

MPNТИ: 34.27.19:62.09.39: 65.09.39

Г.К. АБИТАЕВА^{1*}, З.С. САРМУРЗИНА¹, Г.Н. БИСЕНОВА¹,
Б.К. МУСАБАЕВА¹, Т.Ч. ТУЛТАБАЕВА²

¹Республиканская коллекция микроорганизмов, Астана, Казахстан

²Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Астана, Казахстан

*e-mail: gulyaim_as@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ПРОБИОТИКОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НАПИТКОВ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11

Аннотация

Объекты исследования – молочнокислые бактерии (МКБ), выделенные из биологических образцов, и коллекционные штаммы МКБ.

Цель – характеристика штаммов пробиотиков для разработки напитков профилактического назначения.

В процессе работы проведен скрининг пробиотически активных штаммов МКБ, в результате которого отобрано 17 наиболее активных культур, среди которых 13 коллекционных штаммов из Биобанка промышленных микроорганизмов Республиканской коллекции микроорганизмов и 4 лабораторных изолята. Изучен пробиотический потенциал бактерий: продукция молочной кислоты, антагонизм к условно-патогенным микроорганизмам, адгезивные свойства, устойчивость к неблагоприятным условиям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Идентификация с использованием системы Bruker MALDI-TOF Biotyper позволила отнести изоляты к следующим видам: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

В результате проведенных исследований созданы консорциумы стартерных культур из штаммов *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus plantarum* 1A, *Lactobacillus plantarum* 17 A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 и отобран оптимальный вариант, соответствующий основным технологическим характеристикам с учетом биосовместимости штаммов для включения в состав разрабатываемого напитка профилактического назначения.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, штамм, пробиотик, антагонизм, адгезия.

На сегодняшний день одним из основных направлений в области здорового питания является создание инновационных технологий приготовления продуктов (напитков) профилактического значения, обогащенных минеральными веществами и витаминами, пробиотиками и пребиотиками [1]. Они различаются разнообразным составом, однако ассортимент основан на целенаправленном использовании молока и сырья немолочного происхождения, придающего новым продуктам белковую, липидную, углеводную, витаминную или минеральную направленность [2]. Рынок молочной продукции расширяется появлением новых функциональных продуктов таких как, биомолоко, биокефир, биойогурты, которые представляют собой продукты ферментации молока молочнокислыми бактериями. Пробиотические бактерии, которые обычно используют в ферментированных напитках, это - *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Bifidobacterium* sp. [3]. При разработке комбинированных молочных продуктов уделяется внимание регулированию аминокислотного, жирнокислотного, минерального и витаминного состава, а также приданию продуктам лечебно-профилактических свойств за счет включения в их состав биологически активных веществ и пищевых добавок натурального происхождения.

Анализ научной литературы, патентов по данной научной проблеме свидетельствует о том, что разработка различных рецептов и технологий приготовления лечебно-профилактических продуктов (напитков) с использованием пробиотиков, является

актуальным направлением, которые на рынке приобретают все большую популярность среди потребителей, являясь источником многих необходимых для человека веществ [4-7].

К пробиотическим производственным штаммам предъявляется ряд требований, среди которых: наличие антагонистических свойств по отношению к клиническим и тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, устойчивость к действию секретов желудочно-кишечного тракта и др. С этой целью актуализируется задача по характеристике штаммов пробиотиков для включения в состав напитков профилактического назначения.

Материалы и методы

Выделение чистой культуры

В целях изолирования молочнокислых бактерий из различных традиционных продуктов домашнего приготовления (казы, сметана, иримшик, масло, айран, кумыс, балык) был использован метод, описанный в работе E. Nagyzbekkyzy [8]. Для культивирования МКБ использовали специализированные среды MRS фирмы HiMedia с инкубацией при 37 °C в течение двух суток в микроаэрофильных условиях в термостате (redLINE RI-53, Германия).

Идентификацию изолятов проводили с использованием системы Bruker MALDI-TOF Biotyper. Образцы для MALDI-TOF MS готовили следующим образом: проводили прямой перенос свежей единичной колонии на полированную стальную мишень MSP 96 (Bruker Daltonik), подсушивали. Покрывали 1 мл насыщенного раствора α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix solution в 50% ацетонитриле-2.5% трифторуксусной кислоты (Bruker Daltonik) и высушивали при комнатной температуре [9].

Исследование антагонистической активности методом диффузии в агар.

Готовили суспензию клеток суточных культур МКБ в количестве 1мл/1мл (по стандарту бактериальной мутности) и наносили на поверхность питательной среды в чашки Петри (можно вносить в расплавленную и остуженную среду 0,1 мл суспензии МКБ, перемешивать и разливать в чашки Петри). Далее вырезали лунки с верхом диаметром 10 мм и заполняли их культурами тест-штаммов (0,1 мл). Через сутки измеряли диаметр зоны подавления роста бактерий [10].

Исследование кислотообразующей активности по методу Тернера [11].

Кислотообразующую активность молочнокислых бактерий и консорциумов определяли методом Тернера, перед посевом обязательно проводили определение кислотности молока.

Исследование адгезии к эритроцитам.

Адгезивность штаммов изучали в системе *in vitro* на формализированных эритроцитах человека 0 (1) (Rh+) по методике В. Брилиса. Производили подсчет не менее 100 эритроцитов в не менее чем в 5 полях зрения. Определяли средний показатель адгезии (СПА), коэффициент адгезии. СПА определяли по среднему числу микробов, прикрепившихся к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов. Адгезивность считают нулевой при СПА от 0 до 1,0, низкой – 1,01-2,0, средней – 2,01-4,01, высокой – свыше 4,0. Из общего числа учитываемых эритроцитов вычисляли процент эритроцитов [12].

Определение устойчивости к действию желчи.

Устойчивость изучаемых штаммов к желчи определяли путем внесения суточной культуры в бульонную среду МРС, содержащей 0,3% и 0,5% бычьей желчи. Бактериальный рост анализировали путем подсчета жизнеспособных колоний после 0, 2 и 4 часов культивирования в агаризованной среде при 37 °C в течение 48 часов. Значения pH были приведены до 8,0 в соответствии с экспериментальными протоколами, разработанными для лактобацилл. Фактически pH желчи и поджелудочного сока, выделяемого в кишечник, составляет примерно 8,0 [13].

Определение устойчивости к последовательному действию кислоты и желчи.

Имитацию транзита по ЖКТ проводили по методике Haller [14]. Культуры вначале инкубировали при pH 2,0-3,0 в физиологическом растворе в течение 1-2 ч, затем помещали в 1 % желчный бульон. Начальная концентрация культуры микроорганизма должна составлять 10^7 КОЕ/мл

Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием среднего показателя, квадратичного отклонения средней, ошибки средней, коэффициента Стьюдента, уровень доверительного интервала p . Использовалась программа «Statis». Результаты считались достоверными, если вероятность ноль-гипотезы не превышала 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Из биологических образцов выделено 10 изолятов, имеющих морфологически характерные для молочнокислых бактерий признаки, а именно однородные колонии белого или беловато-молочного цвета с ровными краями и выпуклой поверхностью, с кисломолочным запахом. После оценки титра жизнеспособности (не менее 10^7 - 10^9) КОЕ/мл для дальнейшей работы взято 4 отобранных изолята и 13 коллекционных штаммов МКБ рода *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Pediococcus* (таблица 1). Идентификация с использованием системы Bruker MALDI-TOF Biotyper позволила отнести 4 отобранных изолята к следующим видам: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

Таким образом, количество исследуемых нами объектов составляет 17 МКБ, как выделенных, так и коллекционных штаммов.

Таблица 1 – Коллекционные штаммы МКБ из РКМ и выделенные из биологических образцов

Наименование штамма	Источник
<i>Lactobacillus sakei</i> 24 A B-RKM 0559	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0357	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0670	B-RKM
<i>Lactobacillus casei</i> 15 LB B-RKM 0549	B-RKM
<i>Lactobacillus fermentum</i> 9 LB B-RKM0607	B-RKM
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	B-RKM
<i>Lactobacillus brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0024	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0019	B-RKM
<i>L. plantarum</i> 17A	лабораторный изолят
<i>L. plantarum</i> 4 A	лабораторный изолят
<i>L. casei</i> Y1	лабораторный изолят
<i>L. paracasei</i> 2A	лабораторный изолят

Примечание: B-RKM - Биобанк промышленных микроорганизмов Республиканской коллекции микроорганизмов

Изучение антимикробной активности.

Одним из важных факторов при скрининге на пробиотических препаратов является антагонизм к различным патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

В наших исследованиях антагонистическая активность изучалась к таким тест-штаммам, как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* из Биобанка промышленных микроорганизмов РКМ.

Результаты антагонистической активности исследуемых объектов представлены в таблице 2, низкая активность – 1,0-4,9 мм, средняя – 5,0-8,9, высокая - более 9 мм. В группу неактивных вошли культуры, не подавляющие тест-штаммы.

Большинство отобранных культур показало среднее значение антагонистической активности к патогенам *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae*: диаметр зон подавления роста не превышала 9 мм. Высокую степень антагонизма проявили лишь культуры В-РКМ 0149 (11,33±0,18 мм) – к *Streptococcus pyogenes* и (11,2±0,3мм) – к *Klebsiella pneumoniae*. Штамм 2 А (12,33±0,58 мм и 11,33±0,4 мм, соответственно).

Таблица 2 – Диаметр зоны ингибирования (мм), обусловленной антимикробной активностью штаммов МКБ в отношении тест-штаммов

Штамм МКБ	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Kl. pneumoniae</i>	<i>Str. pyogenes</i>
<i>L. sakei</i> 24 А В-РКМ 0559	6,0±1*	7,7±0,57	2,4±0,3	7,8±0,3	6,8±0,5
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0149	10,1±0,53	10,0±1*	10,4±0,2	11,2±0,3	11,33±0,18
<i>L. pentosus</i> 14 LB В-РКМ 0604	6,4±0,3	6,8±0,4	3,2±0,7	5,4±0,6	5,6±0,2
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0357	7,1±0,4	5,4±0,6	0	7,3±0,4	7,8±0,6
<i>L. plantarum</i> В-РКМ 0670	8,1±0,3	6,5±0,2	2,0±0,3	6,0±0,2	6,8±0,6
<i>L. casei</i> 15 LB В-РКМ 0549	9,1±1,0*	6,4±0,3	3,3±1*	7,7±0,9	8,8±0,2
<i>L. fermentum</i> 9 LB В-РКМ 0607	6,1±0,2	7,1±0,2	0	6,8±0,5	7,1±0,8
<i>P.pentosaceus</i> 22 LB В-РКМ 0598	3,0±0	6,0±1*	3,3±0,6	5,4±0,7	6,9±0,5
<i>L.brevis</i> 4 LB В-РКМ 0610	3,8±0,4	6,6±0,6	0	6,4±0,3	7,8±0,7
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0024	8,1±0,2	5,8±1*	2,9±0,4	8,8±0,6	8,5±0,3
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0149	7,4±0,6	6,9±0,4	2,4±0,7	7,9±0,2	8,7±0,5
<i>L.plantarum</i> 5LB В-РКМ 0547	4,6±0,7	7,4±0,2	0	6,2±0,4	6,7±0,1
<i>L.plantarum</i> В-РКМ 0019	6,7±0,2	5,9±0,6	0	8,4±0,6	8,1±0,4
<i>L.plantarum</i> 17А	8,1±0,9	9,9±0,57	11,1±0,4	9,4±0,2	8,5±0,5
<i>L.plantarum</i> 4 А	12±1,0*	14,5±0,2	7,3±0,3	8,4±0,2	7,9±0,7
<i>L. casei</i> Y1	14,6±0,4	11,5±0,3	9,8±0,6	7,4±0,2	8,4±0,5
<i>L. paracasei</i> 2А	11±0,3	15,5±0,5	12,0±1	11,33±0,4	12,33±0,58

Примечание: * p<0,001; ** p<0,01; *** p<0,02; **** p<0,05

Зоны ингибирования: 0 мм - нулевая активность; 1,0-4,9 мм - низкая активность; 5,0-8,9 мм - средняя; ≥ 9 мм - высокая

По отношению к *Staphylococcus aureus* показатели антагонизма были выше среднего у четырех культур *Lc.lactis* В-РКМ 0149 (10,0±1 мм), штамм 17А (14,5±0,2 мм), штамм Y1 (11,5±0,3мм) и штамм 2 А (15,5±0,5мм).

Наименьшие показатели антагонистической активности у всех культур были отмечены к тест-штамму *C. albicans*, а у *Lc.lactis* В-РКМ 0357, *L. fermentum* 9 LB В-РКМ 060, *L.brevis* 4 LB В-РКМ 0610, *L. plantarum* 5LB В-РКМ 0547 и *L. plantarum* В-РКМ 0019 она полностью отсутствовала (=0). Лишь четыре культуры: изолят 2 А, изолят Y1, *Lc. lactis* В-РКМ 0149 и штамм 17А подавляли рост данного тест-штамма с активностью выше средней.

К *Escherichia coli* высокие показатели антагонистической активности показали *Lc. lactis* В-РКМ 0149 (10,1±0,53 мм), *L. casei* 15 LB В-РКМ 0549 (9,1±1,0 мм), штамм 4 А (12±1,0 мм), штамм Y1 (14,6±0,4 мм) и штамм 2 А (11±0,3 мм). Низкая активность зарегистрирована у *P. pentosaceus* 22 LB В-РКМ 0598, *L.brevis* 4 LB В-РКМ 0610, *L. plantarum* 5LB В-РКМ 0547 (3,0±0 мм, 3,8±0,4мм и 4,6±0,7 мм, соответственно).

Таким образом, высокой антагонистической активностью в отношении всех испытанных тест-культур обладают культуры: *Lc.lactis* В-РКМ 0149, штамм 17А, штамм 4 А, штамм Y1 и штамм 2 А. Слабыми антагонистами являются *P. pentosaceus* 22 LB В-РКМ

0598, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610. К тест-штамму *Candida albicans* у ряда культур антагонистическая активность не была выявлена.

Исследование кислотообразующей активности.

Одним из наиболее известных биологических свойств молочнокислых бактерий является способность продуцировать молочную кислоту.

Неактивными считаются штаммы, титруемая кислотность которых колеблется в пределах 20-80° Т, а те штаммы, у которых этот показатель выше 120°Т, считаются высокоактивными. В приведенной ниже таблице 3 отображены показатели кислотообразующей активности исследуемых штаммов.

Полученные данные свидетельствуют о хорошей кислотообразующей способности большинства штаммов. Этот параметр отмечен у штаммов *Lactococcus lactis* B-RKM 0357, *Lactobacillus plantarum* B-RKM 0019, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus plantarum* 17A, *Lactobacillus plantarum* 4 A.

Таблица 3 – Воздействие бычьей желчи на рост МКБ

Наименование штамма	Кислотообразование в молоке, °Т	Концентрация бычьей желчи (%)		Средний показатель адгезии (СПА)
		0,3	0,5	
<i>L. sakei</i> 24 A B-RKM 0559	73	++	++	3,8 ± 1,7**
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	119	+	+	3,5 ± 1,6
<i>L. pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	71	-	-	2,7 ± 1,08
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0357	125	++	+	3,5 ± 1,6
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0670	123	-	-	2,1 ± 1,08
<i>L. casei</i> 15 LB B-RKM 0549	58	-	-	2,2 ± 1,0
<i>L. fermentum</i> 9 LB B- RKM0607	40	-	-	2,4 ± 1,0
<i>P.pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	55	-	-	0,4 ± 0,23
<i>L.brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	115	+	+	1,9 ± 0,9
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0024	33	++	+	3,2 ± 1,4
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	127	+	+	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	51	-	-	3,0 ± 1,1
<i>L.plantarum</i> B-RKM 0019	120	-	-	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 17A	126	++	++	4,0 ± 1,98**
<i>L.plantarum</i> 4 A	128	+	-	5,8 ± 2,21***
<i>L. casei</i> Y1	145	++	++	6,6 ± 2,38***
<i>L. paracasei</i> 2A	130	++	++	4,8 ± 1,0

Примечание: ++ рост хороший; + видимый рост; - отсутствие роста

* p<0,001; ** p<0,01; *** p<0,02; **** p<0,05

СПА: 0-1,0 - нет активности; 1,0-2,0 - Слабый; 2,01-4,01 - Умеренный; ≥ 4,0 -высокий.

Изучение адгезивной активности.

В связи с тем, что защитные функции лактобацилл реализуются благодаря адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам кишечника, конкуренции за рецепторы связывания, блокады адгезии и колонизации слизистых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, была исследована адгезивная способность лактобактерий.

Исследование адгезивности штаммов проводилось *in vitro* на формализированных эритроцитах человека 0 (1) (Rh+) по методике В. Брилиса. Показано, что все коллекционные штаммы проявляют адгезивную активность, 11 штаммов обладают средней степенью адгезии, 1 штамм проявил слабую степень СПА, 1 штамм не обладает данным свойством. Выявлено, что культуры МКБ, выделенные из биологических образцов, обладают способностью к адгезии в высокой степени. Значения показателей адгезии представлены в таблице 3.

Устойчивость культур к пробам, имитирующим транзит по желудочно-кишечному тракту.

Коллекционные культуры в количестве 13 штаммов были исследованы на устойчивость к воздействию бычьей желчи концентрациях 0,3% и 0,5%, 6 из которых были способны расти в присутствии желчи в исследуемых концентрациях. 4 выделенные культуры бактерий не подавляются желчью и способны расти во всех концентрациях (таблица 3). Таким образом установлено, что 10 культур МКБ проявляют активность в отношении двух концентраций желчи, что является основанием при выборе пробиотически активных культур.

Имитацию транзита по ЖКТ проводили по методике Haller и соавт. (2001). Устойчивость к действию кислоты обнаружена у 13 лактобацилл с титром жизнеспособных клеток от 10^4 до 10^8 КОЕ/мл. Основную массу составляют культуры с показателем ЖСП – 10^7 - 10^8 КОЕ/мл.

Полученные результаты устойчивости лабораторных изолятов к стресс-факторам *in vitro* указывают на способность штаммов лактобацилл к выживанию при неблагоприятных для них условиях в верхних отделах ЖКТ.

Технологическая характеристика молочнокислых штаммов.

Далее нами были получены консорциумы на основе двух и более молочнокислых бактерий. Для составления комбинаций были отобраны следующие виды лактобактерий: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 и 2 культуры *Lactobacillus plantarum* (17A, 4A).

В таблице 4 отмечены основные показатели, характеризующие изучаемые штаммы: органолептические свойства, консистенция, активность свертывания, кислотообразование.

Следуя полученным данным, в качестве стартерных культур для разработки кисломолочного продукта отобраны культуры, которые соответствуют основным параметрам. Кроме того, несмотря на слабые характеристики в процессе ферментации молока, а именно активность образования сгустка и кислотообразование, в работу был взят штамм *Lactobacillus brevis*, так как штамм имеет научно-производственный задел [8].

При составлении консорциумов отобраны штаммы, обладающие антагонистической способностью, адгезивной активностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам желудочно-кишечного тракта.

Таблица 4 - Основные показатели активности и энергии кислотообразования

Культуры	Текстуральные свойства конечного продукта	Органолептические свойства сгустков	Сквашивание (ч)	pH	Кислот. активность
<i>L. casei</i> Y1	скашивание отличное, консистенция однородная, вязкость хорошая, вкус кисломолочный	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный	3,5-4	6,4	66°
<i>L. paracasei</i> 2A	скашивание хорошее, консистенция густая, вязкость средняя, вкус кисломолочный	Цвет молочный, вкус со вкусом кефира	4-4,45	6,5	75°
<i>L. brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	Скашивание слабое, полужидкая консистенция	Цвет белый, запах молочный, вкус слегка кисловатый	14	5,0	102°
<i>L. plantarum</i> 4A	Скашивание хорошее, слабая вязкость, густая консистенция	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный	5	6,0	68°
<i>L. plantarum</i> 17A	Скашивание хорошее, вязкость средняя, однородная сметанообразная консистенция	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный	6	6,4	66°

При создании комбинаций учитывали биосовместимость штаммов, входящих в консорциум. Оценку биосовместимости проводили путем совместного культивирования на плотной агаровой среде методом перпендикулярных штрихов. О совместимости штаммов судили по равномерному росту и отсутствию зон задержки роста.

При первичном отборе составлены следующие комбинации биосовместимых штаммов молочнокислых бактерий: Вариант 1: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; Вариант 2: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; *Lactobacillus paracasei* Y2; Вариант 3: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2 A; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 4A; Вариант 4: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* A2; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 17A.

Для устойчивого состояния штаммов применяли метод непрерывного культивирования. С этой целью в стерильные пробирки с обезжиренным молоком вносили по 100 мкл каждой культуры в ассоциациях. Затем пробирки помещали в термостат при температуре 37° и через каждые 12 часов культуры пересеивали в свежее молоко. После каждого отрезка культивирования снимали такие параметры как кислотообразование и органолептика. Путем микроскопирования проводили микробиологический контроль и подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Непрерывное культивирование продолжали до получения постоянного соотношения микроорганизмов, входящих в состав консорциумов.

Таким образом, на основе визуальной оценки биосовместимости и экспериментальном подборе соотношения культур, были составлены несколько вариантов (таблица 5).

Таблица 5 – Характеристики полученных продуктов, полученные в процессе ферментации молока предложенными вариантами консорциумов

Варианты комбинаций	Текстуральные свойства конечного продукта	Органолептические свойства сгустков	Активность сквашивания (ч)	pH	Кислотообразование по Тернору°	КОЕ/мл
Вариант 1	Сквашивание хорошее, консистенция однородная, вязкость хорошая	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный с приятным привкусом	4,5	3,6	70	2,8x10 ⁸
Вариант 2	Сквашивание хорошее, вязкость хорошая, плотная консистенция однородная	Цвет молочный, вкус приятный кисломолочный	3,5	4,0	76	4x10 ⁹
Вариант 3	Сквашивание хорошее, консистенция однородная, вязкость удовлетворительная	Цвет молочный белый, вкус кислый	5,0	4,0	81	2x10 ⁸
Вариант 4	Сквашивание хорошее, вязкость средняя, консистенция густая	Цвет молочный, вкус кислый	5,0	4,0	107	6x10 ⁸

В результате исследований отобран вариант 2, в состав которого входят *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A. Данный консорциум соответствует требуемым параметрам технологических характеристик, а именно: имеет текстуральные свойства конечного продукта в виде хорошего сквашивания

и вязкости, плотной и однородной консистенции, проявляет соответствующие органолептические свойства: молочный цвет, чистый кисломолочный вкус с приятным привкусом, активность сквашивания -3,5 часов, кислотообразование по Тернеру- 90 °Т, титр пробиотических клеток - 4×10^9 КОЕ/мл.

Заключение

Штаммы молочнокислых бактерий изучены на наличие пробиотических свойств и соответствие основным технологическим характеристикам (органолептические свойства, консистенция, активность свертывания, кислотообразование) в качестве стартерных культур консорциума для разработки кисломолочного продукта. На их основе созданы 4 комбинации консорциумов стартерных культур с учетом биосовместимости штаммов. Отобран оптимальный вариант, консорциум *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A, соответствующий основным технологическим характеристикам с учетом биосовместимости штаммов для включения в состав разрабатываемого напитка профилактического назначения.

Финансирование

Настоящее исследование финансируется Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (грант № BR10764998).

Литература:

- 1 Kumar D., Lal M. K. Dutt S., Raigond P., Sudhakar S. et al. Functional Fermented Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics from Non-Dairy Products: A Perspective from Nutraceutical / Mol. Nutr. Food Res. 2022, 66: 2101059 (doi.org/10.1002/mnfr.202101059)
- 2 Guimarães J.T., Silva E.K., Ranadheera C.S. Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage / Ultrason Sonochem. – 2019, 55:157-164 (doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.02.025.)
- 3 A Yelnetty and M Tamasoleng The addition of Yam Tuber (*Dioscorea alata*) flour as a source of prebiotic on biomilk synbiotic characteristics / IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2019, 247:1-6. (doi.org/10.1088/1755-1315/247/1/012052)
- 4 Balthazar C. F., Guimarães J. F. et. al The future of functional food: emerging technologies application on prebiotics, probiotics and postbiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:2560–2586 (doi.org/10.1111/1541-4337.12962)
- 5 Panesar P.S., Anal A.K., Kaur R. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Opportunities, Health Benefits and Industrial Challenges / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 1-13. (doi.org/10.1002/9781119702160.ch1)
- 6 de la Rosa O., Flores-Gallegos A.C., Ascacio-Valdés J.A., Sepúlveda L., Montañez J.C., Aguilar C.N. Fructooligosaccharides as Prebiotics, their Metabolism, and Health Benefits / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 307-337 (doi.org/10.1002/9781119702160.ch13)
- 7 Grujović M. Ž., Mladenović K. G., Semedo-Lemsaddek T., Laranjo, M., Stefanović O. D., Kocić-Tanackov S. D. Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:1537–1567 (doi.org/10.1111/1541-4337.12897)
- 8 Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Li K., Shaikhin S, Saduakhassova S, Kushugulova A, Marotta F. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods / Asian J. Applied Sci. – 2016, 9(143-158) (doi: 10.3923/ajaps.2016.143.158)
- 9 Schulthess B., Bloembergen G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory / Journal of clinical microbiology. 2014, 52(1089-1097)
- 10 Sarmurzhina Z., Bissenova G., Zakarya K. et al. Characterization of probiotic strains of lactobacillus candidates for development of synbiotic product for kazakh population / Journal of Pure and Applied Microbiology, 2017, 11(151–161) (doi.10.22207/JPAM.11.1.20)
- 11 General pharmacopoeial article «Determination of the specific activity of probiotics: OFS. 1.7.2.0009.15». - [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIIIth ed.]. - T. II. -P. 24. (in Russ.).

12 Brilis, V.I., Brilene, T.A., Lentsner, K.P., Lentsner, A.A. Method of studying the adhesive process of microorganisms / Laboratornoe delo, 1986, 4(210–212).

13 Genci G., Trotta F., Galdini G. Ustoychivost' spor i vegetativnykh kletok *Bacillus clausii* k probam, imitiruyushchim tranzit po zheludochno-kishechnomu traktu / Zdorov'ye Ukrainy. – 2008, 19/1(57-59)

14 Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M.G., Scherenbacher, P., Bode, C. and Hammes, W.P. (2001) Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. Syst Appl Microbiol 24(218–226) (doi.org/10.1078/0723-2020-00023)

Г.К. АБИТАЕВА^{1*}, З.С. САРМУРЗИНА¹, Г.Н. БИСЕНОВА¹,
Б.К. МУСАБАЕВА¹, Т.Ч. ТУЛТАБАЕВА²

¹ Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы, Астана, Қазақстан

² С.Сейфуллин атындағы қазақ агротехникалық университеті, Астана, Қазақстан

*e-mail: gulyaim_as@mail.ru

ПРОФИЛАКТИКАЛЫҚ МАҚСАТТАҒЫ СУСЫНДАРДЫ ӘЗІРЛЕУГЕ АРНАЛҒАН ПРОБИОТИКАЛЫҚ ШТАММДАРДЫҢ СИПАТТАМАСЫ

Түйін

Зерттеу нысандары - биологиялық үлгілерден жаңа бөлініп алынған сүт қышқылы бактериялары (СҚБ) және коллекциялық СҚБ штамдары.

Мақсаты - профилактикалық сусындарды әзірлеу үшін пробиотикалық штаммдардың сипаттамасы

Жұмыс барысында пробиотикалық белсенді штаммдарға скрининг жүргізілді, нәтижесінде ең белсенді ретінде 17 дақыл таңдалды, олардың ішінде Республикалық микроорганизмдер коллекциясының өнеркәсіптік микроорганизмдер Биобанкінен 13 коллекциялық штамм және 4 зертханалық изолят. Пробиотикалық потенциал зерттелді, оның ішінде сүт қышқылының өндірісі, оппортунистік микроорганизмдерге антагонизм, жабысқақ қасиеттері, асқазан-ішек жолдарының қолайсыз жағдайларына төзімділігі. Bruker MALDI-TOF BIOTYPER жүйесін қолдана отырып сәйкестендіру изоляттарды келесі түрлерге жатқызуға мүмкіндік берді: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus plantarum* 1A, *Lactobacillus plantarum* 17 A, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610 штаммдарынан Стартер дақылдарының консорциумдары құрылды және штаммдардың биоүйлесімділігін ескере отырып, негізгі технологиялық сипаттамаларға сәйкес келетін оңтайлы нұсқа таңдалды. әзірленіп жатқан профилактикалық мақсаттағы сусынның құрамына енгізу.

Түйін сөздер: сүт қышқылы бактериялары, штамм, пробиотик, антагонизм, адгезия.

IRSTI: 34.27.19:62.09.39: 65.09.39

G.K. ABITAYEVA^{1*}, Z.S. SARMURZINA¹, G.N. BISSENOVA¹,
B.K. MUSSABAYEVA¹, T.Ch. TULTABAYEVA²

¹Republican collection of microorganisms, Astana, Kazakhstan

²Kazakh agro-technical university named after S.Seifullin, Astana, Kazakhstan

*e-mail: gulyaim_as@mail.ru

CHARACTERISTICS OF PROBIOTIC STRAINS FOR THE DEVELOPMENT OF PREVENTIVE DRINKS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11

Abstract

The objects of study are lactic acid bacteria (LAB) isolated from biological samples and collection strains of LAB

Purpose - characterization of probiotic strains for the development of preventive drinks

In the course of the work, screening of probiotically active strains was carried out, as a result of which 17 cultures were selected as the most active, among them 13 collection strains from the Biobank of Industrial Microorganisms of the Republican Collection of Microorganisms and 4 laboratory isolates. The probiotic potential was studied, among which, the production of lactic acid, antagonism to opportunistic microorganisms, adhesive properties, resistance to adverse conditions of the gastrointestinal tract. Identification using the Bruker MALDI-TOF Biotyper system allowed isolates to be assigned to the following species: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

As a result of the research, consortiums of starter cultures were created from strains of *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus plantarum* 1A, *Lactobacillus plantarum* 17 A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 and the optimal variant was selected that corresponds to the main technological characteristics, taking into account the biocompatibility of strains for inclusion in the composition of the drink for preventive purposes.

Keywords: lactic acid bacteria, strain, probiotic, antagonism, adhesion.

Today, one of the main directions in the field of healthy nutrition is the creation of innovative technologies for the preparation of products (drinks) of preventive value, enriched with minerals and vitamins, probiotics and prebiotics [1]. They differ in a variety of composition, but the range is based on the targeted use of milk and raw materials of non-dairy origin, which gives new products a protein, lipid, carbohydrate, vitamin or mineral focus [2]. The market for dairy products is expanding with the emergence of new functional products such as biomilk, biokefir, bioyogurt, which are products of milk fermentation by lactic acid bacteria. Probiotic bacteria that are commonly used in fermented drinks are *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium sp.* [3]. During development of combined dairy products, attention is paid to the regulation of amino acid, fatty acid, mineral and vitamin composition, as well as to giving the products therapeutic and prophylactic properties due to the inclusion of biologically active substances and food additives of natural origin in their composition.

An analysis of the research and patents on this scientific issue indicates that the development of various formulations and technologies for the preparation of therapeutic and prophylactic products (drinks) using probiotics is an important area that is becoming increasingly popular among consumers on the market, being a source of many necessary for human substances [4-7].

A number of requirements are imposed on probiotic production strains, among which the presence of antagonistic properties in relation to clinical and test strains of pathogenic and opportunistic microorganisms should be studied for resistance to the action of secrets of the gastrointestinal tract, etc. For this purpose, the task of characterizing probiotic strains is being updated for inclusion in preventive drinks.

Materials and methods

Isolation of culture

In order to isolate lactic acid bacteria from various traditional home-made products (kazy, homemade sour cream, irimshik, butter, ayran, koumiss, balyk) the method described in the work E. Nagyzbekkyzy was used [8]. For the cultivation of LAB, specialized MRS media (HiMedia) were used with incubation at 37°C for two days under microaerophilic conditions in a incubator (redLINE RI-53, Germany).

Isolates were identified using the Bruker MALDI-TOF Biotyper system. Samples for MALDI-TOF MS were prepared as follows: a fresh single colony was directly transferred to a polished MSP 96 steel target (Bruker Daltonik) and dried. Covered with 1 µl of a saturated solution of α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) matrix solution in 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid (Bruker Daltonik) and dried at room temperature [9].

Test of Antagonistic activity of LAB

A cell suspension of daily LAB cultures is prepared in an amount of 1 mld/1 ml (according to the standard of bacterial turbidity) and applied to the surface of the dish (0.1 ml of LAB suspension can be added to the molten and cooled medium, mixed and poured into a Petri dish). Next, wells with a top diameter of 10 mm are cut out and filled with cultures of test strains (0.1 ml). A day later, the diameter of the zone of absence of bacterial growth is measured [10].

Study of acid-forming activity according to the Turner method [11].

The acid-forming activity of lactic acid bacteria and consortia was determined by the Turner method; before sowing, it is imperative to determine the acidity of milk, since there may be some deviations.

Test of adhesion of LAB

The adhesiveness of the strains was studied on formalized human erythrocytes 0 (1) (Rh+) according to the method of V. Brilis [12]. At least 100 erythrocytes were counted in at least 5 fields of view. Determined the average adhesion index (AAI), adhesion coefficient. AAI was determined by the average number of microbes attached to the surface of one erythrocyte, counting all available erythrocytes in 5 fields of view, but not less than 50 erythrocytes. Adhesion is considered no activity at AAI from 0 to 1.0, low - 1.01-2.0, medium - 2.01-4.01, high - over 4.0. The percentage of erythrocytes was calculated from the total number of erythrocytes taken into account.

Bile Tolerance

The resistance of the studied strains to bile was determined by adding a daily culture to the MPC broth medium containing 0.3% and 0.5% bovine bile. Bacterial growth was analyzed by counting viable colonies after 0, 2 and 4 hours of cultivation in agar medium at 37°C for 48 hours. pH values were adjusted to 8.0 according to experimental protocols developed for lactobacilli. In fact, the pH of bile and pancreatic juice secreted into the intestine is approximately 8.0 [13].

Tolerance to sequential action of acid and bile

Simulation of transit through the gastrointestinal tract was performed according to the method of Haller et al. [14]. Cultures were first incubated at pH 2.0-3.0 in physiological saline for 1-2 hours, then placed in 1% bile broth. The initial concentration of the microorganism culture should be 10⁷ CFU/ml

Statistical processing of results

Experiments of this study were performed in triplicate and the results developed as mean ± standard deviation (M±SD). Statistical significance was assessed by Student's $\frac{1}{4}$ s *t* test. Results are considered significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

10 isolates with morphologically characteristic features of LAB were isolated, namely homogeneous colonies of white or whitish-milky color, with smooth edges and a convex surface, with a sour-milk smell. After determining the viability titer (not less than 10⁷-10⁹ CFU / ml), 4

isolates and 13 collection strains of LAB of the genus *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Pediococcus* were taken for further work (Table 1).

Identification using Bruker MALDI-TOF Biotyper identified 4 isolates to the species: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*. Thus, the number of studied objects is 17 strains of LAB, including newly isolated and collectible strains.

Table 1 - Collection strains of LAB from RCM and isolated from biological samples

Strain name	Source
<i>Lactobacillus sakei</i> 24 A B-RKM 0559	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0357	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0670	B-RKM
<i>Lactobacillus casei</i> 15 LB B-RKM 0549	B-RKM
<i>Lactobacillus fermentum</i> 9 LB B- RKM0607	B-RKM
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	B-RKM
<i>Lactobacillus brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0024	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0019	B-RKM
<i>L. plantarum</i> 17A	laboratory isolate
<i>L. plantarum</i> 4 A	laboratory isolate
<i>L. casei</i> Y1	laboratory isolate
<i>L. paracasei</i> 2A	laboratory isolate

Note: B-RKM - Biobank of Industrial Microorganisms of the Republican Collection of Microorganisms

Study of antimicrobial activity

One of the important factors in screening for probiotic preparations is antagonism to various pathogenic and opportunistic microorganisms.

In our studies, antagonistic activity was studied against test strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* from Biobank of Industrial Microorganisms of the RCM.

The results of the antagonistic activity are presented in Table 2. The inactive group included cultures that did not suppress test strains.

Most of the cultures showed an average value of antagonistic activity to pathogens *Streptococcus pyogenes* and *Klebsiella pneumoniae*: the width of growth inhibition zones did not exceed 9 mm. Only cultures of B-RKM 0149 (11.33 ± 0.18 mm) to *Streptococcus pyogenes* and (11.2 ± 0.3 mm) to *Klebsiella pneumoniae* showed a high degree of antagonism. Strain 2 A (12.33 ± 0.58 mm and 11.33 ± 0.4 mm, respectively).

Table 2 - Diameter of the inhibition zone (mm) caused antimicrobial activity of LAB strains against test strains microorganisms ($M \pm SD$)

Strain name	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Kl. pneumoniae</i> ,	<i>Str.s pyogenes</i>
1	2	3	4	5	6
<i>L. sakei</i> 24 A B-RKM 0559	$6,0 \pm 1^*$	$7,7 \pm 0,57$	$2,4 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,5$
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	$10,1 \pm 0,53$	$10,0 \pm 1^*$	$10,4 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,3$	$11,33 \pm 0,18$
<i>L. pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	$6,4 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,7$	$5,4 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,2$
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0357	$7,1 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,6$	0	$7,3 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,6$
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0670	$8,1 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,6$

Table 2 continuation

1	2	3	4	5	6
<i>L. casei</i> 15 LB B-RKM 0549	9,1±1,0*	6,4±0,3	3,3±1*	7,7±0,9	8,8±0,2
<i>L. fermentum</i> 9 LB B- RKM 0607	6,1±0,2	7,1±0,2	0	6,8±0,5	7,1±0,8
<i>P. pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	3,0±0	6,0±1*	3,3±0,6	5,4±0,7	6,9±0,5
<i>L. brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	3,8±0,4	6,6±0,6	0	6,4±0,3	7,8±0,7
<i>Lc. lactis</i> B-RKM 0024	8,1±0,2	5,8±1*	2,9±0,4	8,8±0,6	8,5±0,3
<i>Lc. lactis</i> B-RKM 0149	7,4±0,6	6,9±0,4	2,4±0,7	7,9±0,2	8,7±0,5
<i>L. plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	4,6±0,7	7,4±0,2	0	6,2±0,4	6,7±0,1
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0019	6,7±0,2	5,9±0,6	0	8,4±0,6	8,1±0,4
<i>L. plantarum</i> 17A	8,1±0,9	9,9±0,57	11,1±0,4	9,4±0,2	8,5±0,5
<i>L. plantarum</i> 4 A	12±1,0*	14,5±0,2	7,3±0,3	8,4±0,2	7,9±0,7
<i>L. casei</i> Y1	14,6±0,4	11,5±0,3	9,8±0,6	7,4±0,2	8,4±0,5
<i>L. paracasei</i> 2A	11±0,3	15,5±0,5	12,0±1	11,33±0,4	12,33±0,58

Note: * p<0,001; ** p<0,01; *** p<0,02; **** p<0,05

Inhibition zones: 0 mm - No activity; 1.0-4.9 mm - Weak; 5.0-8.9 mm - Moderate; ≥ 9 mm - Strong.

Antagonism indicators to *Staphylococcus aureus* were moderate in *Lc. lactis* B-RKM 0149 (10.0±1 mm), strain 17A (14.5±0.2 mm), strain Y1 (11.5±0.3 mm) and strain 2 A (15.5±0.5 mm).

The lowest indicators of antagonistic activity in all cultures were noted against *C. albicans*. For *Lc. lactis* B-RKM 0357, *L. fermentum* 9 LB B-RKM 060, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610, *L. plantarum* 5LB B-RKM 0547 and *L. plantarum* B-RKM 0019 it was completely no activity (=0). Only four cultures - isolate 2 A, isolate Y1, *Lc. lactis* B-RKM 0149 and strain 17A suppressed the growth of *C. albicans* with moderate activity.

To *Escherichia coli*, strong level of antagonistic activity were shown by *Lc. lactis* B-RKM 0149 (10.1±0.53 mm), *L. casei* 15 LB B-RKM 0549 (9.1±1.0 mm), strain 4 A (12±1.0 mm), strain Y1 (14.6±0.4 mm) and strain 2 A (11±0.3 mm). Low level activity was registered in *P. pentosaceus* 22 LB B-RKM 0598, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610, *L. plantarum* 5LB B-RKM 0547 (3.0±0 mm, 3.8±0.4 mm and 4, 6±0.7 mm, respectively).

Thus, in general, cultures have strong antagonistic activity: *Lc. lactis* B-RKM 0149, strain 17A, strain 4 A, strain Y1 and strain 2 A. Weak antagonists are *P. pentosaceus* 22 LB B-RKM 0598, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610. No antagonistic activity was detected against the *Candida albicans* test strain in a number of cultures.

Study of acid-forming activity

One of the best known biological properties of LAB is the ability to produce lactic acid.

Strains whose titratable acidity ranges from 20-80° T are considered inactive, and those with this indicator over 120° T are considered highly active. Table 3 below shows the indicators of the acid-forming activity of the studied strains.

The data obtained indicate a good acid-forming ability of most strains. This parameter was noted in the strains *Lactococcus lactis* B-RKM 0357, *Lactobacillus plantarum* B-RKM 0019, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus plantarum* 17A, *Lactobacillus plantarum* 4 A.

Table 3 - The impact of bovine bile on the growth of the LAB

Strain name	Acid-forming in milk, °T	Concentration of bovine bile (%)		Average adhesion index (AAI)
		0,3	0,5	
1	2	3	4	5
<i>L. sakei</i> 24 A B-RKM 0559	73	++	++	3,8 ± 1,7**
<i>Lc. lactis</i> B-RKM 0149	119	+	+	3,5 ± 1,6
<i>L. pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	71	-	-	2,7 ± 1,08

Table 3 continuation

1	2	3	4	5
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0357	125	++	+	3,5 ± 1,6
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0670	123	-	-	2,1 ± 1,08
<i>L. casei</i> 15 LB B-RKM 0549	58	-	-	2,2 ± 1,0
<i>L. fermentum</i> 9 LB B- RKM0607	40	-	-	2,4 ± 1,0
<i>P.pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	55	-	-	0,4 ± 0,23
<i>L.brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	115	+	+	1,9 ± 0,9
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0024	33	++	+	3,2 ± 1,4
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	127	+	+	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	51	-	-	3,0 ± 1,1
<i>L.plantarum</i> B-RKM 0019	120	-	-	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 17A	126	++	++	4,0 ± 1,98**
<i>L.plantarum</i> 4 A	128	+	-	5,8 ± 2,21***
<i>L. casei</i> Y1	145	++	++	6,6 ± 2,38***
<i>L. paracasei</i> 2A	130	++	++	4,8 ± 1,0

Note. ++ Good growth; + Visible growth; - No growth

AAI: 0-1.0 - No activity; 1.0-2.0 - Weak; 2.01-4.01 - Moderate; ≥ 4.0 - Strong. ($M \pm SD$)

Study of adhesive activity

The protective functions of lactobacilli are realized due to the adhesion of microorganisms to intestinal epithelial cells, competition for binding receptors and blockade of adhesion and colonization of mucous membranes by pathogenic and opportunistic microorganisms. Therefore, the adhesive ability of lactobacilli was investigated.

Test of the adhesiveness of strains was carried out on formalized human erythrocytes 0 (1) (Rh +) according to the method of V. Brilis. All collection strains showed the property of adhesion (table 3). 11 strains showed moderate degree, 1 strain showed a weak degree of AAI, 1 strain does not have this property. All newly isolated LAB cultures have a strong level of adhesion. The values of the adhesion index are presented in Table 3.

Tolerance of cultures to test samples simulating transit through the gastrointestinal tract

Collection cultures in the amount of 13 strains were tested for tolerance to bovine bile concentrations of 0.3% and 0.5%, 6 of them were able to grow in the presence of bile at the studied concentrations. 4 isolates are not inhibited by bile and are able to grow at all concentrations (Table 3). Thus, 10 LAB cultures are active against two concentrations of bile, which is the basis for choosing probiotic active cultures.

Simulation of transit through the gastrointestinal tract was performed according to the method of Haller et al. (2001). Acid resistance was found in 13 lactobacilli with viable cell titer from 10^4 to 10^8 CFU/ml. The bulk is made up of cultures with an indicator of GSP - 107-108 CFU / ml.

The obtained results of the tolerance of laboratory isolates to stress factors *in vitro* indicate the ability of strains of lactobacilli to survive under unfavorable conditions for them in the upper gastrointestinal tract.

Technological characteristics of LAB

We obtained consortiums based on two or more LAB. The following species of lactobacilli were selected for combinations: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 and 2 cultures of *Lactobacillus plantarum* (17A, 4A).

Table 4 shows the main indicators characterizing the studied strains: organoleptic properties, texture, coagulation activity, acid formation.

Following the data obtained, cultures that correspond to the main parameters were selected as starter cultures for the development of a fermented milk product. In addition, despite the weak characteristics in the process of milk fermentation, namely the activity of clot formation and acid formation, a strain of *Lactobacillus brevis* was taken into work, since the strain has a scientific and industrial foundation [8].

During the development of consortia, strains with antagonistic ability, adhesive activity and tolerance to adverse factors of the gastrointestinal tract were selected.

Table 4 - Main indicators of activity and acid formation

Strain name	Textual properties of the experimental product	Organoleptic properties of clots	Fermentation (h)	pH	Acid formation activity
<i>L. casei</i> Y1	Fermentation is excellent, the consistency is homogeneous, the viscosity is good, the taste is fermented	The color is milky, the taste is pure fermented milk	3,5-4	6,4	66°
<i>L. paracasei</i> 2A	Fermentation is good, the consistency is thick, the viscosity is medium, the taste is fermented milk	The color is milky, the taste is kefir-flavored	4-4,45	6,5	75°
<i>L. brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	Fermentation is weak, semi-liquid consistency	The color is white, the smell is milky, the taste is slightly sour	14	5,0	102°
<i>L. plantarum</i> 4A	Fermentation is good, low viscosity, thick consistency	The color is milky, the taste is pure fermented milk	5	6,0	68°
<i>L. plantarum</i> 17A	Fermentation is good, medium viscosity, homogeneous creamy consistency	The color is milky, the taste is pure fermented milk	6	6,4	66°

In the process of creating consortium associations, the biocompatibility of the strains was considered. Biocompatibility assessment was carried out by co-cultivation on agar medium by the method of perpendicular strokes. The compatibility of strains was reported by uniform growth and the absence of inhibition zones.

During the primary selection, the following combinations of biocompatible strains of LAB were compiled: Association 1 - *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; Association 2 - *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; *Lactobacillus paracasei* Y2; Association 3- *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2 A; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 4A; Association 4- *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* A2; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 17A.

For the stable state of the strains, the method of continuous cultivation was used. For this purpose, 100 ml of each culture in associations were added to sterile tubes with skimmed milk. Then the test tubes were placed in a incubator at a temperature of 37 ° and every 12 hours the cultures were transplanted into fresh milk. After each segment of cultivation, parameters such as acid formation and organoleptics were removed. Microbiological control was carried out by microscopy and the number of viable cells was calculated. Continuous cultivation was continued until a constant ratio of microorganisms belonging to the consortia was obtained.

Thus, based on a visual assessment of biocompatibility and experimental selection of the ratio of cultures, several variants were compiled (Table 5).

Table 5 - Characteristics of the obtained products in the process of milk fermentation with compiled consortia options

Associations	Textual properties of the experimental product	Organoleptic properties of clots	Fermentation (h)	pH	Acid formation activity	CFU/ml
Association 1	Good fermentation, the consistency is uniform, the viscosity is good	The color is milky, the taste is pure fermented milk with a pleasant aftertaste	4,5	3,6	70	2,8x10 ⁸
Association 2	Good fermentation, viscosity is good, dense consistency is uniform	The color is milky, the taste is pleasant sour-milk	3,5	4,0	76	4x10 ⁹
Association 3	Good fermentation, the consistency is uniform, the viscosity is satisfactory	The color is milky, sour taste	5,0	4,0	81	2x10 ⁸
Association 4	Good fermentation, medium viscosity, thick consistency	The color is milky, sour taste	5,0	4,0	107	6x10 ⁸

As a result of the studies, Association 2 was selected, which included *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A. This consortium showed the required parameters for our product and the titer of viable cells turned out to be higher than in other variants. The consortium shows the required parameters of technological characteristics, namely, it has textural properties of the final product in the form of good fermentation and viscosity, dense and homogeneous consistency, exhibits organoleptic properties corresponding to the milk color, pure fermented milk taste with a pleasant aftertaste, fermentation activity is 3.5 hours, acid formation according to the Term 90 ° C, the titer of probiotic cells is 4x10⁹ CFU/ml.

Conclusion

Strains of LAB have been studied for the presence of probiotic properties and for compliance with the main technological characteristics (organoleptic properties, consistency, coagulation activity, acid formation) as starter cultures for the development of a fermented milk product. Based on them, 4 associations of a consortium of starter cultures have been developed, taking into account the biocompatibility of strains. The consortium *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A showed the required parameters and was taken for inclusion in the basis of the developed drink.

Funding

This study is funded by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (grant № BR10764998).

References:

- 1 Kumar D., Lal M. K. Dutt S., Raigond P., Sudhakar S. et al. Functional Fermented Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics from Non-Dairy Products: A Perspective from Nutraceutical / Mol. Nutr. Food Res. 2022, 66: 2101059 (doi.org/10.1002/mnfr.202101059)
- 2 Guimarães J.T., Silva E.K., Ranadheera C.S. Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage / Ultrason Sonochem. – 2019, 55:157-164 (doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.02.025.)
- 3 A Yelnetty and M Tamasoleng The addition of Yam Tuber (*Dioscorea alata*) flour as a source of prebiotic on biomilk synbiotic characteristics / IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2019, 247:1-6. (doi.org/10.1088/1755-1315/247/1/012052)

- 4 Balthazar C. F., Guimarães J. F. et. al The future of functional food: emerging technologies application on prebiotics, probiotics and postbiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:2560–2586 (doi.org/10.1111/1541-4337.12962)
- 5 Panesar P.S., Anal A.K., Kaur R. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Opportunities, Health Benefits and Industrial Challenges / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 1-13. (doi.org/10.1002/9781119702160.ch1)
- 6 de la Rosa O., Flores-Gallegos A.C., Ascacio-Valdés J.A., Sepúlveda L., Montáñez J.C., Aguilar C.N. Fructooligosaccharides as Prebiotics, their Metabolism, and Health Benefits / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 307-337 (doi.org/10.1002/9781119702160.ch13)
- 7 Grujović M. Ž., Mladenović K. G., Semedo-Lemsaddek T., Laranjo, M., Stefanović O. D., Kocić-Tanackov S. D. Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:1537–1567 (doi.org/10.1111/1541-4337.12897)
- 8 Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Li K., Shaikhin S, Saduakhassova S, Kushugulova A, Marotta F. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods / Asian J. Applied Sci. – 2016, 9(143-158) (doi: 10.3923/ajaps.2016.143.158)
- 9 Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory / Journal of clinical microbiology. 2014, 52(1089-1097)
- 10 Sarmurzina Z., Bissenova G., Zakarya K. et al. Characterization of probiotic strains of lactobacillus candidates for development of synbiotic product for kazakh population / Journal of Pure and Applied Microbiology, 2017, 11(151–161)(doi.10.22207/JPAM.11.1.20)
- 11 General pharmacopoeial article «Determination of the specific activity of probiotics: OFS. 1.7.2.0009.15». - [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIIIth ed.]. - T. II. -P. 24. (in Russ.).
- 12 Brilis, V.I., Brilene, T.A., Lentsner, K.P., Lentsner, A.A. Method of studying the adhesive process of microorganisms / Laboratornoe delo, 1986, 4(210–212).
- 13 Genci G., Trotta F., Galdini G. Ustoychivost' spor i vegetativnykh kletok *Bacillus clausii* k probam, imitiruyushchim tranzit po zheludochno-kishechnomu traktu / Zdorov'ye Ukrainy. – 2008, 19/1(57-59)
- 14 Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M.G., Scherenbacher, P., Bode, C. and Hammes, W.P. (2001) Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. Syst Appl Microbiol 24(218–226)(doi.org/10.1078/0723-2020-00023)