

Пищевые ингредиенты, сырье и материалы Food Ingredients, Raw Materials and Materials

Научная статья
УДК 579.2
DOI: 10.14529/food220202

ИЗУЧЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LATILACTOBACILLUS SAKEI*

А.П. Никифорова✉, anna.p.nikiforova@gmail.com

И.С. Хамагаева, ikhamagaeva@mail.ru

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления (ВСГУТУ),
Улан-Удэ, Россия

Аннотация. При разработке бактериальных препаратов для пищевой промышленности на сегодняшний день широко применяются пробиотические микроорганизмы. Для подбора пробиотических штаммов молочнокислых бактерий необходим учет таких факторов, как биохимическая активность, резистентность к различным значениям активной кислотности среды и желчи и т. д. В связи с этим в статье изучаются биотехнологический потенциал и устойчивость к неблагоприятным факторам среды штаммов *Latilactobacillus sakei* LSK-45, *Latilactobacillus sakei* DSM 20017. Установлено, что изучаемые штаммы обладают высокой активностью: через 16 ч культивирования на среде MRS количество жизнеспособных клеток достигает 10^{10} КОЕ/см³. Образование в процессе ферментации молочной кислоты приводит к снижению активной кислотности до pH 4,27. Также показано, что бактерии обладают высокой толерантностью к высоким и низким значениям pH. Так, при pH 3,5 выживаемость *L. sakei* LSK-45 составила 66,63 %, а при pH 8,3 – 71,75 %. Лучшую толерантность показал штамм *L. sakei* DSM 20017: при pH 3,5 выживаемость составила 79,55 %, а при pH 8,3 – 92,02 %. Также штаммы являются устойчивыми к желчи: при содержании желчи в питательной среде 40 % выживаемость обоих штаммов составила более 50 %. Изучение толерантности к фенолу (0,4 %) показало высокую толерантность штаммов (79,73 % и 81,80 % для *L. sakei* LSK-45 и *L. sakei* DSM 20017 соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о том, что изучаемые штаммы могут использоваться в составе бактериальных препаратов для пищевой промышленности.

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, биотехнологические свойства, молочнокислые бактерии, *Latilactobacillus sakei*, биотехнология, желчь, фенол, pH, пробиотики, стрессовые факторы

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (номер гранта МК-128.2020.11)

Для цитирования: Никифорова А.П., Хамагаева И.С. Изучение пробиотического потенциала штаммов молочнокислых бактерий *Latilactobacillus sakei* // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2022. Т. 10, № 2. С. 15–21. DOI: 10.14529/food220202

STUDY OF PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA *LATILACTOBACILLUS SAKEI*

A.P. Nikiforova✉, anna.p.nikiforova@gmail.com
I.S. Khamagaeva, ikhamagaeva@mail.ru

East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia

Abstract. During the development of bacterial starter cultures for the food industry, probiotic microorganisms are widely used nowadays. For the selection of probiotic strains of lactic acid bacteria different factors such as biochemical activity, ability to resist various pH values and bile content should be taken into account. In this regard, the biotechnological properties and resistance to stress factors of *Latilactobacillus sakei* LSK-45 and *Latilactobacillus sakei* DSM 20017 were studied in the article. It was found that after 16 h of cultivation of bacteria on MRS medium, the number of viable cells reaches 10^{10} CFU/cm³. The formation of lactic acid during fermentation leads to a decrease in active acidity to pH 4.27. It has also been shown that bacteria have a high tolerance to high and low pH values. So, at pH 3.5, the survival rate of *L. sakei* LSK-45 was 66.63 %, and at pH 8.3 – 71.75 %. The *L. sakei* DSM 20017 strain showed better tolerance: at pH 3.5 the survival rate was 79.55 %, and at pH 8.3 it was 92.02 %. Also, the strains are resistant to bile: the survival rate of both strains was more than 50 % in the medium with 40 % of bile. The study of phenol tolerance (0.4 %) showed high tolerance of studied bacterial strains (79.73 % and 81.80 % for *L. sakei* LSK-45 and *L. sakei* DSM 20017, respectively). The results showed that the studied strains can be used as a component of bacterial starter cultures for food industry.

Keywords: probiotic microorganisms, biotechnological properties, lactic acid bacteria, *Latilactobacillus sakei*, biotechnology, bile, phenol, pH, probiotics, stress factors

Acknowledgments. This work was supported by a grant of the President of Russian Federation for state support of young Russian scientists – candidates of science (grant number MK-128.2020.11)

For citation: Nikiforova A.P., Khamagaeva I.S. Study of probiotic potential of lactic acid bacteria *Latilactobacillus sakei*. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2022, vol. 10, no. 2, pp. 15–21. (In Russ.) DOI: 10.14529/food220202

Введение

Ферментированные продукты из рыбы пользуются высоким потребительским спросом во всем мире. Их ассортимент достаточно широк и представлен продуктами различных наименований, в том числе пастами и соусами [1, 5, 7, 9, 13].

В последние годы ферментация с использованием пробиотических микроорганизмов, в том числе молочнокислых бактерий, широко применяется для разработки новых технологий рыбных продуктов. Например, применение *Lactococcus lactis* M10 и *Weissella cibaria* M3 позволило сократить продолжительность ферментации и улучшить качество традиционного китайского ферментированного рыбного продукта Chouguiyu [1].

В работе В. Speranza и др. проводится выбор бактериальных стартовых культур для производства ферментированного рыбного

соуса. В результате были отобраны штаммы, которые позволяют сократить продолжительность ферментации и улучшить микробиологические показатели готового продукта [11].

Известно также исследование ученых из Тайланда, которые использовали для ферментации рыбы бактериальную стартовую культуру, состоящую из *Lactiplantibacillus plantarum* IFRPD P15 и *Limosilactobacillus reuteri* IFRPD P17. Это позволило сократить время ферментации и улучшить показатели безопасности продукта в связи с тем, что применяемые бактерии обладают активностью против патогенной микрофлоры [7].

Большой интерес представляет применение молочнокислых бактерий для создания рыбных продуктов с пробиотическими свойствами.

В связи с вышеизложенным важным направлением развития пищевой промышленно-

сти является поиск новых бактериальных штаммов, предназначенных для использования в качестве стартовых культур для ферментированных рыбных продуктов [1, 5, 7, 11].

При создании новых бактериальных препаратов для пищевой промышленности должен проводиться учет биохимической активности и влияния стрессовых факторов на рост применяемых штаммов [10, 14].

Ценность штаммов определяется способностью сохранять высокую биохимическую активность, зависящую от внешних факторов и от соотношения между биохимически активными и неактивными клетками в популяциях микроорганизмов [14].

Известно, что молочнокислые бактерии обладают развитыми механизмами защиты от стрессовых факторов, которые позволяют им выживать в суровых условиях. Эти механизмы зависят от многих факторов [2–4, 6, 8].

Таким образом, целью работы является изучение пробиотических свойств штаммов молочнокислых бактерий *Latilactobacillus sakei* LSK-45 и *Latilactobacillus sakei* DSM 20017, предназначенных для использования в составе бактериальных препаратов для рыбоперерабатывающей промышленности.

Объекты и методы исследований

Объектами экспериментальных исследований служили два штамма молочнокислых бактерий вида *Latilactobacillus sakei* (Katagiri et al. 1934) Zheng et al. 2020):

- *Latilactobacillus sakei* LSK-45,
- *Latilactobacillus sakei* DSM 20017.

Оба штамма были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИгенетика.

При проведении экспериментальных исследований молочнокислые бактерии культивировали на полужидкой среде MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (ООО «НПЦ «Биокомпас-С») при оптимальной температуре, равной 37 °С.

Количественный учет молочнокислых микроорганизмов проводили методом предельных разведений на агаризованной среде MRS (ООО «НПЦ «Биокомпас-С»).

Для изучения морфологии клеток из колоний изучаемых штаммов готовили фиксированные бактериальные препараты, окрашивали их по Граму и микроскопировали с применением микроскопа Микмед-6 (ЛОМО, Россия).

Для оценки пробиотических свойств штаммов изучали их устойчивость к воздействию опасных факторов среды, в том числе активной кислотности, желчи, фенола.

Активную кислотность (рН) питательной среды определяли при помощи рН-метра Анион-4100 (ООО НПЦ «Инфраспек-Аналит», Россия).

Толерантность изучаемых штаммов к желчи оценивали по количеству жизнеспособных клеток. При этом предварительно в питательную среду с содержанием желчи 0; 20 и 40 % вносили инокулят бактерий, затем питательную среду инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч, проводили количественный учет жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий.

Оценку толерантности бактерий к высоким и низким значениям рН проводили при значениях рН питательной среды, равных 3,5 и 8,3.

Толерантность бактерий к фенолу определяли после его культивирования в течение 24 ч при 37 °С в питательной среде с содержанием фенола 0,4 %.

Результаты и их обсуждение

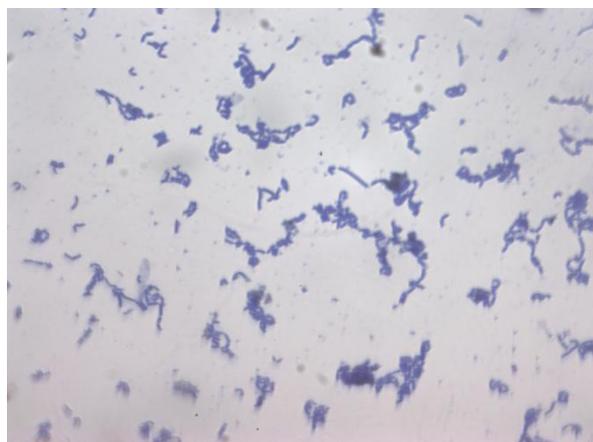
На первом этапе проводили анализ характеристик, полученных из паспортов штаммов. Известно, что штамм *Latilactobacillus sakei* LSK-45 был получен из конской колбасы. Штамм обладает антагонистической активностью против *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*.

Штамм *Latilactobacillus sakei* DSM 20017 является типовым штаммом вида и был выделен из традиционного японского алкогольного напитка sake.

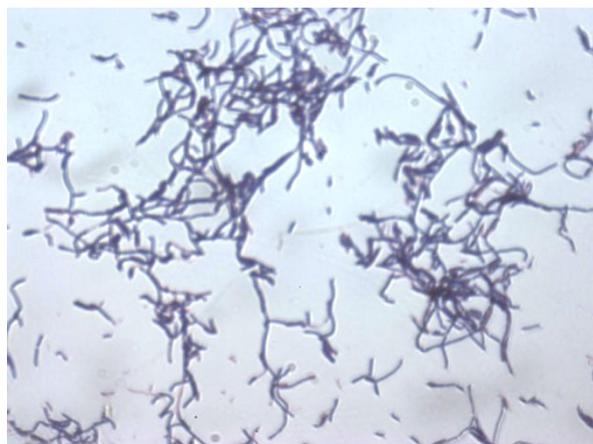
Известно, что бактерии вида *Latilactobacillus sakei* хорошо адаптированы к росту в мясе и рыбе, способны развиваться при низких положительных температурах [12]. Ранее проведенными исследованиями установлено, что изучаемые штаммы являются толерантными к высоким концентрациям соли (6–10 %), причем большей толерантностью обладает штамм *Latilactobacillus sakei* LSK-45 [15]. Эти свойства свидетельствуют о том, что бактерии вида *Latilactobacillus sakei* могут применяться при ферментации рыбы.

В результате анализа морфологии штаммов установлено, что особенностью штамма *L. sakei* LSK-45 является наличие коротких грамположительных палочек, которые расположены поодиночке, цепочками или группа-

ми. Клетки штамма *L. sakei* DSM 20017 представляют собой грамположительные палочки, расположенные поодиночке, парами и цепочками (рис. 1).



а) *L. sakei* LSK-45



б) *L. sakei* DSM 20017

Рис. 1. Морфология штаммов *Latilactobacillus sakei*

На втором этапе изучали биохимическую активность штаммов, о которой судили по количеству жизнеспособных клеток и изменению pH при культивировании на среде MRS. Результаты исследований представлены на рис. 2.

Представленные данные показывают, что оба штамма обладают высокой активностью. Через 16 ч культивирования количество жизнеспособных клеток достигает 10^{10} КОЕ/см³, а затем остается на прежнем уровне. Снижение pH в процессе культивирования до значения 4,27 вызвано образованием в процессе ферментации молочной кислоты.

При разработке пищевых продуктов пробиотической направленности важное внима-

ние уделяется количеству жизнеспособных клеток, которое должно составлять не менее 10^6 КОЕ/г. Однако известно, что в процессе изготовления и хранения продукта, а также в результате прохождения через желудочно-кишечный тракт часть микроорганизмов погибает [14]. В связи этим на следующем этапе экспериментальных исследований оценивали влияние неблагоприятных факторов среды на рост изучаемых штаммов. Результаты представлены на рис. 3.

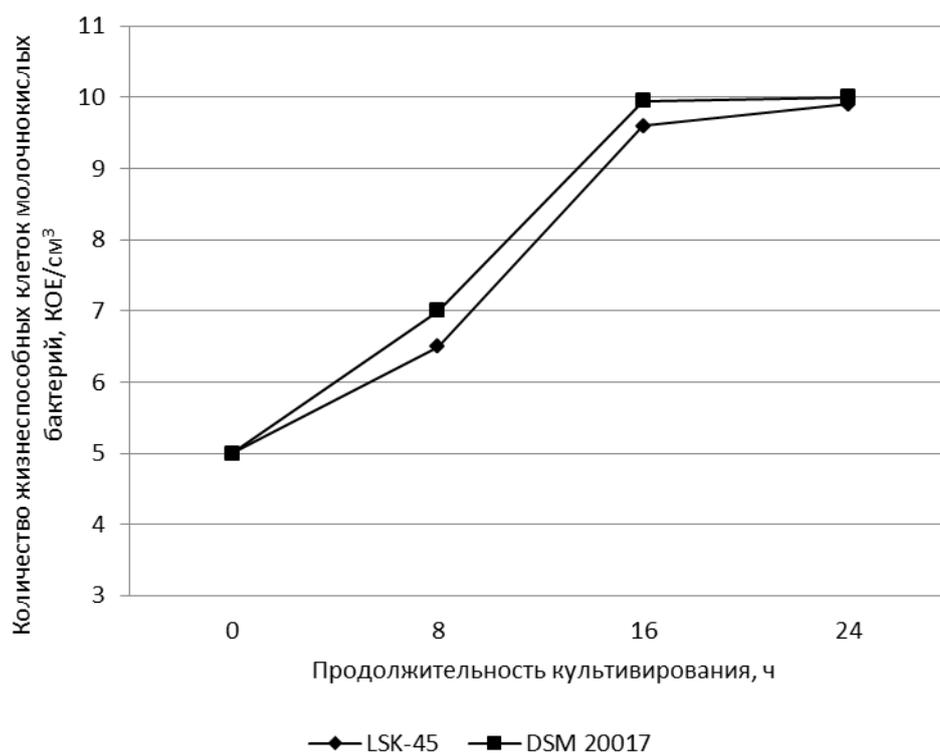
В результате исследований установлено, что изучаемые штаммы являются устойчивыми к желчи и фенолу, а также способны расти при низких и высоких значениях pH.

Большую устойчивость к высоким и низким значениям pH демонстрирует штамм *L. sakei* DSM 20017: при pH 3,5 выживаемость составляет 79,55 %, а при pH 8,3 – 92,02 %, тогда как выживаемость штамма *L. sakei* LSK-45 при pH 3,5 равна 66,63 %, а при pH 8,3 – 71,75 %. Возможно, это связано с происхождением штаммов, что подтверждается данными, приведенными в работе Sawatari и Yokota, в которой штаммы, выделенные из разных источников, отличались по устойчивости к высоким значениям pH [8].

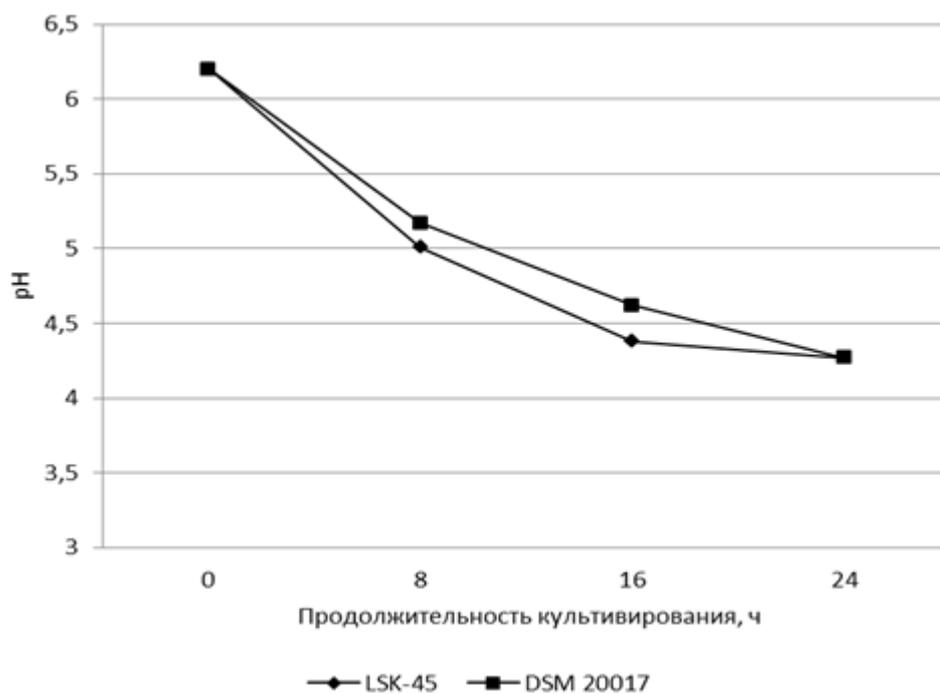
Желчные кислоты играют важную роль в процессе пищеварения. Их присутствие в кишечнике оказывает угнетающее действие на микроорганизмы [12]. Полученные результаты показывают, что изучаемые штаммы являются устойчивыми к желчи: при 40 % желчи в среде выживаемость штаммов составляет более 50 %.

Устойчивость микроорганизмов к фенолу также изучается при оценке пробиотических свойств [10, 14]. В результате исследований установлено, что штаммы *L. sakei* LSK-45 и *L. sakei* DSM 20017 способны расти при содержании фенола 0,4 %, их выживаемость составляет 79,73 и 81,80 % соответственно.

Установлено, что изучаемые штаммы обладают высокой биохимической активностью и устойчивостью к действию неблагоприятных факторов, воспроизводящим условия желудочно-кишечного тракта. Таким образом, *Latilactobacillus sakei* LSK-45 и *Latilactobacillus sakei* DSM 20017 являются перспективными для применения в составе бактериальных препаратов для пищевой промышленности, применение которых позволит получить рыбные продукты, обладающие пробиотическими свойствами.



а)



б)

Рис. 2. Количество жизнеспособных клеток бактерий (а) и изменение pH (б) в процессе культивирования штаммов *L. sakei* LSK-45 и *L. sakei* DSM 20017 на среде MRS

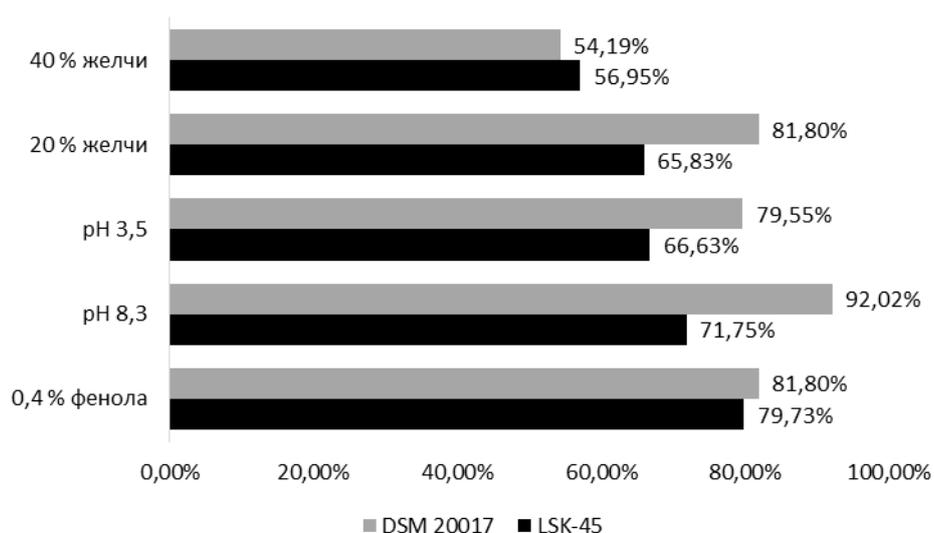


Рис. 3. Выживаемость штаммов *L. sakei* при воздействии неблагоприятных факторов

Список литературы/References

1. Bao R., Liu S., Ji C., Liang H., Yang S., Yan X., Zhou Y., Lin X., Zhu B. Shortening Fermentation Period and Quality Improvement of Fermented Fish, Chouguiyu, by Co-inoculation of *Lactococcus lactis* M10 and *Weissella cibaria* M3. *Front. Microbiol.*, 2018, no. 9, p. 3003. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03003
2. Boor K.J. Bacterial stress responses: What doesn't kill them can make them stronger. *PLoS Biol.*, 2006, vol. 4, no. 1, pp. 18–20. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040023
3. Ezraty B., Gennaris A., Barras F., Collet J.-F. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no 7, pp. 385–396. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.26
4. Guchte M. Van de., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 2002, no. 82, pp. 187–216. DOI: 10.1023/a:1020631532202
5. Nguyen A.D.Q., Sekar A., Kim M., Nguyen L.P., Le N.T., Uh S., Hong S., Kim K. Fish sauce fermentation using *Marinococcus halotolerans* SPQ isolate as a starter culture. *Food Sci Nutr.*, 2021, no. 9, pp. 651–661. DOI: 10.1002/fsn3.2024
6. Papadimitriou K., Alegria A., Bron P.A., de Angelis M., Gobbetti M., Kleerebezem M., Lemos J.A., Linares D.M., Ross P., Stanton C., Turrone F., van Sinderen D., Varmanen P., Ventura M., Zúñiga M., Tsakalidou E., Kok J. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, vol. 80, no. 3, pp. 837–890. DOI: 10.1128/mmr.00076-15
7. Saithong P., Panthavee W., Boonyaratankornkit M., Sikkhamondhol C. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaasom, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, vol. 110, no. 5, pp. 553–557. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.06.004
8. Sawatari Y., Yokota A. Diversity and mechanisms of alkali tolerance in lactobacilli, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 16, pp. 5385. DOI: 10.1128/aem.01367-07
9. Skåra T., Axelsson L., Stefansson G., Ekstrand B., Hagen H. Fermented and ripened fish products in the northern European countries. *J. Ethn. Foods*, 2015, vol. 2, no. 1. pp. 18–24. DOI: 10.1016/j.jef.2015.02.004
10. Somashekaraiyah R., Shruthi B., Deepthi B.V., Sreenivasa M.Y. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from neera: A naturally fermenting coconut palm nectar. *Front. Microbiol.*, 2019, no. 10, p. 1382. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01382

11. Speranza B., Racioppo A., Campaniello D., Altieri C., Sinigaglia M., Corbo M.R., Bevilacqua A. Use of Autochthonous *Lactiplantibacillus plantarum* Strains to Produce Fermented Fish Products. *Front. Microbiol.*, 2020, no. 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.615904

12. Zagorec M., Champomier-Vergès M.-C. *Lactobacillus sakei*: A Starter for Sausage Fermentation, a Protective Culture for Meat Products. *Microorganisms*, 2017, no. 5(3). DOI: 10.3390/microorganisms5030056

13. Бремнер Г.А. Безопасность и качество рыбо- и морепродуктов. СПб: Профессия, 2009, 512 с. [Bremner G.A. Safety and quality of fish and seafood, St. Petersburg, 2009. 512 p.]

14. Китаевская С.В. Современные тенденции отбора и идентификации пробиотических штаммов молочнокислых бактерий // *Вестник Казанского технологического университета*. 2012, Т. 15, № 17. С. 184–188. [Kitaevskaya S.V. Modern trends in the selection and identification of probiotic strains of lactic acid bacteria. *Bulletin of Kazan Technological University*, 2012, vol. 15, no. 17, pp. 184–188. (In Russ.)]

15. Никифорова А.П., Хазагаева С.Н., Хамагаева И.С. Исследование устойчивости *Lactobacillus sakei* к осмотическому стрессу // *Техника и технология пищевых производств*. 2021. Т. 51, № 3. С. 574–583. [Nikiforova A.P., Khazagaeva S.N., Khamagaeva I.S. Tolerance of *Lactobacillus sakei* to Osmotic Stress. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2021, vol. 51, no. 3, pp. 574–583]. DOI: 10.21603/2074-9414-2021-3-574-583

Информация об авторах

Никифорова Анна Платоновна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, доцент кафедры «Стандартизация, метрология и управление качеством», Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия, anna.p.nikiforova@gmail.com

Хамагаева Ирина Сергеевна, доктор технических наук, профессор, заведующая кафедрой «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров», Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия, ikhamagaeva@mail.ru

Information about the authors

Anna P. Nikiforova, candidate of technical sciences, senior scientist, associate professor of the department of standardization, metrology and quality management, East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia, anna.p.nikiforova@gmail.com

Irina S. Khamagaeva, doctor of technical sciences, professor, head of the department of dairy technology, merchandising and examination of goods, East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia, ikhamagaeva@mail.ru

Статья поступила в редакцию 02.11.2021

The article was submitted 02.11.2021