 °С, сохраняя 95 %-ую активность в течении 21-дневного хранения. Разработка данного фермента способствовала не только расщеплению лактозы на глюкозу и галактозу, но и улучшению антиоксидантных свойств (Abdella 2024).

В проведенном исследовании для разработки технологической схемы получения безлактозной закваски была использована температура сквашивания на уровне 37 °С. Исследование Vi и др. подтверждает, что температура сквашивания влияет на эффективность гидролиза лактозы (Vi 2023). Оптимальной температурой для данного процесса была определена 37 °С, при которой скорость гидролиза лактозы составила 79 %. Однако, при повышении температуры до 40 °С скорость гидролиза снизилась до 65 %, $p > 0,05$.

Заключение

По результатам проведенных исследований, было разработано 16 вариантов для определения совместимых и несовместимых штаммов, из которых 7 оказались биосовместимы и были выбраны для дальнейших экспериментов по разработке технологической схемы для получения закваски в жидкой форме. У 7 совместимых вариантов была изучена максимальная жизнеспособность и кислотообразующая способность. В результате полученных исследований консорциум № 11 обладал наибольшей кислотообразующей способностью, равной 110 °Т. На основе этого консорциума, состоящего из штаммов *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*, была разработана технологическая схема получения безлактозной закваски.

Исследование показало, что совместное культивирование нескольких заквасочных куль-

тур обеспечивает более эффективное снижение уровня лактозы и ускорение метаболизма галактозы по сравнению с другими методами ферментации. Кроме этого, органолептический анализ показал, что ферментированный продукт оказался приемлемым для потребителей по внешнему виду, текстуре и вкусу.

В результате исследований было установлено, что наиболее экономически выгодным и безопасными штаммами для разработки безлактозной закваски являются штаммы, выделенные из домашних кисломолочных продуктов. Получен акт внедрения, разработан технологический регламент, а также прописан способ приготовления и инструкция по применению разработанной безлактозной закваски. В настоящее время планируются работы по внедрению этой технологии в производство.

Благодарности

Автор статьи благодарен Астанинскому филиалу «Казахский научно-исследовательский институт пищевой и перерабатывающей промышленности», лаборатории «Микробиология и биотехнология» для предоставления возможности проведения исследования в рамках проекта.

Источник финансирования

Работа выполнялась в рамках научного проекта 0118РК00553 «Технология производства безлактозных кисломолочных продуктов» (2018–2021 гг.) по программе основанной на BR05236766-OT-20 «Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или научно-технической деятельности» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- Agarwal, V., & Varadwaj, P. (2023). An Extensive Review on β -lactamase Enzymes and their Inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 30(7), 783–808. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220620165429>
- Aili, L., & Zheng, X.H. (2023). Health implication of lactose intolerance and updates on its dietary management. *International dairy journal*, 140, 105–608. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105608>
- Garate, J., & Salleres, S. (2022). Quantification of Lactose in Lactose-Free and Low-Lactose Milk and Milk Products by BIOMILK 300 Lac Biosensor: First Action 2020.09. *Journal of AOAC International*, 105(3), 759–773. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab164>
- Kable, M. E., & Lemay, D. G. (2023). Association of Estimated Daily Lactose Consumption, Lactase Persistence Genotype (rs4988235), and Gut Microbiota in Healthy Adults in the United States. *The Journal of nutrition*, 153(8), 2163–2173. <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2023.06.025>
- Widyastuti, Y., & Tidona, F. (2021). Health-Promoting Properties of Lactobacilli in Fermented Dairy Products. *Frontiers in microbiology*, 12, 673–890. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673890>

- Zommara, M., & Ghanimah, M. (2023). Probiotic and technological characterization of selected *Lactobacillus* strains isolated from different Egyptian cheeses. *BMC microbiology*, 23(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02890-1>
- Kalathinathan, P., & Kodiveri, M. G. (2023). A Review on the Various Sources of β -Galactosidase and Its Lactose Hydrolysis Property. *Current microbiology*, 80(4), 122. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03220-4>
- Sousa, M. A., & Granada, C. E. (2020). Acid lactic lactobacilli as a biotechnological tool to improve food quality and human health. *Biotechnology progress*, 36(2), 29–37. <https://doi.org/10.1002/btpr.2937>.
- Mohammed, T., & Abdelmoneim, A. (2022). Potential probiotics and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt-like products. *LWT*, 159(10), 113–207.
- Li, L., & Xiao, G. (2023). Physicochemical, microbiological, and sensory properties of low-lactose yogurt using *Streptococcus thermophilus* with high β -galactosidase activity. *Journal of the science of food and agriculture*, 103(15), 7374–7380. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12840>
- Kayacan, S., & Dertli, E. (2023). Isolation and characterization of yogurt starter cultures from traditional yogurts and growth kinetics of selected cultures under lab-scale fermentation. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 53(4), 454–463. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2098325>
- Ibrahim, S. A., & Krastanov, A. (2021). Fermented foods and probiotics: An approach to lactose intolerance. *The Journal of dairy research*, 88(3), 357–365. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000625>
- Katoch, G. K., & Rasane, P. (2022). Lactose Intolerance and Its Dietary Management: An Update. *Journal of the American Nutrition Association*, 41(4), 424–434. <https://doi.org/10.1080/07315724.2021.1891587>
- Zhang, S. S., & Kong, J. (2020). Low-sugar yogurt making by the co-cultivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 with yogurt starter cultures. *Journal of dairy science*, 103(4), 3045–3054. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17347>
- Toca, M. D. C., & Vinderola, G. (2022). Lactose intolerance: myths and facts. An update. Intolerancia a la lactosa: mitos y verdades. Actualización. *Archivos argentinos de pediatría*, 120(1), 59–66. <https://doi.org/10.5546/aap.2022.eng.59>
- Korc, E., & Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 375–384. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.014>
- Marvelous, C., & Brouwer, H. J. (2024). Evaluation of a novel stationary phase for the separation of lactose and isomers in lactose-free products using high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Journal of chromatography. A*, 1716, 464–661. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464661>
- Глушанова, Н.А. (2005). Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника: Автореф. дисс. ... д. м. н.
- Скородумов, Д.И., & Субботин, В.В. (2005). *Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных*. Изобраф.
- Банникова, Л.А., & Семинихина, В.Ф. (1987). *Микробиологические основы молочного производства*. Агропромиздат.
- He, W., & Nie, S. P. (2024). Lactobacilli and Their Fermented Foods as a Promising Strategy for Enhancing Bone Mineral Density: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 72(32), 17730–17745. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c03218>
- Lozano, J., & Zunino, P. (2022). Probiotic potential of GABA-producing lactobacilli isolated from Uruguayan artisanal cheese starter cultures. *Journal of applied microbiology*, 133(3), 1610–1619. <https://doi.org/10.1111/jam.15664>
- Facioni, M. S., & Cena, H. (2020). Nutritional management of lactose intolerance: the importance of diet and food labelling. *Journal of translational medicine*, 18(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02429-2>
- Brizuela, N. S., & Tymczynszyn, E. E. (2021). Whey permeate as a substrate for the production of freeze-dried *Lactiplantibacillus plantarum* to be used as a malolactic starter culture. *World journal of microbiology & biotechnology*, 37(7), 115. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03088-1>
- Heczko, P. B., & Strus, M. (2024). Importance of Lactobacilli for Human Health. *Microorganisms*, 12(12), 23–82. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122382>
- Mann, S., & Ku, S. (2021). Oral probiotic activities and biosafety of *Lactobacillus gasseri* HHuMIN D. *Microbial cell factories*, 20(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01563-w>
- Araújo, N. G., & Cardarelli, H. R. (2022). Development and characterization of lactose-free probiotic goat milk beverage with bioactive rich jambo pulp. *Journal of food science and technology*, 59(10), 3806–3818. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05399-z>
- Taeger, M., & Thiele, S. (2021). Additional costs of lactose-reduced diets: lactose-free dairy product substitutes are a cost-effective alternative for people with lactose intolerance. *Public health nutrition*, 24(13), 4043–4053. <https://doi.org/10.1017/S1368980021002779>
- Li, A., & Lu, Y. (2023). Advances in Low-Lactose/Lactose-Free Dairy Products and Their Production. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(13), 2553. <https://doi.org/10.3390/foods12132553>
- Abdella, M. A. A., & Hassan, M. E. (2024). Covalent immobilization of β -galactosidase using a novel carrier alginate/tea waste: statistical optimization of beads modification and reusability. *Bioprocess and biosystems engineering*, 47(2), 249–261. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02959-1>
- Bi, H., & Na, Z. (2023). Influence of Pasteurization on Maillard Reaction in Lactose-Free Milk. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(20), 7105. <https://doi.org/10.3390/molecules28207105>

Сведения об авторе:

Иманбаева Мадина Каиртаевна (корреспондентный автор) – докторант кафедры «Общей биологии и геномики» НАО «Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева»; старший преподаватель кафедры «Гистология и цитология» НАО Медицинский университет Астана (Астана, Казахстан, e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru).

Information about author:

Imanbayeva Madina Kairtaevna (corresponding author) – doctoral student of the Department of «General biology and genomics» NJSC «L.N. Gumilev Eurasian National University»; Senior Lecturer of the Department of «Histology and cytology» NJSC «Astana Medical University» (Astana, Kazakhstan, e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru).

Автор туралы мәлімет:

Иманбаева Мадина Каиртаевна (корреспондент-автор) – Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті КеАҚ «Жалпы биология және геномика» кафедрасының докторанты; Астана медицина университеті КеАҚ «Гистология және цитология» кафедрасының аға оқушысы (Астана, Қазақстан, e-mail: imanbaeva_madina@inbox.ru).

Поступило 12 июля 2025 года

Принято 20 февраля 2026 года