

УДК 641.1:616.33:616.34

Исследование пробиотических свойств бактериального концентрата

Арктический государственный
агротехнологический университет

Т. Н. Занданова

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Занданова Туяна Нимбуевна

Адрес: 677007, город Якутск,

ш. Сергеляхское, 3 км, д. 3

E-mail: tuyana35@mail.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования
доступны по запросу

у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Занданова, Т. Н. (2022). Исследование пробиотических свойств бактериального концентрата. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (3).

<https://doi.org/10.36107/spfp.2022.311>

ПОСТУПИЛА: 09.04.2022

ПРИНЯТА: 25.08.2022

ОПУБЛИКОВАНА: 30.09.2022

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

автор сообщает об отсутствии
конфликта интересов.



АННОТАЦИЯ

Введение. Применение поликомпонентных пробиотиков при лечении дисбактериозов обеспечивает комплексное воздействие различных метаболитов на кишечную микробиоту. Многоштабные микробные сообщества обладают более высоким адаптационным потенциалом в сравнении с моновидными препаратами. Однако, создание многоштабных микробных сообществ требует тщательного подбора по их биосовместимости. Разработка новых подходов к созданию поликомпонентных пробиотических препаратов является актуальной проблемой.

Цель работы. Исследовать пробиотические свойства замороженного бактериального концентрата, полученного микробного консорциума.

Материалы и методы. Для исследования использовали замороженный бактериальный концентрат микробного консорциума, полученный путем наращивания биомассы на питательной среде из творожной сыворотки с добавлением ростовых компонентов. Для получения микробного консорциума использовали новый подход к формированию его состава - автоотбор микробиоты кефирной грибковой закваски при pH 3–4. В работе использованы современные общепринятые методы количественного учета микроорганизмов, устойчивости к желчи и низкой активной кислотности, адгезивной и антибиотической активности.

Результаты. Установлено что, микробиота бактериального концентрата способна к росту на питательной среде с 20 % желчи и активной кислотности среды pH2, проявляет высокоадгезивные свойства и антагонистическую активность по отношению к широкому спектру патогенных и условно-патогенных бактерий.

Выводы. Полученные данные указывают на сохранение исходных свойств микробного консорциума после замораживания и возможности применения бактериального концентрата в качестве эффективной биологически активной добавки к пище для профилактики дисбиоза кишечной микробиоты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

пробиотики, молочнокислые бактерии, курунга, кумыс, адгезия, антибиотическая активность, устойчивость к желчи

Probiotic Properties Study of Bacterial Concentrate

Arctic State Agrotechnological University

Tuyana N. Zandanova

CORRESPONDENCE:

Tuyana N. Zandanova

Address: 677007, Yakutsk city, 3,
Sergelyakhskoe sh. 3 km,
E-mail: tuyana35@mail.ru

FOR CITATIONS:

Zandanova, T. N. (2022). Probiotic properties study of bacterial concentrate. *Storage and Processing of Farm Products*, (3). <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.311>

RECEIVED: 09.04.2022

ACCEPTED: 25.08.2022

PUBLISHED: 30.09.2022

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Background. The use of multicomponent probiotics in the treatment of dysbiosis provides a complex effect of various metabolites on the intestinal microbiota. Multi-strain microbial communities have a higher adaptive potential compared to single-species preparations. However, the creation of multi-strain microbial communities requires careful selection for their biocompatibility. The development of new approaches to the creation of multicomponent probiotic preparations is an urgent problem.

Purpose. The aim of the work is to study the probiotic properties of a frozen bacterial concentrate obtained by us from a microbial consortium.

Materials and Methods. The frozen bacterial concentrate of the microbial consortium, obtained by increasing the biomass on a nutrient medium from curd whey with the addition of growth components, used for the study. To obtain a microbial consortium, a new approach to the formation of its composition was used - autoselection of the microflora of kefir fungal starter at pH 3-4. The work uses modern generally accepted methods for quantitative accounting of microorganisms, resistance to bile and low active acidity, adhesive and anti-biotic activity.

Results. It found that the microflora of the bacterial concentrate is capable of growing on a nutrient medium with 20 % bile and active acidity of the pH2 medium, exhibits highly adhesive properties and antagonistic activity against a wide range of pathogenic and opportunistic bacteria.

Conclusions. The data obtained indicate the preservation of the original properties of the microbial consortium after freezing and the possibility of using the bacterial concentrate as an effective biologically active food supplement for the prevention of intestinal microbiota dysbiosis.

KEYWORDS

probiotics, lactic acid bacteria, kurunga, koumiss, adhesion, antibiotic activity, bile resistance

ВВЕДЕНИЕ

Пробиотики необходимы для поддержания и восстановления микробиологического статуса человека. Такие факторы как ухудшение экологии, стрессы, применение консервантов в продуктах питания, заболевания являются причинами развития дисбактериоза. Эпигенетические механизмы регуляции клеток организма могут быть нарушены при развитии дисбиоза кишечной микробиоты. Измененная микрофлора кишечника может вызывать развитие различных заболеваний, иммуно-опосредованные, метаболические, а также сердечно-сосудистые заболевания. Пробиотические бактерии оказывают многоуровневое воздействие на организм человека: восстановление нормальной микрофлоры кишечника, синтез биологически активных веществ, укрепление кишечного барьера, подавление роста патогенных и условно-патогенных бактерий (Мазанкова & Лыкова, 2004; Новик, 2006; Маягский, 2000).

Кишечный микробиом желудочно-кишечного тракта человека способен поддерживать его здоровье, гомеостаз и эпигеном. Существует связь между дисбактериозом кишечника и системными иммунными заболеваниями, включая воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), рассеянный склероз и аутоиммунные заболевания. Патогенные микроорганизмы способны при дисбактериозе повышать проницаемость кишечного барьера, вследствие чего патогены способны проникать в циркуляцию и вызывать ВЗК. Помимо того, γ -глутамилтрансферазы, секретируемые микробиотой кишечника в условиях дисбактериоза кишечника, приводят к измененной посттрансляционной модификации пептидов в просвете кишечника, активируя каскады иммунного ответа, которые инициируют патологические аутоиммунные процессы (Айтабаев и соавт., 2018; Qin, 2010).

Эффективность действия пробиотиков индивидуальна и зависит от их способности адаптироваться к эндоэкологии человека. Основными факторами, влияющими на рост бактерий в условиях желудочно-кишечного тракта, является активная кислотность среды, движение пищевых масс, концентрация желчи. Указанные факторы обуславливают неоднородную плотность микробных популяций на различных участках желудочно-кишечного тракта (Stark & Lee, 1982).

Поликомпонентные бактериальные сообщества обладают широким спектром полезных свойств (Каледина и соавт., 2019; Галимзянов и др., 2012; Кригер & Сюй, 2018; Тихомирова, 2014). Известно, что микрофлора национальных кисломолочных продуктов, таких как курунга и кумыс, способна подавлять развитие условно-патогенной и патогенной микрофлоры (Занданова и соавт., 2020; Занданова & Гоголева, 2018; Букачакова, 2013; Ермолаева и соавт., 2012; Календина и соавт., 2019). Доказано, что микрофлора этих продуктов проявляет антагонистическую активность по отношению *Staphylococcus aureus*, *Alcaligenes faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* и фунгицидное действие по отношению к *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula aurantiaca* (Стоянова, 2017). Вероятно, это связано с тем, что многокомпонентная микрофлора кумыса и курунги синтезирует комплекс бактериоцинов таких как диплококцин, низин, лактолин и др. (Стоянова и соавт., 2012; Лахтин и др., 2014). Так, было установлено, что сообщество лактобактерий *Lactobacillus gallinarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* и *Lactobacillus fermentum*, выделенных из курунги, кумыса, айрана и чегена, обладает высокой антагонистической активностью. Так, зона ингибирования роста *Escherichia coli* B-6954 — 33,2 мм, *Bacillus fastidiosus* B-5651 — 32,4 мм, *Pseudomonas fluorescens* B-3502 — 27,0 мм, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027—34,6 мм, *Leuconostoc mesenteroides* B-8404—31,7 мм, *Candida albicans* ATCC 885—653 — 32,2 мм, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923—30,2 мм. (Кригер, 2017; Кригер & Сюй, 2018, с.45–47).

Эффективность бактериальных препаратов определяется совокупностью биологических свойств штаммов, входящих в их состав. Спорозоносные аэробные бациллы (род *Bacillus*), энтерококки, пропионовокислые бактерии, аэрококки, сахаромикеты и высшие грибы (*Aspergillus*, *Risopus*, *Cordiceps*) являются составными компонентами рецептуры некоторых современных пробиотиков.

Современные клиники нуждаются в антидисбиозных препаратах и в расширении ассортимента пробиотиков. Большой интерес к поликомпонентным пробиотикам вызван тем, что введение симбиотических комплексов формируют в организме более

устойчивые биорезонансные системы эндосимбионтов, и на практике дают стабильные результаты (Алешкин и соавт., 2010).

Создание многокомпонентных препаратов проводится с помощью подбора культур на основе их биосовместимости. Использование чистых культур лактобактерий и дрожжей в заквасках не всегда позволяют воссоздать уникальную по своим свойствам микрофлору курунги и кумыса, известных своими лечебными свойствами. Одним из направлений получения мультиштаммовых препаратов является формирование естественной популяции микроорганизмов. В процессе проведения длительной автоселекции микрофлоры кефирной грибковой закваски с термофильными лактобактериями нами разработан способ получения симбиотической закваски при pH 3–4. Данный подход формирует симбиотический микробный консорциум, идентичный микрофлоре курунги и кумыса. В состав микробного консорциума входят термофильные и мезофильные лактобактерии, дрожжи сбраживающие и не сбраживающие лактозу, а также ацетобактерии.

Целью данной статьи явилось исследование пробиотических свойств бактериального концентрата микробного консорциума. Для решения поставленной цели в работе решались следующие задачи: (1) изучение устойчивости микрофлоры к низким pH и желчи; (2) исследование адгезивной и антагонистической активности микрофлоры бактериального концентрата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В качестве объекта исследования использовали замороженный бактериальный концентрат микробного консорциума, полученный путем наращивания биомассы на творожной сыворотке с добавлением ростовых компонентов. Для сравнительного анализа использовали исходный инокулят — микробный консорциум. Тест-штаммы микроорганизмов были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦ ЭСПИ» Министерства здравоохранения РФ.

Методы

Для исследования устойчивости к желчи использовали жидкие среды MRS, содержащие 20% и 40% желчи. Культивирование инокулированных питательных сред с различной концентрацией желчи проводили в течение 12 ч. В качестве контроля использовали посе́вы без добавления желчи.

Исследование проводили по ОФС.1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков». Для определения антагонистической активности использовали метод отсроченного антагонизма на плотной среде по задержке роста тест-штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Адгезивные свойства микробного консорциума и бактериального концентрата микробного консорциума оценивали по среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту участия эритроцитов (КУЭ); об адгезивности культур и микробного консорциума судили по индексу адгезивности микроорганизмов (ИАМ). Согласно методике микроорганизмы считали неадгезивными при ИАМ менее 1,75, низкоадгезивными — от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными — от 2,51 до 4,0; высокоадгезивными — при ИАМ более 4,0 (Брилис, 1986).

Оборудование и материалы

В процессе эксперимента использовался анализатор «БакТрак 4100», производства SY-LAB Geracte GmbH 2018 года выпуска. Способность бактерий переносить низкие значения pH оценивали по росту на питательной среде BiMedia 620A с pH 2,0.

Процедура исследования

Были проведены исследования антибиотической активности микробного консорциума и бактериального концентрата к тестовым изолятам из коллекции патогенной и условно-патогенной микрофлоры ИЭВС и ДВ СФНЦА РАН (г. Новосибирск).

Титры культур измеряли через 30, 60, 90 и 120 мин после посева. В качестве контроля служила питательная среда с pH 6,0. В контроле титр определяли через 120 мин.

Анализ данных

Все исследования проводили в трехкратной и пятикратной повторности. Обработка экспериментальных данных проводилась методами математического анализа с использованием программы Microsoft Office Excel. Для обработки данных была установлена степень вероятности безошибочного прогноза 95%. Оценку среднеквадратичного отклонения значения показателя проводили по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2},$$

где σ — среднеквадратичное отклонение; x_k — значение показателя; \bar{x} — среднее арифметическое значение показателя; n — кратность исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Важнейшей задачей при консервировании бактериального концентрата является сохранение жизнеспособности клеток и исходных пробиотических свойств инокулята (Хамнаева и соавт., 2016). Консервирование бактериального концентрата микробного консорциума проводили замораживанием в морозильной камере при -25°C со скоростью ох-

лаждения 100°C в минуту. После 24-часовой выдержки при -25°C флаконы размораживали в водяной бане при $(37-40)^\circ\text{C}$. Исследуемые образцы засевали в жидкие среды MRS, содержащих 20 % и 40 % желчи. Культивирование инокулированных питательных сред проводили в течение 12 ч. В качестве контроля использовали посе́вы без добавления желчи. Результаты исследования представлены в Таблице 1.

Из данных представленных в Таблице 1 следует, что микрофлора бактериального концентрата и микробного консорциума способна к росту на питательной среде с 20 % желчи (Шавыркина и соавт., 2017; Cagno, 2006).

Далее были проведены исследования по способности микрофлоры микробного консорциума и бактериального концентрата переносить низкие значения pH. Оценивали устойчивость бактерий по росту на питательной среде с pH 2,0. Титры культур измеряли через 30, 60, 90 и 120 мин после посева. Для сравнительного анализа использовали кефирную грибковую закваску.

В качестве контроля использовали питательную среду с pH 6,0. В контроле титр определяли через 120 мин. Результаты исследований представлены в Таблице 2.

Таблица 1

Устойчивость микрофлоры бактериального концентрата к желчи

№	Наименование образцов	Наличие помутнения инокулированной питательной среды после 12 часов культивирования		
		в питательной среде с 20 % желчи	в питательной среде с 40 % желчи	в питательной среде без добавления желчи
1	Бактериальный концентрат микробного консорциума	+	-	+
2	Закваска микробного консорциума на обезжиренном молоке	+	-	+

Таблица 2

Влияние pH на выживаемость микроорганизмов

Вид закваски	Интервал времени, мин					Контроль
	0	30	60	90	120	
	логарифм числа клеток/см ³					
Бактериальный концентрат	4,8 ± 0,08	4,8 ± 0,08	4,6 ± 0,17	4,4 ± 0,17	3,8 ± 0,08	6,8 ± 0,08
Микробный консорциум на обезжиренном молоке	3,8 ± 0,08	3,6 ± 0,17	3,4 ± 0,17	3,2 ± 0,08	2,8 ± 0,08	5,4 ± 0,17
Кефирная закваска	3,8 ± 0,08	3,4 ± 0,17	3,2 ± 0,08	2,8 ± 0,08	2,2 ± 0,08	5,4 ± 0,17

Из представленных в Таблице 2 данных видно, что снижение pH до 2 ед задерживает рост клеток во всех образцах. Вначале культивирования в течение 60 мин сохраняется исходный титр жизнеспособных бактерий в бактериальном концентрате, микробном консорциуме и кефирной закваске. Культивирование в течение 90 мин приводит к уменьшению количества бактерий в кефирной закваске на один порядок. Полученные данные свидетельствуют, что микрофлора бактериального концентрата и микробного консорциума более устойчива к активной кислотности среды pH 2. Вероятно, это связано с тем, что одним из факторов формирования микробного консорциума является длительная автоселекция микрофлоры кефирной грибковой закваски и термофильных лактобактерий при pH 3–4. Селективные условия формируют устойчивость микрофлоры к кислотному стрессу. Следовательно, сформированная при создании микробного консорциума устойчивость микрофлоры к низким значениям активной кислотности среды сохраняется в бактериальном концентрате.

Адаптация микроорганизмов к факторам внешней среды в процессе автоселекции обеспечивается механизмами, гарантирующими стабильность микробного консорциума. К таким механизмам относятся межклеточная когезия и адгезия бактерий.

Для изучения влияния условий культивирования на адаптационный потенциал микроорганизмов проводили изучение адгезивных свойств:

- чистых культур лактобактерий *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* культивируемые на стерилизованном обезжиренном молоке;
- микрофлоры бактериального концентрата, полученный культивированием микробного консорциума на питательной среде;

- микробного консорциума, полученного путем длительной автоселекции микрофлоры кефирной грибковой закваски.

Результаты исследования представлены в Таблице 3.

Из данных Таблицы 3 следует, что микробные сообщества проявляют более высокие адгезивные свойства. Из представленных данных следует, что чистые культуры проявляют средне — и низкоадгезивные свойства, а микробные сообщества высокоадгезивные свойства.

Полученные результаты подтверждают данные о том, что адгезивные свойства микроорганизмов зависят от физиологического состояния, вызванных адаптацией к внешним факторам. Высокие адгезивные свойства микроорганизмов способствует быстрой адаптации в условиях желудочно-кишечного тракта.

Антимикробная активность лактобактерий зависит от условий культивирования: активной кислотности, температуры культивирования, наличия питательных субстратов в среде и др. Исследования антагонистической активности бактериального концентрата и микробного консорциума проводили в Институте экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА Агробиотехнологий РАН. Результаты исследований представлены в Таблице 4.

Из Таблицы 4 видно, что испытуемые образцы проявляют антагонистическую активность против широкого круга грамм-положительных и отрицательных микроорганизмов. Из представленных данных видно, что в бактериальном концентрате сохраняются пробиотические свойства инокулята.

Таблица 3

Влияние условий культивирования на адгезивные свойства микроорганизмов

Наименование опыта	СПА	КУЭ	ИАМ	Адгезивные свойства
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3,3	78	2,9	Среднеадгезивные
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	1,73	72	2,4	Низкоадгезивным
Кефирная закваска	3,3	74	4,4	Высокоадгезивные
Бактериальный концентрат микробного консорциума	4,2	80	5,25	Высокоадгезивные
Микробный консорциум	3,8	78	4,8	Высокоадгезивные

Таблица 4

Антагонистическая активность микробного консорциума и бактериального концентрата по отношению к тестовым изолятам

№	Наименование изолята и музейных штаммов	Наличие антагонистической активности	
		Микробного консорциума	Бактериального концентрата
1	<i>Enterococcus faecalis</i> Изолят 253	+	+
2	<i>Enterococcus faecium</i> Изолят 2198	+	+
3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Изолят 2994	+	+
4	<i>Listeria monocytogenes</i> Изолят 1987	+	+
5	<i>Salmonella enterica</i> Изолят 2445	+	+
6	<i>Salmonella enterica</i> Изолят 2736	+	+
7	<i>Streptococcus bovis</i> Изолят 2109	+	+
8	<i>Klebsiella pneumonia</i> Изолят 2263	+	+
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Изолят 1287	-	-
10	<i>Enterobacter cloacae</i> Изолят 2198	+	+
11	<i>Citrobacter diversus</i> Изолят 2298	+	+
12	<i>Citrobacter freundii</i> Изолят 2019	+	+
13	<i>Klebsiella pneumonia</i> K1 5054	+	+
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+
15	<i>Shigella sonnei</i> I фазы 941	+	+
16	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+
19	<i>Bacillus subtilis</i> 534	+	+

Качественная характеристика замороженного бактериального концентрата представлена в Таблице 5.

Из данных Таблицы 5 можно сделать вывод, что полученный замороженный бактериальный концентрат характеризуется высокой концентрацией

жизнеспособных клеток и ферментирующей активностью, что делает возможным его применение беспересадочным методом для производства кисломолочных продуктов смешанного брожения, а также в качестве биологически активной добавки к пище (Крумликов и др., 2016).

Таблица 5

Качественная характеристика замороженного бактериального концентрата

Показатель	Значение показателя
Консистенция и внешний вид	Однородная жидкость. Допускается отделение сыворотки
Цвет	От кремового до светло-коричневого по всему объему, с темными включениями
Вкус и запах	Кисломолочный с привкусом ржаной муки
Массовая доля сухих веществ, %	7,2 ± 0,5
Активная кислотность (pH)	5 – 7
Температура сквашивания, °C	28 + 2
Активность (продолжительность сквашивания 10 л при внесении концентрата с 1 ед. активности), ч	10 – 12
Титруемая кислотность, °T	120
Температура при выпуске с предприятия, °C	6 ± 2

Показатель		Значение показателя
Продолжительность хранения, мес.		3
Количество микроорганизмов, КОЕ/см ³ , не менее:		
лактобактерии:		
термофильные		5 · 10 ¹⁰
мезофильные		4 · 10 ¹¹
дрожжи:		
не сбраживающие лактозу		3 · 10 ⁸
сбраживающие лактозу		2 · 10 ⁷
Микрокартина		Единичные тонкие палочки разной длины, единичные и скопления дрожжей
Объем бакконцентрата в см ³ , в котором отсутствуют:	БГКП (колиформы)	10
	<i>S. aureus</i>	10
	Патогенные, в том числе сальмонеллы	100

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходный инокулят для получения бактериального концентрата -микробный консорциум получают культивированием в течение 72 часов кефирной грибковой закваски и термофильных лактобактерий при pH 3–4. Известно, длительное нахождение лактобактерий в условиях кислотного стресса формирует фенотипически гетерогенное сообщество микроорганизмов (Gilbert et al., 2004), обладающее устойчивостью к неблагоприятным внешним условиям. К механизмам, формирующим устойчивость микробных сообществ, относятся изменение метаболизма микроорганизмов для поддержания роста (Serrazanetti et al., 2011), выработка бактериоцинов (Pang et al, 2022), экзополисахаридов (Caggianiello et al., 2016), уменьшение проницаемости клеточной мембраны путем перераспределения жирных кислот в ней (Fernandez et al., 2008; Wu et al, 2012).

Нами установлено, что микрофлора микробного консорциума и его бактериального концентрата способна сохранять жизнеспособность при концентрации желчи 20 % и активной кислотности pH 2.

При формировании гетерогенных микробных сообществ важную роль выполняет клеточная адгезия. Она необходима для клеточной коммуникации и регуляции, а также способствует развитию

бактерий в микробных сообществах. Механическое взаимодействие между клетками и внеклеточным матриксом влияет и контролирует функцию клеток (Khalili & Ahmad, 2015). Лактобактерии являются комменсалами, которые стабильно или временно колонизирует поверхности слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта человека (Arena et al., 2017). Высокоадгезивные свойства микробных сообществ повышает кишечно-адаптированный потенциал поликомпонентных препаратов.

Молочнокислые бактерии продуцируют бактериоцины, которые представляют собой антимикробные пептиды, синтезированные на рибосомах. Синтез бактериоцинов лактобактериями является одним из механизмов борьбы с конкурирующей микрофлорой (Tatsaporn & Kornkanok, 2020). По некоторым данным, повышение антибиотической активности при длительном кислотном стрессе может быть связано так же с изменением метаболизма клеток, переходом от катаболизма углеводов к катаболизму аминокислот (Zhang et al., 2012).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой антибиотической активности как микробного консорциума, так и бактериального концентрата к широкому спектру патогенных и условно-патогенных бактерий. Таким образом, селективные

условия формирования микробного консорциума обеспечивают высокий адаптационный потенциал и позволяет получить поликомпонентный бактериальный концентрат с пробиотическими свойствами.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты доказывают, что сформированные при длительном кислотном воздействии механизмы адаптации микроорганизмов при получении микробного консорциума сохраняются в ее

замороженном бактериальном концентрате. Бактериальный концентрат проявляет толерантность к высокой концентрации желчи и молочной кислоты, проявляет высокоадгезивные свойства и антибиотическую активность, и может быть рекомендован в качестве пробиотической биологически активной добавки к пище. Поликомпонентные пробиотики обеспечивают приживаемость бактерий в различных экологических нишах желудочно-кишечного тракта.

ЛИТЕРАТУРА

- Алешкин, А. В., Амерханова, А. М., Воропаева, Е. А., Ефимова, О. Г., Цейтлин, Г. Я., & Коновалова, М. В. (2010). Клинико-лабораторная оценка эффективности препарата «БифидумМульти» при диспансерном лечении онкобольных детей. *Медицинский альманах*, (1), 193–195.
- Брилис, В. И. (1986). Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. *Лабораторное дело*, (4), 210–214.
- Букачакова, Л. Ч. (2013). Исследование физико-химических и микробиологических показателей закваски алтайского кисломолочного напитка чеген. *Процессы и аппараты пищевых производств*, (3), 1–7.
- Галимзянов, Х. М., Башкина, О. А., Досмуханова, Э. Г., Абдрахманова, Р. О., Демина, Ю. З., Даудова, А. Д., Алешкин, А. В., Несвижский, Ю. В., Рыбкин, В. С., Афанасьев, С. С., Чикобава, М. Г., Аршба, И. М., Рубальский, М. О., & Рубальский, Е. О. (2018). Клиническое значение биопленкообразования у бактерий. *Астраханский медицинский журнал*, 13(4), 32–42. <https://doi.org/10.17021/2018.13.4.32.42>
- Ермолаева, А. Н. (2012). Изучение культур молочнокислых микроорганизмов выделенных из кумыса различных регионов Северного Казахстана. *Биотехнология, теория и практика*, (3), 87–90.
- Занданова, Т. Н., & Гоголева, П. А. (2018). Подбор питательной среды для получения бактериального концентрата микробного консорциума. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*, (5), 67–72.
- Занданова, Т. Н., Лосорова, Ю. Е., & Мырьянова, Т. П. (2020). Исследование возможности получения ассоциативной закваски для курунги. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*, (9), 185–192. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-9-185-192>
- Каледина, М. В., Федосова, А. Н., & Байдина, И. А. (2019). Антипатогенная активность национальных кисломолочных напитков. *Пищевая промышленность*, (10), 72–75. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10163>
- Кригер, О. В. (2017). Актуальные вопросы создания функциональных напитков с антибиотическими свойствами. *Актуальные вопросы индустрии напитков*, (1), 62–64.
- Кригер, О. В., & Сюй, В. (2018). Разработка поликомпонентного пробиотика на основе лактобактерий, выделенных из национальных кисломолочных продуктов. В *Инновации в пищевой биотехнологии: Сборник трудов Международного симпозиума* (с. 44–47). Кемерово: Кемеровский государственный университет.
- Крумликов, В. Ю., Остроумов, Л. А., Сухих, С. А., & Кригер, О. В. (2016). Подбор параметров стабилизации (замораживание и сушка) симбиотического консорциума с целью получения закваски прямого внесения. *Техника и технология пищевых производств*, (3), 25–30.
- Лактин, М. В., Афанасьев, С. С., Лактин, В. М., Алешкин, В. А., Караулов, А. В., Алешкин, А. В., Несвижский, Ю. В., Байракова, А. Л., Афанасьев, М. С., & Воропаева, Е. А. (2014). Влияние лектинов пробиотических бактерий на условно-патогенный и пробиотический компартменты микробиоценоза биотопа человека. *Астраханский медицинский журнал*, (9), 51–58.
- Мазанкова, Л. Н., & Лыкова, Е. А. (2004). Пробиотики: Характеристика препаратов и выбор в педиатрической практике. *Детские инфекции*, (1), 18–24.
- Маягский, А. Н. (2000). Дисбактериоз: Иллюзии и реальность. *Педиатрия*, (4), 80–88.
- Новик, Г. И. (2006). Биологическая активность микроорганизмов-пробионтов. *Прикладная биохимия и микробиология*, (2), 187–194.
- Стоянова, Л. Г. (2017). Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis subsp. lactis* с антимикробным действием. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, (5), 41–65. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2017-5-41-61>
- Стоянова, Л. Г., Устюгова, Е. А., & Нетрусов, А. И. (2012). Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: Разнообразие и свойства (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, (3), 259–275.

- Тихомирова, О. М. (2014). Перспективы использования метаболитов микроорганизмов ассоциации «Тибетский рис» для повышения чувствительности грибов к антимикотикам. *Успехи медицинской микологии*, (12), 439–441.
- Хамнаева, Н. И., Олмоева, В. Д., & Намсараева, З. М. (2016). Исследование антагонистической активности комбинированного инокулята на основе микробной ассоциации кефирных грибов. *Вестник Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления*, (4), 84–88.
- Шавыркина, Н. А., Обрезкова, М. В., & Малиновская, М. Г. (2017). Получение кисломолочного напитка на основе ацидофильно-дрожжевой закваски. *Ползуновский вестник*, (4), 42–46.
- Arena, M. P., Capozzi, V., Spano, G., & Fiocco, D. (2017). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2641–2657. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8182-z>
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M. & Spano, S. (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*.100.3877–3886. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7471-2>
- Cagno, R. (2006) Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using Caciotta cheese model system. *Int.Dairy J.* 16. 119–130.
- Fernandez, A., Ogawa, J., Penaud, S., Boudebouze, S., Ehrlich, D., van de Guchte, M., & Maguin, E. (2008). Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *Proteomics*, 8(15), 3154–3163. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200700974>
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., J. McBain A., H. Rickard, A., & W. Whyte, F. (2004) The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Advances in Microbial Physiology*. 46.203–256. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(02\)46005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(02)46005-5)
- Qin, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Stark, P. L., & Lee, A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of Medical Microbiology*, 15(2), 189–203. <https://doi.org/10.1099/00222615-15-2-189>

REFERENCES

- Aleshkin, A. V. Amerkhanova, A. M., Voropaeva, E. A., Efimova, O. G., Tseitlin, G. Ya., & Konovalova, M. V. (2010). Kliniko-laboratornaya otsenka effektivnosti preparata “Bifidum-Mul’ti” pri dispansernom lechenii onkologicheskikh detei [Clinical and laboratory evaluation of the effectiveness of the drug “Bifidumulti” in the dispensary treatment of children with cancer]. *Medsinskii al’manakh [Medical Almanac]*, (1), 193–195.
- Brilis, V. I. (1986). Metodika izucheniya adgezivnogo protsesa mikroorganizmov [Methods of studying the adhesive process of microorganisms]. *Laboratornoe delo [Laboratory Business]*, (4), 210–214.
- Bukachakova, L. Ch. (2013). Issledovanie fiziko-khimicheskikh i mikrobiologicheskikh pokazatelei zakvaski altaiskogo kislomolochnogo napitka chegen [Investigation of physico-chemical and microbiological parameters of the starter culture of the Altai fermented milk drink chegen]. *Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv [Processes and Devices of Food Production]*, (3), 1–7.
- Ermolaeva, A. N. (2012). Izuchenie kul’tur molochnokisllykh mikroorganizmov vydelennykh iz kumysa razlichnykh regionov Severnogo Kazakhstana [Study of cultures of lactic acid microorganisms isolated from koumiss from various regions of Northern Kazakhstan]. *Biotehnologiya, teoriya i praktika [Biotechnology, Theory and Practice]*, (3), 87–90.
- Galimzyanov, Kh. M., Bashkina, O. A., Dosmukhanova, E. G., Abdrakhmanova, R. O., Demina, Yu. Z., Daudova, A. D., Aleshkin, A. V., Nesvizhskii, Yu. V., Rybkin, V. S., Afanas’ev, S. S., Chikobava, M. G., Arshba, I. M., Rubal’skii, M. O., & Rubal’skii, E. O. (2018). Klinicheskoe znachenie bioplenkoobrazovaniya u bakterii [Clinical significance of biofilm formation in bacteria]. *Astrakhanskii meditsinskii zhurnal [Astrakhan Medical Journal]*, 13(4), 32–42. <https://doi.org/10.17021/2018.13.4.32.42>
- Kaledina, M. V., Fedosova, A. N., & Baidina, I. A. (2019). Antipatogennaya aktivnost’ natsional’nykh kislomolochnykh napitkov [Anti-pathogenic activity of national fermented milk drinks]. *Pishchevaya promyshlennost’ [Food Industry]*, (10), 72–75. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10163>
- Khamnaeva, N. I., Olmoeva, V. D., & Namsaraeva, Z. M. (2016). Issledovanie antagonistskoi aktivnosti kombinirovannogo inokulyata na osnove mikrobnoi assotsiatsii kefirnykh gribov [Study of the antagonistic activity of the combined inoculate based on the microbial association of kefir fungi]. *Vestnik Vostochno-Sibirskogo gosudarstvennogo universiteta tekhnologii i upravleniya [Bulletin of the East Siberian State University of Technology and Management]*, (4), 84–88.
- Kruger, O. V. (2017). Aktual’nye voprosy sozdaniya funktsional’nykh napitkov s antibioticheskimi svoistvami [Topical issues of creating functional drinks with antibiotic properties]. *Aktual’nye voprosy industrii napitkov [Current Issues of the Beverage Industry]*, (1), 62–64.
- Kruger, O. V., & Syui, V. (2018). Razrabotka polikomponentnogo probiotika na osnove laktobakterii, vydelennykh iz natsional’nykh kislomolochnykh produktov [Development of a multicomponent probiotic based on lactobacilli isolated from national fermented milk products]. In *Innovatsii v pishchevoi biotekhnologii: Sbornik trudov Mezhdunarodnoi nauchnoy konferentsii [Innovations in food biotechnology: Collection of papers of the International Scientific Conference]*. Novosibirsk: SibGPI. 10–14.

- arodnogo simpoziuma [Innovations in Food Biotechnology: Proceedings of the International Symposium] (pp. 44–47). Kemerovo: Kemerovskii gosudarstvennyi universitet.
- Krumlikov, V. Yu., Ostroumov, L. A., Sukhikh, S. A., & Kriger, O. V. (2016). Podbor parametrov stabilizatsii (zamrazhivanie i sushka) simbioticheskogo konsortsiuma s tsel'yu polucheniya zakvaski pryamogo vneseniya [Selection of stabilization parameters (freezing and drying) of the symbiotic consortium in order to obtain a starter culture of direct application]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv* [Equipment and technology of food production], (3), 25–30.
- Lakhtin, M. V., Afanas'ev, S. S., Lakhtin, V. M., Aleshkin, V. A., Karaulov, A. V., Aleshkin, A. V., Nesvizhskii, Yu. V., Bairakova, A. L., Afanas'ev, M. S., & Voropaeva, E. A. (2014). Vliyaniye lektinov probioticheskikh bakterii na uslovno-patogennyy i probioticheskii kompartmenty mikrobiotsenoza biotopa cheloveka [Influence of probiotic bacteria lectins on conditionally pathogenic and probiotic compartments of human biotope microbiocenosis]. *Astrakhanskii meditsinskii zhurnal* [Astrakhan Medical Journal], (9), 51–58.
- Mayagetskii, A. N. (2000). Disbakterioz: Illyuzii i real'nost' [Dysbiosis: Illusions and reality]. *Pediatrics* [Pediatrics], (4), 80–88.
- Mazankova, L. N., & Lykova, E. A. (2004). Probiotiki: Kharakteristika preparatov i vybor v pediatricheskoi praktike [Probiotics: Characteristics of drugs and choice in pediatric practice]. *Detskie infektsii* [Childhood Infections], (1), 18–24.
- Novik, G. I. (2006). Biologicheskaya aktivnost' mikroorganizmov-probiontov [Biological activity of probiont microorganisms]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], (2), 187–194.
- Shavyrkina, N. A., Obrezkova, M. V., & Malinovskaya, M. G. (2017). Poluchenie kislomolochnogo napitka na osnove atsidofil'no-drozhzhevoi zakvaski [Obtaining a fermented milk drink based on acidophilic yeast starter culture]. *Polzunovskii vestnik* [Polzunovsky Bulletin], (4), 42–46.
- Stoyanova, L. G. (2017). Vydelenie i identifikatsiya molochnokislykh bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* s antimikrobnym deistviem [Isolation and identification of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with antimicrobial action]. *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* [News of the Timiryazev Agricultural Academy], (5), 41–65. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2017-5-41-61>
- Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A., & Netrusov, A. I. (2012). Antimikrobnyye metabolity molochnokislykh bakterii: Raznoobrazie i svoystva (obzor) [Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria: Diversity and properties (review)]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], (3), 259–275.
- Tikhomirova, O. M. (2014). Perspektivy ispol'zovaniya metabolitov mikroorganizmov assotsiatsii "Tibetskii ris" dlya povysheniya chuvstvitel'nosti gribov k antimikotikam [Prospects for the use of metabolites of microorganisms of the association "Tibetan Rice" to increase the sensitivity of fungi to antimycotics]. *Uspekhi meditsinskoi mikologii* [Advances in Medical Mycology], (12), 439–441.
- Zandanova, T. N., & Gogoleva, P. A. (2018). Podbor pitatel'noi sredy dlya polucheniya bakterial'nogo konsentrata mikrobnogo konsortsiuma [Selection of a nutrient medium for obtaining bacterial concentrate of the microbial consortium]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Вестник Красноярского государственного аграрного университета], (5), 67–72.
- Zandanova, T. N., Losorova, Yu. E., & Myr'yanova, T. P. (2020). Issledovanie vozmozhnosti polucheniya assotsiativnoi zakvaski dlya kurungi [Investigation of the possibility of obtaining an associative starter culture for kurunga]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University], (9), 185–192. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-9-185-192>
- Arena, M. P., Capozzi, V., Spano, G., & Fiocco, D. (2017). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2641–2657. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8182-z>
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., & Spano, S. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100.3877–3886. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7471-2>
- Cagno, R. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using Caciotta cheese model system. *The International Dairy Journal*, (16), 119–130.
- Fernandez, A., Ogawa, J., Penaud, S., Boudebouze, S., Ehrlich, D., van de Guchte, M., & Maguin, E. (2008). Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *Proteomics*, 8(15), 3154–3163. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700974>
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., J. McBain A., H. Rickard, A. & W. Whyte, F. (2004) The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Advances in Microbial Physiology*. 46. 203–256. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(02\)46005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(02)46005-5)
- Qin, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Qin, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Stark, P. L., & Lee, A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of Medical Microbiology*, 15(2), 189–203. <https://doi.org/10.1099/00222615-15-2-189>
- Stark, P. L., & Lee, A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of Medical Microbiology*, 15(2), 189–203. <https://doi.org/10.1099/00222615-15-2-189>