

УДК: [679.872+ 579.873. 1] : 57.083. 1

## РЕЖИМИ СУМІСНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ БІФІДО- ТА ПРОПІОНОВОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Л. Капрельянц, Л. Труфкаті, Л. Крупицька\*

Одеська національна академія харчових технологій  
вул. Канатна, 112, Одеса 65039, Україна  
e-mail: krupitskaja.lora@yandex.ua

У статті наведено результати досліджень з пошуку режиму для сумісного культивування культур *Bifidobacterium longum* – Я 3, *Bifidobacterium adolescentis* – С 52, *Bifidobacterium bifidum* – 1 з культурою *Propionibacterium shermanii* – PS 4 на лактозному середовищі з додаванням соєвої сироватки. Зміна оптимальних температур культивування бактерій призводила до зниження їх росту, тоді як за проміжної температури (34±1) °С спостерігали рівномірний розвиток пробіотичних мікроорганізмів, показники кількості пропіоновокісних і біфідобактерій за даної температури наближались один до одного. За результатами досліджень було визначено режими сумісного культивування біфідо- та пропіоновокісних бактерій. Одночасне внесення бактеріальних інокулятив у співвідношенні 1:1 за температури (34±1) °С було найбільш вдалим для росту й нагромадження біомаси пробіотичними культурами. Виявлено, що зразки пробіотичних бактерій, культивованих в асоціації, мають вищу біохімічну активність, ніж у монокультурі, про що свідчить збільшення біомаси клітин біфідобактерій і пропіоновокісних бактерій. Щільність популяції пробіотичних мікроорганізмів у консорціумі збільшувалася з 10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup> до 10<sup>10</sup> КУО/см<sup>3</sup>, що говорить про симбіотичні зв'язки досліджених мікроорганізмів. При сумісному культивуванні з пропіоновокісними бактеріями вид *Bifidobacterium longum* характеризувався найвищими показниками. У комбінованій заквасці *B. longum* – Я 3 було 3·10<sup>10</sup> КУО/см<sup>3</sup>, активна кислотність досягла 5,3 одн. рН, титрована кислотність – 74 °Т. Тому *B. longum* – Я 3 був обраний для подальших досліджень з метою створення симбіотичного продукту в консорціумі з пропіоновокісними бактеріями.

*Ключові слова:* біомаса, сумісне культивування, температурний режим, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, симбіотик.

Сучасна індустрія біологічно активних добавок (БАД) і продуктів функціонального харчування динамічно розвивається. Для отримання продуктів нового покоління пропонують використовувати мікроорганізми, які мають здатність адаптуватись і виживати в кишково-шлунковому тракті людини та здійснювати позитивний вплив на її імунну систему і здоров'я загалом [5, 9].

Виробляється доволі широкий асортимент препаратів-пробіотиків, створених на основі біфідобактерій, лактококів і лактобацил, які позитивно діють на фізіологічні, біохімічні й імунні реакції організму через оптимізацію та стабілізацію його мікроекологічного статусу [4]. В останні роки науковців приваблюють пропіоновокісли бактерії, відмінною особливістю яких є те, що вони не перетравлюються в кишково-шлунковому тракті людей, стійкі до жовчних кислот, витримують кислотність шлункового соку, можуть здійснювати біосинтез вітаміну В<sub>12</sub>, який регулює основні обмінні процеси, сприяє підвищенню імунного статусу організму людини, покращує загальне самопочуття

за рахунок активізування білкового, вуглеводного та жирового обміну, покращує процес кровотворення. За умови браку вітаміну  $B_{12}$  виникають кишково-шлункові захворювання, дисбактеріоз, анемія [1, 7].

Позитивна роль пропіоновокислих бактерій як пробіотиків також обумовлена утворенням ними пропіонової кислоти, міnorних органічних кислот, бактеріоцинів, ферментів. Ці унікальні мікроорганізми мають імуномодулювальні й антимутагенні властивості, здатні знижувати генотоксичну дію низки хімічних сполук і УФ-променів [1, 6]. Пропіоновокислі бактерії виявляють високі адгезивні властивості, що дає їм змогу краще за інші пробіотичні мікроорганізми колонізувати кишковий епітелій, створюючи захисний бар'єр. Крім того, за спільного культивування екзополісахариди, синтезовані пропіоновокислими бактеріями, стимулюють ріст біфідобактерій, забезпечують їхню гнучку адаптацію та захищають як окремі клітини, так і усю популяцію від несприятливих факторів зовнішнього середовища (зміна температури, низькі значення рН, заморожування і зневоднення) [8].

Враховуючи, що синтез вітаміну  $B_{12}$  кишковою мікробіотою незначний, цей вітамін має потрапляти до організму з їжею, а через те, що кисломолочні продукти є продуктами щоденного прийому, то доцільною є їхня вітамінізація. Складність виготовлення таких продуктів пов'язана з тим, що пропіоновокислі бактерії мають слабку кислотоутворюючу здатність і не ферментують молоко [5]. У зв'язку з цим розробка концентрованих заквасок на основі біфідо- і пропіоновокислих бактерій, що мають високу біохімічну активність, є актуальною проблемою.

Метою роботи був пошук режимів сумісного культивування і нагромадження біомаси бактеріями родів *Bifidobacterium* та *Propionibacterium*.

#### Матеріали та методи

У роботі використовували культури з музею кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування ОНАХТ *Bifidobacterium longum* – Я 3, *Bifidobacterium adolescentis* – С 52, *Bifidobacterium bifidum* – 1, *Propionibacterium shermanii* – PS 4. Культивування проводили на лактозному середовищі з додаванням соєвої сироватки [2, 3].

Критерієм вибору температурного режиму для сумісного культивування пропіоновокислих і біфідобактерій було порівняння динаміки накопичення кількості клітин пробіотичних мікроорганізмів за різних температур. Відомо, що температурний оптимум для пропіоновокислих бактерій дорівнює  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ , а для біфідобактерій –  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , тому ці точки були обрані нами як граничні. Нагромадження біомаси зазначеними культурами, яке спостерігали за оптимальних температур, слугувало контролем.

Для виявлення можливості сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій було проведено два експерименти. У першому лактозне середовище інокулювали сумішшю добових культур у співвідношенні 1:1; у другому культури вносили послідовно: спочатку біфідобактерії, через 5 год культивування – пропіоновокислі бактерії також у співвідношенні 1:1. Посівні дози інокулятив були стандартизовані до  $1 \cdot 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>. Культивування проводили протягом 24 год за температури  $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Обидва експерименти проводили для кожного виду біфідобактерій. Контролем слугувало середовище з чистими культурами.

Облік результатів проводили прямим підрахунком пропіоновокислих бактерій у лічильних камерах Горяєва та розсівом біфідобактерій у напіврідке поживне середовище. За отриманими даними будували графіки в напівлогарифмічних координатах (рис. 4–6).

#### Результати і їхнє обговорення

Аналіз результатів сумісного культивування за температури  $37^\circ\text{C}$  показав зниження нагромадження біомаси *P. shermanii* – PS 4 до  $6 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup> порівняно з контрольним зраз-

ком, який вирощували за оптимальної температури – 30 °С, а кількість клітин біфідобактерій була на порядок вищою: *B. bifidum* – 1 –  $5 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. adolescentis* – C 52 –  $3 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. longum* – Я 3 –  $6 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, оскільки для них такий температурний режим є оптимальним (рис. 1).

Термостатування за температури (30±1) °С протягом 24 год гальмувало ріст біфідобактерій. Нагромадження біомаси дослідженими бактеріями знизилася: *B. bifidum* – 1 – до  $4 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. adolescentis* – C 52 – до  $9 \cdot 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. longum* – Я 3 – до  $6 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup> порівняно з контрольним зразком. У той час, як показник кількості клітин *P. shermanii* – PS 4 був найвищим –  $4 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (цей температурний режим є оптимальним для вирощування пропіоновокислих бактерій) (рис. 2).

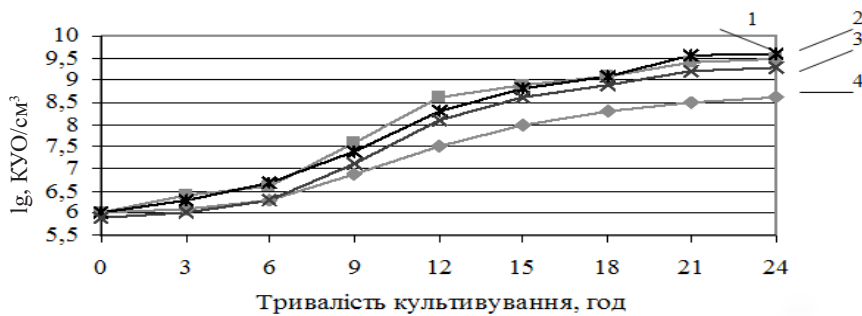


Рис. 1. Динаміка росту пробіотичних культур за температури (37±1) °С (контрольний зразок для біфідобактерій): 1 – *B. longum* – Я 3; 2 – *B. bifidum* – 1; 3 – *B. adolescentis* – C 52; 4 – *P. shermanii* – PS 4

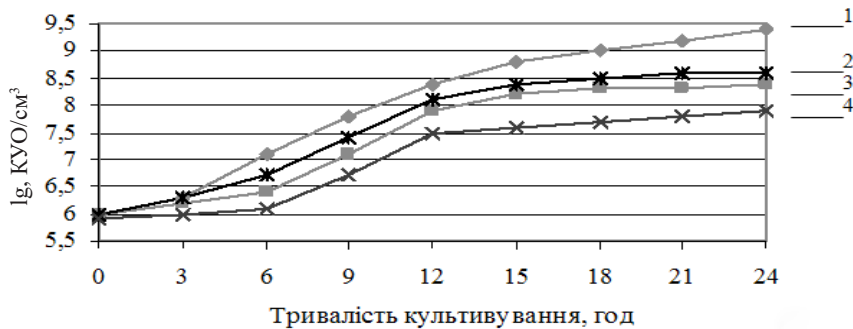


Рис. 2. Динаміка росту пробіотичних культур за температури (30±1) °С (контрольний зразок для пропіоновокислих бактерій): 1 – *P. shermanii* – PS 4; 2 – *B. longum* – Я 3; 3 – *B. bifidum* – 1, 4 – *B. adolescentis* – C 52

Зміна оптимальних температур культивування бактерій призводила до зниження біомаси, тоді як за проміжної температури (34±1) °С спостерігали рівномірний ріст пробіотичних мікроорганізмів, показники біомаси пропіоновокислих і біфідобактерій за даної температури наближали один до одного: *P. shermanii* – PS 4  $1 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. bifidum* – 1 –  $3 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. adolescentis* C 52 –  $2 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. longum* – Я 3 –  $4 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (рис. 3).

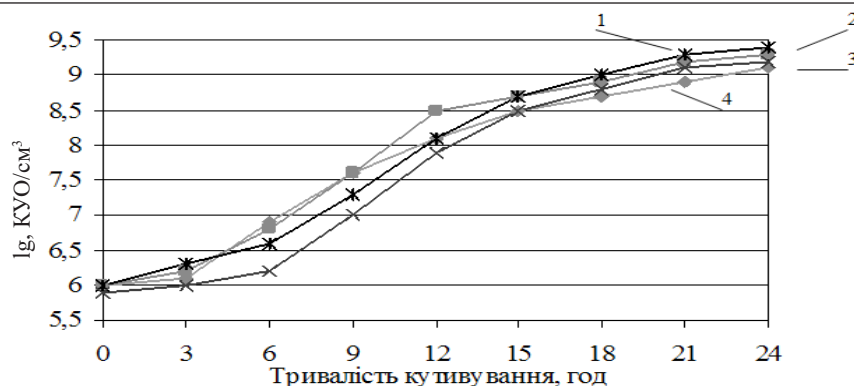


Рис. 3. Динаміка росту пробіотичних культур за температури ( $34\pm 1$ ) °C: 1 – *B. longum* – Я 3; 2 – *B. bifidum* – 1; 3 – *B. adolescentis* – C 52; 4 – *P. shermanii* – PS 4

За результатами цих досліджень для сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій обрано такий оптимальний режим: температура ( $34\pm 1$ ) °C, тривалість культивування – 24 год.

Подальше сумісне культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій проводили з метою визначення оптимального варіанта внесення бактерій. Найбільш інтенсивний ріст біфідобактерій спостерігали у першій серії експерименту за одночасного внесення культур: *B. bifidum* – 1 –  $2 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. adolescentis* – C 52 –  $1 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. longum* – Я 3 –  $3 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup> (рис. 4–6). Це можна пов'язати з тим, що логарифмічні фази росту обох мікроорганізмів при окремому культивуванні збігаються, тим самим при подальшому сумісному культивуванні продукти життєдіяльності, накопичені пропіоновокислими бактеріями, стимулюють ріст біфідобактерій. За умов внесення пропіоновокислих бактерій після 5 год попереднього культивування біфідобактерій спостерігали незначне зниження приросту біомаси на початку логарифмічної фази порівняно з першою лінією експерименту. Це можна пояснити тим, що внесені пропіоновокислі бактерії почали використовувати поживні речовини середовища та деякі продукти метаболізму біфідобактерій для свого росту, проте вже на 24-ту год культивування біомаса комбінованої закваски в першій і другій лінії була однаковою –  $(4-5) \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>.

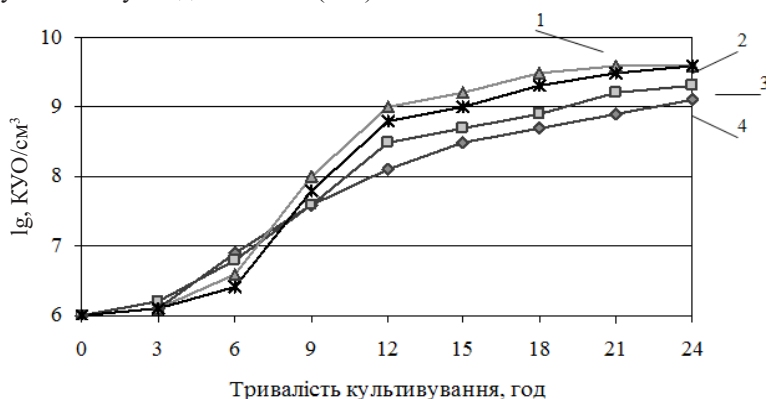


Рис. 4. Вплив *P. shermanii* – PS 4 на динаміку росту *B. bifidum* – 1 при сумісному культивуванні (1:1) 1 – *B. bifidum* – 1 + *P. shermanii* – PS 4; 2 – *B. bifidum* – 1 + *P. shermanii* – PS 4 (через 5 год); 3 – *B. bifidum* – 1; 4 – *P. shermanii* – PS 4



Рис. 5. Вплив *P. shermanii* – PS 4 на динаміку росту *B. longum* – Я 3 при сумісному культивуванні (1:1): 1 – *B. longum* – Я 3 + *P. shermanii*- PS 4; 2 – *B. longum* – Я 3 + *P. shermanii* – PS 4 (через 5 год); 3 – *B. longum* – Я 3; 4 – *P. shermanii*- PS 4

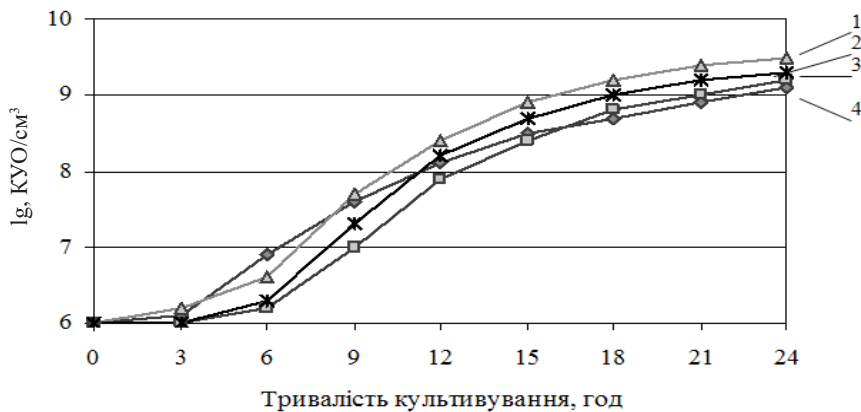


Рис. 6. Вплив *P. shermanii* – PS 4 на динаміку росту *B. adolescentis* - C 52 при сумісному культивуванні (1:1): 1 – *B. adolescentis* – C 52 + *P. shermanii* – PS 4; 2 – *B. adolescentis* – C 52 + *P. shermanii* – PS 4 (через 5 год); 3 – *B. adolescentis* - C 52; 4 – *P. shermanii* – PS 4

За результатами досліджень визначено, що одночасне внесення бактеріальних інокулятів у співвідношенні 1:1 за проміжної температури ( $34 \pm 1$ ) °C було найбільш вдалим для росту й накопичення біомаси пробіотичними культурами.

Результати подальших експериментів показали, що культури пробіотичних бактерій, культивованих в асоціації за одночасного внесення інокулятів у співвідношенні 1:1, мають вищу біохімічну активність, ніж у монокультури, про що свідчить збільшення біомаси клітин біфідо- та пропіоновокислих бактерій і підвищення кислотного потенціалу комбінованої закваски (див. таблицю).

Щільність популяції пробіотичних мікроорганізмів у консорціумі збільшувалася з  $10^9$  КУО/см<sup>3</sup> до  $10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, що свідчить про симбіотичні зв'язки біфідо- та пропіоновокислих бактерій.

Показники розвитку бактерій родів *Bifidobacterium* і *Propionibacterium*- у монокультури й у консорціумі за одночасного внесення після 24 год культивування (n=3, P ≤ 0,95)

Показник	У монокультури				У консорціумі бактерій у співвідношенні 1:1		
	<i>B. longum</i> -Я 3	<i>B. bifidum</i> - I	<i>B. adolescentis</i> - C 52	<i>P. shermanii</i> - PS 4	<i>B. longum</i> - Я 3 + <i>P. shermanii</i> - PS 4	<i>B. bifidum</i> - I + <i>P. shermanii</i> - PS 4	<i>B. adolescentis</i> - C 52 + <i>P. shermanii</i> - PS 4
Кількість клітин біфідобактерій, КУО/см <sup>3</sup>	4·10 <sup>9</sup>	3·10 <sup>9</sup>	2·10 <sup>9</sup>	–	3·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>10</sup>	1·10 <sup>10</sup>
Кількість клітин пропіоново-кислих бактерій, КУО/см <sup>3</sup>	–	–	–	1·10 <sup>9</sup>	4·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>10</sup>
Активна кислотність, рН	4,7	4,7	4,9	5,9	5,3	5,3	5,4
Титрована кислотність, °Т	64	62	59	70	74	73	71

Пропіоновокислі бактерії відомі своєю здатністю до утворення вітаміну В<sub>12</sub>, який є важливим джерелом як один із компонентів субстрату для розвитку клітин біфідобактерій. У свою чергу, біфідобактерії метаболізують лактозу до лактату, що спрощує метаболітичний шлях пропіоновокислих бактерій, тим самим прискорюючи розвиток і накопичення пропіоновокислих бактерій. Окрім того, біфідо- та пропіоновокислі бактерії є постійними мешканцями шлунково-кишкового тракту. Всі ці характеристики дають підстави для висновку, що біфідо- та пропіоновокислі бактерії мають симбіотичні зв'язки (мутуалізм) і що вдале поєднання вищезазначених мікроорганізмів дає великі перспективи для створення симбіотичної закваски пробіотичної дії. Створення вдалої мікробної композиції у певних пропорціях є запорукою якісного продукту, який буде конкурентоспроможним за умов інтенсивного розвитку сегменту функціональних продуктів харчування.

Одержані результати експерименту свідчать про можливість сумісного культивування бактерій родів *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* за температури (34±1) °С протягом 24 год. Незалежно від способу внесення інокулятив біфідо- та пропіоновокислих бактерій, за 24 год культивування накопичувалася майже однакова кількість біомаси, проте за одночасного внесення спостерігали трохи швидший приріст у логарифмічній фазі.

За сумісного культивування з пропіоновокислими бактеріями штам *B. longum* – Я 3 характеризувався найвищою біохімічною активністю. У комбінованій заквасці *B. longum* – Я 3 було 3·10<sup>10</sup> КУО/см<sup>3</sup>, а активна кислотність досягала 5,3 одн. рН, титрована кислотність – 74 °Т. Тому *B. longum* – Я 3 був обраний для подальших досліджень з метою створення симбіотичного продукту в консорціумі з пропіоновокислими бактеріями.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Белозерова Л. Н. Разработка технологии кисломолочного продукта с использованием пропанонокислых бактерий: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04. Улан-Удэ, 2000. 126 с.
2. Капрельянц Л. В., Труфкаті Л. В., Крупицька Л. О. Поживне середовище для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на основі рослинної сировини // Наукові праці ОНАХТ. 2015. Т. 3. №4 (64). С. 98–103.
3. Капрельянц Л. В., Труфкаті Л. В., Крупицька Л. О. Усовершенствование состава питательной среды для культивирования бифидобактерий // Наук. вісн. ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2015. Т. 3. № 4 (64). С. 47–54.



4. Широбоков В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Нові стратегії в області створення і клінічного використання пробіотиків // Вісн. фармакології та фармації. 2010. № 2. С. 18–30.
5. Batista A., Silva M., Raices R. Quality parameters of probiotic yogurt added to glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical–chemical and metabolic activity analyses // Food Res. Int. 2015. Vol. 77. P. 627–635.
6. Falentin H., Jan. G., Loux V. The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications // PloS One. 2010. Vol. 5. P. 11748–11753.
7. Kanmani P., Satish Kumar R., Yuvaraj N. Probiotics and its functionally valuable products – A review // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2013. Vol. 53. N 6. P. 641–658.
8. Kouya T., Misawa K., Horiuchi M. Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains // J. Biosci. Bioeng. 2007. Vol. 103. N 5. С. 464–471.
9. Papadimitriou K., Zoumpopoulou G., Foligne B. Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches // Frontiers in Microbiology. 2015. Vol. 6. P. 58.

Стаття: надійшла до редакції 23.05.16

доопрацьована 15.09.16

прийнята до друку 25.10.16

## SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR CO-CULTIVATION OF BIFIDOBACTERIA AND PROPIONIC ACID BACTERIA

L. Kaprelyants, L. Trufkati, L. Krupitskaya

*Odessa National Academy of Food Technologies*  
112, Kanatna St., Odessa 65039, Ukraine  
e-mail: krupitskaja.lora@yandex.ua

The article presents the results of research to find modes for co-cultivation of cultures *Bifidobacterium longum* – Я 3, *Bifidobacterium adolescentis* – С 52, *Bifidobacterium bifidum* – 1 with the culture of *Propionibacterium shermanii* – PS 4 on lactose medium. Changing the temperature optimum cultivation of the bacteria resulted in a decrease in their growth, while at an intermediate temperature (34±1) °C was observed even development of probiotic microorganisms indicators amount of bifidobacteria and propionibacteria at the temperature approaching each other. According to the results of the experimental data it was determined the optimum temperature for the joint cultivation of bifidobacteria and propionic acid bacteria. Simultaneous application of bacterial inoculum in the ratio 1: 1 at an intermediate temperature (34±1) °C was the most successful development and accumulation of probiotic cultures. It was found that the samples of probiotic bacteria cultured in the association have higher biochemical activity than in a monoculture, as evidenced by the increase in bifidobacteria cell biomass and propionic acid bacteria. The population density of probiotic microorganisms in the consortium increased from 10<sup>9</sup> CFU/cm<sup>3</sup> to 10<sup>10</sup> CFU/cm<sup>3</sup>, indicating a symbiotic relationship test organisms. When co-cultured with propionic acid bacteria species *Bifidobacterium longum* characterized by high rates. The combined leaven *B. longum* – Я 3 was 3·10<sup>10</sup> CFU/ cm<sup>3</sup>, active acidity reached 5.3 sub. pH, titration acidity – 74 °T. Therefore, *B. longum* – Я 3 was selected for further studies in order to create a symbiotic product in a consortium with propionic acid bacteria.

*Keywords:* biomass, co-cultivation, the mass fraction, temperature, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, symbiotic.