

УДК 637.146.21:579.872.07

МОЛОЧНОКИСЛЫЕ И ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ: ФОРМИРОВАНИЕ СООБЩЕСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ С БИФИДОГЕННЫМИ И ГИПОТЕНЗИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ

© 2019 г. А. В. Бегунова¹, И. В. Рожкова¹, Е. А. Зверева², О. А. Глазунова², Т. В. Фёдорова², *

¹Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности,
Москва, 115093 Россия

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2018 г.

После доработки 05.04.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

В работе представлены результаты исследований по созданию на основе молочнокислых и пропионовокислых бактерий комбинированной закваски и изучению функциональных свойств продуктов, полученных на ее основе. Показано, что кисломолочный продукт, полученный с использованием комбинированной закваски на основе подобранных штаммов: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CR201, *Lactobacillus rhamnosus* Ф и *Propionibacterium shermanii* Э2 в соотношении 2 : 1 : 6 (об./об./об.) *in vitro* обладал выраженным антагонистическим действием в отношении патогенных, условно-патогенных микроорганизмов и возбудителей порчи продуктов, а также ингибировал активность ангиотензин-1-превращающего фермента, в моделях *in vivo* оказывал бифидогенное и умеренное гипотензивное действие. Кроме того, добавление в обезжиренное молоко гидролизатов сывороточных белков коровьего молока приводило к усилению роста пропионовокислых бактерий и увеличению количества жизнеспособных клеток в готовом кисломолочном продукте, что повышало его антимикробную активность *in vitro* и бифидогенное (пробиотическое) действие *in vivo*.

Ключевые слова: пробиотики, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, пропионовокислые бактерии, комбинированная закваска, белково-пептидные гидролизаты, антагонистическая активность, антигипертензивная активность

DOI: 10.1134/S0555109919060047

В современных условиях в связи с изменением экологической обстановки и широким применением антибиотиков наблюдается ухудшение здоровья населения, связанное в первую очередь с нарушениями микробиома человека, приводящее к тяжелым заболеваниям как желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), так и организма в целом. В настоящее время проблема изучения микробной экологии человека, а также в этой связи симбионтных и пробиотических микроорганизмов, становится актуальной и важной задачей [1–5].

В последние годы концепция оздоровления человека и предупреждения развития различных заболеваний ЖКТ заключается во введении в рацион кисломолочных продуктов, содержащих пробиотические штаммы бактерий, включая лактобактерии, бифидобактерии и пропионовокислые бактерии [6–9]. При этом все большее внимание исследователей привлекают пропионовокислые

бактерии, обладающие пробиотическими свойствами, благодаря продукции уксусной, пропионовой и минорных органических кислот, ферментов и биологически активных продуктов их вторичного метаболизма [10]. Пропионовокислые бактерии в ЖКТ устойчивы к действию желчных кислот и выдерживают низкую (рН 2.0) кислотность среды в желудке [11]. Они ингибируют активность р-глюкуронидазы, азаредуктазы и нитроредуктазы – ферментов, образуемых кишечной микрофлорой и вовлекаемых в образование мутагенов, канцерогенов и промоторов роста опухолей [12]. Некоторые штаммы пропионовокислых бактерий способны синтезировать бактериоцины, например, *Propionibacterium thoenii* P126 и *Propionibacterium jensenii* B1264, подавляющие развитие ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжей и плесневых грибов [13]. Экспериментальные и клинические исследования

пропионовых бактерий показали наличие у них иммуномодулирующей, антивирусной, противовоспалительной, бифидогенной активностей, а также гипохолестеринемических, антиоксидантных, антиканцерогенных и др. свойств [10]. В ряде исследований также показана высокая антимуtagenная активность пропионовокислых бактерий [12].

Таким образом, широкий спектр продуктов вторичного метаболизма и комменсальный характер взаимодействий с молочнокислыми бактериями делают пропионовокислые бактерии перспективными для использования в процессах ферментации и получения широкого спектра различных функциональных продуктов [13, 14].

Цель работы – создание комбинированной закваски на основе молочнокислых и пропионовокислых бактерий и изучение функциональных свойств продуктов, полученных с ее использованием в моделях *in vitro* и *in vivo*

МЕТОДИКА

Культуры. В работе использовались штаммы молочнокислых *Lactobacillus rhamnosus* Ф, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CR201 и пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* Э2 из фонда Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Москва, Россия). Для культивирования лактобактерий использовали стерильное обезжиренное молоко, для пропионовокислых бактерий – кукурузно-лактозную среду ГМК2 (“Биокомпас-С”, Россия).

В качестве тест-штаммов были использованы грамтрицательные *Escherichia coli* В-125 и грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* 2097 (из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского применения Минздрава России), а также вызывающий порчу продуктов штамм плесневого микроскопического гриба *Penicillium brevicompactum*, выделенный из сметаны, и изолят дрожжей *Torulasporea delbrueckii*, выделенный из йогурта. Тест-культуры *S. aureus* 2097, *E. coli* В-125, *P. brevicompactum* и *T. delbrueckii* выращивали пробирках на скошенном питательном агаре следующего состава (г/л): пептон мясной ферментативный – 21.0, агар микробиологический – 12.15, натрия хлорид – 6.5, глюкоза – 6.25, Na_2HPO_4 – 3.5, KH_2PO_4 – 0.6. *S. aureus* 2097 и *E. coli* В-125 культивировали при $37 \pm 2^\circ\text{C}$, *P. brevicompactum* и *T. delbrueckii* – при $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Антагонистическая активность. Антагонистическую активность штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий определяли методом смешанных популяций в сравнении с ростом тест-штаммов в монокультурах [15]. Совместное культивирование исследуемых штаммов молоч-

нокислых и пропионовокислых бактерий и тест-штаммов проводили на питательной среде следующего состава (г/л гидролизованного молока): глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5.0, KH_2PO_4 – 4.0, при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и $24 \pm 1^\circ\text{C}$ для тест-штаммов бактерий и грибов соответственно. После 24 и 48 ч совместного культивирования с тест-штаммами бактерий проводили высевы на плотные питательные среды, для дрожжей и плесневых грибов после 24 и 72 ч соответственно.

Антагонистическую активность кисломолочных напитков по отношению к патогенным, условно-патогенным микроорганизмам и возбудителям порчи продуктов определяли методом диффузии в агар [16]. Исследуемые образцы вносили в виде кисломолочного продукта без подщелачивания.

Биосовместимость штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактериальных культур. Биосовместимость культур определяли методом прямого совместного культивирования на поверхности плотной питательной среды (капельная методика) [17]. Суточную культуру наносили на поверхность питательной среды бактериологической петлей диаметром 3 мм. Посев оставляли при комнатной температуре до полного впитывания капли. После этого, отступив 1–2 мм от края первого пятна, наносили каплю культуры тестируемого микроорганизма. Растекаясь, вторая капля затекала на пятно культуры до половины диаметра. В той части, где произошло наложение капель, создавались условия для возникновения конкурирующих отношений между культурами. Свободные части пятен каждой культуры служили контролем жизнеспособности каждой из них. После подсыхания капель чашки инкубировали в анаэроостате в анаэробных условиях при 30°C . Наличие антагонизма выявляли визуально по наличию признаков подавления роста одной культуры другой.

Питательная среда для определения биосовместимости культур имела следующий состав: гидролизованное молоко – 50%, дрожжевой автолизат – 4%, KH_2PO_4 – 4 г/л, агар – 1.5%, объем доводили до 1 л дистиллированной водой.

Определение количества клеток. Количество клеток *Lb. rhamnosus* в чистой и смешанных культурах определяли методом посева на питательную среду MRS-агар. Культивирование проводили в анаэробных условиях при $37 \pm 1^\circ\text{C}$, подсчитывали все выросшие на среде колонии в течение 48–72 ч.

Количество клеток *Pr. shermanii* в чистой и смешанных культурах определяли методом посева на питательную среду следующего состава (%): триптон – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, агар-агар – 1.5, K_2HPO_4 – 0.025, MnSO_4 – 0.005 и лактат натрия – 2.1 (60%-ный сироп) [18]. Культивирование проводили в анаэробных условиях при $30 \pm 1^\circ\text{C}$, подсчитывали выросшие на среде колонии. В смешанной культуре *Pr. shermanii* подсчет вырос-

ших колоний осуществляли через 2–3 и 6 сут термостатирования при $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Количество клеток бактерий рассчитывали как разность между общим количеством колоний, выросших через 6 сут, и количеством колоний, выросших через 2–3 сут [19].

Количество клеток *Lc. lactis* ssp. *cremoris* определяли по ГОСТ 33951-2016 “Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов”.

Кислотообразующая активность штаммов. Кислотообразующую активность определяли после внесения в стерилизованное обезжиренное молоко 1% закваски с последующим культивированием в биореакторах фирмы DASGIP (“Eppendorf”, Германия) с автоматическим измерением активной кислотности.

Содержание органических кислот. Органические кислоты в среде (молочная, уксусная и пропионовая) анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Agilent Infinity 1290 (“Agilent Technologies”, США) с детекцией на диодно-матричном детекторе при длине волны 210 нм с использованием колонки Zorbax SB-C8 (4.6 × 50 мм, 1.8 мкм) как описано в работе [15].

Определение функциональных свойств кисломолочных продуктов *in vitro*. Антиоксидантную активность *in vitro* в образцах кисломолочных напитков определяли флуоресцентным методом ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (“BioTek”, США) с генерацией пероксильного радикала в реакционной среде [20].

Гипотензивную активность *in vitro* в образцах белково-пептидных гидролизатов белков подсырных сывороток определяли по их способности ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент (АПФ) – ключевое звено ренин-ангиотензиновой системы, участвующей в регуляции артериального давления [20]. Измерения проводили с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (“BioTek”).

Определение функциональных свойств кисломолочных продуктов в моделях *in vivo*. Исследование гипотензивных свойств кисломолочных продуктов проводили на самцах крыс линии SHR (Питомник лабораторных животных “ПУЩИНО”, Пушкино, Россия) со спонтанной гипертензией (Spontaneously hypertensive rats) [21]. Животные случайным образом были распределены на три группы по 10 особей каждая:

– контрольная группа – вводили по 2 мл дистиллированной воды;

– опытная группа № 1 – вводили по 2 мл кисломолочного продукта на основе обезжиренного молока;

– опытная группа № 2 – вводили по 2 мл кисломолочного продукта с добавлением гидролизата сывороточных белков молока.

Введение соответствующих образцов осуществлялось ежедневно внутривентрикулярно при помощи зонда. В течение 25 сут эксперимента проводили контроль уровня артериального давления у лабораторных животных с использованием монитора Coda Monitor (“Kent Scientific”, США) с набором манжет и датчиков RAT-CUFFKIT (“Kent Scientific”, США). Для каждого животного проводили не менее 10 циклов измерений, а полученные при этом результаты усредняли.

Исследование бифидогенных свойств кисломолочных продуктов проводили на самцах крыс линии Wistar (бридированы в виварии ФИЦ Биотехнологии РАН) на модели антибиотик-ассоциированного дисбиоза [22]. Дисбиоз индуцировали ежедневным введением внутривентрикулярно с помощью зонда антибиотика (АБ) – 10%-ного фторхинолон байтрила (Байтрил®, “Bayer”, Германия) в дозе 10 мг на 1 кг массы тела животного. В эксперименте по тестированию бифидогенных свойств было взято четыре группы по 10 животных каждая:

1 – интактная группа, без введения АБ;

2 – контрольная группа, в которой через 30 мин после введения АБ вводили по 3 мл дистиллированной воды;

3 – опытная группа № 1, в которой через 30 мин после введения АБ вводили по 3 мл кисломолочного продукта на основе обезжиренного молока;

4 – опытная группа № 2 – через 30 мин после введения АБ вводили по 3 мл кисломолочного продукта с добавлением гидролизата сывороточных белков молока.

По окончании экспериментов (25 и 14 сут при исследовании гипотензивных и бифидогенных свойств соответственно) экспериментальных животных усыпляли углекислым газом. Производили забор крови и фекальных масс из толстой кишки.

Сыворотку крови отделяли центрифугированием в течение 10 мин на центрифуге 5702R (“Eppendorf”, Германия) при 4°C и $2000g$. В сыворотке крови концентрацию компонентов ренин-ангиотензиновой системы – ангиотензинов I и II определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов (“Enzo”, США).

Для количественного учета групп микроорганизмов навеску из фекалий крыс массой 1.0 г вносили в регенерированный агаризованный 0.1%-ный тиогликолево-фосфатный буфер в соотношении 1 : 10. Из этой суспензии готовили последовательные 10-кратные разведения, которые вносили в соответствующие питательные среды. Бифидобактерии в фекальных массах животных определяли на среде TOS-MUP-агар (TOS пропионатный агар с

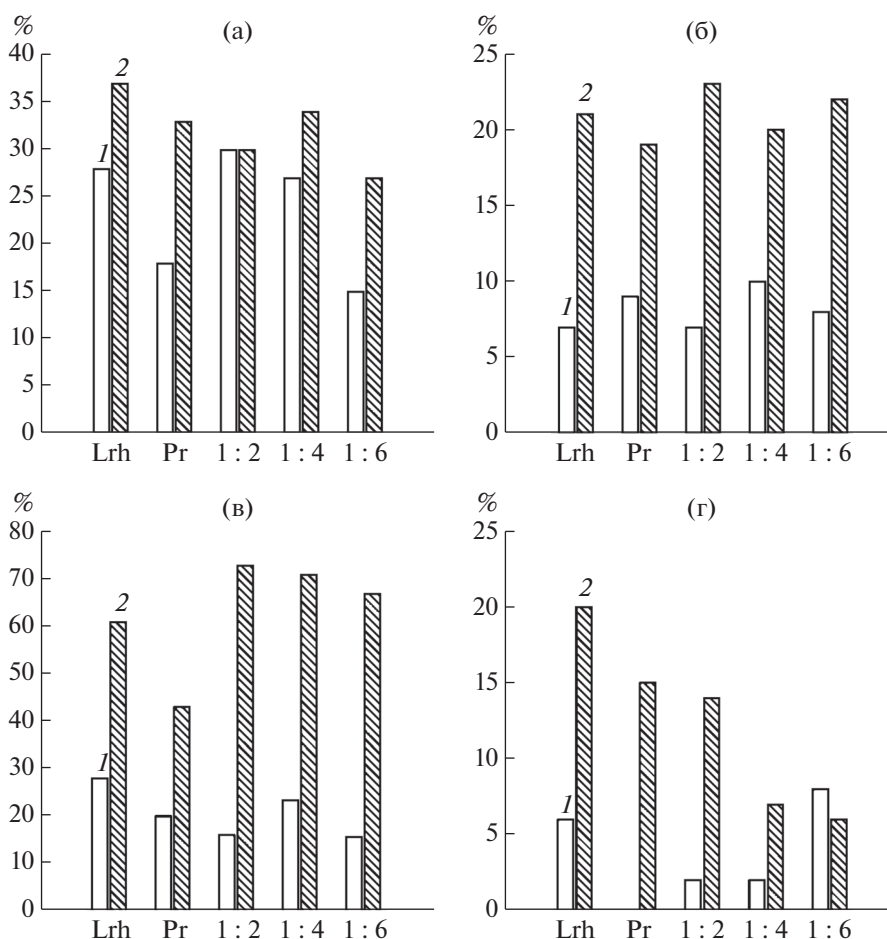


Рис. 1. Антагонистическая активность (%) *Lactobacillus rhamnosus* Φ (Lrh) и *Propionibacterium shermanii* Э2 (Pr) и их ассоциаций (соотношение 1 : 2, 1 : 4, 1 : 6) по отношению к тест-штаммам условно-патогенных *Escherichia coli* B-125 (а), патогенных *Staphylococcus aureus* 2097 (б) микроорганизмов и возбудителей порчи пищевых продуктов *Penicillium brevicompactum* (в) и *Torulaspora delbrueckii* (г) на 24 ч (1) и 72 ч (2) совместного культивирования.

мупирамином лития, “Merck”, Германия), лактобациллы – на среде MRS как описано в работе [23].

Содержание, питание, уход за животными, манипуляции и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями приказа Минздрава России от 1.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики” и Международными правилами гуманного обращения с животными – Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей.

Органолептическую оценку кисломолочных напитков проводили по 5-бальной шкале.

Статистическая обработка. Обработку данных проводили с применением программ “Statistica 10” и “Microsoft Excel”. Статистически значимыми по двустороннему критерию Стьюдента считали отлчия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование сообщества лакто- и пропионовокислых бактерий

Результаты исследований ряда авторов показывают, что антимикробная активность является не только видовым, но характерным для отдельного штамма признаком [24]. На первом этапе работы для включения в ассоциацию лакто- и пропионовокислых бактерий был изучен спектр антимикробной активности пробиотических штаммов *Lb. rhamnosus* Φ, *Pr. shermanii* Э2, а также их сообществ в соотношении 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 6 (об./об.). В качестве тест-культур использовали штаммы *S. aureus* 2097, *E. coli* B-125, штамм *P. brevicompactum*, выделенный из сметаны, штамм дрожжей *T. delbrueckii*, выделенный из йогурта. Из результатов, представленных на рис. 1 видно, что при раздельном культивировании наиболее выраженной антагонистической активностью обладал штамм *Lb. rhamnosus* Φ, несколько меньшей – *Pr. shermanii*.

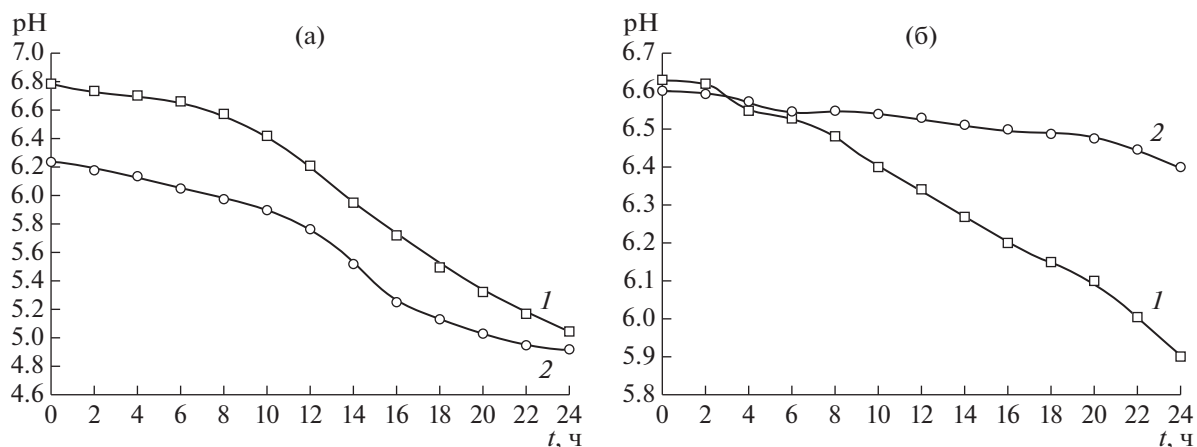


Рис. 2. Кислотообразующая активность штаммов *Lactobacillus rhamnosus* Φ (а) и *Propionibacterium shermanii* Э2 (б) при культивировании на различных средах: 1 – гидролизат сывороточных белков коровьего молока; 2 – обезжиренное коровье молоко.

Для ассоциации молочнокислых и пропионовокислых бактерий было отмечено увеличение ингибирования роста тестовой культуры плесневого гриба по сравнению с монокультурами. Так, степень подавления ассоциациями была на уровне 67–73%, а монокультурами – 61 и 43% для *Lb. rhamnosus* Φ и *Pr. shermanii* Э2 соответственно. Антагонистическая активность монокультур *Lb. rhamnosus* Φ и *Pr. shermanii* Э2 и их ассоциаций по отношению к патогенной бактерии *S. aureus* 2097 была практически на одном уровне (19–23%). Наибольшую степень подавления дрожжей показали монокультуры (15–20%) по сравнению с их ассоциациями (6–14%). Таким образом, как монокультуры, так и смешанные культуры обоих штаммов *in vitro* обладали хорошей антагонистической активностью.

На втором этапе работ оценивали развитие пробиотических культур *Lb. rhamnosus* Φ и *Pr. shermanii* Э2 в обезжиренном молоке при оптимальной температуре культивирования (37°C) и внесении 10% посевного материала. Результаты показали, что лактобациллы являются слабыми кислотообразователями, а пропионовые бактерии не способны ферментировать обезжиренное молоко в виде монокультуры (рис. 2). При заквашивании штаммом *Lb. rhamnosus* Φ коагулирование белков молока наблюдалось спустя 20 ч, при этом сгусток имел недостаточно выраженный кисломолочный вкус и был непрочным. Снижение значения активной кислотности (Δ pH) составляло 0.5 и 1.3 через 12 и 24 ч роста соответственно на стерилизованном обезжиренном молоке (рис. 2а). Полученные результаты подтверждают данные литературы о низкой протеолитической активности пробиотических лактобацилл и пропионовокислых бактерий в отношении казеина молока [25, 26]. Для интенсификации роста было проведено культивирование исследуемых штаммов на гид-

ролизате сывороточных белков молока [20]. При культивировании *Lb. rhamnosus* Φ на белково-пептидном гидролизате наблюдали ускоренную динамику снижения активной кислотности: Δ pH через 12 и 24 ч составляло 0.6 и 1.7 ед. соответственно (рис. 2а). Рост штамма *Pr. shermanii* Э2 при культивировании на белково-пептидном гидролизате также происходил более интенсивно по сравнению с ростом на обезжиренном молоке: Δ pH через 12 и 24 ч – 0.3 и 0.8 соответственно (рис. 2б). При этом сквашенные образцы во всех случаях характеризовались жидкой консистенцией и выраженным горьким вкусом (оценка 1–2 по бальной шкале).

Для получения кисломолочного продукта с приемлемыми органолептическими свойствами в ассоциацию пробиотических культур был включен третий штамм – *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201, который являлся умеренным кислотообразователем, но обеспечивал, с одной стороны медленное снижение pH для роста культур *Lb. rhamnosus* Φ и *Pr. shermanii* Э2, с другой – образовывал при сквашивании сгусток, обладающий высокими реологическими свойствами. При этом анализ биосовместимости культур *Lb. rhamnosus* Φ, *Pr. shermanii* Э2 и *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201 показал, что они не проявляют антагонизм по отношению друг к другу и потому могут быть использованы для подбора эффективного сообщества (рис. 3).

Добавление *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201 к пробиотическим культурам *Lb. rhamnosus* Φ и *Pr. shermanii* Э2 способствовало ускорению сквашивания обезжиренного молока. Так, уже через 12 ч культивирования значения активной кислотности достигало значения pH 4.7–4.8 (табл. 1, 2). При этом нарастание кислотности в процессе сквашивания комбинированными заквасками повышалось с увеличением в них доли лактокок-

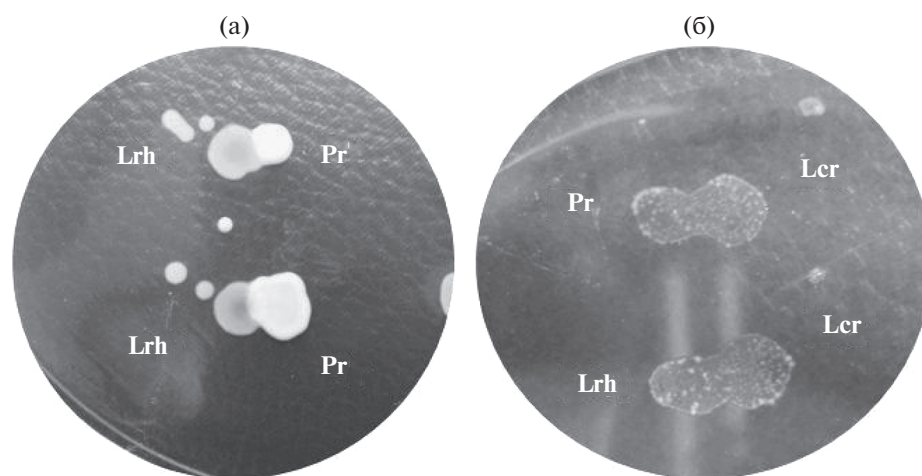


Рис. 3. Определение биосовместимости культур *Lactobacillus rhamnosus* Φ (Lrh) с *Propionibacterium shermanii* Э2 (Pr) (а) и *Lb. rhamnosus* Φ (Lrh), *Pr. shermanii* Э2 (Pr) с *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CR201 (Lcr) (б) капельным методом.

ков (табл. 2). Количество клеток молочнокислых бактерий для всех вариантов исследованных соотношений культур в ассоциации составляло около 10^8 КОЕ/мл, в то же время наибольшее количество пропионовокислых бактерий в конце ферментации было отмечено для соотношения штаммов *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201: *Lb. rhamnosus* Φ: *Pr. shermanii* Э2 1:1:6 и 2:1:6 (табл. 1, 2). Внешение 20–30% белкового гидролизата в молочную основу увеличивало количество клеток *Pr. shermanii* Э2 в готовом продукте в 10 раз ($2-4 \times 10^8$ КОЕ/мл), по сравнению с образцом, приготовленным на стерилизованном обезжиренном молоке (1×10^7 КОЕ/мл) (табл. 2). Содержание молочнокислых бактерий было приблизительно на одном уровне – 2.5×10^8 КОЕ/мл при всех исследованных соотношениях культур. Продолжительность сквашива-

ния до достижения значения pH 4.8 составила 9–10 ч при концентрации инокулята 5–10%.

Органолептическая оценка образцов кисломолочных напитков показала, что наилучшими вкусовыми качествами и консистенцией (вязкость и гомогенность сгустка) обладал кисломолочный продукт, полученный при использовании соотношения штаммов в ассоциации *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201: *Lb. rhamnosus* Φ: *Pr. shermanii* Э2 2:1:6 (табл. 1).

Действительно, культивирование пропионовокислых бактерий (ПКБ) в присутствии молочнокислых (МКБ) является классическим примером комменсализма в смешанных культурах [27]. Так, с одной стороны, в результате сбраживания лактозы молочнокислыми бактериями образуется молочная кислота, которая является предпочтительным источником углерода для роста пропионо-

Таблица 1. Характеристики заквасок и готовых продуктов на их основе

Соотношение штаммов в закваске, об./об.			Активная кислотность в процессе сквашивания, pH*			Количество клеток, КОЕ/мл						Органолептическая оценка, балл
						молочнокислые бактерии			пропионовокислые бактерии			
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CR201	<i>Lb. rhamnosus</i> Φ	<i>Pr. shermanii</i> Э2	0 ч	8 ч	12 ч	0 ч	8 ч	10 ч	0 ч	8 ч	10 ч	
1	1	2	6.17	4.90	4.75	6×10^6	2.6×10^8	7×10^8	1.7×10^6	3×10^7	7×10^7	3
1	1	4	6.17	4.92	4.74	5×10^6	2.4×10^8	7×10^8	4×10^6	2×10^7	2×10^7	3
1	1	6	6.15	4.93	4.74	2.5×10^6	1.1×10^8	4×10^8	6.4×10^6	4.2×10^7	2×10^8	3
2	1	4	6.19	4.79	4.72	6×10^6	6.8×10^7	2.5×10^8	4.2×10^6	6.4×10^7	8.4×10^7	4
2	1	6	6.18	4.78	4.73	2.5×10^6	6.5×10^7	1×10^8	6.0×10^6	8×10^7	1.1×10^8	4

* Содержание гидролизата сывороточных белков молока 30%.

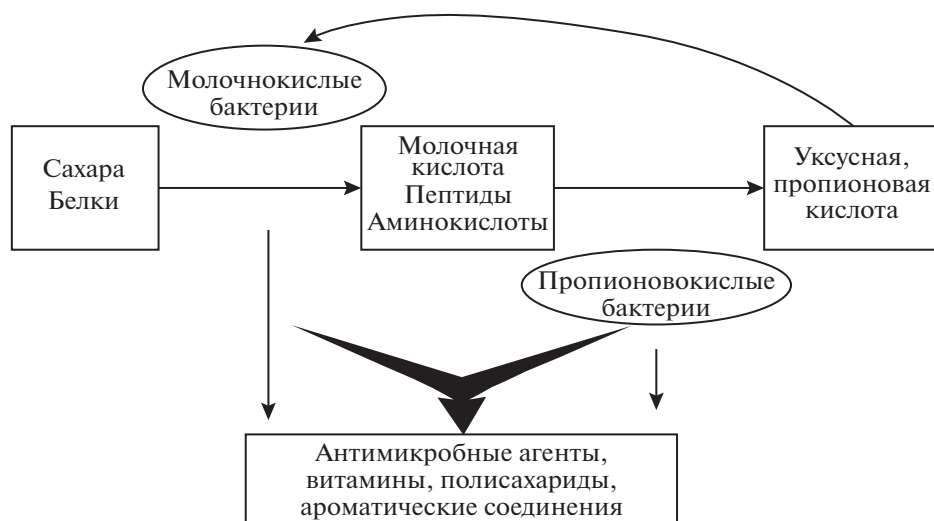


Рис. 4. Схематическое представление доказанных и гипотетических мутуалистических взаимодействий, происходящих между молочнокислыми и пропионовокислыми бактериями во время их совместной ферментации и образования соединений, необходимых для их развития и синтеза функциональных биомолекул.

вокислых бактерий и синтеза ими пропионовой и уксусной кислот. С другой стороны, в результате работы протеаз МКБ образуются необходимые для роста ПКБ пептиды и свободные аминокислоты (рис. 4). При этом рост МКБ в смешанных культурах с ПКБ стимулировался за счет снижения скорости накопления молочной кислоты и наличия синтезируемых пропионовыми бактериями факторов роста, таких как экзополисахариды, жирные кислоты и др. Добавление белково-пептидного гидролизата в молочную основу стимулировало более интенсивный рост ПКБ в смешанной культуре по сравнению с ростом на обезжиренном молоке (табл. 1, 2). По-видимому, наличие пептидов и свободных аминокислот в ростовой среде уже в начале культивирования обеспечивало возможность роста пропионовых бактерий одновременно с МКБ без задержки, связанной с предварительным накоплением в среде

ростовых веществ, необходимых ПКБ и образующихся в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

Функциональные свойства кисломолочных продуктов *in vitro*. Анализ биологически активных свойств кисломолочных продуктов (КМП) *in vitro*, полученных с использованием закваски (*Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201: *Lb. rhamnosus* Ф: *Pr. shermanii* Э2 – 2 : 1 : 6) показал, что оба продукта (как на обезжиренном молоке, так и с добавлением 30% гидролизата сывороточных белков) обладали высокой антиоксидантной, гипотензивной и антимикробной активностями (табл. 3).

Оба образца КМП показали близкие значения антиоксидантной активности – 260–280 мкМ ТЭ/г белка (табл. 3). Тем не менее, КМП с гидролизатом имел более высокую АПФ-ингибирующую активность $IC_{50} = 1.9 \pm 0.2$ мг/мл продукта, тогда как на обезжиренном молоке – 3.2 ± 0.6 .

Таблица 2. Изменение pH и количества клеток заквасочных культур в процессе сквашивания кисломолочных продуктов с разным содержанием белково-пептидного гидролизата

Соотношение штаммов в ассоциации, об./об.			Количество гидролизата, %	Изменение pH		КОЕ/мл			
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CR201	<i>Lb. rhamnosus</i> Ф	<i>Pr. shermanii</i> Э2		0 ч	10 ч	лактобактерии		<i>Pr. shermanii</i>	
						0 ч	10 ч	0 ч	10 ч
2	1	6	30	6.19	4.78	5×10^6	1.4×10^8	6.4×10^6	4.0×10^8
2	1	6	20	6.32	4.83	2×10^6	2.5×10^8	6.4×10^6	2.7×10^8
2	1	6	10	6.24	4.86	2.5×10^6	2.5×10^8	6.4×10^6	6×10^7
2	1	6	0	6.25	4.80	1×10^6	2.5×10^8	6.4×10^6	1.4×10^7

Хорошо известно, что в результате гидролиза белков коровьего молока под действием протеолитических систем заквасочных и пробиотических культур образуется широкий спектр биологически активных пептидов, обладающих антиоксидантной, АПФ-ингибирующей, антимикробной и др. активностями [28–30]. Добавление в молочную основу гидролизата сывороточных белков коровьего молока, в котором ранее нами был идентифицирован ряд антиоксидантных и АПФ-ингибирующих пептидов [20], по-видимому, привело к усилению антигипертензивных свойств кисломолочного продукта, но антиоксидантная активность при этом не увеличивалась, по сравнению с таковой в продукте без гидролизата. Последнее может объясняться тем, что наибольший вклад в антиоксидантную активность вносят ди- и трипептиды, которые в первую очередь могут быть использованы бактериями в процессе их жизнедеятельности.

КМП с гидролизатом также проявлял более высокую антагонистическую активность по отношению тест-штаммов бактерий *S. aureus* 2097, *E. coli* В-125 и возбудителя порчи пищевых продуктов – плесневого гриба *Pr. brevicompactum*, по сравнению с образцом, полученным сквашиванием обезжиренного молока (табл. 3, рис. 5), что коррелировало с более высоким содержанием жизнеспособных клеток *Pr. shermanii* Э2 в кисломолочном продукте с добавлением белково-пептидного гидролизата. Взаимодействия между МКБ и ПКБ важны для проявления ими антимикробного и фунгицидного действия, определяющего его пробиотические и консервирующие эффекты, которые, как известно, значительно возрастают в смешанных

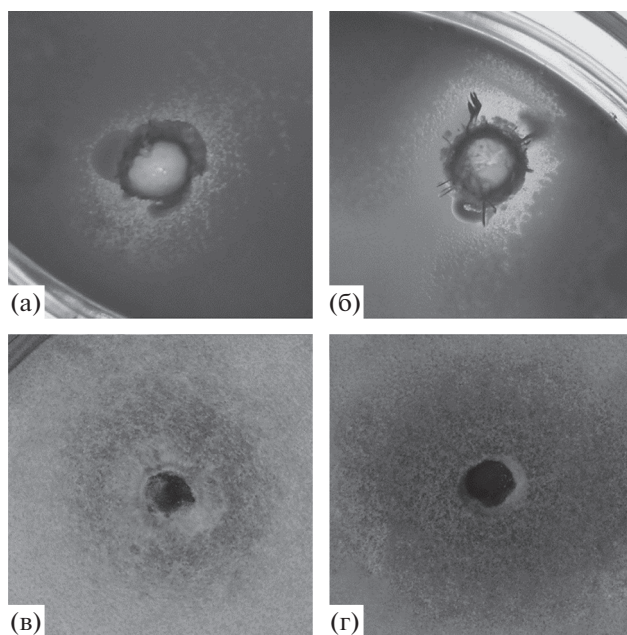


Рис. 5. Антагонистическая активность в отношении *E. coli* В125 (а, б) и *Penicillium brevicompactum* (в, г) КМП, полученных сквашиванием обезжиренного молока (а, в) и тоже с добавлением 30% гидролизата сывороточных белков коровьего молока (б, г). (Использована комбинированная закваска на основе штаммов *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201, *Lactobacillus rhamnosus* Ф и *Propionibacterium shermanii* Э2 в соотношении 2 : 1 : 6).

культурах (комбинированных заквасках). Это связано с усилением синтеза антимикробных соединений, таких как молочная, пропионовая и уксусная кислоты, пероксид водорода, диацетил

Таблица 3. Антиоксидантная, гипотензивная и антимикробная активности кисломолочных продуктов, полученных с использованием комбинированной закваски (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CR201, *Lactobacillus rhamnosus* Ф и *Propionibacterium shermanii* Э2 в соотношении 2 : 1 : 6)

Показатель	Напиток кисломолочный на пастеризованном обезжиренном молоке*	Напиток кисломолочный на пастеризованном молоке с белково-пептидным гидролизатом, 30%*
Содержание молочнокислых и пропионовокислых микроорганизмов, КОЕ/мл**		
<i>Pr. shermanii</i>	$(1.5-3) \times 10^7$	$(4-6) \times 10^8$
<i>Lb. rhamnosus</i>	$(4-6) \times 10^8$	$(3-3.5) \times 10^8$
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	$(5-7) \times 10^8$	$(7-8) \times 10^8$
АОЕ, мкМ ТЭ/г белка	267 ± 11	276 ± 14
АПФ-ингибирующая активность (IC ₅₀), мг/мл	3.2 ± 0.6	1.9 ± 0.2
Антагонистическая активность (зона угнетения роста тест-культур на агаризованной среде, мм)		
<i>S. aureus</i> 2097	13.3–14.5	16.3–17.3
<i>E. coli</i> В125	26.0–27.0	28.7–31.5
<i>P. brevicompactum</i>	20–21	24.0–25.5

* Доза вносимого инокулята комбинированной закваски 10%.

** Через 9–10 ч культивирования (сквашивания).

Таблица 4. Динамика артериального давления (АД) и концентрация компонентов ренин-ангиотензиновой системы в сыворотке крови крыс линии SHR

Группа, №	Систолическое АД, мм рт. ст.			Диастолическое АД, мм рт. ст.			Ангиотензин I, нг/мл	Ангиотензин II, нг/мл
	0 сут.	25 сут.	ΔP	0 сут.	25 сут.	ΔP	25 сут	25 сут
1. Вода (интактный контроль)	166 ± 15	200 ± 19	+34	90 ± 11	127 ± 17	+37	4.47 ± 0.21	2.94 ± 0.28
2. Контрольный КМП* (обезжиренное молоко)	171 ± 14	165 ± 13	-6	106 ± 12	106 ± 10	0	4.96 ± 0.30	2.59 ± 0.23
3. Опытный КМП (с 30% гидролизата)	170 ± 13	154 ± 12	-16	108 ± 7	97 ± 8	-11	5.23 ± 0.17	2.36 ± 0.33

* КМП – кисломолочный продукт на основе штаммов *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CR201, *Lb. rhamnosus* Ф и *P. shermanii* Э2 в соотношении 2:1:6.

и некоторые другие низкомолекулярные метаболиты, в том числе бактериоцины [27, 31–33]. Так было показано, что фунгицидная активность 33 штаммов МКБ связана в первую очередь с продукцией таких органических кислот, как молочная, уксусная и фенилмолочная кислоты [34]. Анализ содержания молочной, уксусной и пропионовой кислот (353, 2321, 1188 мкг/мл соответственно) в КМП показал, что концентрация первых двух в образце продукта с добавлением белково-пептидного гидролизата выше в 6 и 2 раза соответственно, по сравнению с приготовленным на обезжиренном молоке (56, 1020, 1746 мкг/мл соответственно). В то же время содержание пропионовой кислоты в КМП с гидролизатом, наоборот, меньше.

Функциональные свойства кисломолочных продуктов *in vivo*. На следующем этапе были исследованы функциональные свойства (гипотензивные и бифидогенные) двух образцов кисломолочных продуктов, полученных на обезжиренном молоке (контроль) и с добавлением 30% гидролизата сывороточных белков (опыт в моделях *in vivo*).

Оценка гипотензивных свойств КМП на основе комбинированной закваски проводилась на модели с использованием крыс с устойчиво высоким уровнем артериального давления (линия SHR). Среднее систолическое давление у крыс на момент начала эксперимента составляло 176 ± 12 мм рт. ст. (табл. 4). Показано статистически значимое снижение среднего систолического давления при внутрижелудочном введении образцов КМП. Гипотензивный эффект на 25 день эксперимента для опытного образца КМП составил $\Delta P = 16$ мм рт. ст., в то время как для контрольного образца (на обезжиренном молоке) всего лишь $\Delta P = 6$ мм рт. ст. (табл. 4).

Для выяснения механизмов гипотензивного действия продуктов в сыворотке крови животных были измерены концентрации основных компонентов ренин-ангиотензиновой системы: ангиотензинов I и II (рис. 6). Концентрация ангио-

тензина I в крови животных, получавших опытный образец КМП (группа № 3), составляла 5.0–5.3 нг/мл и была несколько выше, по сравнению с животными группы № 2, получавшими КМП на обезжиренном молоке, у которых концентрация ангиотензина I в крови составляла 4.9–5.0 нг/мл (табл. 4). В то же время концентрация ангиотензина II в крови опытных животных, получавших продукты, была ниже, по сравнению с группой интактного контроля (группа № 1) – 2.9–3.0 нг/мл, причем в группе, получавших КМП с гидролизатами, данный эффект был несколько более выражен (2.36 нг/мл), по сравнению с группой, получавшей КМП на обезжиренном молоке (2.6 нг/мл) (табл. 4). Полученные результаты по изменению уровней ангиотензинов I и II в сыворотке крови животных группы № 2 коррелировали с результатами снижения давления у этой группы. Когда уровень ангиотензина II снижался вследствие ингибирования действия АПФ, повышается уровень ангиотензина I (рис. 6). Таким образом, в основе механизма антигипертензивного эффекта кисломолочных продуктов *in vivo*, по всей видимости, лежит ингибирование АПФ, при этом оба продукта обладали АПФ-ингибирующей активностью *in vitro* (табл. 3). Показанный нами гипотензивный эффект для КМП согласовывался с данными литературы. Так, при тестировании КМП, заквашенных различными культурами молочнокислых бактерий, было показано снижение систолического давления у крыс линии SHR в диапазоне значений 6–20 мм рт. ст. [35–37].

На модели индуцированного антибиотиком дисбиоза у самцов крыс линии Wistar исследованы бифидогенные свойства КМП. Показано, что по сравнению с интактным контролем при внутрижелудочном введении антибиотика Байтрил в ЖКТ происходит изменения свидетельствующие о развитии умеренного дисбактериоза. Прежде всего, это относится к составу микрофлоры кишечника. В толстом кишечнике у животных группы № 2 (отрицательный контроль) статистически

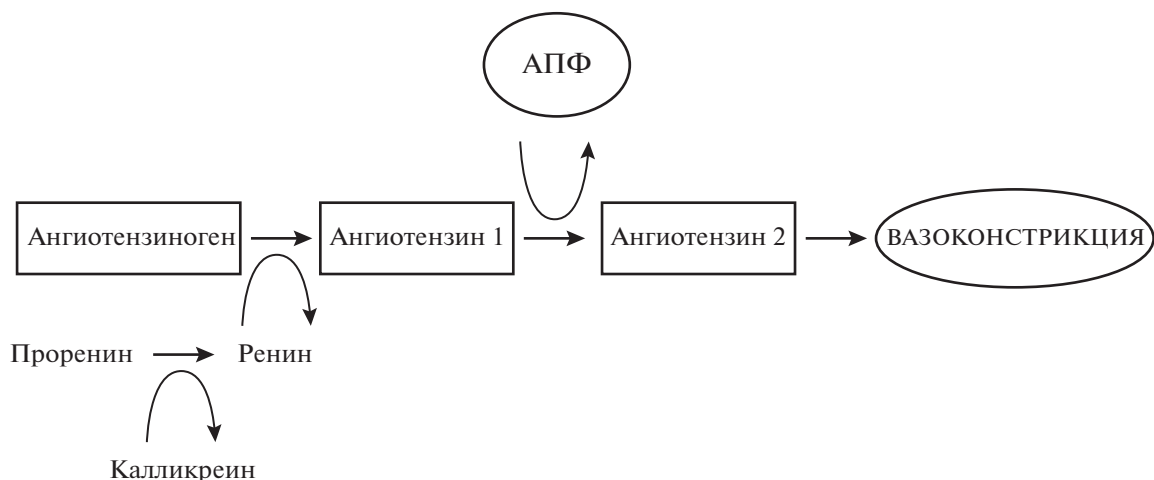


Рис. 6. Схематическое изображение функционирования и взаимодействия компонентов ренин-ангиотензиновой системы (АПФ – ангиотензин-1-превращающий фермент) [37]. Ренин регулирует начальный, лимитирующий скорость работы этап ренин-ангиотензиновой системы путем отщепления N-концевого сегмента ангиотензиногена, в результате чего образуется биологически инертный декапептид – ангиотензин 1 (Ang 1). Неактивный декапептид Ang 1 гидролизуется АПФ с отщеплением C-концевого дипептида с образованием биологически активного октапептида ангиотензина 2 (Ang 2) – мощного вазоконстриктора. Ферментативная активность АПФ приводит к повышению вазоконстрикции (сужению кровеносных сосудов, особенно артерий и как следствие повышению артериального давления) и снижению вазодилатации.

достоверно ($p < 0.01$) снижался уровень лактобацилл в 2.2 раза, бифидобактерий – в 9 раз (табл. 5), по сравнению с интактным контролем. В опытной группе животных № 4, в которой на фоне приема АБ крысам ежедневно вводили внутрижелудочно опытный образец КМП с добавлением гидролизата, выявлены позитивные изменения в составе “полезной” (пробиотической) флоры (табл. 5). Показано статистически достоверное нарастание количества кишечных лактобацилл *Lactobacillus* и бифидобактерий (примерно в 1.5 и 3 раза соответственно, $p < 0.05$) в фекальных массах животных, которым на фоне приема антибиотика вводили опытный КМП (содержащий 30% гидролизата) (табл. 5). В то время как для контрольного образца

КМП (на обезжиренном молоке) эффект отсутствовал. При этом бифидогенная активность КМП с гидролизатом коррелировала с повышенным содержанием в нем ПКБ по сравнению с продуктом на молоке (табл. 4). Известно, что пропионовокислые бактерии обладают бифидогенным действием, при этом синтезируемая ими пропионовая кислота оказывает стимулирующее влияние на метаболическую активность бифидобактерий, в частности *Bifidobacterium longum* [38]. Однако содержание пропионовой кислоты в КМП с гидролизатом меньше, чем в продукте на молоке (1188 и 1746 мкг/мл соответственно). Необходимо отметить, что не только продукция пропионовой кислоты может отвечать за бифидогенный эф-

Таблица 5. Содержание лактобактерий и бифидобактерий при внутрижелудочном введении кисломолочных продуктов крысам Wistar на фоне антибиотик-индуцированного дисбиоза

Группа	Количество бифидобактерий, КОЕ/г фекас	Количество лактобактерий, КОЕ/г фекас
№ 1 Интактный контроль	9.0×10^8	8.8×10^8
№ 2 Отрицательный контроль (АБ* + вода)	1.5×10^8	4.0×10^8
№ 3 Контрольный продукт (АБ + КМП** на обезжиренном молоке)	1.5×10^8	4.2×10^8
№ 4 Опытный продукт (АБ + КМП с 30% гидролизата)	4.0×10^8	5.8×10^8

* АБ – антибиотик Байтрил.

** КМП – кисломолочный продукт на основе комбинированной закваски *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CR201, *Lactobacillus rhamnosus* Ф и *Propionibacterium shermanii* Э2 в соотношении 2 : 1 : 6 соответственно.

фект ПКБ. Так, например было показано, что *Propionibacterium freudenreichii* является продуцентом ростовых бифидогенных стимуляторов, таких как 2-амино-3-карбокси-1,4-нафтохинон (ACNQ) и 1,4-дигидрокси-2-нафтойная кислота (DHNA) [39]. Также было показано, что при транзите через ЖКТ наличие жизнеспособных клеток пропионобактерий усиливало рост и развитие местной бифидофлоры кишечника, при этом тестируемое содержание ПКБ в каловых массах составляло порядка 10^9 КОЕ.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00094).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kerry R.G., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H.-S., Das G. // J. Food Drug Anal. 2018. V. 26. № 3. P. 927–939.
- Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F. // Neurobiol. Stress. 2017. V. 7. P. 124–136.
- Tang W.H.W., Kitai T., Hazen S.L. // Circ. Res. 2017. V. 120. № 7. P. 1183–1196.
- Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. // Mol. Nutr. Food Res. 2017. V. 61. № 1. P. 1600240.
- Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. // Int. Dairy J. 2017. V. 67. P. 46–60.
- Leroy F., Vuyst L. De // Trends Food Sci. Technol. 2004. V. 15. № 2. P. 67–78.
- Tamang J.P., Shin D.-H., Jung S.-J., Chae S.-W. // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 578.
- Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutkins R. // Curr. Opin. Biotechnol. 2017. V. 44. P. 94–102.
- Macori G., Cotter P.D. // Curr. Opin. Biotechnol. 2018. V. 49. P. 172–178.
- Cousin F.J., Mater D.D.G., Foligné B., Jan G. // Dairy Sci. Technol. 2011. V. 91. № 1. P. 1–26.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. // J. Biotechnol. 2000. V. 84. № 3. P. 197–215.
- Vorobjeva L.I., Khodjaev E.Y.U., Vorobjeva N.V. // Microb. Ecol. Health Dis. Taylor & Francis, 2008. V. 20. № 2. P. 109–112.
- Ekinci F.Y., Gurel M. // J. Dairy Sci. 2008. V. 91. № 3. P. 892–899.
- Aguilar-Toalá J.E., Garcia-Varela R., Garcia H.S., Mata-Haro V., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordoba B., Hernández-Mendoza A. // Trends Food Sci. Technol. 2018. V. 75. P. 105–114.
- Фёдорова Т.В., Васина Д.В., Бегунова А.В., Рожкова И.В., Раскошная Т.А., Габриэлян Н.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 264–276.
- Coman M.M., Verdenelli M.C., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Boyko N., Cresci A. // J. Appl. Microbiol. 2014. V. 117. № 2. P. 518–527.
- Глушанова Н.А., Блинов А.И., Бахаев В.В. // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2004. № 6. С. 37–39.
- Thierry A., Madec M.N. // Lait. 1995. V. 75. № 4–5. P. 315–323.
- Tharmaraj N., Shah N.P. // J. Dairy Sci. 2003. V. 86. № 7. P. 2288–2296.
- Торкова А.А., Рязанцева К.А., Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Центалович М.Ю., Фёдорова Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 6. С. 580–591.
- Conceição-Vertamatti A.G., Borghi F., Canova F., Grassi-Kassisse D.M. // Vasa. 2017. V. 46. № 6. P. 431–439.
- Самохина Л.С., Кололова Г.С., Ганина В.И., Ионова И.И., Семенов Г.В. // Известия ВУЗОВ. Пищевая технология. 2012. № 5–6. С. 17–20.
- Семенухина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В., Фёдорова Т.В., Шишова Т.И. // Вопросы питания. 2018. Т. 87. № 5. С. 52–62.
- Rabah H., do Carmo F.L., Jan G. // Microorganisms. 2017. V. 5. № 2. P. 24.
- Shihata A., Shah N.P. // Int. Dairy J. 2000. V. 10. № 5. P. 401–408.
- Gagnaire V., Thierry A., Léonil J. // Lait. 2001. V. 81. № 3. P. 339–353.
- Smid E.J., Lacroix C. // Curr. Opin. Biotechnol. 2013. V. 24. № 2. P. 148–154.
- Akalin A.S. // Trends Food Sci. Technol. 2014. V. 36. № 2. P. 79–95.
- Linares D.M., Gómez C., Renes E., Fresno J.M., Tornadizo M.E., Ross R.P., Stanton C. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 846.
- Choi J., Sabikhi L., Hassan A., Anand S. // Int. J. Dairy Technol. 2012. V. 65. № 1. P. 1–12.
- Schwenninger S.M., Lacroix C., Truttman S., Jans C., Spöndli C., Bigler L., Meile L. // J. Food Prot. 2008. V. 71. № 12. P. 2481–2487.
- Reis J.A., Paula A.T., Casarotti S.N., Penna A.L.B. // Food Eng. Rev. 2012. V. 4. № 2. P. 124–140.
- Özcelik S., Kuley E., Özogul F. // LWT. 2016. V. 73. P. 536–542.
- Gerez C.L., Carbajo M.S., Rollán G., Torres Leal G., Font de Valdez G. // J. Food Sci. 2010. V. 75. № 6. P. M354–M359.
- Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A.F., Astizaran-García H., Hernández-Mendoza A., Vallejo-Cordoba B. // J. Dairy Sci. 2013. V. 96. № 7. P. 4094–4099.
- Beltrán-Barrientos L.M., Hernández-Mendoza A., Torres-Llanes M.J., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordoba B. // J. Dairy Sci. 2016. V. 99. № 6. P. 4099–4110.
- Ricci I., Artacho R., Olalla M. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2010. V. 50. № 5. P. 390–402.
- Roland N., Bouglé D., Lebeurrer F., Arhan P., Maubois J.-L. // Int. Dairy J. 1998. V. 8. P. 587–588.
- Isawa K., Hojo K., Yoda N., Kamiyama T., Makino S., Saito M., Sugano H., Mizoguchi C., Kurama S., Shibasaki M., Endo N., Sato Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66. № 3. P. 679–681.

Lactic and Propionic Acid Bacteria for Creating Combined Starters and Obtaining Functional Dairy Fermented Products with Bifidogenic and Hypotensive Properties

A. V. Begunova^a, I. V. Rozhkova^a, E. A. Zvereva^b, O. A. Glazunova^b, and T. V. Fedorova^{b, *}

^aAll-Russia Research Institute of Dairy Industry,
Moscow, 115093 Russia

^bBach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Received December 10, 2018; revised April 05, 2019; accepted June 20, 2019

Abstract — Functional properties of a dairy fermented beverage, obtained using a combined starter based on lactic and propionic acid bacteria were studied. It was shown that the fermented product obtained using a combined starter based on *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* CR201, *Lactobacillus rhamnosus* F and *Propionibacterium shermanii* E2 strains in a ratio of 2 : 1 : 6 (v/v), respectively, had a pronounced antagonistic effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and causative agents of food spoilage *Penicillium brevicompactum* and *Torulaspora delbrueckii*, as well as ACE inhibitory activity *in vitro*. A bifidogenic and moderate hypotensive effect were demonstrated using *in vivo* models. Also the addition of whey protein hydrolysates to skimmed milk leads to an increase in the growth of propionic acid bacteria and an increase in the number of viable cells in the fermented beverage. At the same time fermented beverage with hydrolysates had higher antimicrobial activity *in vitro* and bifidogenic effect *in vivo* compared with the fermented beverage without hydrolysates.

Keywords: probiotic, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, propionibacteria, combined starter, protein-peptide hydrolysate, antagonistic activity, bifidogenic activity, anti-hypertensive activity