ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-260-269
УДК 60:614.95

Оригинальная статья
http://fptt.ru

Создание многоштаммового бактериального консорциума для технологии пробиотических препаратов кормового назначения

Г. С. Волкова*, Е. М. Серба

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии, Москва, Россия

Дата поступления в редакцию: 24.12.2020

Дата принятия в печать: 03.03.2021

**e-mail: galina.volkova@bk.ru*
© Г. С. Волкова, Е. М. Серба, 2021

Аннотация.
Введение. Создание многоштаммовых пробиотических препаратов без учета биосовместимости штаммов часто приводит к снижению их эффективности вследствие подавления жизнеспособности микроорганизмов. Поэтому актуальным является создание препаратов пробиотиков на основе хорошо сочетаемых штаммов, у которых практически отсутствует явление антагонизма.
Объекты и методы исследования. Отобранные штаммы молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Для оценки биосовместимости молочнокислых бактерий использовали метод прямого совместного культивирования на поверхности плотной среды (капельная методика). Наличие антагонизма выявляли визуально по наличию признаков подавления одной культуры другой через 24 и 48 ч после начала инкубации. Оценку антагонизма составленных ассоциаций штаммов проводили по методике Романович.
Результаты и их обсуждение. В результате скрининга были отобраны 7 перспективных штаммов, определены удельная скорость роста (0,32–0,84 $ч^{-1}$) и максимальная плотность популяции (до 2,2 млрд КОЕ/$см^3$). Изучены механизмы адаптации штаммов в смешанной культуре и определены комбинации штаммов, в которых будет отсутствовать явление антагонизма и конкуренции за субстрат. Составлен четырехштаммовый консорциум (*Lactobacillus plantarum* 314/8, *Lactobacillus helveticus* R0052/6, *Enterococcus faecium B-2240*D, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27). Произведен экспериментальный подбор соотношения культур в консорциуме и выбран оптимальный вариант, при котором культуры присутствуют в равных соотношениях. Изучены биосинтетические свойства консорциума и соотношение штаммов в его составе на различных стадиях роста. Подтвержден сбалансированный рост консорциума, хорошая сочетаемость штаммов и отсутствие явления антагонизма. Отработан режим культивирования на молочной сыворотке (анаэробно, соотношение штаммов 1:1:1:1, 24 ч при 37 °C).
Выводы. Консорциум пробиотических бактерий может быть использован при разработке заквасок и пробиотических лечебно-профилактических препаратов, а также продуктов функционального питания.

Ключевые слова. Бактерии, скрининг, консорциум, пробиотики, биосовместимость, антагонизм, культивирование, симбиоз, штаммы

Для цитирования: Волкова Г. С., Серба Е. М. Создание многоштаммового бактериального консорциума для технологии пробиотических препаратов кормового назначения // Техника и технология пищевых производств. 2021. Т. 51. № 2. С. 260–269. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-260-269.

Original article

Available online at http://fptt.ru/eng

New Multistrain Bacterial Consortium for Feed Probiotics

Galina S. Volkova*, Elena M. Serba

All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology, Moscow, Russia

Received: December 24, 2020

Accepted: March 03, 2021

**e-mail: galina.volkova@bk.ru*
© G.S. Volkova, E.M. Serba, 2021

Abstract.
Introduction. Multistrain probiotics often include biocompatible strains, which leads to suppression of microbial viability and,

as a result, decreases their efficacy. Therefore, new probiotics should be based on well-matched strains with no antagonism.
Study objects and methods. The research featured strains of lactic and propionic acid bacteria from the VNIIPBT collection. The method of direct co-cultivation on dense medium (drop technique) was used to assess the biocompatibility of lactic acid bacteria. Antagonism was detected visually based on signs of suppression after 24 and 48 h after the onset of incubation. Antagonism of the consortia was assessed by the Romanovich method.
Results and discussion. The screening resulted in seven promising strains with the specific growth rate of 0.32–0.84 h^{-1} and the maximum population density ≤ 2.2 billion CFU/cm^3. A set of experiments on the strain adaptation mechanisms revealed combinations of strains with the lowest antagonism and competition for the substrate. The research resulted in a four-component consortium of *Lactobacillus plantarum* 314/8, *Lactobacillus helveticus* R0052/6, *Enterococcus faecium* B-2240D, and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27. The optimal ratio was the one where the cultures were present in equal proportions. The study also described the biosynthetic properties of the consortium and the ratio of the strains in its composition. The consortium demonstrated a balanced growth, good strain compatibility, and absence of antagonism. The cultivation mode was tested anaerobically on milk whey at 37°C for 24 h (strain ratio = 1:1:1:1).
Conclusion. The new consortium proved suitable for industrial production of feed probiotics.

Keywords. Bacteria, screening, consortium, probiotics, biocompatibility, antagonism, cultivation, symbiosis, strains

For citation: Volkova GS, Serba EM. New Multistrain Bacterial Consortium for Feed Probiotics. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(2):260–269. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-260-269.

Введение

Современная биотехнология неразрывно связана с использованием новых подходов к отбору природных микроорганизмов при создании бактериальных препаратов.

В настоящее время на отечественном рынке имеется широкий ассортимент препаратов на основе молочнокислых бактерий, оказывающих позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма через стабилизацию его микроэкологического статуса. В последние годы интерес для исследователей представляют пропионовокислые бактерии, которые обладают способностью к синтезу витамина B_{12} и высокими антимутагенными свойствами [1–3].

Важной причиной не всегда убедительной клинической эффективности пробиотических добавок является то, что при создании консорциума микроорганизмов подбираются виды бактерий без учета их биосовместимости. Это приводит к подавлению жизнеспособности микроорганизмов и утрате значимых свойств. Опубликованные результаты исследований показали, что, развиваясь в составе консорциумов, штаммы молочнокислых бактерий, в зависимости от уровня их биосовместимости, достигают различного уровня накопления биомассы [4–6].

Симбиотические пробиотики являются результатом рационального комбинирования бактериальных пробиотиков и пребиотиков, содержат несколько штаммов бактерий, которые образуют симбиоз антагонистической активности и антибиотической устойчивости. Как правило, комплексные препараты характеризуются более высокими медико-биологическими свойствами по сравнению с отдельными штаммами [7–9].

В окружающей среде микроорганизмы присутствуют не в виде индивидуальной культуры, а в составе микробиоценозов. Они отличаются высокой жизнеспособностью и по ряду характеристик превосходят чистые, лабораторные культуры.

Консорциумы микроорганизмов обычно неустойчивы. Через несколько циклов деления происходит подавление роста одних штаммов за счет преобладания самого активного штамма, наиболее приспособленного к конкретным условиям питательной среды [10–12]. Основная задача разработки комплексного пробиотика заключается в сохранении стабильного состава составляющих его штаммов как на стадиях получения препарата на производстве, так и на стадии применения.

В Международном кодексе номенклатуры бактерий понятие консорциума включает в себя ассоциацию из двух или более микроорганизмов. Консорциум могут составлять микроорганизмы, обладающие сходными биологическими и технологическими свойствами, при отсутствии явления антагонизма.

Совместное культивирование штаммов в жидкой или плотной питательной среде с последующей констатацией факта стимуляции или угнетения развития лежит в основе методик определения взаимоотношений. Среди бактерий встречаются культуры антагонисты. Они не сочетаются не только с культурами другого вида, но и со штаммами внутри вида [13–15]. Такие штаммы не могут быть использованы в комбинации закваски, состоящей из нескольких культур.

Явление синергизма, заключающееся во взаимном усилении биологических свойств отдельных бактерий, дает возможность консорциуму создать единую биологическую систему, обладающую защитными свойствами от влияния других микроорганизмов [16]. Защитные свойства обусловлены антимикробной активностью бактерий и синтезом целого ряда биологически активных веществ.

Многочисленные исследования показывают, что для создания пробиотических препаратов на основе бактериальных консорциумов, содержащих биологически совместимые штаммы, необходимо в производственных условиях реализовать и поддерживать оптимальные условия существования микробного симбиоза для достижения высоких терапевтических свойств бактериального препарата. Поэтому постановка исследования должна быть направлена как на создание консорциума биологически совместимых штаммов бактерий, так и на поиск оптимальных условий для накопления биомассы и сохранение соотношения титра каждого штамма в консорциуме. Это довольно сложная комплексная задача, требующая проработанной научной основы.

В литературе описаны важнейшие характеристики бактериального пробиотического препарата:
– высокая жизнеспособность штаммов консорциума, быстрый переход культур в активное состояние;
– антагонизм к возбудителю заболевания животного;
– отсутствие антагонизма к нормальной полезной микрофлоре животного;
– отсутствие антагонизма нормальной микрофлоры к штамму пробиотика;
– наличие адгезивной способности у штамма пробиотика;
– безопасность препарата;
– стабильность характеристик штаммов при производстве и хранении.

Для подтверждения заявленного эффекта создаваемого пробиотического препарата необходимо провести исследования в клинических лабораториях, работая со штаммами и клиническими изолятами, взятыми из желудочно-кишечного тракта животного [17, 18].

При изучении механизма действия пробиотических препаратов внимание исследователей направлено на молочнокислые бактерии, присутствующие в микробиоме кишечника [19, 20]. Описана способность отдельных штаммов пропионовокислых бактерий выживать и присутствовать в желудочно-кишечном тракте в течение 17–20 ч. Это позволяет использовать эти штаммы в качестве компонента современных пробиотических препаратов. Таким образом, подбор биологически совместимых штаммов при соблюдении условий оптимизации соотношений чистых культур молочнокислых и пропионовокислых бактерий является базой для активных симбиозов на основе этих бактерий.

В настоящее время является актуальным создание пробиотических препаратов на основе ассоциации молочнокислых и пропионовокислых бактерий с новыми биотехнологическими свойствами для эффективной профилактики нарушения микробиоценоза желудочно-кишечного тракта [21–23].

Целью исследования стала разработка на основе изучения межштаммовых взаимодействий и механизмов адаптации селекционированных штаммов состава симбиотического консорциума молочнокислых и пропионовокислых бактерий перспективного для создания пробиотических препаратов.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований служили штаммы-продуценты органических кислот из коллекции ВНИИПБТ: *Lactobacillus plantarum* 314/8, *Lactobacillus helveticus* R0052/6, *Lactobacillus acidophilus* var. *coccoideus* M-94/2, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* L-2, *Enterococcus faecium* 2240/D, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27.

В качестве основного углеводсодержащего субстрата для молочнокислого брожения использовалась питательная среда MRS-1, а также среда следующего состава: вода дистиллированная – 600 мл, мясная вода – 400 мл, дрожжевой экстракт – 5,0 г, натрия ацетат – 5,0 г, глюкоза – 2,5 г, аммония цитрат – 2,0 г, K_2HPO_4 – 2,0 г, Твин 80 – 1 мл, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0,2 г, $MgSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0,05 г. Условия культивирования: анаэробно, оптимум pH 5,5–5,8, температура культивирования 37 °C. Культивирование продуцентов проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 см^3 с 100 см^3 питательной среды. В процессе ферментации производили нейтрализацию образующихся кислот раствором 0,1 н NaOH.

Изучение биохимических и технологических свойств исследуемых штаммов проводили

Таблица 1. Кинетические показатели роста отобранных штаммов молочнокислых бактерий и образование молочной кислоты на 36 ч роста

Table 1. Kinetic growth parameters of the lactic acid bacteria and the formation of lactic acid after 36 h of growth

Штамм	Удельная скорость роста, ч$^{-1}$	Время выхода популяции в стационарную фазу, ч	Количество молочной кислоты, г/дм^3
L. helveticus R0052/6	0,32 ± 0,10	18,2 ± 2,3	29,0 ± 1,4
L. acidophilus var. *coccoideus* M-94/2	0,39 ± 0,10	17,5 ± 2,1	31,5 ± 1,9
L. casei subsp. *rhamnosus* L-2	0,45 ± 0,11	21,2 ± 2,1	42,2 ± 2,1
L. plantarum 314/8	0,37 ± 0,10	22,7 ± 2,2	35,5 ± 1,8
E. faecium 2240/D	0,51 ± 0,12	21,4 ± 2,2	33,0 ± 1,8
L. lactis subsp. *lactis* 1500/12	0,84 ± 0,14	20,7 ± 1,3	36,5 ± 1,8

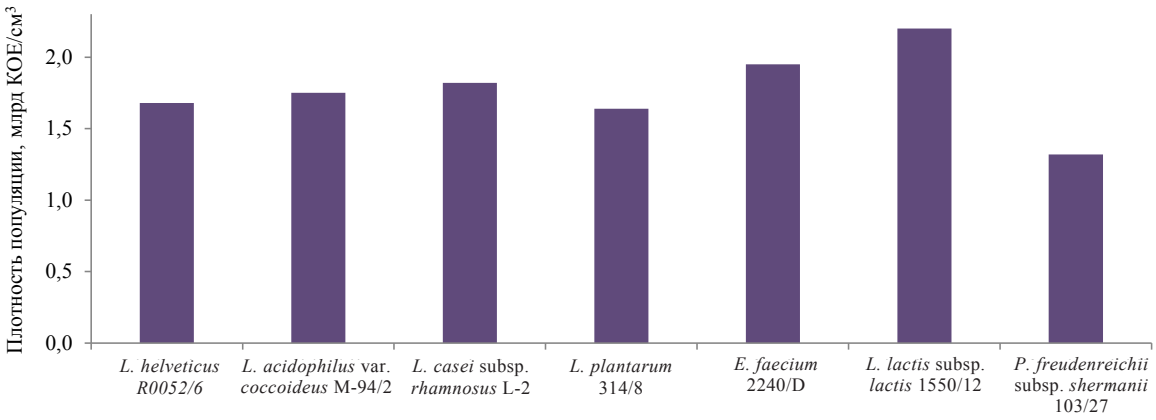


Рисунок 1. Максимальная плотность популяции

Figure 1. Maximal population density

стандартными методами. Определение количества микроорганизмов в посевном материале и культуральной жидкости проводили по ГОСТ 26670. Количество клеток (в мл суспензии) устанавливаи по ГОСТ 10444.11 с помощью прямого подсчета числа клеток в единице объема на счетной камере Горяева-Тома. Накопление биомассы бактерий определяли с использованием колориметра КФК-2 нефелометрически. Количество биомассы устанавливали по калибровочной кривой с учетом разведений. Микроскопирование препаратов – по ГОСТ 9225. Содержание редуцирующих веществ в культуральной жидкости определяли методом Шомоди-Нельсона по ГОСТ 54905. Количество молочной кислоты определяли методом ВЭЖХ по ГОСТ 33410 на приборе Series-200 («PerkinElmer»).

Для оценки биосовместимости молочнокислых бактерий использовали метод прямого совместного культивирования на поверхности плотной питательной среды (капельная методика) [19]. 24-часовую культуру бактерий наносили на чашку Петри с плотной средой MRS-1 с помощью петли. Каплю оставляли на чашке до полного ее впитывания. Капля второй культуры наносится со смещением на 1–2 мм от края первой капли, добиваясь затекания на каплю первой культуры. В той части, где произошло наложение капель, оценивают границу, образуемую между культурами. Контролем служат свободные области капель. После подсыхания капель чашки инкубировали в термостате при 37 °С.

Наличие антагонизма выявляли визуально через 24 ч роста по признаку подавления одной культуры другой. Если видимая задержка роста показывает антагонистические взаимоотношения исследуемых культур, а граница четко просматривается, то в этом случае культуры считаются биологически несовместимыми. При слиянии пятен культуры являются биосовместимыми. В некоторых случаях визуально отмечается расширение области роста в зоне слияния. В случае выхода в зоне слияния одной культуры на поверхность другой, с подавлением роста второй культуры, то такие культуры считали проявляющими слабый антагонизм. Если визуально определяли зону задержки роста по краю капель культур, то их характеризовали как проявляющие сильный антагонизм.

Антагонистические свойства отдельных пар штаммов молочнокислых бактерий изучали по методике Романович [24]. Методика предусматривает, что, если происходило исчезновение окраски метиленовой сини культуральной жидкости консорциума, то реакция считалась положительной. Это свидетельствовало либо о сильной конкуренции за субстрат, либо о несовместимости действия бактериоцинов друг друга. Полное обесцвечивание наступало через 5–8 ч.

Биометрическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики

Рисунок 2. Биосовместимость штаммов *Lactobacillus helveticus* R0052/6 и *Lactobacillus plantarum* 314/8 (полное слияние капель)

Figure 2. Biocompatibility of *Lactobacillus helveticus* R0052/6 and *Lactobacillus plantarum* 314/8 (complete confluence of drops)

Таблица 2. Результаты изучения антагонизма ассоциаций бактерий

Table 2. Antagonism of bacterial consortia

Наименование штамма	Фильтрат культуральной жидкости
L. acidophilus var. *coccoideus* M-94/2 и *L. plantarum* 314/8	реакция отрицательная
L. acidophilus var. *coccoideus* M-94/2 и *L. brevis* K-1	реакция положительная
L. casei subsp. *rhamnosus* L-2 и *L. helveticus* R0052/6	реакция отрицательная
L. brevis K-1 и *L. plantarum* 314/8	реакция положительная
L. acidophilus var. *coccoideus* M-94/2 и *L. casei* subsp. *rhamnosus* L-2	реакция отрицательная
L. plantarum 314/8 и *L. helveticus* R0052/6	реакция отрицательная
L. casei subsp. *rhamnosus* L-2 и *L. brevis* K-1	реакция положительная

(t-критерии Стьюдента) с использованием Microsoft Excel 9.0.

Результаты и их обсуждение

В результате скрининга высокопродуктивных штаммов молочнокислых бактерий по выходу молочной кислоты и скорости роста из коллекции ВНИИПБТ были отобраны 7 штаммов: *Lactobacillus helveticus* R0052/6, *Lactobacillus acidophilus* var. *coccoideus* M-94/2, *Lactobacillus plantarum* 314/8, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* L-2, *Enterococcus faecium* 2240/D. У них выход молочной кислоты от использованной лактозы был равен или выше 50 %. Также использовали *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1500/12 и *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27.

Результаты определения показателей роста и максимальной плотности популяции для максимального накопления биомассы отобранных штаммов приведены в таблице 1 и рисунке 1.

Исследование биосовместимости молочнокислых бактерий проводили методом капель на плотной среде MRS-1 (рис. 2). Результатом стало предварительное определение комбинаций штаммов, в которых будет отсутствовать явление антагонизма и конкуренции за субстрат. Первичный отбор позволил составить следующие пары биосовместимых штаммов молочнокислых бактерий:

– *L. acidophilus* var. *coccoideus* M-94/2 и *L. plantarum* 314/8;
– *L. acidophilus* var. *coccoideus* M-94/2 и *L. casei subsp. rhamnosus* L-2;
– *L. casei* subsp. *rhamnosus* L-2 и *L. helveticus* R0052/6;
– *L. helveticus* R0052/6 и *L. plantarum* 314/8.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности совместного культивирования подобранных

Таблица 3. Подбор соотношения штаммов в консорциуме № 1

Table 3. Ratio of strains in consortium No. 1

Культуры / Соотношение штаммов в консорциуме	Титр клеток, lg КОЕ/см³			
	1:1:1:1	1,5:1:1:0,5	1,5:1,5:0,5:0,5	2:0,5:1:0,5
L. plantarum 314/8	9,17 ± 0,46	9,23 ± 0,46	9,14 ± 0,46	9,26 ± 0,46
L. helveticus R0052/6	9,17 ± 0,46	9,00 ± 0,45	8,11 ± 0,40	8,70 ± 0,44
E. faecium 2240/D	9,14 ± 0,46	9,00 ± 0,45	8,00 ± 0,40	9,00 ± 0,45
P. freudenreichii subsp. *shermanii* 103/27	9,01 ± 0,45	8,00 ± 0,40	8,00 ± 0,40	8,00 ± 0,40

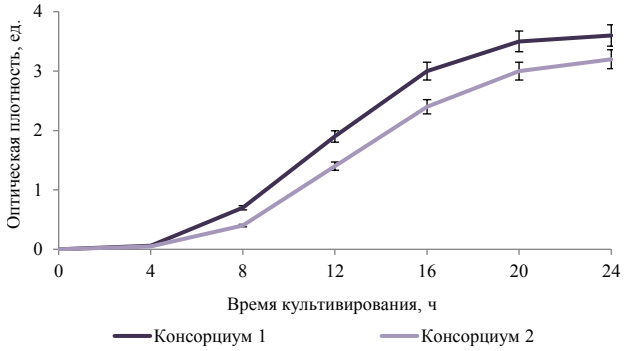
Таблица 4. Подбор соотношения штаммов в консорциуме № 2

Table 4. Ratio of strains in consortium No. 2

Культуры / Соотношение штаммов в консорциуме	Титр клеток, lg КОЕ/см³			
	1:1:1:1	1,5:1:1:0,5	1,5:1,5:0,5:0,5	2:0,5:1:0,5
L. casei subsp. *rhamnosus* L-2	9,15 ± 0,46	9,18 ± 0,46	9,08 ± 0,45	9,20 ± 0,46
L. acidophilus var. *coccoideus* M-94/2	9,08 ± 0,45	9,00 ± 0,45	9,00 ± 0,45	9,00 ± 0,45
E. faecium 2240/D	9,08 ± 0,45	8,00 ± 0,40	8,04 ± 0,40	8,70 ± 0,44
P. freudenreichii subsp. *shermanii* 103/27	9,08 ± 0,45	8,00 ± 0,40	8,11 ± 0,40	8,00 ± 0,40

В таблицах 3 и 4 данные статистически достоверны при $P < 0,05$ (n = 3).

In Tables 3 and 4, the data are statistically significant at $P < 0.05$ (n = 3).



Данные статистически достоверны при $P < 0,05$ (n = 3)

Рисунок 3. Накопление биомассы консорциумами бактерий на глюкозной среде

Figure 3. Biomass accumulation by bacterial consortia in glucose medium

пар штаммов молочнокислых бактерий для получения многокомпонентных пробиотических препаратов определенного состава. Выборочные ассоциации штаммов и некоторые другие пары были проверены на антагонизм по методике Романович [24]. Результаты представлены в таблице 2.

Комбинации штаммов, дающие отрицательную реакцию с метиленовой синью, могут быть рекомендованы для составления комбинированной закваски.

На основе визуальной оценки биосовместимости штаммов молочнокислых бактерий были отобраны две пары с наилучшим синергизмом, на основе которых составлены два консорциума:

– *L. plantarum* 314/8, *L. helveticus* R0052/6, *E. faecium* 2240/D, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27;

– *L. acidophilus* var. *coccoideus* M-94/2, *L. casei* subsp. *rhamnosus* L-2, *E. faecium* 2240/D, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27.

Произведен экспериментальный подбор соотношения культур в консорциумах. Выбран оптимальный вариант, при котором культуры присутствуют в равных соотношениях (табл. 3 и 4).

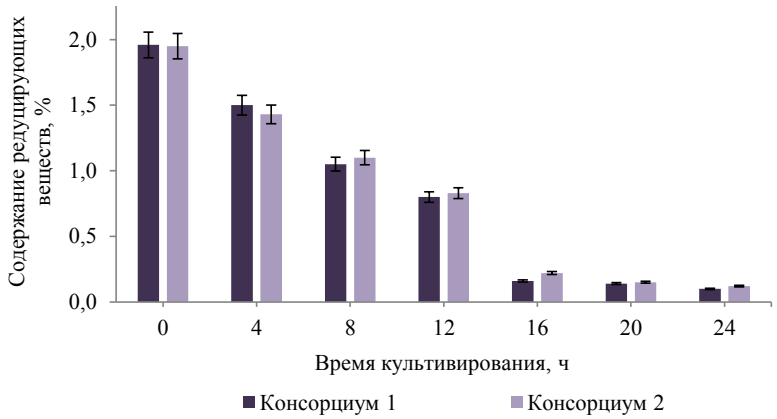
Получены экспериментальные данные по динамике накопления биомассы на глюкозной среде (рис. 3) и по содержанию редуцирующих сахаров (рис. 4).

Анализ рисунка 3 показывает, что накопление биомассы для каждого консорциума достигает максимума к 24 ч роста. Это говорит о переходе культур в стационарную фазу роста. Дальнейшее увеличение времени культивирования нецелесообразно. На рисунке 4 показано, что к 24 ч культивирования содержание сахаров в питательной среде падает до минимума.

В дальнейших исследованиях экспериментально подобрана температура культивирования консорциумов 37 °C. Так как из четырех штаммов консорциумов три штамма – это молочнокислые бактерии с оптимальной температурой для роста 35–37 °C, то это является определяющим фактором. Для штамма пропионовокислых бактерий оптимальной температурой роста является 30–32 °C, а при 37 °C штамм растет с незначительным снижением скорости роста.

Изучен состав консорциума № 1 при различном времени роста, а также титр клеток каждого штамма при культивировании. Результаты представлены в таблице 5.

Данные таблицы 5 свидетельствуют о сбалансированном росте консорциума № 1, хорошей сочетаемости штаммов, высокой биологической



Данные статистически достоверны при $P < 0,05$ (n = 3)

Рисунок 4. Динамика содержания редуцирующих веществ в культуральной жидкости при культивировании

Figure 4. Content of reducing substances in the culture liquid during cultivation

Таблица 5. Состав консорциума № 1 при культивировании

Table 5. Composition of consortium No. 1 during cultivation

Время, ч	Титр жизнеспособных клеток, lg КОЕ/см³				
	Консорциум	*L. helveticus* R0052/6	*L. plantarum* 314/8	*E. faecium* 2240/D	*P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27
6	7,60 ± 0,38	7,00 ± 0,35	7,00 ± 0,35	7,00 ± 0,35	7,00 ± 0,35
10	8,62 ± 0,43	8,04 ± 0,40	8,04 ± 0,40	8,01 ± 0,40	8,00 ± 0,40
12	8,67 ± 0,43	7,04 ± 0,35	8,15 ± 0,41	8,08 ± 0,40	8,00 ± 0,40
18	9,72 ± 0,49	9,08 ± 0,45	9,18 ± 0,46	8,11 ± 0,41	9,08 ± 0,45
20	9,74 ± 0,49	9,18 ± 0,46	9,18 ± 0,46	8,11 ± 0,41	9,08 ± 0,45

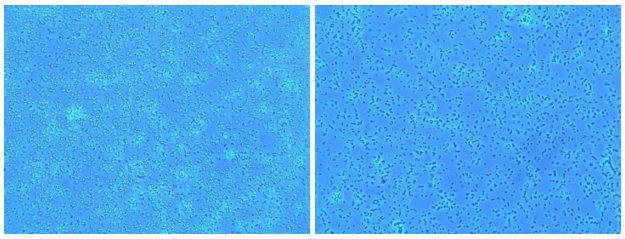
Данные статистически достоверны при P < 0,05 (n = 3)

Data are statistically significant at P < 0.05 (n = 3).

совместимости и отсутствии явления антагонизма. В качестве приоритетного по накоплению биомассы выбран консорциум № 1. Он может быть рекомендован для получения пробиотического препарата, а консорциум № 2 по характеристикам роста уступает консорциуму № 1. Проведена микроскопия культуральных жидкостей через 24 ч роста консорциумов (рис. 5). Микроскопия показывает отсутствие посторонней микрофлоры, высокую плотность популяции, равномерное распределение клеток в поле зрения.

Подобранные штаммы определяют высокую биологическую активность консорциума. Это позволяет создать биологический препарат с заданными физиолого-биохимическими и технологическими свойствами. Дальнейшие исследования предполагают проведение молекулярно-генетической идентификации штаммов консорциума, что является важным этапом при производстве пробиотического препарата, обеспечивая чистоту используемых культур и их идентичность, а также безопасность производства [25].

Производство пробиотического препарата осуществляется периодическим или непрерывным способами в ферментерах путем биоконверсии молочной сыворотки подобранным консорциумом молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Режим культивирования анаэробный, совместное культивирование 4-х штаммов в соотношении 1:1:1:1. Время культивирования 24 ч. Температурный режим культивирования 37 °C.



a b

Рисунок 5. Микроскопия культуральной жидкости через 24 ч культивирования на жидкой среде MRS-1 консорциумов № 1 (a) и № 2 (b)

Figure 5. Microscopy of the culture liquid after 24 h of cultivation in liquid medium MRS-1: consortia No. 1 (a) and No. 2 (b)

Штаммы молочнокислых бактерий *L. plantarum* 314/8 и *L. helveticus* R0052/6, *L. acidophillus* var. *coccoideus* M-94/2 и *L. casei* subsp. *rhamnosus* L-2 депонированы в ВКМ ИБФМ им. Г. К. Скрябина под номерами ВКМ B-3478D, ВКМ B-3477D, ВКМ B-3403D и ВКМ B-3402D соответственно.

Скрининг высокоактивных штаммов микроорганизмов для создания новых пробиотических препаратов представляет собой длительный и трудоемкий процесс. Перспективу использования имеют молочнокислые и пропионовокислые бактерии, т. к. являются действующим началом практически всех имеющихся на рынке пробиотических препаратов. Согласно современным научным представлениям, помимо безопасного состава пробитических препаратов, в дальнейших исследованиях необходимо использовать *in vitro* и *in vivo* модели для уточнения механизмов действия пробиотиков. При этом каждый предполагаемый биологический эффект необходимо связать с конкретным штаммом, входящим в его состав. Большое значение имеет точная идентификация молочнокислых бактерий, сложность которой состоит в лабильности при проявлении основных характеристик, огромного разнообразия видов, их схожести, а также наличия нетипичных форм.

Результатом данной работы стало создание консорциумов пробиотических бактерий, которые имеют перспективу использования при разработке заквасок и пробиотических лечебно-профилактических препаратов, а также продуктов функционального питания.

Выводы

Получены экспериментальные данные по кинетическим показателям роста и способности к

синтезу молочной кислоты исследуемых штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий в лабораторных условиях. Установлено, что накопление молочной кислоты может достигать до 4,22 %, удельная скорость роста – 0,32–0,84 $ч^{-1}$, максимальная плотность популяции – до $2,2\times10^9$ КОЕ/$см^3$.

На основе изучения биосовместимости штаммов молочнокислых бактерий установлены комбинации штаммов, в которых отсутствует явление антагонизма и конкуренции за субстрат. Это делает их перспективными для создания консорциумов. Подобран состав двух целевых консорциумов с учетом скорости роста и выхода биомассы, выбраны оптимальные варианты соотношения штаммов в их составе, выбран предпочтительный консорциум, включающий штаммы: *Lactobacillus plantarum* 314/8, *Lactobacillus helveticus* R0052/6, *Enterococcus faecium* 2240/D, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27.

Разработаны параметры совместного культивирования консорциума: режим культивирования анаэробный, соотношение 4-х штаммов в консорциуме 1:1:1:1, время культивирования 24 ч при 37 °С.

Штаммы молочнокислых бактерий *L. plantarum* 314/8 и *L. helveticus* R0052/6, *Lactobacillus acidophilus* var. *coccoideus* M-94/2 и *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* L-2 депонированы в ВКМ ИБФМ им. Г. К. Скрябина под номерами ВКМ B-3478D, ВКМ B-3477D, ВКМ B-3403D и ВКМ B-3402D соответственно.

Критерии авторства

Г. С. Волкова – рзработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация экспериментальных данных, написание статьи и ее редактирование, включающее существенные дополнения в содержании; подготовка промежуточных версий статьи. Е. М. Серба – разработка концепции и дизайна исследования, стратегическое управление комплексом исследований, финальное одобрение версии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

G.S. Volkova developed the concept and designed the study, analyzed and interpreted experimental data, wrote and proofread the manuscript. E.M. Serba developed the research concept and design, supervised the research complex, and approved of the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Биотехнологические основы создания кормовых добавок с защитно-профилактическими свойствами / Г. С. Волкова [и др.]. М.: Первое экономическое издательство, 2020. 148 с.

2. МУК 4.2.2602-10. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. М.: Роспотребнадзор, 2010. 60 с.

3. Creation and use of microorganism in meat production / A. Gizatov [et al.] // Periodico Tche Quimica. 2020. Vol. 17. № 35. P. 713–727.

4. Шиповская Е. А., Евелева В. В., Черпалова Т. М. Исследование биосинтетической активности молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* при сбраживании лактозы молочной сыворотки // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. № 4 (31). С. 635–642. (In Eng.).

5. Антифунгальная активность штамма *Propionibacterium freudenreichii* и представителей рода *Lactobacillus* / Е. П. Рыжкова [и др.] // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. № 2. С. 144–149.

6. Крумликов В. Ю., Остроумов Л. А. Подбор параметров стабилизации симбиотического консорциума с целью получения закваски прямого внесения // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 42. № 3. С. 25–30.

7. Бокова Т. А. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: место метабиотиков в коррекции дисбиотических нарушений // Вопросы практической педиатрии. 2016. Т. 11. № 5. С. 38–42. https://doi.org/10.20953/1817-7646-2016-5-38-42.

8. Интенсификация процесса культивирования физиологически адаптированных штаммов лактобацилл как основа для создания биопрепаратов микробного происхождения для птицеводства / А. Г. Кощаев [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. № 128. С. 1102–1115. https://doi.org/10.21515/1990-4665-128-076.

9. Разработка поликомпонентного метаболитного пробиотика / Ю. В. Кулакова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 5. С. 80–86.

10. Просеков А. Ю., Остроумов Л. А. Инновационный менеджмент биотехнологий заквасочных культур // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 43. № 4. С. 64–69.

11. Исследование антибиотической устойчивости и антиоксидантных свойств микроорганизмов желудочно-кишечного тракта / О. О. Бабич [и др.] // Актуальные вопросы науки. 2015. № 18. С. 20–24.

12. Determination of the intensity of bacteriocin production by strains of lactic acid bacteria and their effectiveness / M. I. Zimina [et al.] // Foods and Raw Materials. 2017. Vol. 5. № 1. P. 108–117. https://doi.org/10.21179/2308-4057-2017-1-108-117.

13. Prosekov A. Yu., Babich O. O., Bespomestnykh K. V. Identification of industrially important lactic acid bacteria in foodstuffs // Foods and Raw Materials. 2013. Vol. 1. № 2. P. 42–45. https://doi.org/10.12737/2053.

14. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity / G. M. Chiocchetti [et al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019. Vol. 59. № 10. P. 1534–1545. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421521.

15. Juturu V., Wu J. C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications // Biotechnology Advances. 2018. Vol. 36. № 8. P. 2187–2200. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007.

16. Фитобиотики в кормлении сельскохозяйственных животных / О. А. Багно [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 4. С. 687–697. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.4.687rus.

17. Дудикова Г. Н., Чижаева А. В. Консорциум молочнокислых бактерий и дрожжей для ржаной закваски с повышенными антагонистическими свойствами // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 41. № 2. С. 34–39.

18. Получение продукции птицеводства без антибиотиков с использованием перспективных программ кормления на основе пробиотических препаратов / В. И. Фисинин [и др.] // Вопросы питания. 2017. Т. 86. № 6. С. 114–124.

19. Шурхно Р. А. Микробиологический препарат на основе гомоферментативных штаммов *Lactobacillus plantarum*, выделенных из природных источников для биоконсервирования растительных ресурсов (обзор проведенных исследований в период с 2000 по 2015 г.) // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. 2016. Т. 158. № 1. С. 5–22.

20. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs / F. Minervini [et al.] // Food Microbiology. 2015. Vol. 52. P. 66–76. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.009.

21. Production, characterization, and antimicrobial activity of a bacteriocin from newly isolated *Enterococcus faecium* IJ-31 / I. Javed [et al.] // Journal of Food Protection. 2010. Vol. 73. № 1. P. 44–52. https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.44.

22. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии: формирование сообщества для получения функциональных продуктов с бифидогенными и гипотензивными свойствами / А. В. Бегунова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 6. С. 566–577. https://doi.org/10.1134/S0555109919060047.

23. Дурникин Д. А., Силантьева М. М., Ерещенко О. В. Стимуляция ультразвуком накопления биомассы молочнокислых и пропионовокислых бактерий при глубинном культивировании // Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета им. Богдана Хмельницкого. 2016. Т. 6. № 2. С. 287–293.

24. Исследование ауто-, изо- и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл / Н. А. Глушанова [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2005. Т. 44. № 6. С. 138–142.

25. Urwyler S. K., Glaubitz J. Advantage of MALDI-TOF-MS over biochemical-based phenotyping for microbial identification illustrated on industrial applications // Letters in Applied Microbiology. 2016. Vol. 62. № 2. P. 130–137. https://doi.org/10.1111/lam.12526.

References

1. Volkova GS, Rimareva LV, Kuksova EV, Serba EM. Biotechnological basis for creating feed additives with protective and preventive properties. Moscow: Pervoe ehkonomicheskoe izdatel′stvo”; 2020. 148 p. (In Russ.).

2. MUK 4.2.2602-10. Sistema predregistratsionnogo doklinicheskogo izucheniya bezopasnosti preparatov. Otbor, proverka i khranenie proizvodstvennykh shtammov, ispol′zuemykh pri proizvodstve probiotikov [Measurement Guidelines MUK 4.2.2602-10. System of pre-registration preclinical study of drug safety. Selection, verification, and storage of industrial strains used in the probiotics production]. Moscow: Rospotrebnadzor; 2010. 60 s.

3. Gizatov A, Gizatova N, Mironova I, Gazeev I, Nigmatyanov A. Creation and use of microorganism in meat production. Periodico Tche Quimica. 2020;17(35):713–727.

4. Shipovskaya EA, Eveleva VV, Cherpalova TM. Biosynthetic activity study of *Lactobacillus acidophilus* lactic acid bacteria in the lactose fermentation of whey. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2019;9(4)(31):635–642.

5. Ryzhkova EP, Danilova IV, Shamraichuk IL, Kurakov AV, Netrusov AI. Antifungal activity of *Propionibacterium freudenreichii* and several *Lactobacillus* species. Mycology and Phytopathology. 2018;52(2):144–149. (In Russ.).

6. Krumlikov VYu, Ostroumov LA, Sukhikh SA, Kriger OV. Choice of stabilization parameters (freezing and drying) of symbiotic consortium to obtain a starter of direct inoculation. Food Processing: Techniques and Technology. 2016;42(3):25–30. (In Russ.).

7. Bokova TA. Microbiocenosis of the gastrointestinal tract: place of metabiotics in correction of dysbiotic disorders. Clinical Practice in Pediatrics. 2016;11(5):38–42. (In Russ.). https://doi.org/10.20953/1817-7646-2016-5-38-42.

8. Koshchayev AG, Lysenko YuA, Mishchenko VA, Luneva AV, Radchenko VV, Machneva NL, et al. Intensification of the cultivation process of physiologically-adapted lactobacilli as a basis for the creation of biological products of microbial origin for poultry breeding. Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University. 2017;(128):1102–1115. (In Russ.). https://doi.org/10.21515/1990-4665-128-076.

9. Kulakova YuV, Aleshkin AV, Afanasiev SS, Zhilenkova OG. Development of polycomponent metabolite probiotic. Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology. 2013;(5):80–86. (In Russ.).

10. Prosekov AYu, Ostroumov LA. Innovation management biotechnology of starter cultures. Food Processing: Techniques and Technology. 2016;43(4):64–69. (In Russ.).

11. Babich OO, Dyshlyuk LS, Prosekov AYu, Shishin MV. Issledovanie antibioticheskoy ustoychivosti i antioksidantnykh svoystv mikroorganizmov zheludochno-kishechnogo trakta [Antibiotic resistance and antioxidant properties of microorganisms of the gastrointestinal tract]. Aktual′nye voprosy nauki [Relevant Issues of Science]. 2015;(18):20–24. (In Russ.).

12. Zimina MI, Gazieva AF, Pozo-Dengra J, Noskova, SYu, Prosekov AYu. Determination of the intensity of bacteriocin production by strains of lactic acid bacteria and their effectiveness. Foods and Raw Materials. 2017;5(1):108–117. https://doi.org/10.21179/2308-4057-2017-1-108-117.

13. Prosekov AYu, Babich OO, Bespomestnykh KV. Identification of industrially important lactic acid bacteria in foodstuffs. Foods and Raw Materials. 2013;1(2):42–45. https://doi.org/10.12737/2053.

14. Chiocchetti GM, Jadán-Piedra C, Monedero V, Zúñiga M, Vélez D, Devesa V. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019;59(10):1534–1545. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421521.

15. Juturu V, Wu JC. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Biotechnology Advances. 2018;36(8):2187–2200. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007.

16. Bagno OA, Prokhorov ON, Shevchenko SA, Shevchenko AI, Dyadichkina TV. Use of phytobioticts in farm animal feeding. Agricultural Biology. 2018;53(4):687–697. (In Russ.). https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.4.687rus.

17. Dudikova GN, Chizhayeva AV. Consortium of lactic acid bacteria and yeast for rye starter with the increased antagonistic properties. Food Processing: Techniques and Technology. 2016;41(2):34–39. (In Russ.).

18. Fisinin VI, Egorov IA, Laptev GYu, Lenkova TN, Nikonov IN, Ilyina LA, et al. Antibiotic-free poultry production based on innovative nutritional programs with the involvement of probiotics. Problems of Nutrition. 2017;86(6):114–124. (In Russ.).

19. Shurkhno RA. A microbiological preparation based on the homofermentative strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from the natural sources for bioconservation of plant resources (review of studies between 2000 and 2015). Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki. 2016;158(1):5–22. (In Russ.).

20. Minervini F, Lattanzi A, De Angelis M, Celano G, Gobbetti M. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. Food Microbiology. 2015;52:66–76. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.009.

21. Javed I, Ahmed S, Manam S, Riaz M, Ahmad B, Ishtiaq Ali M, et al. Production, characterization, and antimicrobial activity of a bacteriocin from newly isolated *Enterococcus faecium* IJ-31. Journal of Food Protection. 2010;73(1):44–52. https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.44.

22. Begunova AV, Rozhkova IV, Zvereva EA, Glazunova OA, Fedorova TV. Lactic and propionic acid bacteria: the formation of a community for the production of functional products with bifidogenic and hypotensitive properties. Applied Biochemistry and Microbiology. 2019;55(6):566–577. (In Russ.). https://doi.org/10.1134/S0555109919060047.

23. Durnikin DA, Silantyeva MM, Ereshchenko OV. Ultrasound-enhanced cell production of lactic and propionic acid bacteria under submerged cultivation for industrial purposes. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University. 2016;6(2):287–293. (In Russ.).

24. Glushanova NA, Verbitskaya NB, Petrov LN, Blinov AI, Shenderov BA. Study of auto-, iso- and gomoantagonism of probiotical lactobacilli strains. Byulleten′ Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk [Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]. 2005;44(6):138–142. (In Russ.).

25. Urwyler SK, Glaubitz J. Advantage of MALDI-TOF-MS over biochemical-based phenotyping for microbial identification illustrated on industrial applications. Letters in Applied Microbiology. 2016;62(2):130–137. https://doi.org/10.1111/lam.12526.