

УДК 579.24:664.642.2

## ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ В КАЧЕСТВЕ СТАРТЕРНЫХ КУЛЬТУР ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЗАКВАСКИ ПРЯМОГО ВНЕСЕНИЯ

Нагызбеккызы Э., Молдагулова Н.Б., Сембаева Д.Ж., Сембаев К.Д.,  
Молдагулова Э.Б., Дуамбеков М.С.

ТОО «Экостандарт.kz», Нур-султан, e-mail: elvira\_29.04@mail.ru

Изучены основные параметры культивирования штаммов молочнокислых бактерий: определение оптимальных и предельных температур роста; рост в питательной среде; продолжительность культивирования, доза внесения от объема питательной среды. Отработаны оптимальные параметры культивирования штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав консорциума для получения закваски прямого внесения. Культура *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* показала высокий титр клеток при условиях роста  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , 48 ч,  $\text{pH} = 6,5 \pm 0,2$ . Тогда как для культуры *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* оптимальными условиями культивирования оказались температура культивирования  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , продолжительность инкубации 16 ч и 24 ч, при  $\text{pH} = 6,5 \pm 0,2$ . Также высокий титр клеток получен ( $1,5 \times 10^9$  и  $1,42 \times 10^9$  соответственно) при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , но при этом продолжительность культивирования составляла 48 ч. В следующей серии опытов была подобрана оптимальная питательная среда для культивирования всех трех исследуемых штаммов, наилучшие результаты получены на среде опытный вариант № 6 (0,5 г/л витаминного концентрата), где рост титра клеток на порядок выше. Выбрана оптимальная доза инокулята, обеспечивающая равномерный рост и размножение молочнокислых микроорганизмов. Для всех трех пробиотических культур оптимальным количеством посевного материала выбрана доза инокулята 5% от объема питательной среды.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, пробиотики, закваски, *Lactobacillus*, штаммы, ростовые характеристики

## SELECTION OF OPTIMAL PARAMETERS FOR CULTIVATING THE LACTIC ACID BACTERIA STRAINS PERSPECTIVE AS A STARTER CULTURES FOR DEVELOPMENT THE STARTER OF DIRECT APPLICATION

Nagyzbekkyzy E., Moldagulova N.B., Sembaeva D.Zh., Sembaev K.D.,  
Moldagulova E.B., Duambekov M.S.

LLP «Ecostandard. kz», Nur-Sultan, e-mail: elvira\_29.04@mail.ru

The main parameters of lactic acid bacteria strains cultivation were studied: the optimal and limiting temperatures of growth; growth in a nutrient medium; the duration of cultivation, the dosage depending the volume of the nutrient medium. The optimal parameters of lactic acid bacteria strains cultivation, that make up the consortium for development the starter of direct addition, were selected. The strain *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* showed a high titer of cells under growth conditions  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  for 48 h,  $\text{pH} = 6.5 \pm 0.2$ . Whereas for culture *Pediococcus acidilactici* and *Streptococcus spp.* the optimal cultivation conditions were: cultivation temperature of  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , incubation time of 16 h and 24 h, at  $\text{pH} = 6.5 \pm 0.2$ . Also, a high cell titer was obtained ( $1.5 \times 10^9$  and  $1.42 \times 10^9$ , respectively) at a temperature of  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , but the cultivation duration was 48 hours. In the next series of experiments, the optimal nutrient medium for cultivation of all three strains under study was selected, the best results were obtained on the medium experimental variant No. 6. (0.5 g/l of vitamin concentrate), where the growth of cell was higher. The optimal dose of inoculum, ensuring uniform growth and reproduction of lactic acid microorganisms was selected. For all three probiotic cultures, the optimal amount of inoculum was 5% of the volume of the nutrient medium.

**Keywords:** lactic acid bacteria, probiotics, ferments, *Lactobacillus*, strains, growth characteristics

Большинство микроорганизмов, участвующих в коррекции эндоэкологии человека, хорошо растут в молоке, это и объясняет тот факт, что именно молоко является основой многих эффективных пробиотических продуктов.

Для человека потребление натуральных, в частности кисломолочных, продуктов, полученных биотехнологическим способом с использованием различных микроорганизмов в качестве заквасочных или стартерных культур, является наиболее естественным и доступным путем получения пробиоти-

ков. Несмотря на имеющиеся достижения в этой области актуальным является поиск отечественных конкурентоспособных стартерных культур молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии (МКБ) проявляют выраженное пробиотическое действие на организм, в связи с чем их часто используют в качестве заквасочных культур [1, 2].

Проводя направленный отбор микроорганизмов, можно получить штаммы бактерий, обладающих специальным комплексом биотехнологических свойств, что позволяет проектировать и создавать новые продук-

ты с направленным составом микрофлоры. Ценными считаются штаммы, длительно сохраняющие биохимическую активность, зависящую и от внешних факторов (состава питательной среды, температуры и т.д.), и от соотношения между биохимически активными и неактивными клетками в популяциях микроорганизмов, что определяет жизнеспособность культуры, ее практическую ценность [2, 3].

Температурный диапазон жизнедеятельности МКБ довольно широк: мезофильные виды растут при оптимальной температуре 25–32 °С; минимальной температурой для них является 10 °С. Для термофильных видов оптимальная температура роста колеблется в пределах 40–45 °С, а минимальная – 20–22 °С. Имеются сведения, что некоторые МКБ способны расти при температуре 3–5 °С. Для большинства видов МКБ оптимальная температура роста составляет 37–38 °С, а кислотность рН = 6,5 ± 0,2 [1, 4, 5]. Также известно, что рост и размер колонии на плотной среде зависит от состава питательной среды [6].

Цель исследования: разработка оптимальных параметров культивирования пробиотических культур молочнокислых бактерий, повышение титра жизнеспособных клеток.

#### Материалы и методы исследования

В ходе исследования решались следующие задачи:  
– отработать оптимальные параметры культивирования штаммов, входящих в состав консорциума для получения закваски. Основные изучаемые признаки при этом следующие: определение оптимальных и предельных температур роста; рост в питательной среде; продолжительность культивирования.

На первом этапе эксперимента с целью определения оптимальных параметров культивирования штаммов были исследованы три пробиотически ак-

тивных штамма МКБ, выделенных из различных кисломолочных продуктов и отобранные на основе изучения у них основных биологических свойств. В качестве основных параметров культивирования штаммов были изучены такие параметры, как оптимальная питательная среда, температура и продолжительность культивирования.

С целью повышения культуральной активности штаммов МКБ были разработаны оптимальные питательные среды, проведены эксперименты по культивированию исследуемых штаммов на модифицированных средах и элективной среде МРС-бульон с добавлением различных концентраций витаминного концентрата. Экспериментальные питательные среды засевались 1% посевного материала от объема среды. Культуры инкубировали при 20 ± 1 °С, 37 ± 1 °С, 45 ± 1 °С в течение 16, 24 и 48 ч. Определение титра клеток проводили по методу Коха.

Для определения оптимального времени культивирования снимали титр культур после 16, 24, 48 ч инкубации при различной температуре.

Изучали влияние дозы инокулята на рост и размножение бактерий. Оптимальное количество посевного материала выбирали по максимальной скорости роста бактерий, отражающей эффективность накопления биомассы и жизнеспособных клеток микроорганизмов.

#### Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенной работы из различных видов МКБ, выделенных нами для создания заквасок прямого внесения, были отобраны 3 культуры молочнокислых бактерий (табл. 1).

Из маточного инокулята исследуемой культуры сделан посев в объеме 1% посевного материала от объема питательной среды МРС бульон (HiMedia). Культуры были инкубированы при температурных режимах 20 ± 1 °С, 37 ± 1 °С, 45 ± 1 °С в течение 16, 24 и 48 ч. Определение титра клеток проводили по методу Коха.

Таблица 1

Характеристика отобранных культур

Наименование культуры	Источник выделения	Микроморфология	Макроморфология
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Кумыс	Короткие палочки, грамположительные, спор не образуют	Поверхностные колонии, светлые, непрозрачные, выпуклые, края ровные, гладкой S формы, пигментов не образуют, диаметр колоний около 1 мм
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Сухая закваска для йогурта «Нарине»	Круглые кокки, грамположительные	Мелкие колонии блестящие, выпуклые, края ровные, гладкой S формы, пигментов не образуют, диаметр колоний 0,5–1 мм
<i>Streptococcus spp.</i>	Кефир «Natige»	Кокки, овальные, грамположительные	Колонии молочно-белого цвета, выпуклые, края ровные, гладкой S формы, пигментов не образуют, диаметр колоний 1–2 мм

В результате полученных данных, стало известно что культура *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* показала высокий титр клеток при температуре и продолжительности культивирования –  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , 48 ч. Тогда как для культуры *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* оптимальными оказались иные условия, эти культуры показали высокий титр клеток при различных условиях культивирования, а именно высокий титр клеток зафиксирован при температуре инкубации  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , с продолжительностью 16 ч и 24 ч, также получены высокие показатели культивирования их ( $1,5 \times 10^9$  и  $1,42 \times 10^9$  соответственно) при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , но при этом продолжительность культивирования составляла 48 ч (табл. 2).

Для повышения титра молочнокислых бактерий при культивировании в лабораторных условиях, был проведен анализ

отечественных и зарубежных работ, проведенных в данном направлении. Анализ показал, что наибольшее влияние на рост МКБ оказывает концентрация в питательной среде источников углеводов, белков и витаминов.

Опираясь на данную информацию, был проведен анализ зависимости роста молочнокислых микроорганизмов на модифицированных средах и элективной среде МРС-бульон с добавлением различных концентраций витаминного концентрата.

В результате проведения экспериментов с целью повышения культуральной активности штаммов МКБ были разработаны оптимальные питательные среды в различных вариантах (табл. 3, 4). Согласно проведенному выше исследованию выбранные нами условия культивирования (температура и время) являются оптимальными для роста штаммов МКБ.

Таблица 2

Титр клеток пробиотических культур при различных параметрах культивирования

Культура	Температурный режим	Время культивирования, ч		
		16	24	48
<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i>	$20 \pm 1^\circ\text{C}$	$1,0 \times 10^6$	$9,15 \times 10^7$	$1,78 \times 10^8$
	$37 \pm 1^\circ\text{C}$	$2,0 \times 10^8$	$1,96 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$
	$45 \pm 1^\circ\text{C}$	$2,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$3,65 \times 10^6$
<i>Pediococcus acidilactici</i>	$20 \pm 1^\circ\text{C}$	$5,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$
	$37 \pm 1^\circ\text{C}$	$1,48 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,65 \times 10^8$
	$45 \pm 1^\circ\text{C}$	$2,85 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
<i>Streptococcus spp.</i>	$20 \pm 1^\circ\text{C}$	$4,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$1,42 \times 10^9$
	$37 \pm 1^\circ\text{C}$	$1,81 \times 10^9$	$1,75 \times 10^9$	$1,0 \times 10^5$
	$45 \pm 1^\circ\text{C}$	$1,85 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$

Таблица 3

Кинетика роста пробиотического штамма *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* при различных условиях роста

Изоляты			<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i>
№ п/п	Состав культуральной среды	Условия культивирования	Титр клеток, КОЕ/мл
1	МРС бульон (HiMedia)	$37 \pm 1^\circ\text{C}$ , 48 ч, pH $6,5 \pm 0,2$	$1,73 \times 10^9$
2	Модифицированная среда*		$3,0 \times 10^8$
3	МРС бульон/питательный бульон 50/50		$5,3 \times 10^8$
4	МРС бульон/питательный бульон 70/30		$1,9 \times 10^8$
5	МРС бульон +1% вит концентрат (А, Е, С)		$2,63 \times 10^9$
6	МРС бульон +0,5% вит концентрат (А, Е, С)		$3,57 \times 10^9$

\* П р и м е ч а н и е: модифицированная среда следующего состава, г/л: витаминный концентрат – 5.00, гидролизат казеина – 1.00, пептон – 9.00, мясной экстракт – 10.00, дрожжевой экстракт – 5.00, глюкоза – 20.00, твин-80 – 1.00, магния сульфат – 0.10, лимоннокислый натрий – 5.00, фосфорнокислый натрий – 5.00, pH  $6,5 \pm 0,2$ . Стерилизация проводилась при  $121^\circ\text{C}$ , 20 мин.

Таблица 4

Кинетика роста пробиотических штаммов *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* при различных условиях роста

Изоляты			<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
№ п/п	Состав культуральной среды	Условия культивирования	Титр клеток, КОЕ/мл	
1	МРС бульон (HiMedia)	37 ± 1 °С, 24 ч, рН 6,5 ± 0,2	1,36×10 <sup>9</sup>	1,66×10 <sup>9</sup>
2	Модифицированная среда*		9×10 <sup>8</sup>	1,0×10 <sup>6</sup>
3	МРС бульон/ питательный бульон 50/50		3,0×10 <sup>6</sup>	3,12×10 <sup>5</sup>
4	МРС бульон/ питательный бульон 70/30		2,3×10 <sup>7</sup>	2,0×10 <sup>6</sup>
5	МРС бульон +1% вит концентрат (А, Е, С)		2,61×10 <sup>9</sup>	1,96×10 <sup>9</sup>
6	МРС бульон +0,5% вит концентрат (А, Е, С)		3,4×10 <sup>9</sup>	2,8×10 <sup>9</sup>

При выборе оптимальной питательной среды для всех трех исследуемых штаммов, наилучшие результаты получены на среде опыт. вар. № 6 (0,5 г/л витаминного концентрата), где рост титра клеток культуры *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* в 1 мл составляет 3,57×10<sup>9</sup>, рост титра клеток культуры *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* в 1 мл составляет 3,4×10<sup>9</sup> и 2,8×10<sup>9</sup> соответственно. Также в питательной среде опыт. вар. № 5 (1,0 г/л витаминного концентрата) – титр клеток культуры *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* в 1 мл составляет 2,63×10<sup>9</sup>, а титры клеток культуры *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* в 1 мл составляет 2,61×10<sup>9</sup> и 1,96×10<sup>9</sup> соответственно.

В результате анализа полученных данных нами была составлена пропись модифицированной среды № 6 следующего состава, г/л: витаминный концентрат – 5.00, протеозопептон – 10.00, мясной экстракт – 10.00, дрожжевой экстракт – 5.00, глюкоза – 20.00, твин – 80–1.00, аммония цитрат – 2.00, натрия ацетат – 5.00, магния сульфат – 0.10, марганца сульфат – 0.05, натрия гидрофосфат – 2.00, рН 6,5 ± 0,2. Хотелось бы отметить, что все три исследуемые культуры показали хороший рост в модифицированной среде № 5 следующего состава, г/л: витаминный концентрат – 10.00, протеозопептон – 10.00, мясной экстракт – 10.00, дрожжевой экстракт – 5.00, глюкоза – 20.00, твин-80 – 1.00, аммония цитрат – 2.00, натрия ацетат – 5.00, магния сульфат – 0.10, марганца сульфат – 0.05, натрия гидрофосфат – 2.00, рН 6,5 ± 0,2. Стерилизация проводилась при 121 °С, 20 мин. Полученный титр клеток культур *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus*, *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* в питательной среде № 5 чуть ниже по сравнению с титром клеток, полученных в среде № 6, однако они выше по сравнению с другими титрами кле-

ток, полученных в контрольной и опытной питательной среде.

Полученные результаты, дали возможность повысить титр клеток в культуральной жидкости *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* до 3,57×10<sup>9</sup> при температуре культивирования 37 ± 1 °С, 48 ч. А для культуры *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* до 3,4×10<sup>9</sup> и 2,8×10<sup>9</sup> соответственно, при температуре культивирования 37 ± 1 °С, с продолжительностью 24 ч.

Культивирование или выращивание микроорганизмов осуществляется с целью получения биомассы клеток бактерий и продуктов их метаболизма. Важную роль при этом играет активность посевного материала. Инокулят должен обладать высокой биохимической активностью, использование которого позволит интенсифицировать процесс наращивания клеток и получить биомассу с высоким титром бактерий. В связи с этим далее изучали влияние дозы инокулята на рост и размножение бактерий.

Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют, что при добавлении в питательную среду 3% инокулята нарастание биомассы бактерий происходит медленно, это означает, что процесс культивирования удлиняется. С повышением дозы инокулята до 5%, нарастание биомассы бактерий происходит интенсивнее, что подтверждается полученными данными. Дальнейшее увеличение дозы инокулята до 7% также приводит к более быстрому росту бактерий.

Количество клеток культуры *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* к концу культивирования при дозе инокулята 5% достигает 1,15×10<sup>9</sup> КОЕ/мл, что на порядок выше, чем при дозе инокулята 3% (7×10<sup>8</sup> КОЕ/мл). Это связано с тем, что клетки, попав в свежую, богатую питательными веществами среду начинают размножаться с максимальной для данной культуры скоростью. И чем выше начальная концентрация клеток, тем

меньше времени им требуется для активизации необходимых ферментных систем, синтеза нуклеиновых кислот, особенно РНК, которые необходимы для биосинтеза белков. Наибольшее количество клеток было отмечено при дозе инокулята 5% и составило для культуры *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* –  $1,15 \times 10^9$  КОЕ/мл, это не намного выше, чем при дозе инокулята 7% –  $1,0 \times 10^9$  КОЕ/мл. Культуры *Pediococcus acidilactici* и *Streptococcus spp.* также показали высокий титр при дозе внесения инокулята 5% (табл. 5).

Таблица 5

Рост трех пробиотических штаммов при различной дозе внесения

№ п/п	Культуры	Титр клеток при дозе инокулята		
		3%	5%	7%
1	<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i>	$7 \times 10^8$	$1,15 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$
2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	$1,08 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
3	<i>Streptococcus spp.</i>	$1,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$

Таким образом, для всех трех пробиотических культур оптимальной выбрана доза инокулята 5% от объема питательной среды, обеспечивающая равномерный рост и размножение микроорганизмов. Дальнейшее увеличение массовой доли посевного материала нецелесообразно как по экономическим, так и по технологическим показателям.

### Заключение

Выделение и отбор пробиотически активных МКБ – сложный и трудоемкий

процесс, который требует немало времени и затрат. Изучение биологических свойств новых штаммов этих микроорганизмов является актуальной и своевременной задачей и немаловажным аспектом является подбор оптимальных параметров культивирования (температура, продолжительность, состав питательной среды и т.д.). В связи с чем нами были проведены исследования в данном направлении и согласно полученным экспериментальным данным, определены рекомендуемые параметры культивирования штаммов, используемые для получения йогурта на основе верблюжьего молока.

### Список литературы

1. Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: лабораторный практикум: учеб.-метод. пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. 85 с.
2. Просеков А.Ю. Научные основы производства продуктов питания: учеб. пособие. Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2005. 234 с.
3. Китаевская С.В. Современные тенденции отбора и идентификации пробиотических штаммов молочнокислых бактерий // Вестник Казанского технологического университета. 2012. № 17. С. 184–188.
4. Yang E., Fan L., Yan J., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S., Walker B. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. AMB Express, 2018. vol. 8. no. 10. P. 14.
5. Chramostova J., Mosnova R., Lisova I., Pesek E., Drbohlav J., Nemeckova I. Influence of Cultivation Conditions on the Growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, and *Streptococcus thermophilus*, and on the Production of Organic Acids in Fermented Milks. Czech J. Food Sci. 2014. vol. 32. no. 5. P. 422–429.
6. Тренина М.А., Епремян А.С., Стоянова Л.Г. Зависимость ростовых характеристик природных штаммов *Lactococcus lactis subsp. lactis* от состава агаризованных питательных сред, используемых для наращивания биомассы // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2015. № 1. С. 31–36.