

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Капрельянец Л. В., д-р техн. наук, профессор, Труфкати Л. В., канд. техн. наук, доцент,
Крупницкая Л. А., аспирант

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

*В данной работе проведены сравнительные исследования динамики роста культуры *Bifidobacterium bifidum* при культивировании на стандартных классических средах и на лактозной среде с добавлением различной массовой доли соевой сыворотки. Установлено необходимое количество соевой сыворотки для культивирования и накопления биомассы бактерий вида *Bifidobacterium bifidum*.*

*In this study, we conducted comparative studies of growth dynamics of the culture *Bifidobacterium bifidum* when cultured on standard classical medium and on lactose medium with addition of varying mass fraction of soy whey. A necessary amount of soy whey and for the cultivation of biomass accumulation of bacteria species *Bifidobacterium bifidum* was established.*

Ключевые слова: культивирование, соя, соевая сыворотка, питательная среда, биомасса, *Bifidobacterium bifidum*.

Постановка проблемы. Повышение биобезопасности продуктов питания и по сей день остается сложной задачей, одним из путей решения которой является создание в продуктах конкурентной микробиологической среды, препятствующей развитию болезнетворного и гнилостного микробиоценоза. Вносимая в продукт полезная заквасочная микробиота, которая является антагонистом как патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, так и технически вредной микрофлоры, и одновременно с этим обогащает продукт другими функциональными характеристиками [1, 4].

Одной из важнейших групп комменсалов человека является род *Bifidobacterium*. Представители рода *Bifidobacterium* являются естественными обитателями толстого кишечника детей и взрослых людей, при этом множество видов обладает позитивными эффектами на организм хозяина [9]. Бифидобактерии принимают активное участие в пищеварении и всасывании. Они способствуют процессам ферментативного переваривания пищи, так как усиливают гидролиз белков, сбраживают углеводы, омыляют жиры, растворяют клетчатку, стимулируют перистальтику кишечника, способствуют нормальной эвакуации кишечного содержимого. Антагонистическая активность бифидобактерий связанная с продукцией органических кислот и бактериоцинов с широким спектром антимикробного действия, а также со способностью блокировать рецепторы на слизистой кишечника, предотвращающие фиксацию на них потенциально опасных микроорганизмов. Поэтому бифидобактерии представляют собой значительный интерес как защитный агент продуктов питания [1, 2]. В связи с этим, актуальным является вопрос по увеличению выхода биомассы вышеуказанного рода бактерий при их культивировании за счет улучшения ростовых качеств питательных сред с одновременным снижением экономических затрат при их приготовлении.

При производстве биопрепаратов пробиотиков, одной из важнейших проблем является получение наибольшего количества качественной биомассы культивируемых микроорганизмов. Для достижения этой цели необходимы качественные питательные среды. В связи с этим появилась потребность улучшить качество производственных питательных сред для микроорганизмов путем добавления к ним стимуляторов роста, к которым относятся разнообразные экстракты растительного происхождения.

В литературе описано значительное количество производственных питательных сред для культивирования и выделения бифидобактерий, такие как кукурузно-лактозная среда (КЛС), MRS — бульон, среда «Бифидум», и целый ряд других [2]. Углеводная часть питательных сред представлена преимущественно лактозой. В их состав также входят в качестве аминного питания пептоны и отвары растительного и животного происхождения. В производственных масштабах используют кукурузно-лактозную среду, так как вещества растительного происхождения, являясь источниками пищевых волокон и фруктоолигосахаридов, сами по себе оказывают стимулирующее действие на рост нормальной микрофлоры, помимо того являются менее дорогостоящими, чем сырье животного происхождения.

Последнее время кукурузный экстракт стал труднодоступным ингредиентом для приготовления питательных сред, поэтому перед нами стоит проблема поиска его аналога. После изучения химического состава было установлено, что наиболее полноценным и подходящим для включения в питательные среды, предназначенные для культивирования бифидобактерий, являются зернобобовые культуры и продукты их переработки. Они содержат высококачественный белок и, кроме того, являются источником

полиненасыщенных жирных кислот, витаминов, макро- и микроэлементов, пищевых волокон, не содержат холестерина и твердых жиров [4]. Бифидобактерии весьма требовательны к составу питательной среды, а особенно к наличию легкоусвояемых азотистых соединений, аминокислот, углеводов, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, минеральных элементов [7, 9]. Добавление некоторых витаминов к среде позволяет исключить из нее ряд аминокислот. Наиболее чувствительны бифидобактерии к наличию тиамин, рибофлавина, ниацина, биотина, пантотеновой кислоты [9]. Соевое молоко является богатым источником водорастворимых витаминов: тиамин, рибофлавин, ниацин, фолиевая кислота, токоферолы, также в нем имеется витамин К [6]. Известно, что минеральный состав среды в большой степени влияет на рост бифидобактерий, однако их потребности в минеральных веществах изучены недостаточно. В синтетических средах для роста им необходимо железо, магний, фосфаты, хлориды калия и натрия [7, 9]. Соевое молоко богато фосфором, железом, цинком, калием. Продукты переработки сои содержат такие пребиотические олигосахариды, как стахиоза и раффиноза, которые стимулируют рост бифидобактерий [6, 3], также обнаруживаются фитовещества сои полифенольной природы, в частности изофлавоны, в количестве 1,6...2,2 мг/г сухого вещества. Изофлавоны сои обладают рядом профилактических и лечебных свойств, применяются при различных видах раковых опухолей, атеросклерозе, остеопорозе, гормональных нарушениях, обладают антиоксидантными свойствами, поэтому зарубежом используются при производстве функциональных продуктов [4, 5].

Таким образом, сравнительный анализ питательных сред, на которых можно осуществлять культивирование бифидобактерий, показывает, что успешность выращивания этих микроорганизмов зависит от качества и состава среды, обусловленных как видом белковой основы, так и спецификой стимулирующих компонентов. Использование растительных экстрактов может позволить усовершенствовать имеющиеся и разработать новые эффективные питательные среды для бифидобактерий. Перспективность таких сред связана со сравнительной себестоимостью растений при использовании их как основы или компонента питательных сред для культивирования бифидобактерий. Учитывая высокую потребность в таких средах, связанную с интенсификацией производства бактериальных препаратов для коррекции нарушений микробиоценоза организма человека, проблема разработки новых и совершенствование имеющихся питательных сред для культивирования бифидобактерий остается актуальной.

Целью настоящего исследования явилась разработка новой питательной среды на основе растительного сырья, которая должна, в первую очередь, отвечать питательным потребностям бифидобактерий, а также не должна быть дорогостоящей.

Объекты исследования. В работе использовали музейную культуру *Bifidobacterium bifidum*, которая является классическим пробиотиком. Нами проведены исследования динамики роста культуры бактерий *B. bifidum* при культивировании на классических питательных средах (кукурузно-лактозная среда, MRS бульон, среда «Бифидум») и на лактозной среде с добавлением различной массовой доли соевой сыворотки.

Методы исследований. Культивирование бифидобактерий проводили на указанных питательных средах: кукурузно-лактозная среда, MRS бульон, среда «Бифидум», лактозная среда с добавлением соевой сыворотки. Температура проводимого термостатирования — $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, продолжительность — 24 ч.

Для определения наиболее подходящей концентрации соевой сыворотки в лактозной питательной среде изучали динамику роста культуры *Bifidobacterium bifidum* на среде с добавлением различной массовой доли соевой сыворотки — 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %. В качестве закваски использовали суточную культуру бифидобактерий, которая была стандартизована до $1 \cdot 10^6$ КОЕ/см³. Контролем служила жидкая питательная кукурузно-лактозная среда. Динамика роста заквасочной культуры была изучена в промежутке от 0 до 48 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

В ходе эксперимента подсчитывали количество клеток бифидобактерий с помощью счетной камеры Горяева, и контролировали изменение активной кислотности культуральной жидкости.

Количественный учет жизнеспособных клеток бифидобактерий, в экспериментальных и контрольном образцах, проводили методом предельных разведений в пробирках с полужидкой кукурузно-лактозной средой. С последующим термостатированием посевов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 72 часов.

Соевую сыворотку для добавления в экспериментальные образцы питательной среды получали по технологической схеме, которая включает следующие операции: шелушение сои, влаготепловая обработка в течение 5 мин при температуре 120°C в 0,5-процентном растворе Na_2CO_3 при гидромодуле 1:6, удаление раствора Na_2CO_3 , дезинтеграция, водная экстракция при температуре 100°C и гидромодуле 1:5 в течение 10 мин, фильтрование, пастеризация при температуре 90°C в течение 15 мин, охлаждение до температуры 37°C , внесение заквасочной культуры, сквашивание при 37°C до pH 4,5, либо осаждение белков с помощью раствора лимонной кислоты с концентрацией 20...30 % при 90°C в течении 15 мин, фильтрация, нейтрализация ее в 30-процентном растворе NaOH до pH=6,8...7,0 (рис. 1).

Результаты исследований. На первом этапе исследования определяли изменение динамики роста бифидобактерий на традиционных питательных средах (кукурузно-лактозная среда, MRS-бульон, среда «Бифидум») и на среде с добавлением соевой сыворотки.

Как видно на рис. 2, количество клеток на традиционных питательных средах после 24 ч культивирования незначительно отличаются между собой, и находятся в таких пределах: на кукурузно-лактозной среде — $8 \cdot 10^7$ КОЕ/см³, на среде «Бифидум» — $2 \cdot 10^8$ КОЕ/см³, на бульоне MRS — $1 \cdot 10^8$ КОЕ/см³, в то время на питательной среде с добавлением соевой сыворотки было на порядок выше — $9 \cdot 10^8$ КОЕ/см³.

Среда «Бифидум» является полужидкой готовой промышленной средой, которую целесообразно использовать для количественного учета клеток в лабораторных условиях, а не для накопления биомассы, так как для выращивания бифидобактерий необходима жидкая питательная среда. Состав жидких питательных сред представлен в табл. 1.

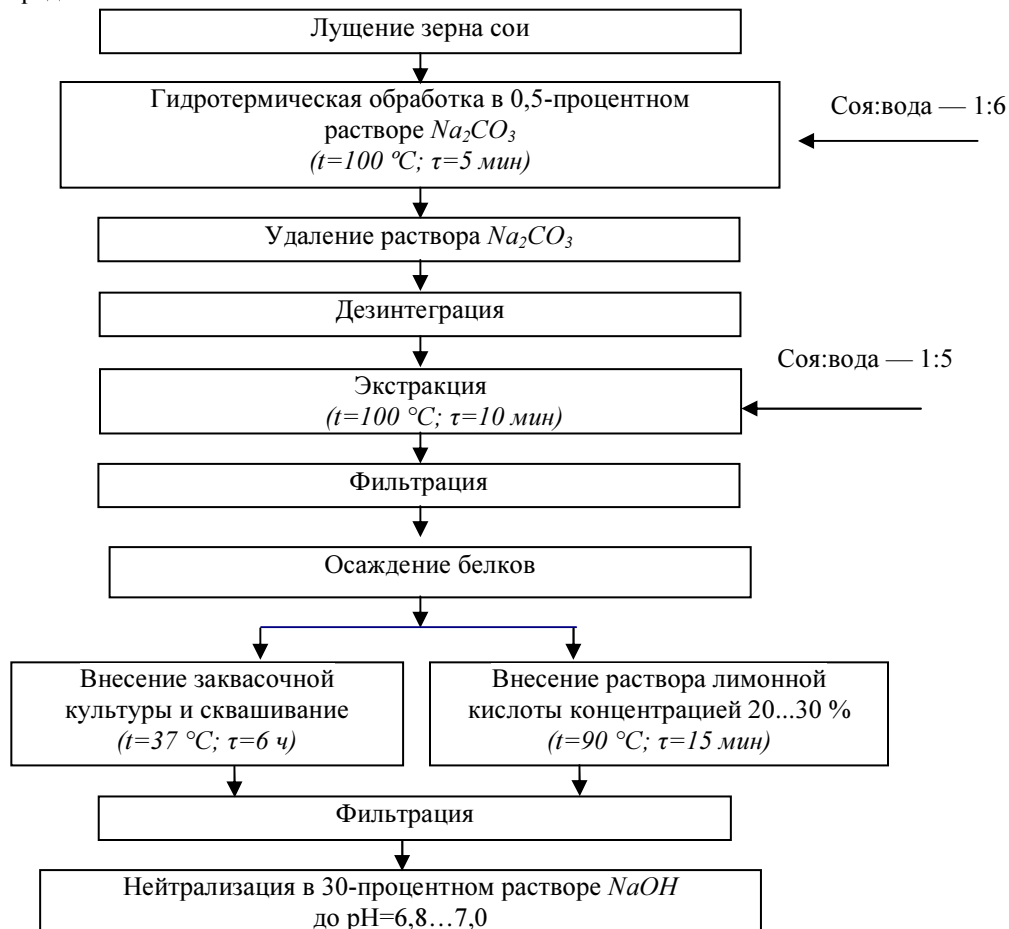
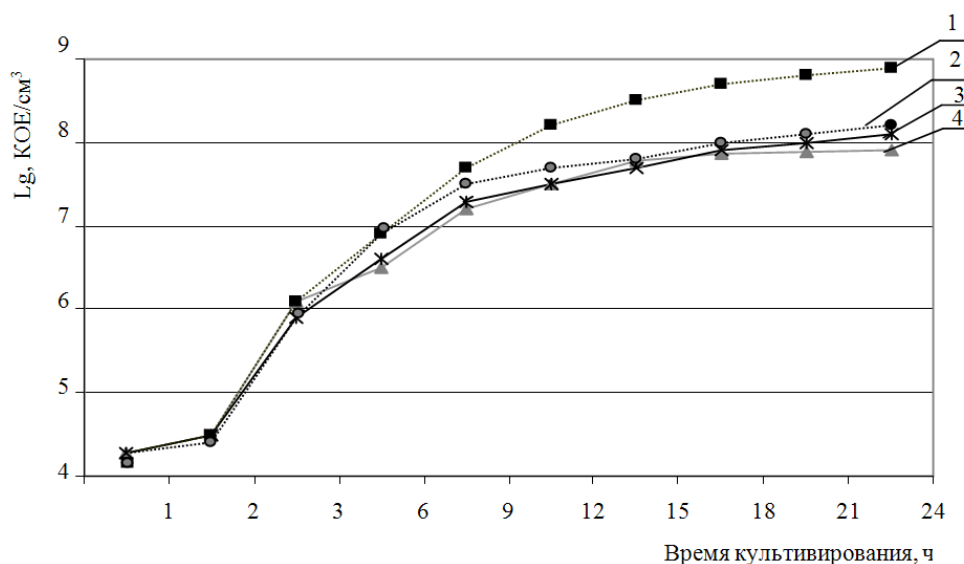


Рис. 1 — Технологическая схема получения соевой сыворотки

Так как кукурузно-лактозная среда значительно дешевле, чем MRS-бульон и при замене кукурузного экстракта на соевую сыворотку, которая содержит множество необходимых для бифидобактерий ростовых веществ, показала наилучший результат, было решено использовать ее в дальнейших исследованиях по культивированию и накоплению биомассы.

На втором этапе исследования определяли изменение динамики роста и активной кислотности бифидобактерий на лактозной среде с добавлением различной массовой доли соевой сыворотки — 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %. Контролем служила кукурузно-лактозная среда. Подсчет клеток осуществляли с помощью камеры Горяева. Данные приведены на рис. 3–4.

Как показывают полученные результаты, все образцы характеризуется хорошей биохимической активностью. С понижением содержания массовой доли соевой сыворотки до 1 % в среде происходит снижение скорости роста бифидобактерий, о чем свидетельствуют и значение активной кислотности 6,27 ед. рН, следовательно, процесс культивирования удлиняется.



1 — лактозная среда с добавлением соевой сыворотки; 2 — среда «Бифидум»;
3 — бульон MRS; 4 — кукурузно-лактозная среда

Рис. 2 — Динамика роста бактерий *B. bifidum* на разных питательных средах

Таблица 1 — Состав жидких питательных сред для культивирования бифидобактерий

Ингредиенты	Состав среды (на 1 дм ³ дистиллированной воды)		
	кукурузно-лактозная среда	лактозная среда с добавлением соевой сыворотки	бульон MRS
Кукурузный экстракт	30 см ³ /дм ³	—	—
Соевая сыворотка	—	30 см ³ /дм ³	—
Пептон	10 г/дм ³	10 г/дм ³	10 г/дм ³
МПБ	—	—	8,0 г/дм ³
Дрожжевой экстракт	—	—	4,0 г/дм ³
Лактоза	10 г/дм ³	10 г/дм ³	—
Глюкоза	—	—	20 г/дм ³
Аскорбиновая кислота	0,5 м	0,5 м	—
Натрий ацетат	—	—	5,0 г/дм ³
Аммоний лимоннокислый	—	—	2,0 г/дм ³
Натрий лимоннокислый	6,0 г/дм ³	6,0 г/дм ³	—
MgSO ₄	—	—	0,2 г/дм ³
MnSO ₄	—	—	0,04 г/дм ³
NaH ₂ P ₄	1,0 г/дм ³	1,0 г/дм ³	—
K ₂ HPO ₄	2,0 г/дм ³	2,0 г/дм ³	2,0 г/дм ³
Твин-80	—	—	1,0 г/дм ³

К концу культивирования количество клеток на среде с массовой долей соевой сыворотки 3 % достигло $2 \cdot 10^9$ КОЕ/см³, что максимально приближается к значениям контроля $8 \cdot 10^8$ КОЕ/см³, в то время как количество клеток при культивировании на лактозной среде, с массовой долей 1 % и 2 %, были значительно ниже $9 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ и $4 \cdot 10^8$ КОЕ/см³ соответственно. С повышением массовой доли соевой сыворотки от 4 % до 5 % количество клеток возрастает до $9 \cdot 10^9$ КОЕ/см³ и $7 \cdot 10^{10}$ КОЕ/см³ соответственно. Дальнейшее увеличение массовой доли сыворотки до 6 % незначительно сказывается на показателях прироста биомассы $6 \dots 7 \cdot 10^{10}$ КОЕ/см³, в то время, как значение активной кислотности, по сравнению с меньшими концентрациями (3 %, 4 %, 5 %) оказалось более низким 4,2 ед. pH. На среде с добавлением 6 % соевой сыворотки происходил активный прирост биомассы бактерий и накопление продуктов метаболизма, ростовые факторы среды истощались, что повлекло внутривидовую конкуренцию за потребление питательных веществ. Это и стало причиной снижения количества клеток после 24 ч культивирования, в то время как, активная кислотность продолжала увеличиваться.

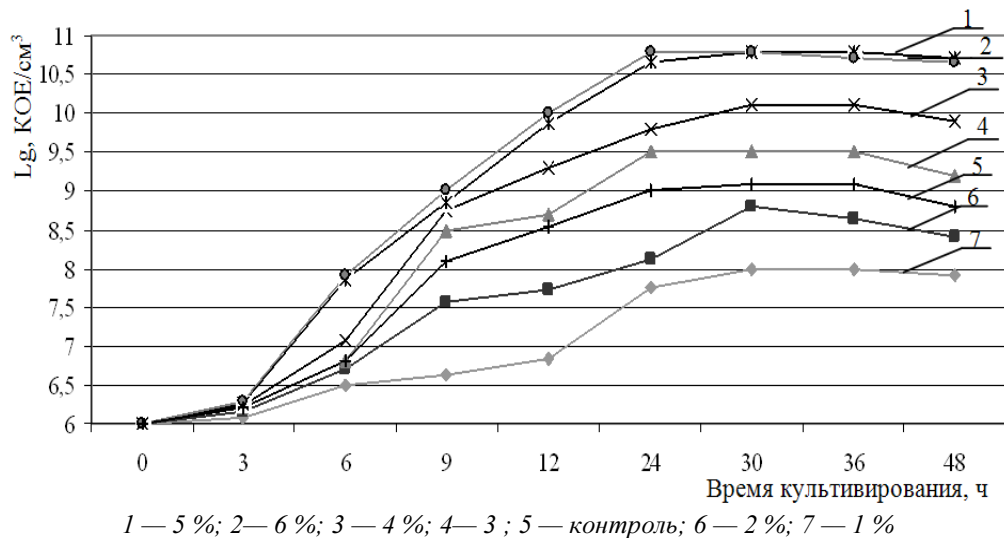


Рис. 3 — Кинетика роста *B. bifidum* на лактозной среде с добавлением различной массовой доли соевой сыворотки

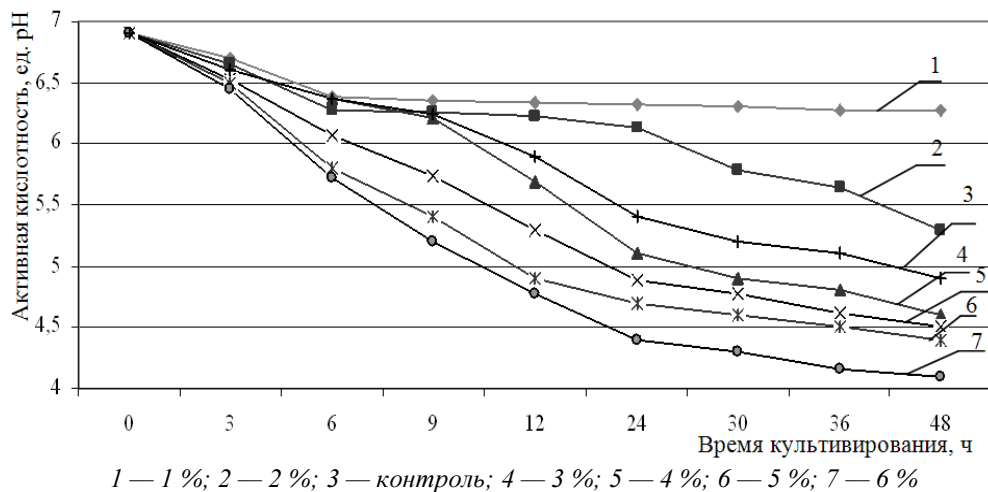


Рис. 4 — Изменение активной кислотности среды с добавлением различной массовой доли соевой сыворотки при культивировании *B. bifidum*

При количественном учёте жизнеспособных микроорганизмов в экспериментальных образцах заквасочной культуры, выращенной на среде с добавлением разной массовой доли соевой сыворотки (1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %) установили, что количество живых клеток в образце с массовой долей соевой сыворотки 3 % в 3 раза выше, чем в образце с массовой долей 1 %, и в 3 раза ниже — при 5 %, 6 %, и максимально близко к значению контроля, хотя незначительно превышает его. Результаты представлены в табл. 2.

К концу культивирования количество клеток на среде с массовой долей соевой сыворотки 3 % достигло $7 \cdot 10^9$ КОЕ/см³, что максимально приближается к значению контроля $3 \cdot 10^9$ КОЕ/см³, в то время как количество клеток при культивировании на лактозной среде с массовой долей 1 % и 2 % были значительно ниже — $7 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ и $2 \cdot 10^8$ КОЕ/см³ соответственно.

С повышением массовой доли соевой сыворотки от 4 % до 5 % количество жизнеспособных клеток возрастает — $2 \cdot 10^{10}$ КОЕ/см³ и $1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/см³ соответственно. В то время как на среде с массовой долей сыворотки 6 % наблюдали быстрый прирост биомассы жизнеспособных клеток уже на первые сутки. Согласно методике проведения данного эксперимента, мы продолжили термостатирование образца с 6 % соевой сыворотки, но результат несущественно изменился. Следовательно, бактерии исчерпали питательные вещества среды, и в дальнейшем не были способны активно развиваться и накапливать биомассу в достаточном количестве.

Таблица 2 — Количественный учет жизнеспособных бактерий *Bifidobacterium bifidum*

Название штамма	Массовая доля соевой сыворотки, %	Время культивирования, ч		
		24	48	72
<i>B. bifidum</i>	Показатели роста микроорганизмов в 1 см ³ , КОЕ			
	1%	3·10 ⁵	5·10 ⁶	7·10 ⁷
	2%	5·10 ⁵	8·10 ⁷	2·10 ⁸
	3%	6·10 ⁶	8·10 ⁸	7·10 ⁹
	4%	4·10 ⁷	1·10 ⁹	2·10 ¹⁰
	5%	1·10 ⁸	8·10 ¹⁰	1·10 ¹¹
	6%	4·10 ¹⁰	5·10 ¹⁰	5·10 ¹⁰
	контроль	2·10 ⁶	6·10 ⁸	3·10 ⁹

Выводы. По результатам данного исследования можно сделать заключение, что добавление соевой сыворотки в питательную среду улучшает ее ростовые качества, обогащая бифидогенными факторами, что приводит к большему выходу биомассы бактерий вида *B. Bifidum*, чем при культивировании на классических средах. Положительная роль соевой сыворотки заключается в том, что она имеет сложный многокомпонентный состав, обладающий физиологической функциональностью, и содержит соединения, необходимые для роста и развития бифидобактерий: заменимые и незаменимые аминокислоты, водорастворимые витамины, полисахариды (целлюлоза и гемицеллюлоза), фитовещества (изофлавины), минеральные вещества.

Проведенные микробиологические исследования позволили выбрать максимально подходящее количество соевой сыворотки для добавления в питательную лактозную среду, и составило 3 % массовой доли от общего объема среды. Выбор был аргументирован тем, что показатель прироста биомассы бактерий, необходимый для использования в пищевой промышленности, максимально приближался к контролю. С повышением массовой доли соевой сыворотки от 4 % до 5 % количество жизнеспособных клеток возрастает до 2·10¹⁰ КОЕ/см³ и 1·10¹¹ КОЕ/см³ соответственно. Такие данные позволяют рекомендовать к использованию лактозную среду с добавлением соевой сыворотки от 4 % до 5 % для культивирования бифидобактерий с целью получения биологически-активных препаратов.

Таким образом, доказано, что соевая сыворотка может быть использована для приготовления жидкой лактозной среды в качестве растительного аналога кукурузного экстракта, что значительно сокращает расходы, одновременно обогащая среду дополнительными бифидогенными факторами. В дальнейшем планируем заменить кукурузный экстракт соевой сывороткой и в полужидкой лактозной среде для количественного учета жизнеспособных клеток рода *Bifidobacterium*.

Литература

1. Гришель, А. И. Пробиотики и их роль в современной медицине [Текст] / А. И. Гришель, Е. П. Кишкурно. // Вестник фармации. — 2009. — № 1 (43). — С. 90 – 93.
2. Cheikhoussef, A. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application [Text] / A. Cheikhoussef, N. Pogori, H. Zhang // International Journal of Food Microbiology. — 2008. — Vol. 125. — P. 215–222.
3. Шерстобитов, В. В. К вопросу о соевом молоке [Текст] / В. В. Шерстобитов // Молочная промышленность. — 2003. — № 1. — С. 53 – 54.
4. Силенко, Г. П. Лечебные и питательные свойства соевых продуктов [Текст] / Г. П. Силенко, Л. В. Капрельянц, А. С. Аметов и др. — М.: «Сигнал», 2000. — 90 с.
5. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание [Текст]: Т. 3. Пробиотики и функциональное питание. — М.: Грантъ, 2001. — 288 с.
6. Капрельянц, Л. В. Углеводные пребиотические вещества из сои [Текст] / Л. В. Капрельянц, В. В. Шерстобитов, Л. В. Рекичанская // Зерновые продукты и комбикорма. — 2005. — № 2. — С. 18–20.
7. Кигель, Н. Ф. Заквасочные культуры для ферментированных молочных продуктов: основные свойства и виды [Текст] / Н. Ф. Кигель // Молочна промисловість. — 2005. — № 1 (16). — С. 26–29.
8. Biavati, V. Probiotics and Bifidobacteria [Text] / V. Biavati, V. Bottazzi, L. Morelli. — Novara (Italy): MOFIN ALCE, 2001. — 79 p.
9. Biavati, V. The Family Bifidobacteriaceae. The Prokaryotes. Third Edition: a handbook on the Biology of Bacteria: Synbiotic Association, Biotechnology, Applied Microbiology [Text] / V. Biavati, P. Mattarelli. — Singapore: Springer Science, 2006. — Vol. 3. — P. 322–382.