

**3d International Scientific-Practical Conference  
on the Humanities and the Natural Science 2015**

- [12] Vorobyova L.I. Propionic acid bacteria. 1999. -300 p.  
[13] Brilis V.I., Brilene T.A., Lentsner H.P., Lentsner A.A. // Microbiology. -1982; 9: 75-8.  
[14] Vorobyova L.I., Abilev S.K. Anti-mutagenic properties of bacteria // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2002. T. 38. -№ 2. - P. 115-127

**Khamagaeva I.S., Khamaganova I.V., Zambalova N.A.,  
Khazagaeva S.N.**

**STUDY OF EXOPOLYSACCHARIDE  
MAKING CAPABILITIES OF  
PROBIOTIC MICROORGANISMS**

**Khamagaeva I.S., Russia, Doctor of Technical science,  
Professor, East-Siberian State University of Technology and  
Management**

**Khamaganova I.V., Russia, Doctor of Technical  
science, associate Professor, East-Siberian State University of  
Technology and Management**

**Zambalova N.A., Russia, Candidate of Economic  
Sciences, East-Siberian State University of Technology and  
Management**

**Khazagaeva S.N., Russia, Candidate of Technical  
science, associate Professor, East-Siberian State University of  
Technology and Management**

**Abstract**

Structural and mechanical characteristics and consumer properties of dairy products depend largely on the ability of the starter cultures to produce extracellular polysaccharides.

The article presents the results of a study exopolysaccharides potential bifidobacteria, lactobacteria and propionic acid bacteria. Selected strains of probiotic microorganisms - Bifidobacterium Bifidum 8<sub>3</sub>, Lactococcus lactis subspecies Cremoris 24<sub>4</sub>, Propionibacterium Shermanii AC-2503, have a

### 3d International Scientific-Practical Conference on the Humanities and the Natural Science 2015

pronounced ability to synthesize exopolysaccharides. It is found that with increasing concentrations of sodium selenite concentration increases exopolysaccharides, which are factors of adaptation of probiotic microorganisms. The selected optimal dose of sodium selenite application provides the high exopolysaccharides content and rapid growth of probiotic microorganisms.

**Keywords:** probiotic microorganisms, exopolysaccharides, cultivation, sodium selenite.

#### **Введение.**

Закваски являются основополагающим фактором качества при производстве сметаны. Благодаря закваскам продукт приобретает характерные вязкость, структуру сгустка, консистенцию, аромат. Закваски определяют стабильность качественных показателей продукта при хранении [1-4].

Важным аспектом разработки пробиотического продукта является отбор штаммов по производственно-ценным свойствам. Основу заквасок для классической сметаны составляют молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis subspecies lactis* и *Lactococcus lactis subspecies cremoris* [5].

Многолетний опыт по подбору микрофлоры заквасок показывает, что лучше всего сочетаются штаммы, имеющие близкую активность кислотообразования. Поэтому в качестве основы закваски для пробиотического продукта наряду с бифидобактериями *Bifidobacterium Bifidum* 8<sub>3</sub> выбраны молочнокислые бактерии вида *Lactococcus lactis subspecies cremoris*, так как они, активно развиваясь в молоке, формируют плотный сметанообразный сгусток, и, являясь менее активными кислотообразователями, характеризуются низким постокислительным потенциалом [6-9].

Для повышения функциональных свойств и улучшения консистенции разрабатываемого продукта в состав комбинированной закваски введены пропионовокислые бактерии.

Структурно-механические свойства кисломолочных сгустков обуславливаются коллоидным состоянием мицелл казеинаткальцийфосфатного комплекса, денатурацией сывороточных белков, дисперсностью и физическим состоянием жировой эмульсии, синтезом микроорганизмами закваски естественных стабилизаторов – экзополисахаридов.

Накапливаемые в процессе сквашивания полисахариды соединяются с белками молока, образуя углеводно-белковые

### 3d International Scientific-Practical Conference on the Humanities and the Natural Science 2015

комплексы, повышая гидрофильность сгустка, и оказывают положительное влияние на консистенцию сметаны.

Согласно литературным данным, синтез и качественный состав экзополисахаридов бактерий зависят от условий культивирования [10-12]. Нами установлено, что при культивировании бифидобактерий и пропионовокислых бактерий на питательной среде с добавлением селенита натрия повышается вязкость культуральной жидкости и увеличивается концентрация экзополисахаридов [13-15]. Что касается лактококков, то такая информация в литературе не обнаружена.

В связи с этим, для создания комбинированной закваски с высокими структурно-механическими свойствами необходимо подбирать заквасочные культуры с учетом их способности продуцировать экзополисахариды.

Целью данной работы является исследование условий культивирования пробиотических микроорганизмов на синтез экзополисахаридов.

#### Материалы и методы исследований.

Объектами исследований служили чистые культуры пробиотических бактерий: штаммы *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *freundenreichii* AC-2500, *Propionibacterium cyclohexanicum kusano* AC-2560, *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *shermanii* AC-2503, полученные из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (Москва), штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium longum* DK 100, *Bifidobacterium bifidum* 83, *Bifidobacterium longum* B379M, активизированные уникальным биотехнологическим методом, разработанным в ВСГУТУ [16] и штаммы молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 18П, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 244, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* T-18-20, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика».

Для культивирования пробиотических микроорганизмов применяли разработанную в ВСГУТУ питательную среду на основе осветленной сыворотки с внесением ростовых компонентов.

Концентрацию экзополисахаридов определяли антроновым методом [17]. Количественный учет бифидо- и пропионовокислых бактерий проводили в соответствии с МУК 4.2.999-00; *Lactococcus lactis* – на плотной агаризованной среде MRS [18]. В таблицах обсуждаются статистически достоверные различия при  $p < 0,05$ .

**3d International Scientific-Practical Conference  
on the Humanities and the Natural Science 2015**

**Результаты и обсуждение.**

На начальном этапе исследований, при отборе культур для комбинированной закваски был изучен синтез экзополисахаридов пробиотическими микроорганизмами.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, наиболее высокая способность к продуцированию экзополисахаридов обнаружена у штаммов *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* AC-2503, *Bifidobacterium bifidum* 8<sub>3</sub> и *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* 24<sub>4</sub>.

Таблица 1 – Полисахаридный потенциал микроорганизмов

Объект исследования	Относительная вязкость культуральной жидкости, сСт	Концентрация полисахаридов, мкг/см <sup>3</sup>
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> AC-2500	1,88	19,70±0,61
<i>P. cyclohexanicum</i> kusano AC-2560	3,86	29,60±0,43
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> AC-2503	4,45	30,2±0,26
<i>Bifidobacterium longum</i> DK-100	1,92	5,9±0,04
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 8 <sub>3</sub>	2,41	7,8±0,021
<i>Bifidobacterium longum</i> B 379 M	2,4	7,5±0,03
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 24 <sub>4</sub>	4,62	23,8±0,21
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 18П	4,45	18,3±0,17
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> T-18-20	4,57	19,6±0,31

Согласно современным представлениям роль естественных стабилизаторов выполняют экзополисахариды, от концентрации которых зависят плотность и влагоудерживающая способность сгустков, консистенция продукта. Микробные полисахариды представлены широким спектром полимеров, самых различных по составу, строению, типу связей [19, 20].

Способность экзополисахаридов к структурированию коллоидных систем зависит не только от их концентрации, но и от качественного состава. В частности присутствие

**3d International Scientific-Practical Conference  
on the Humanities and the Natural Science 2015**

ацилированных (остатки нейтральных моносахаридов этерифицированы жирными кислотами) полисахаридов, положительно влияет на способность к структурированию и увеличению вязкости культуральной жидкости. В данном случае это видно на примере штамма *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* AC-2500: относительно высокая концентрация экзополисахаридов на фоне небольшой вязкости.

Установлено, что наиболее выраженной способностью к продуцированию полисахаридов обладают штаммы *L. cremoris* 24<sub>4</sub> (23,8 мкг/см<sup>3</sup>), *B. bifidum* 8<sub>3</sub> (7,8 мкг/см<sup>3</sup>), *P. shermanii* AC-2503 (30,2 мкг/см<sup>3</sup>). Они характеризуются высокими производственно-ценными свойствами, соответствуют предъявляемым критериям пригодности и являются перспективными для использования в составе комбинированной закваски для производства пробиотической сметаны.

На следующем этапе было изучено влияние различных доз селенита натрия на биосинтез экзополисахаридов пробиотическими микроорганизмами. Результаты исследований представлены в таблице 2 и на рисунке 1.

Таблица 2 – Влияние доз селенита натрия на синтез экзополисахаридов микроорганизмами

Объект исследования		Концентрация селенита натрия, мкг/см <sup>3</sup>			
		0	10	30	50
<i>P. shermanii</i> AC-2503	КОЕ/см <sup>3</sup>	6·10 <sup>1</sup> <sub>2</sub>	2·10 <sup>1</sup> <sub>2</sub>	2·10 <sup>1</sup> <sub>1</sub>	8·10 <sup>1</sup> <sub>1</sub>
	ЭПС, мкг/см <sup>3</sup>	30,2	33,6	36,9	38,6
<i>B. bifidum</i> 8 <sub>3</sub>	КОЕ/см <sup>3</sup>	4·10 <sup>1</sup> <sub>1</sub>	2·10 <sup>1</sup> <sub>1</sub>	8·10 <sup>1</sup> <sub>0</sub>	1·10 <sup>1</sup> <sub>0</sub>
	ЭПС, мкг/см <sup>3</sup>	7,8	10,3	13,3	14,5
<i>L. cremoris</i> 24 <sub>4</sub>	КОЕ/см <sup>3</sup>	1·10 <sup>1</sup> <sub>2</sub>	6·10 <sup>1</sup> <sub>1</sub>	3·10 <sup>1</sup> <sub>1</sub>	3·10 <sup>1</sup> <sub>0</sub>
	ЭПС, мкг/см <sup>3</sup>	23,8	25,7	29,4	30,6

Как видно из представленных данных (табл. 2), добавление селенита натрия в питательную среду стимулирует синтез экзополисахаридов. Наибольший прирост экзополисахаридов наблюдается в интервале концентраций селенита натрия от 10 до 30 мкг/см<sup>3</sup>. Дальнейшее увеличение концентрации селенита не приводит к существенному повышению экзополисахаридов.

3d International Scientific-Practical Conference  
on the Humanities and the Natural Science 2015

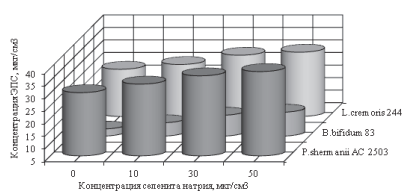


Рисунок 1 – Влияние селенита натрия на биосинтез экзополисахаридов

Установлена корреляционная зависимость между содержанием селенита натрия в питательной среде и концентрацией экзополисахаридов для исследуемых штаммов:

$$P. shermanii AC-2503 \quad Y_2 = -0,003098 \cdot x^2 + 0,31 \cdot x + 30,385 \quad (1)$$

$$B. bifidum 83 \quad Y_1 = -0,00256 \cdot x^2 + 0,26 \cdot x + 7,8 \quad (2)$$

$$L. cremoris 244 \quad Y_2 = -0,002277 \cdot x^2 + 0,25 \cdot x + 23,657 \quad (3)$$

Интересным является тот факт, что повышение концентрации селенита натрия в питательной среде не приводит к задержке роста микроорганизмов, и количество жизнеспособных клеток в конце культивирования составляет ( $10^{10}$ - $10^{11}$ ) КОЕ/см<sup>3</sup> (табл. 2). Это свидетельствует о высокой устойчивости микроорганизмов к селениту натрия. Устойчивость бактерий к селену может быть обусловлена наличием ассоциированных с клетками полисахаридов, препятствующих проникновению селена в клетки, которые затем высвобождаются в среду. Из литературных источников известно о защитных биологических функциях синтезируемых микроорганизмами экзополисахаридов, которые играют главную защитную роль, поскольку действуют гораздо быстрее по сравнению с индуцибельными системами защиты связей [19-21].

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований установлены условия культивирования бифидо-, лакто- и пропионовокислых бактерий с учетом их способности к синтезу экзополисахаридов.

**Выводы.**

1. Подобраны штаммы пробиотических микроорганизмов – Bifidobacterium Bifidum 83, Lactococcus lactis

### 3d International Scientific-Practical Conference on the Humanities and the Natural Science 2015

subspecies *Cremonis* 24, *Propionibacterium Shermanii* AC-2503, обладающие выраженной способностью к синтезу экзополисахаридов.

2. Установлено, что с увеличением концентрации селенита натрия повышается концентрация экзополисахаридов, которые являются факторами адаптации пробиотических микроорганизмов.

3. Выбрана оптимальная доза внесения селенита натрия, обеспечивающая высокое количество экзополисахаридов и активный рост пробиотических микроорганизмов.

#### References:

- [1] Borisova G.V. Starter cultures for fermented milk products: classification, characteristics, quality / G.V. Borisova, E.V. Ozhiganova, T.P. Burykina // Dairy, 2008. № 6. P. 73-74.
- [2] Botina S.G. The use of lactic acid bacteria strains synthesizing exopolysaccharides in the production of fermented foods / S.G. Botina, I.V. Rozhkova, V.F. Semenikhina // Storage and processing of agricultural, 2010. № 1. P. 38-40.
- [3] Botina S.G. Streptococcus thermophilus strain producing exopolysaccharides / S.G. Botina, I.V. Rozhkova, V.F. Semenikhina // Storage and processing of agricultural, 2010. № 2. P. 33-35.
- [4] Golod N.A. Adaptation of lactic acid bacteria to the adverse conditions for the growth / N.A. Golod, N.G. Loiko, A.L. Mulyukin, A.L. Neymatov, L.I. Vorobieva, N.E. Suzina, E.F. Shanenko, E.F. Galchenko, G.I. El-Registan // Microbiology, 2009. № 3. T. 78. P. 317-327.
- [5] Laan H. Konings W.N. Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* ssp. *cremonis* Wg2 // Appl. Environ. Microbiol. 1989. 55:3101-3106.
- [6] Desjardins M.L., Roy D., Toupin C. Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium* ssp. // J. Dairy Sci. 1990. 73:1478-1484.
- [7] Klaver F.A.M., Kingma F., Weerkamp A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk // Neth. Milk Dairy J. 1993. 47:151-164.
- [8] Poch M., Bezkorovainy A. Growth-enhancing supplements for various subspecies of the genus *Bifidobacterium* // J. Dairy Sci. 1988. 71:2114-3221.

**3d International Scientific-Practical Conference  
on the Humanities and the Natural Science 2015**

- [9] Tomas T.D., Pritchard G.G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures // *FEMS Microbiol. Rev.* 1987. 46:245-268.
- [10] Pirog T.P. Energy and biological aspects of the intensification of the synthesis of exopolysaccharides *Acinetobacter* sp. in a mixture of ethanol and glucose / T.P. Pirog, M.A. Kovalenko, Y.V. Kuzminskay // *Microbiology*, 2003. T. 72. № 3. P. 348-355.
- [11] Pirog T.P. Influence of the method of preparation of seed on the synthesis of exopolysaccharide etapolan / T.P. Pirog, Y.V. Korzh, N.V. Laschuk // *Biotechnology*, 2005. № 5. P. 32-42.
- [12] Semenikhina V.F. The nutrient medium for the biomass of bifidobacteria / V.F. Semenikhina, I.A. Yarkina // *Dairy*, 2003. № 10. P. 26-27.
- [13] Khamagaeva I.S. Influence of sodium selenite on the metabolism and probiotic microorganisms / I.S. Khamagaeva, O.S. Kuznetsova // *Dairy*, 2010. № 2. P. 74.
- [14] [14] Andreoni V. Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species / V. Andreoni, Moro Luischi, M. Moro, L.Cavalca, D. Erba, S.Ciappelano // *Annals of Microbiology*, 2000. № 50. P. 77-88.
- [15] Development of technology for meat products of a functional purpose for the prevention scarcity selen / N.N. Sleptsova, I.S. Khamagaeva, I.V. Khamaganova // *Engineering and technology of food production. Kemerovo: Univ KemTIIP*, 2010. № 2. P. 21-25.
- [16] Khamagaeva I.S. Scientific bases of biotechnology of dairy products for children and dietary: monograph. - Ulan-Ude. 2005. 279 p.
- [17] Nevo A.S., Pshenichnikova A.B., Ckladnev D.A., Shvets V.I. Influence deuteromethanol and deuterium oxide on growth performance and biosynthesis of exopolysaccharide obligate methylotrophic bacteria // *Biotechnology*, 2003. № 6. P. 38-46.
- [18] GOST 51331-99. Yoghurts. General specifications.
- [19] Sutherland I.W. Bacterial exopolysaccharides // *Adv. Microbiol. Physiol.* 1972. № 8.
- [20] Welman A.D. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria perspectives and challenges / A.D. Welman, I.S. Maddox // *Trends Biotechnology*, 2003. № 21.
- [21] Cernining J. Production of the exocellular polysaccharides by lactic acid bacteria and propionibacteria // *Lait*. 1995. № 75.