

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈՍԿ

ՖԱՐԶԱԴ ՍԱԴՐՈԼԼԱԶ ԿԱՐԻՄՊՈՒՐ

«ԱՎԱՆԴԱԿԱՆ ԻՐԱՆԱԿԱՆ ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԽՍՈՐՎՈՂ «ՐԻՉԱԼ» ԸՄՊԵԼԻՔԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ և ԴՐԱ ԱՐՏԱԴՐՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ»

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան- 2014

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА

ՓԱՐԶԱԴ ՏԱԴՐՈԼԼԱ ԿԱՐԻՄՊՈՒՐ

ИЗУЧЕНИЕ ТРАДИЦИОННОГО ИРАНСКОГО ФЕРМЕНТИРОВАННОГО
МОЛОЧНОКИСЛОГО НАПИТКА «РИЧАЛ» И ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ
ЕГО ПРОИЗВОДСТВА

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.14 - «Биотехнология»

Ереван – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ-ում /ներկայումս ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ/

Գիտական ղեկավար՝

կ.գ.թ. Ֆ.Ն. Տիրունի

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կ.գ.դ.
Է.Գ. Աֆրիկյան

կ.գ.թ. Ա.Ա. Համբարձումյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի Պետական Համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2014թ. ապրիլի 25-ին ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք.Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ/ֆաքս՝ (374 10) 65 41 83:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2014թ. մարտի 25-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու

Գ. Ե. Ավետիսյան

Тема диссертации утверждена в ЗАО “НИИ Биотехнологии” (ныне НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА)

Научный руководитель:

к.б.н. Ф. Н. Тхруни

Официальные оппоненты:

академик НАН РА,
д.б.н. Э.Г. Африкян

к.б.н. А.А. Амбарцумян

Ведущая организация:

Ереванский Государственный Университет

Защита диссертации состоится 25 апреля 2014г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна, 14, тел/факс (374 10) 65 41 83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 25 марта 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат биологических наук

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Пищевые привычки людей разных стран, из разных регионов внутри стран и даже разных религиозных групп в регионах, развивались в течение тысяч лет и они сильно отличаются друг от друга. Молочнокислые продукты питания уже давно ассоциируются с различными демографическими группами и являются неотъемлемой частью их этноса [Srikanjana et al., 2008]. В последнее время особое внимание уделяется изучению микрофлоры национальных традиционных молочнокислых продуктов и созданию на основе выделенных бактерий (единичных или ассоциированных) новых продуктов. Это одно из самых практических и распространенных методов для сохранения биоразнообразия микроорганизмов и использования их органолептических и питательных свойств [Terzic-Vidojevic et al., 2009].

В последнее десятилетие общеизвестно использование молочнокислых бактерий (МКБ) в качестве пробиотиков. Пробиотики обычно определяются как микробные добавки к пище, которые благотворно влияют на организм человека [Wei-Yin Ng., 2009]. Благоприятное воздействие молочнокислых бактерий включают: улучшение здоровья кишечного тракта, усиление иммунной системы, повышение биологической доступности питательных веществ, снижение симптомов непереносимости лактозы, уменьшение распространенности аллергии у восприимчивых лиц, снижение риска заболеваемости некоторыми видами рака [Chcialowski et al., 2009]. Последние научные исследования подтвердили важную роль пробиотиков как часть здоровой диеты для человека, а также и для животных [Bhat and Bhat, 2011]. При создании пробиотиков для лечебно-профилактического применения рекомендуется использовать единые приемы селекции производственных штаммов по критерию антагонистической активности в условиях культивирования смешанных популяций, близких к естественным экологическим. При отборе производственных штаммов следует отдавать предпочтение бактериям с умеренным кислотообразованием в расчете на продукцию отобранными штаммами антибиотикоподобных субстанций. В результате проведенных многочисленных исследований в последнее десятилетие, концепция пробиотиков была расширена за счет включения бактерий кишечного происхождения с бактериями, выделенными из молочнокислых продуктов [FAO/WHO, 2001]. Широкое использование пробиотиков обуславливает необходимость дальнейшей диверсификации источников изоляции бактерий и включает исследование традиционных ферментированных молочнокислых продуктов различных народов из различных географических регионов.

До настоящего времени в Иране, в деревнях (в натуральных хозяйствах) сохраняются традиции приготовления национальных молочнокислых продуктов, технологии которых передаются из поколения в поколение. Большое их разнообразие обусловлено специфичностью используемых видов молока, регионом проживания, традициями местного населения, специфическими добавками растительного происхождения [Saber et al., 2011]. В этой связи представлял интерес проведение работ по выделению и отбору МКБ и дрожжей из различных образцов 3-х молочнокислых напитков «*Ричал*», производимых в натуральных хозяйствах южной области Ирана, которые могут быть потенциально перспективными для производства продуктов функционального питания. Выявление биотехнологического потенциала МКБ и дрожжей актуально и открывает новые перспективы для их использования в разработке технологии приготовления продуктов функционального питания, чему и посвящена данная работа.

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы является:

- Выделение культур молочнокислых бактерий и дрожжей из различных образцов 3-х молочнокислых напитков «*Ричал*», производимых в южной области Ирана.
- Исследование морфо-физиологических, биохимических характеристик выделенных штаммов бактерий.

- Исследование некоторых пробиотических свойств отобранных МКБ (отношение МКБ к действию различных ферментов, желчи, рН, антибиотикам, определение антимикробной активности).
- Отбор МКБ для получения стартерных культур.
- Исследование морфо-физиологических и антимикробных характеристик штаммов дрожжей.
- Отбор штаммов дрожжей для технологии производства продуктов функционального питания.
- Разработка технологии совместного выращивания отобранных стартерных штаммов МКБ и дрожжей в различных питательных средах.
- Исследование возможности применения отобранных стартерных штаммов МКБ и дрожжей в производстве продуктов функционального питания.

Научная новизна

- Впервые выделены и отобраны из 3-х различных образцов молочнокислых напитков «Ричал» штаммы молочнокислых бактерий и дрожжей с антимикробной активностью и некоторыми пробиотическими свойствами.
- Впервые показана зависимость проявления антимикробных свойств выделенных дрожжей в зависимости от условий выращивания.
- Впервые получены стартерные культуры МКБ *Lactobacillus plantarum* F15, *Lactobacillus plantarum* F81, *Lactobacillus pentosus* F85 и дрожжей рода *Kluyveromyces marxianus* FA25 и *Kluyveromyces marxianus* FA13 для производства традиционного для Ирана молочнокислого продукта – «Ричал».
- Впервые показана возможность совместного выращивания отобранных штаммов МКБ *Lactobacillus plantarum* F15, *Lactobacillus pentosus* F85 и дрожжей *Kluyveromyces marxianus* FA 25 и *Kluyveromyces marxianus* FA 13 с антимикробными свойствами для получения нового продукта функционального питания.

Практическая ценность. Отобранные штаммы МКБ *Lactobacillus plantarum* F15, *Lactobacillus plantarum* F81 с пробиотическими свойствами и дрожжей *Kluyveromyces marxianus* FA13 с антимикробными свойствами на основании проведенных научно-производственных испытаний на производственной базе компании «Saverz» по производству молочнокислых продуктов «Saverz» в Иране, могут быть рекомендованы для использования в качестве стартерных культур в производстве новых продуктов функционального питания.

На защиту выносятся следующие основные положения:

- Сравнительные морфо-физиологические и биохимические характеристики МКБ и дрожжей, выделенных из различных образцов 3-х кисломолочных напитков «Ричал».
- Результаты отбора штаммов МКБ, соответствующих определенным требованиям к пробиотикам (наличие антибактериальной активности при рН=6.0-6.5, отношение к ферментам, желчи, рН, устойчивость к антибиотикам).
- Результаты отбора штаммов дрожжей с антимикробными свойствами и исследования факторов, влияющих на проявление их антимикробной активности.
- Результаты отбора стартерных культур МКБ для производства традиционного для Ирана молочнокислого напитка «Ричал».
- Результаты совместного выращивания на различных питательных средах отобранных штаммов МКБ и дрожжей с антимикробными свойствами для получения нового продукта функционального питания для человека и животных.

Связь работы с научными тематиками. Работа выполнена на основе договора между международным научно-образовательным Центром Национальной Академии Наук Республики Армения и аспирантом Фарзатом Каримпуром от 29.10. 2010, г. Ереван, РА.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на международных конференциях: «Первая научно-исследовательская конференция иранских студентов», г. Ереван, РА, 16-17 сентябрь 2011, «Современное состояние биотехнологических разработок и пути коммерциализации», Научный семинар, 11-12 сентябрь, 2012, г. Ереван, РА, на заседаниях ученого совета НППЦ «Армбиотехнология».

Личный вклад соискателя. Собственный вклад включает экспериментальную реализацию сформулированных задач, поиск и анализ научной литературы по теме, обобщение результатов исследований, оформление научных статей и диссертационной работы. Постановка основных задач и разработка методологии проведения исследовательских работ прорабатывались под руководством научного руководителя, кандидата биологических наук, заведующего лабораторией Микробных препаратов НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА Тхруни Ф.Н.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы исследования, результатов и обсуждений экспериментальных исследований, заключения, выводов, приложений и списка использованной литературы, включающего 126 ссылок. Общий объем диссертации 117 страниц, включая 24 таблицы, 11 фото и 6 приложений.

Место выполнения работы. Работа выполнена в лаборатории микробных препаратов НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Публикации . По теме диссертации опубликовано 6 научных работ: в том числе 4 статьи.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава посвящена обзору литературы, в котором приводятся общие характеристики и сведения о роли молочнокислых бактериях (МКБ), продуктах функционального питания на основе живых микроорганизмов. Рассматриваются примеры использования МКБ, дрожжей, растительных добавок с лечебными свойствами в традиционных молочнокислых продуктах разных регионов мира. Обобщены сведения о многочисленных полезных свойствах МКБ, дрожжей, растительных добавок, механизмы действия антимикробных веществ МКБ и дрожжей, приведены современные представления о пробиотических свойствах некоторых молочнокислых бактерий и дрожжей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования. Объектами исследования являлись эндемичные культуры молочнокислых бактерий и дрожжей, которые были выделены из образцов 3-х национальных напитков: 1 – «Ричал» Масти, 2 – «Ричал» Шири, 3 – «Ричал» Дуджи, производимых в натуральных хозяйствах (деревнях) Южного Ирана в течении 2010— 2013 годов.

2.2. Питательные среды. Для выращивания МКБ использовали следующие питательные среды: MRS, M17, Lacto agar (HiMedia, India), MRS бульон (Merck, Germany и HiMedia, India), обезжиренное молоко - сухой порошок производства «Аштарак кат» (Армения), молоко с жирностью 3.2 %.

Для выращивания дрожжей использовали питательные среды: Сабуро агар и Сабуро бульон (HiMedia, India).

2.3. Выделение молочнокислых бактерий и дрожжей. Исследуемые образцы были взвешены и гомогенизированы. С использованием пептонной воды были сделаны серийные

разведения: 0,1 мл из каждого разведения образца пересевали в двух экземплярах — на MRS, M17, Лакто агар, Сабуро агар. Все выделенные культуры МКБ поддерживаются в замороженном виде: 1 мл каждой культуры, выращенной в молоке, переносили в пластиковые пробирки (Eppendorf), содержащие 40% глицерина, культуры хранили в морозильной камере при - 20°C. Дрожжи поддерживаются пересевами на косяки с Сабуро агаром, раз в три месяца.

2.4. Физиологические характеристики МКБ. Для определения физиологических характеристик исследуемых МКБ в работе использовали стандартные методы [Tserovska et al., 2002].

2.5. Выращивание МКБ. Для выращивания МКБ в питательные среды вносили 16-18 ч инокуляты исследуемых бактерии в количестве 10% от объема среды. Культуры выращивали при 37°C, 42° С в течение 8, 24, 48, 72 часов в колбах Эрленмеера (V =100мл). Титр культуры после выращивания определяли измерением оптической плотности на спектрофотометре 2800 WV/VIS фирмы Cole Parmer при длине волны 590 нм или титрованием на твердой питательной среде MRS.

2.6. Получение супернатантов. Для получения супернатантов МКБ и дрожжей культуральную жидкость (КЖ), полученную после выращивания исследуемых микроорганизмов, центрифугировали для отделения биомассы при 4000 об/мин в течение 30 мин.

2.7. Количественное определение бактерицидной активности супернатантов МКБ и дрожжей. Антимикробную активность супернатантов МКБ и дрожжей (при pH=6,0) определяли на тест-культурах с использованием метода диффузии в агаризованную питательную среду. Исследуемые пробы наносили на поверхность газона тест культуры на чашках Петри по 20 мкл с использованием микропипетки. Чашки Петри оставались на столе в течение 1-2 часов в целях содействия диффузии. Активность оценивали измерением размера зоны подавления роста (Ø, мм) тест-культур *Salmonella typhimurium* G-38 and *Bacillus subtilis* 17-89 после 24, 48 часов инкубирования чашек Петри в термостате при 30°C [Ten Brink et al., 2003].

2.8. Тест-культуры. Для определения антимикробных свойств супернатантов МКБ и дрожжей в качестве тест-культур использовали грамотрицательные условно-патогенные бактерии *Salm. typh.* G-38 и грамположительные бактерии *B.subtilis* 17-89, содержащиеся в коллекции лаборатории Микробных препаратов НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

2.9. Определение чувствительности МКБ к желчи, pH, ферментам. Выделенные штаммы МКБ инкубировали в питательной жидкой среде MRS с содержанием определенных концентраций желчи, в течение 24 часов при 37° С в термостате. В работе использовали чистую желчь крупного рогатого скота. Устойчивость культур МКБ к действию различных концентраций желчи определяли по стандартной методике. Выживаемость МКБ в условиях, приближенных к таковым в ЖКТ-е (значение pH в диапазоне 3,0-10,0), проверяли согласно общепринятому методу [Thornton, 1996].

Единичные колонии каждого штамма инкубировали в питательной жидкой среде MRS с содержанием соответствующего фермента в конечной концентрации 0,5 мг/мл. В работе использовали следующие реактивы: Trypsin, Pure from bovine pancreas 3x, activity 2500 NFU/mg (HiMedia), Pepsin, Extra pure activity 1:3000 (HiMedia). После двух часов инкубации в термостате при 37°C, активность ферментов останавливали нагреванием проб до 100°C в течение 5 мин., pH исследуемых проб подводили до pH =5,5-6,0 и проверяли остаточную антибактериальную активность. Выживаемость МКБ оценивали по измерению оптической плотности на спектрофотометре 7800 WV/VIS фирмы Cole Parmer при 590 нм или титрованием на агаризованной питательной среде MRS.

2.10. Определение устойчивости МКБ к антибиотикам. Диско—диффузионный метод определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам основан на регистрации диаметра зоны подавления роста вокруг стандартного диска с антибиотиками. Суспензию исследуемых бактерий наносили на поверхность чашки с питательным агаром. Диски с определенным количеством антибиотика помещали на поверхность инокулированного агара. Использовали следующие диски с антибиотиками: амоксициллин - 10 мг (AMC-30), эритромицин - 15мг (E-15), тетрациклин - 30 мг (TE-30), левомицетин -30 мг (LEV-30), пенициллин - 10 EU (P -10), стрептомицин - 10 мг (S-10), кларитромицин 15γ, В работе использовались диски фирмы «BBL», Англия.

2.11. Приготовление инокулята дрожжей. Культуры дрожжей, выращенные на скошенном Сабуро агаре, смывали физиологическим раствором и использовали для инокуляции в жидкую питательную среду Сабуро. Жидкий инокулят дрожжей выращивали на качалке (220 об/мин) в колбах Эрленмеера (V=100мл) при 30°C в течение 24 час.

2.12. Выращивание дрожжей. Культивирование дрожжей проводили в течение 48-72 часов в условиях, аналогичных для приготовления инокулята (2.11).

2.13. Получение концентрата супернатанта дрожжей. Культуральную жидкость (КЖ) после выращивания дрожжей в течение 48 ч или 72 ч центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. для удаления биомассы. Супернатант отделяли и добавляли 96 % этанола до конечной концентрации 30%, оставляли 24 ч в холодильнике при +4°C, после чего центрифугировали в течение 30 минут при 6000 об/мин. Этанол удаляли выпариванием с использованием роторного испарителя при 35°C- 38°C, 0,01 МПа в течение 2,5 час.

2.14. Хранение и поддержание культуры дрожжей. Дрожжевые культуры сохраняли на скошенном агаре Сабуро при температуре +4 °C. Пересев проводили раз в 3-4 месяца на агаризованную среду Сабуро в чашках Петри или на косяках.

2.15. Выращивание стартерных культур. Для выращивания и отбора стартерных культур использовали жирное (3.2%) и обезжиренное молоко, молоко разбавленное водой в различных соотношениях. Выращивание стартерных культур проводили в полиэтиленовых стаканчиках (V = 100 мл) при 37°C и 42°C в термостате в течение 8 и 48 часов. Далее определяли время сквашивания молока, титруемую и общую кислотность, текстуру сгустка, органолептические свойства, антимикробную активность после 48 часов и после 2 месяцев хранения в холодильнике при +4°C.

2.16. Совместное выращивание МКБ и дрожжей. Эксперименты по совместному выращиванию проводили в двух вариантах:

Первый вариант эксперимента (выращивание в молоке). Использовали отобранные штаммы бактерий *Lactobacillus plantarum* F15, *Lactobacillus plantarum* F81, *Lactobacillus pentosus* F85, которые были выращены в молоке (3.2%) в течении 24 часов в термостате при 30°C. Стартерные культуры дрожжей *Kluveromyces marxianus* FA13, *Kluveromyces marxianus* FA25 выращивали в молоке (3.2%) в течение 48 часов в термостате, при 30°C. Инокуляты дрожжей и бактерий вносили в колбу в равных объемах по 5%. Колбы помещали в термостат при 30°C. Оценку ферментированного молока проводили после 8 ч и 48 ч выращивания и после 2 месяца хранения в холодильнике при +4°C. Определяли время сквашивания молока, титруемую и общую кислотность, текстуру, органолептические свойства.

Второй вариант эксперимента (выращивание в жидкой среде Сабуро). Использовали отобранные штаммы бактерий *Lactobacillus plantarum* F15, *Lactobacillus pentosus* F85, которые были выращены в жидкой среде Сабуро в течении 24 часов. Стартерные культуры дрожжей *Kluveromyces marxianus* FA13, *Kluveromyces marxianus* FA25 выращивали в жидкой среде Сабуро в термостате при 30°C, 48ч. Дрожжи и бактерии вносили в колбу с жидкой средой Сабуро в равных объемах по 5%. Оценку количества биомассы и антимикробной активности полученных продуктов проводили после 8 ч и 48 ч выращивания и после хранения в течение 2 месяцев в холодильнике при 4°C. Определяли титруемую и общую кислотность, текстуру, органолептические свойства, антибактериальную активность. В некоторые колбы после выращивания добавляли по 0,1 мл эссенций мяты, чеснока, сельдерея, полученных в НПЦ «Армбиотехнология», для оценки в полученном продукте органолептических качеств, свойственных национальному продукту «Ричал». После сбора данных был проведен статистический анализ с использованием компьютерной программы Exele 2010, был использован анализ данных программного обеспечения SS.V.20, SAS.V.9.2, (ANOVA ONE WAY).

2.17. Генотипирование отобранных штаммов. Видовая принадлежность отобранных стартерных штаммов МКБ была определена в Центре депонирования микроорганизмов, Тегеран, Иран методом секвенирования 16S РНК. Видовая принадлежность отобранных штаммов дрожжей была определена там же методом секвенирования 26S РНК.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Морфологические и физиологические характеристики МКБ, выделенных из образцов «Ричал»

Из 3 образцов национального напитка «Ричал» были выделены 77 штаммов бактерий и 12 штаммов дрожжей. Первоначальный отбор МКБ проводили по определению времени сквашивания молока. Оценка морфологических характеристик колоний, результаты микроскопии клеток, выделенных бактерий (n=77) показали, что МКБ из 3-х образцов были представлены в основном кокковидными формами – 90%. Палочковидные формы бактерий составляли 10%. 17 штаммов МКБ обладают высокой скоростью сквашивания молока (4-6 часов) при 37⁰С выращивания. Выделенные все штаммы МКБ, в основном, грамположительные, гомоферментативные (n=66), имеются и гетероферментативные (n=11), отличаются по каталазной активности, образуют аммиак из аргинина (n=18), являются в основном факультативными анаэробами. Показан рост при различных температурных режимах (25, 30, 37, 42⁰С) выращивания. Некоторые отобранные МКБ обладают относительно высокой термоустойчивостью (n=36) – выдерживают температуру 65⁰С в течении 30 минут инкубации (тест Шермана). Выделенные бактерии в основном аэротолерантны (n=50) и каталазаотрицательны (n=64). Определение устойчивости выделенных МКБ к разному процентному содержанию NaCl в жидкой питательной среде MRS показало, что бактерии, выделенные из образцов 1 и 2 более чувствительны к содержанию соли (1-10%), чем бактерии, выделенные из образца 3. Все выделенные штаммы МКБ хорошо растут на используемых твердых питательных средах (лакто агар, MRS агар) и различия наблюдаются при оценке роста в жидкой питательной среде MRS (различия зависят от MRS производства различных фирм). Большое разнообразие выделенных МКБ может быть обусловлено тем, что в технологии производства напитка «Ричал» используются добавки разных растений и ферментирование проводят в контейнерах из овечьей шкуры [Mathara., 2004].

Известно, что молочнокислые бактерии являются важными для функционирования микрофлоры ЖКТ. Широкое использование антибиотиков в последнее десятилетие привело к увеличению антибиотикостойчивых микроорганизмов в ЖКТ, поэтому особенно важно, чтобы используемые МКБ обладали высокой устойчивостью к антибиотикам. Для дальнейших исследований, после сравнительной характеристики физиологических свойств, были отобраны и исследованы 28 штаммов МКБ. Показано, что отобранные штаммы МКБ обладают различной устойчивостью к антибиотикам; имеют высокую устойчивость к пенициллину, амоксициллину, кларитромицину и низкую к стрептомицину, левомицетину.

Одним из основных тестов для характеристики МКБ является определение усвояемости сахаров. На основании результатов определения усвояемости углеводов, отобранные 28 штаммов МКБ были собраны в группы: **1**– (LAB sp. F18); **2** – (LAB sp. F66, LAB sp. F83, LAB sp.F84); **3**– (LAB sp. F84); **4**– (LAB sp. F81, LAB sp.F82); **5**– (LAB. LAB sp.F69, LAB sp. F72, LAB sp. F67); **6**– (LAB sp. F64 LAB sp. F56 , LAB sp.F90, LAB sp.F78); **7**– (LAB sp. F15, LAB sp. F92, LAB sp. F93); **8**–(LAB sp.F85, LAB sp.F60, LAB sp.F61, LAB sp.F62, LAB sp.F89); **9** – (LAB sp. F88); **10**– (LAB sp.F22, LAB sp.F63); **11**– (LAB sp.F94); **12** – (LAB sp.F91, LAB sp.F14).

Таким образом, отобранные МКБ можно распределить по усвояемости углеводов на 12 групп, что косвенно может свидетельствовать о том, что выделенные 77 штаммов МКБ могут иметь различную видовую и родовую принадлежность.

3.2. Пробиотические свойства выделенных штаммов МКБ

На основе сравнительных данных по физиологическим и биохимическим свойствам из 77 штаммов отобранные 28 штаммов МКБ были использованы для оценки наличия пробиотических свойств. Данные штаммы МКБ обладают высокой скоростью роста при

выращивании в питательной среде MRS (37°C), что является одним из важных свойств пробиотических штаммов.

Известно, что пробиотики должны отвечать определённым требованиям и обладать заданными свойствами, в частности быть устойчивыми к ферментам, желчным кислотам, антимикробным субстанциям, продуцируемым индигенной микрофлорой, хорошо адгезироваться к эпителию соответствующих слизистых оболочек, должны быть устойчивыми к ряду ферментов пищеварительного тракта, вырабатывать антибиотические вещества [Klaenhammer et al., 1991]. Результаты исследования роста отобранных МКБ при различных значениях рН, а также устойчивость к разным концентрациям желчи обобщены в таблице 1. Как видно из приведенных результатов, низкие концентрации желчи (0,2%) существенно не влияют на рост исследуемых бактерий. Все исследуемые штаммы МКБ сохраняют выживаемость при физиологических концентрациях желчи (соответственно 0,2% - 0,4%). Однако некоторые штаммы МКБ *LAB sp. F15*, *LAB sp. F18*, *LAB sp. F81*, *LAB sp. F85*, *LAB sp. F72* сохраняют устойчивость при концентрации 1% желчи. Отобранные штаммы отличаются по выживаемости при выращивании в среде с различным значением рН. По накоплению биомассы в зависимости от начального значения рН все выделенные МКБ были разделены на несколько групп: которые росли при рН=2.0-5.0; рН=5.0-8.0; рН=9.0-10.0. Полученные данные свидетельствуют о том, что отобранные штаммы МКБ могут принадлежать к различным видам.

Таблица 1.

Характеристика роста штаммов МКБ при различных содержаниях желчи и значениях рН (среда MRS, ОП 590 nm)

МКБ	Контроль	Желчь, %			Значения рН			
		0.2	0.4	1	2	5	7-8	9-10
<i>LAB sp. F4</i>	2.40	4.80	1.36	0.48	0.88	2.40	1.61	0.84
<i>LAB sp. F14</i>	4.80	1.48	0.92	0.64	0.76	4.01	0.16	0.16
<i>LAB sp. F15</i>	5.61	3.80	2.92	5.62	1.61	5.64	6.01	5.62
<i>LAB sp. F18</i>	5.65	4.00	3.80	5.60	1.64	5.21	5.62	5.25
<i>LAB sp. F22</i>	4.01	4.00	2.36	3.04	0.96	3.81	2.48	0.62
<i>LAB sp. F60</i>	4.84	3.48	3.22	3.48	2.42	5.01	5.61	4.83
<i>LAB sp. F61</i>	5.23	3.32	3.40	4.01	1.24	4.80	5.22	5.23
<i>LAB sp. F62</i>	4.80	3.81	3.60	4.82	0.84	4.44	4.82	4.81
<i>LAB sp. F63</i>	4.82	3.92	3.61	3.64	1.12	4.60	5.23	4.81
<i>LAB sp. F64</i>	4.81	3.61	3.28	3.32	1.16	4.80	5.22	4.81
<i>LAB sp. F66</i>	5.60	4.40	3.21	4.80	1.68	5.62	5.62	5.62
<i>LAB sp. F69</i>	4.62	2.84	3.60	2.72	1.21	4.01	4.80	4.81
<i>LAB sp. F72</i>	3.63	4.84	4.01	5.60	1.56	5.60	5.60	5.60
<i>LAB sp. F73</i>	2.56	3.03	0.88	1.28	0.88	2.56	3.21	3.01
<i>LAB sp. F78</i>	4.81	3.43	3.40	4.01	1.48	4.81	5.61	5.64
<i>LAB sp. F83</i>	5.21	3.22	3.23	4.02	2.12	5.22	5.21	5.22
<i>LAB sp. F84</i>	5.25	3.42	3.24	4.01	2.01	5.20	5.20	5.21
<i>LAB sp. F81</i>	4.82	3.20	3.80	4.01	2.04	5.20	5.21	5.20
<i>LAB sp. F82</i>	4.82	3.60	3.25	3.80	2.08	5.20	5.20	5.22
<i>LAB sp. F87</i>	5.03	1.84	3.68	1.41	1.44	4.01	4.80	5.02
<i>LAB sp. F85</i>	4.05	5.21	4.00	3.60	2.80	3.80	4.01	4.01
<i>LAB sp. F67</i>	1.64	3.92	1.28	0.41	1.01	1.80	1.68	0.80
<i>LAB sp. F90</i>	1.52	4.41	1.20	0.52	0.84	2.28	1.52	0.76
<i>LAB sp. F56</i>	1.28	4.05	1.08	0.44	0.80	2.12	1.32	0.84
<i>LAB sp. F88</i>	0.82	3.84	0.76	0.40	0.72	1.68	1.20	0.60
<i>LAB sp. F89</i>	1.24	4.44	1.16	0.44	0.76	2.24	1.44	0.72
<i>LAB sp. F91</i>	1.36	4.83	1.28	2.41	0.76	4.01	1.60	0.40
<i>LAB sp. F92</i>	0.84	4.04	1.08	2.21	0.61	4.02	1.36	0.36
<i>LAB sp. F93</i>	1.01	4.85	1.16	2.36	0.72	0.36	1.52	0.42

С целью определения чувствительности исследуемых МКБ к ферментам, они были подвергнуты ферментативной обработке в соответствующих каждому ферменту условиях. Результаты исследования чувствительности отобранных МКБ к ферментам приведены в таблице 2. Согласно полученным данным можно допустить, что при использовании некоторых отобранных штаммов *LAB sp. F15*, *LAB sp. F60*, *LAB sp. F72*, *LAB sp. F81*, *LAB sp. F78*, *LAB sp. F18*, *LAB sp. F85*, *LAB sp. F82* в составе продуктов функционального питания эти бактерии не будут сильно подвергаться действию пищеварительных ферментов желудочно–кишечного тракта.

Таблица 2.

**Рост молочнокислых бактерий в присутствии ферментов ЖКТ
(среда MRS, ОП 590 nm)**

МКБ	Контроль (без обработки)		Трипсин		Пепсин	
	2ч	24ч	2ч	24ч	2ч	24ч
<i>LAB sp. F4</i>	3.62	5.62	1.48	3.48	1.40	3.08
<i>LAB sp. F14</i>	2.00	4.81	1.44	2.72	1.88	2.56
<i>LAB sp. F15</i>	2.85	5.62	2.72	4.80	1.92	4.80
<i>LAB sp. F18</i>	2.83	5.62	2.12	4.80	1.84	4.00
<i>LAB sp. F22</i>	1.84	5.21	1.21	3.08	1.40	3.40
<i>LAB sp. F60</i>	1.92	5.21	1.48	3.40	1.32	3.21
<i>LAB sp. F61</i>	1.84	4.82	1.84	3.41	1.28	3.22
<i>LAB sp. F62</i>	1.92	4.82	1.48	3.08	1.08	2.85
<i>LAB sp. F63</i>	1.76	4.46	1.44	3.40	1.68	3.25
<i>LAB sp. F64</i>	1.92	4.85	1.68	3.42	1.68	3.40
<i>LAB sp. F66</i>	2.64	5.62	2.40	4.82	2.44	4.04
<i>LAB sp. F69</i>	1.84	4.82	2.80	3.02	2.04	3.03
<i>LAB sp. F72</i>	3.08	5.61	2.48	4.81	3.05	3.65
<i>LAB sp. F73</i>	1.28	4.82	0.84	2.32	0.68	2.02
<i>LAB sp. F78</i>	2.03	4.82	1.41	4.01	1.44	2.84
<i>LAB sp. F83</i>	2.45	5.20	2.48	4.40	2.36	3.82
<i>LAB sp. F84</i>	1.96	4.81	2.41	4.01	2.52	4.41
<i>LAB sp. F81</i>	2.04	5.20	2.41	3.61	2.05	3.81
<i>LAB sp. F82</i>	2.04	4.80	2.36	3.61	2.02	3.61
<i>LAB sp. F87</i>	2.81	5.20	1.92	4.41	2.24	3.60
<i>LAB sp. F85</i>	1.32	3.62	1.61	2.72	1.42	2.72
<i>LAB sp. F67</i>	2.12	4.81	1.62	2.82	2.02	2.62
<i>LAB sp. F90</i>	2.41	4.42	2.52	4.03	2.28	3.68
<i>LAB sp. F56</i>	1.28	3.41	0.85	2.12	0.64	1.96
<i>LAB sp. F88</i>	0.82	3.62	0.68	1.76	0.48	1.64
<i>LAB sp. F89</i>	1.22	3.52	1.32	2.40	1.22	2.02
<i>LAB sp. F91</i>	1.36	3.41	0.76	2.04	0.56	1.80
<i>LAB sp. F92</i>	0.81	3.08	0.61	1.61	0.41	1.44
<i>LAB sp. F93</i>	1.00	3.52	0.64	1.64	0.44	1.56

В настоящее время используются поликомпонентные пробиотики на основании МКБ различных видов и родов, отбор которых следует проводить с учетом природного синергизма видов, путем оценки накопления биомассы отдельными культурами при совместном их выращивании. Поэтому при исследовании новых МКБ в качестве стартеров в производстве разных молочнокислых продуктах важно иметь характеристику их антимикробной активности. Представлял интерес исследовать влияние супернатантов, полученных после выращивания выделенных МКБ в питательной среде MRS, на рост некоторых грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных бактерий (при pH =6,0), на примере *Salm. typh. G-38* и

B.subtilis 17-89 согласно существующим требованиям к пробиотикам [Klaenhammer et al., 1991]. Результаты подавления роста тест культур приведены в таблице 3.

Как видно из полученных данных, определение антимикробной активности супернатантов исследуемых МКБ показало, что некоторые из них подавляют рост грамположительных и грамотрицательных бактерий при pH=6.0. По эффективности проявления антимикробных свойств выделенные бактерии отличаются друг от друга. Наибольшей способностью подавлять рост тест культур имеют штаммы под номерами *LAB* sp. F15, *LAB* sp. F81, *LAB* sp. F85. Можно допустить, что эти МКБ в процессе роста могут синтезировать антимикробные вещества имеющие свойства бактериоцинов.

Таблица 3.

Антимикробная активность отобранных МКБ (pH=6.0)

МКБ	Тест-культура, Ø, мм	
	<i>Salm.typh.</i> <i>G-38</i>	<i>B.subtilis</i> <i>17-89</i>
<i>LAB</i> sp. F15	12±1	13±0,5
<i>LAB</i> sp. F77	10±1	10±1
<i>LAB</i> sp. F22	5± 0,5	5± 0,5
<i>LAB</i> sp. F48	5± 0,5	6± 0,5
<i>LAB</i> sp. F56	5± 0,5	8±0,5
<i>LAB</i> sp. F61	10±0,5	10±0,5
<i>LAB</i> sp. F66	8±0,5	8±0,5
<i>LAB</i> sp. F67	8±0,5	8±0,5
<i>LAB</i> sp. F78	8±0,5	10±0,5
<i>LAB</i> sp. F81	12±0,5	13±0,5
<i>LAB</i> sp. F82	10±0,5	10±0,5
<i>LAB</i> sp. F83	10±0,5	10±0,5
<i>LAB</i> sp. F85	13±0,5	11±0,5

Таким образом, на основании полученных данных, наиболее перспективными по показателям устойчивости к желчи, ферментам, росту бактерий при разных значениях pH, антимикробной активности супернатантов, согласно классификации по Клаенхаймеру, являются штаммы бактерий *LAB* sp. F15, *LAB* sp. F61, *LAB* sp. F81, *LAB* sp. 82, *LAB* sp. F67, *LAB* sp. F85, *LAB* sp. F83, которые могут быть использованы для создания нового продукта функционального питания с антимикробными свойствами.

3.3. Характеристики выделенных штаммов дрожжей

Из 3 образцов напитка «Ричал» были выделены 12 штаммов дрожжей. Морфологическую характеристику колоний дрожжей проводили после 48 ч выращивания на твердой питательной среде Сабуру. Колонии штаммов дрожжей, выделенных из исследуемых образцов, отличаются по своим признакам: окраске и размеру, консистенции, морфологии. По морфологическим признакам выделенные штаммы дрожжей были распределены на 6 групп.

Все выделенные штаммы дрожжей (N=12) были проверены на способность расти в разных жидких питательных средах. Показано, что в жидкой среде MRS растут 50% выделенных дрожжей, в жидкой среде Сабуру -100%, а в молоке при разных температурных режимах (30° и 37°) -33,3%. Четыре штамма дрожжей, выделенных из образца 3 (из группы 3 и 4), не растут ни в одной из используемых питательных сред. Штаммы дрожжей FA13, FA14, FA25 с одинаковой

эффективностью растут в жидких средах MRS и Сабуро. Известно, что наличие аромата молочнокислых продуктов обусловлено присутствием ароматобразующих дрожжей [Kumura et al., 2004]. Исследовали способность отобранных штаммов дрожжей образовывать аромат при выращивании в молоке с разным показателем жирности, после инкубирования в термостате в течение 1, 3, 10 дней, при 30⁰С. Результаты приведены в таблице 4.

Как видно из результатов, приведенных в таблице 4, 2 штамма дрожжей FA13, FA4 обладают ароматобразующими свойствами, которые свойственны национальному продукту «Ричал» Масти, а штамм FA16 обладает специфическим ароматом, свойственным лимону. На основании этих свойств, некоторые из этих штаммов были отобраны для использования в совместном выращивании с МКБ с целью получения продукта с приятным ароматом.

Таблица 4.

Образование аромата при выращивании дрожжей в молоке

Дрожжи	Аромат		Кислотность, °Т	
	Обезжиренное молоко	Жирное молоко (3,2%)	Обезжиренное молоко	Жирное молоко (3,2%)
Образец 1				
FA4	Молочный, мятный	Молочный, мятный, присущий традиционному напитку «Ричал»	40	46
FA13	Молочный, присущий традиционному напитку «Ричал»	Молочный, присущий традиционному напитку «Ричал»	40	45
FA25	Слабо молочный	Резкий, присущий диацетилу	42	48
FA26	Слабо молочный	Присущий диацетилу	54	55
FA10	Слабо молочный	Слабо молочный	35	45
FA12	Без запаха	Молочный	44	48
Образец 2				
FA16	Мятный, лимонный	Мятный, лимонный	53	55
FA14	Молочный	Молочный	35	48
Образец 3				
FA23	Без запаха	Молочный	18	18
FA24	Без запаха	Без запаха	20	18
F A19	Без запаха	Без запаха	20	18
F A20	Без запаха	Без запаха	15	20

Одной из характеристик дрожжей является газообразование, которое зависит от условий выращивания [Psani, 2006]. Оценку способности выделенных 12 штаммов дрожжей к газообразованию проверяли при выращивании на различных питательных средах при 30⁰С. Результаты обобщены в таблице 5. Как видно из приведенных данных, через 48 часов выращивания дрожжей наблюдается газообразование, однако оно зависит от используемой питательной среды: несмотря на то, что все дрожжи растут на используемых средах, газообразование отмечено не у всех дрожжей. Наилучшие результаты по газообразованию были получены при выращивании дрожжей на обогащенной питательной среде (№2, 6). Штаммы дрожжей FA13, FA25 и FA14 проявляли газообразование при выращивании на всех используемых питательных средах.

Таблица 5.

Газообразование штаммов дрожжей при выращивании в различных питательных средах (30⁰С, 48 ч)

Дрожжи	Варианты питательных сред											
	1		2		3		4		5		6	
	газ	рост	газ	рост	газ	рост	газ	рост	газ	рост	газ	рост
Образец 1												
FA4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FA13	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	++	+
FA25	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+++	+
FA26	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
FA10	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
FA18	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Образец 2												
FA16	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
FA14	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+++	+
Образец 3												
FA23	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
FA24	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
FA19	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
FA20	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Газообразование, %	0	0	50	100	33,3	83,3	8,3	4,1	8,1	83,1	66,6	100

- отсутствие газа, роста, + наличие газа, роста

Известно, что проявление антимикробных свойств МКБ зависит от условий культивирования, состава питательной среды, однако данных относительно исследований влияния проявления антимикробных свойств дрожжей против бактерий незначительны [Comitini et al., 2004].

Таблица 6.

Антимикробные свойства штаммов дрожжей при различных условиях выращивания (тест культура *B.subtilis* 17-89)

№	Дрожжи	30 ⁰ С		37 ⁰ С		Жидкая среда	
		Час		час		Сабуро	MRS
		72	120	72	120	Подавление	роста, Ø мм
1	FA4	11±1	12±1	отс	отс	11±0,5	13.5±0.5
2	FA13	13±1	13±1	отс	отс	12±0.5	13±1
3	FA 16	отс	Отс	отс	отс	отс	отс
4	FA 18	отс	Отс	отс	отс	отс	отс
5	FA 23	отс	Отс	отс	отс	отс	отс
6	FA 24	11±0.5	11±1	10±0.5	10±0.5	11.5±0.5	12.5±0.5
7	FA 25	12±0.5	12±1	10±0.5	10±0.5	12±1	13±1
8	FA28	отс	Отс	отс	отс	10.5±0.5	13±0.5
9	FA10	13±1	13±1	отс	отс	11±0.5	12.5±0.5
10	FA14	13±1	13±1	отс	отс	11±0.1	11±1
11	FA19	отс	Отс	отс	отс	отс	отс
12	FA20	отс	Отс	отс	отс	отс	отс
Подавление роста, %		66,6	66,6	30,2	30,2	58,3	58,3

С этой целью исследовали проявление антимикробных свойств супернатантами выделенных дрожжей, полученных после выращивания при различных температурах, времени, на различных питательных средах (Сабуро и MRS). Результаты приведены в таблице 6. Как видно из приведенных в таблице 6 экспериментальных данных, супернатанты не всех отобранных штаммов дрожжей подавляют рост тест культур *B.subtilis* 17-89. Необходимо отметить, что проведенные исследования показали отсутствие подавления роста *Salm.typh.G38*.

Исследование наличия подавления роста тест культур супернатантами дрожжей в зависимости от температуры и времени выращивания на средах Сабуро, MRS показало, что при повышении температуры выращивания дрожжей до 37⁰С в течении 72, 120 часов, антимикробную активность сохраняют супернатанты штаммов FA25, FA24, в то время как остальные штаммы не синтезируют антимикробные вещества. Супернатанты штаммов дрожжей FA4, FA13, FA10, FA14, FA25 синтезируют антимикробные вещества при 30⁰С.

Таким образом, из отобранных 12 штаммов дрожжей, супернатанты 5 штаммов дрожжей после выращивания при 30⁰С и супернатанты 2-х штаммов после выращивания при 37⁰С подавляют рост *B.subtilis* 17-89, но, как показали проведенные исследования, не подавляют рост грамотрицательных бактерий *Salm.typh.G38*.

На основании полученных данных (ароматобразование, газобразование, антимикробная активность), для дальнейших исследований были отобраны штаммы дрожжей FA25, FA13.

3.4. Совместное выращивание МКБ и дрожжей

При исследовании пробиотиков одной из основных проблем является подбор штаммов, характерных для микробиоценоза кишечника человека. В связи с этим была поставлена задача проведения подбора отобранных МКБ, перспективных в качестве пробиотических стартерных культур и изучение их технологических и антимикробных свойств. Для исследования технологических свойств отобранные штаммы МКБ каждый в отдельности были выращены в молоке (3,2%) в течении 24, 48 ч. Были исследованы их органолептические свойства (аромат, вязкость, консистенция сгустка). На основе полученных данных, МКБ были предварительно распределены по трем группам:

1. для сыров – *LAB* sp. F14, *LAB* sp. F16, *LAB* sp. F18, *LAB* sp. F21, *LAB* sp. F65;
2. для йогурта – *LAB* sp. F81, *LAB* sp. F17, *LAB* sp. F77, *LAB* sp. F63, *LAB* sp. F15;
3. для жидкого йогурта (Тан) – *LAB* sp. F85, *LAB* sp. F91, *LAB* sp.F56, *LAB* sp.F50, *LAB* sp. F62.

Таким образом, выделенные из трех образцов напитка «Ричал» некоторые МКБ с ароматобразующими свойствами могут быть рекомендованы для использования в производстве различных молочнокислых продуктов.

Представлял интерес исследование сохранения антимикробных свойств отобранных бактерий из групп 2 и 3 (содержащих МКБ с ароматами йогурта) в качестве стартерных культур при выращивании в различных сочетаниях друг с другом. Опыты проводили при выращивании МКБ в разных условиях: в молоке (обезжиренном и с жирностью 3,2%), при различном разбавлении молока с водой, при температурах выращивания 37⁰ С и 42⁰ С.

На основании полученных данных по технологическим и органолептическим показателям: кислотности, ароматобразованию, консистенции сгустка, температуре выращивания, роста при различных соотношениях молока и воды, штаммы МКБ были сгруппированы в 12 групп (комбинаций). Был проведен статистический анализ данных по технологическим показателям комбинаций МКБ с использованием компьютерной программы Excel 2010, проведением анализа данных с программным обеспечением SPSS.V.20, SAS.V.9.2 ANOVA ONE WAY. Супернатанты МКБ, полученные после выращивания 12 комбинаций, были исследованы на способность проявлять антимикробные свойства на тест культурах *B. subtilis* 17-89 и *Salm. typh.G38*. Результаты приведены в таблице 7.

Таблица 7.

Подавление роста тест культур различными комбинациями отобранных штаммов МКБ при pH=6.0 (t=37°C, 48 ч)

Комбинации МКБ		Тест культуры	
		<i>Salm.typh.</i> G38	<i>B.subtilis</i> 17-89
1	<i>LAB sp.</i> (F56, F15,F77)	+	+
2	<i>LAB sp.</i> (F56, F15, F78)	-	-
3	<i>LAB sp.</i> (F56, F15, F60)	-	+
4	<i>LAB sp.</i> (F56, F15, F61)	-	+
5	<i>LAB sp.</i> (F15, F77)	-	+
6	<i>LAB sp.</i> (F66, F15, F77)	-	-
7	<i>LAB sp.</i> (F78, F15, F77)	-	+
8	<i>LAB sp.</i> (F15, F81)	+	+
9	<i>LAB sp.</i> (F 82, F15)	-	+
10	<i>LAB sp.</i> (F 83, F15)	-	+
11	<i>LAB sp.</i> (F 85, F15)	+	+
12	<i>LAB sp.</i> (F56, F15, F61, F78, F66, F81, F83, F85, F82 , F77)	-	+

Как видно из приведенных данных, не все созданные комбинации штаммов МКБ при pH=6.0 проявляют антимикробную активность на исследуемых тест культурах. Только 3 комбинации МКБ подавляют рост тест культур *Salm.typh.* G38, *B.subtilis* 17-89 и 10 комбинаций МКБ-только рост *B.subtilis* 17-89. Результаты статистического анализа показали, что по показателям конечного значения pH, титруемой кислотности, текстуре, ароматобразованию, времени сквашивания молока, проявлению антимикробной активности, наилучшими оказались комбинации под номерами № 8 и № 11. Эти группы, состоящие из бактерий *LAB sp.* F15, *LAB sp.* F81, *LAB sp.* F85 и были использованы в качестве стартерных культур для совместного выращивания с отобранными штаммами дрожжей.

Таким образом, некоторые используемые МКБ показывают отсутствие межбактериального антагонизма и обеспечивают достаточный выход биомассы потенциальных штаммов-продуцентов в процессе совместного культивирования и высокую выживаемость всех стартерных культур при хранении +4 °С в течении 2 и более месяцев. Однако, сочетания МКБ по разному проявляют антимикробные свойства против исследуемых тест культур. Проявление антимикробной активности при pH=6.0 показывает, что в комбинации стартерных культур имеются штаммы МКБ, которые возможно могут синтезировать антимикробные вещества (бактериоцины) и это свойство зависит от определенного сочетания стартерных культур. Необходимо отметить, что в научной литературе данные по совместному выращиванию бактерий и дрожжей с антимикробными свойствами практически отсутствуют, поэтому представлял интерес исследовать возможность совместного выращивания отобранных штаммов молочнокислых бактерий с некоторыми пробиотическими и ароматобразующими свойствами и дрожжей с антимикробными и ароматобразующими свойствами. Были отобраны штаммы МКБ *LAB sp.* F15 и *LAB sp.* F85 и дрожжей FA13 и FA25. Исходный титр инокулята МКБ для ферментирования молока составлял 10⁶ кл/мл, а инокулята дрожжей- 10⁵ кл/мл.

Оценку процесса совместного выращивания проводили с использованием 2 видов молока: с жирностью 3,5% и обезжиренного и в жидкой среде Сабуро, при температуре выращивания 30°C, 37°C. Эксперименты были поставлены в жирном молоке и обрате с добавлением разного количества дрожжей (0.1-5%). Было отмечено, что газообразование наблюдалось уже при внесении 0.1-0,2% дрожжей. Дальнейшее увеличение количества дрожжей

до 5 % FA13 при совместном выращивании дрожжей FA13 с бактериями *LAB* sp. F15 и *LAB* sp. F85 приводит к увеличению газообразования, что нежелательно для товарного вида молочнокислого продукта.

Таблица 8.

Совместное выращивание МКБ и дрожжей с антимикробными свойствами

Выращивание	Молоко							
	Обезжиренное				Жирное (3,2%)			
	Кислотность, °Т		Зона подавления роста, Ø, мм		Кислотность, °Т		Зона подавления роста, Ø, мм	
	8ч	2 мес	<i>B.subt.</i> 17-89	<i>Salm.typh.</i> G-38	8ч	2 мес.	<i>B.subt.</i> 17-89	<i>Salm.typh.</i> G-38
МКБ								
<i>LAB</i> sp. F15	45	52	Отс	12±0.5	47	55	12±0.2	10±0.4
<i>LAB</i> sp. F85	44	58	Отс	10±0.5	45	52	14±0.5	10±0.4
<i>LAB</i> sp. (F15+F85)	45	55	Отс	10±0.4	45	54	12±0.8	14±0.5
дрожжи								
FA13	42	56	Отс	отс	45	62	14±0.6	12±0.8
FA25	45	75	Отс	11±0.1	45	64	12±0.5	10±0.5
<i>LAB</i> sp. (F15+F85) + FA13, (%)								
0.1	45	75	отс	11±0.8	52	73	13±0.2	12±0.5
0.5	48	78	отс	11±0.7	54	73	18±0.3	15±0.3
1.0	49	80	отс	10±0.5	54	73	20±0.5	15±0.5
2.0	49	75	отс	отс	55	75	14±0.3	13±0.2
5.0	49	75	отс	отс	59	78	15±0.5	13±0.3
<i>LAB</i> sp. (F15+F85) + FA25, (%)								
0.1	46	48	отс	10±0.4	48	74	17±0.4	12±0.5
0.5	44	56	отс	10±0.5	52	74	18±0.5	14±0.5
1.0	48	62	отс	10±0.4	52	70	18±0.5	14±0.4
2.0	49	66	отс	отс	54	70	13±0.5	13±0.4
5.0	53	60	отс	отс	62	70	14±0.5	12±0.2

В таблице 8 приведены результаты антимикробной активности супернатантов ферментированного молока (жирного и обезжиренного), полученного после совместного выращивания исследуемых стартерных культур в течении 8 часов и их хранения после выращивания более 2 месяцев в холодильнике при +4°C (Технологические условия аналогичны условиям, которые используются при производстве «Ричал»). Как видно из приведенных

данных, при отдельном выращивании стартерных культур бактерий и при совместном их выращивании с дрожжами в жирном и обезжиренном молоке в термостате при 37°C в течении 8 часов, и после хранения в холодильнике не было отмечено повышения показателя титруемой кислотности. Хранение полученных ферментированных образцов молока (полученных после совместного выращивания) в холодильнике при +4°C в течении 2 месяцев показало, что титр культур МКБ составил 5.6×10^8 кл/мл и дрожжей 1.2×10^8 кл/мл. Результаты, приведенные в таблице 8 показывают, что при совместном выращивании МКБ и дрожжей имеет место увеличение размеров зон подавления роста тест культур по сравнению с отдельным выращиванием. Наибольший эффект подавления роста тест культур при совместном выращивании дрожжей и МКБ наблюдается при их выращивании с использованием жирного молока и внесением 1% инокулята дрожжей.

Таблица 9.

**Совместное выращивание МКБ и дрожжей с антимикробными свойствами
(среда Сабуро, t=30°C)**

Выращивание	24ч					48ч				
	ОП	Кислотность, °Т	рН	Зона подавления роста, Ø мм		ОП	Кислотность, °Т	рН	Зона подавления роста, Ø мм	
				<i>B.subt.</i> 17-89	<i>Salm.typh.</i> G-38				<i>B.subt.</i> 17-89	<i>Salm.typh.</i> G-38
МКБ										
<i>LAB sp. F15</i>	0.48	50	4.42	отс	отс	0.66	54	4.25	7.0±0.2	отс
<i>LAB sp. F85</i>	0.39	42	4.50	отс	отс	0.54	46	4.35	5.0±0.2	Отс
Дрожжи										
FA13	1.62	24	5.08	отс	Отс	1.80	28	5.0	10.0±1.0	Отс
FA25	1.68	20	5.01	отс	Отс	1.92	25	4.98	9.0±0.8	Отс
<i>LAB sp. F15</i> +FA13	1.72	46	4.35	7,0±0.2	отс	1.98	58	4.21	16.0±1.0	отс
<i>LABsp.F15</i> +FA25	1.59	52	4.30	4,0±0.1	Отс	1.86	56	4.23	15.0±0.8	отс
<i>LABsp.F85</i> +FA13	1.38	52	4.25	7,0±0.1	Отс	1.62	66	4.15	15.0±0.8	отс
<i>LAB sp. F85</i> + FA25	1.47	46	4.40	отс	отс	1.80	50	4.32	14.0±0.5	Отс

Исследование совместного выращивания МКБ и дрожжей проводили в жидкой питательной среде Сабуро при 30°C в течении 48 часов. Результаты приведены в таблице 9. Антимикробная активность отдельно взятых штаммов бактерий *LABsp. F15* и *LABsp. F85* и дрожжей FA13 и FA15 была слабо выражена при выращивании в питательной среде Сабуро после 24 часов роста (известно, что МКБ синтезируют антимикробные вещества до 20 часов выращивания, а дрожжи в основном после 20 часов роста). Исследование совместного выращивания бактерий и дрожжей на среде Сабуро показало, что титр МКБ к 48 часам выращивания составляет в среднем $4,6 \times 10^8$ кл/мл и $5,3 \times 10^8$ кл/мл дрожжей. При этом отмечено подавление роста тест культуры *B.subtilis* 17-89 после 24 и 48 часов выращивания. Однако, при этом не было отмечено подавление роста тест культуры *Salm.typh.* G38.

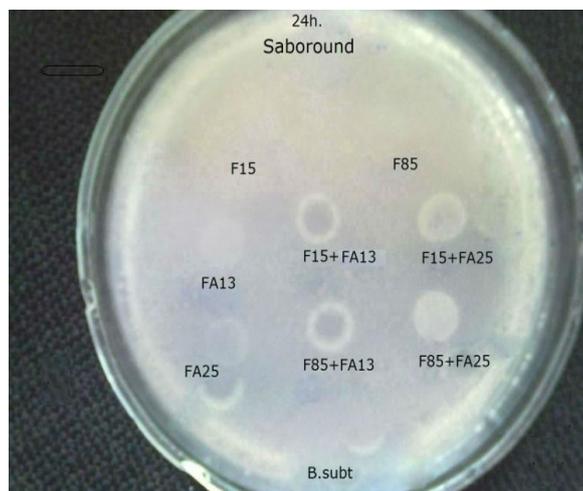


Рис 1. Антимикробная активность супернатантов после 24 часов совместного выращивания бактерий с дрожжами в среде Сабуро (высев на среде Сабуро, тест культура *B.subtilis* 17-89)

На рис. 1 четко видно различие результатов по подавлению роста тест культуры *B.subtilis* 17-89. Полученные 2 супернатанта из культуральных жидкостей после совместного выращивания бактерий *LABsp.* F15 и *LABsp.* F85 с дрожжами FA13 в среде Сабуро проявляли антимикробную активность. в то время как супернатанты полученные после выращивания бактерий *LABsp.* F85 с дрожжами FA25 не подавляли рост тест культуры.

Таким образом, сравнение результатов по совместному выращиванию отобранных штаммов МКБ и дрожжей в жирном молоке, обрате, жидкой среде Сабуро показало, что полученный супернатант ферментированного продукта по разному подавляет рост как *Salm. typh.* G38, так и *B.subtilis* 17-89. Полученные данные указывают на влияние условий (состав среды, времени выращивания, используемых штаммов дрожжей) при совместном культивировании бактерий и дрожжей на проявление антимикробной активности.

На основании полученных данных, были отобраны штаммы МКБ и дрожжей, которые были посланы в Исследовательский Центр Науки и Технологий (IROST) Директору Персидской Коллекции Типовых культур (PTCC), г. Тегеран, Исламская республика Иран, на предмет генотипирования с применением метода секвенирования ДНК 16S rRNA для МКБ и 26S rRNA для дрожжей. На основании полученных данных 3 штамма МКБ и 2 штамма дрожжей депонированы в «Центре Депонирования микробов» (ЦДМ) НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА. Штаммы получили шифры и номера:

Lactobacillus pentosus F85 – MDC 9625

Lactobacillus plantarum F81- MDC 9624

Lactobacillus plantarum F15- MDC 9623

Kluyveromyces marxianus FA 25- MDC 10325

Kluyveromyces marxianus FA13sp- MDC 10324

С использованием данных стартерных культур МКБ и дрожжей были наработаны образцы продуктов, аналогичных «Ричал» и переданы для проведения дегустации на кафедру переработки продуктов животноводства Национального Аграрного Университета РА, для проведения дегустации, а также в Иран, провинцию Ясудж, Университет медицинских наук и здравоохранения, на кафедру питания и лекарственных препаратов. Были получены протоколы с положительными отзывами.

«Saverz» компания по производству молочнокислых продуктов, Исламской Республики Иран, на основании переданных идентифицированных стартерных культур, провела технологический процесс получения нового продукта с антимикробными свойствами. На основании полученных результатов, сделан вывод о возможности организации производства нового функционального продукта на данном предприятии.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выделены и исследованы МКБ и дрожжи с антимикробными свойствами из 3-х образцов напитка «Ричал», национального молочнокислого продукта, производимого в натуральных хозяйствах (деревнях) южного Ирана.
2. Полученные супернатанты отобранных 13 штаммов МКБ проявляют антимикробную активность при рН=6.0. Исследование их устойчивости к действию желчи, трипсина, пепсина, диапазону значений рН, может свидетельствовать о том, что отобранные штаммы могут иметь пробиотические свойства.
3. Показано, что полученные супернатанты 7 штаммов дрожжей обладают антимикробной активностью против *Bacillus subtilis* 17-89. На основании наличия аромата, газообразования, антимикробной активности были отобраны штаммы дрожжей *Kluuveromyces marxianus* FA 25 и *Kluuveromyces marxianus* FA13.
4. Показано, что проявление антимикробной активности отобранных штаммов дрожжей зависит от состава питательной среды, температуры и времени выращивания.
5. Скрининг 10 штаммов МКБ по органолептическим, физиологическим, биохимическим и антимикробным свойствам выявили перспективность применения штаммов МКБ *Lactobacillus pentosus* F85, *Lactobacillus plantarum* F81, *Lactobacillus plantarum* F15 в качестве стартерных культур.
6. Совместное выращивание отобранных стартерных культур *Lactobacillus plantarum* F81 и *Lactobacillus plantarum* F15 с дрожжами *Kluuveromyces marxianus* FA 13 в молоке в течении 8 часов инкубации при 37⁰С позволило создать продукт функционального питания с антимикробными свойствами и наличием органолептических свойств присущих, национальному продукту «Ричал».
7. Совместное выращивание отобранных стартерных штаммов *Lactobacillus plantarum* F81 и *Lactobacillus plantarum* F15 с дрожжами *Kluuveromyces marxianus* FA 25 или *Kluuveromyces marxianus* FA 13 в среде **Сабуро** показало возможность получения нового продукта с антимикробными свойствами для использования, возможно, в качестве кормовой добавки с целью уменьшения общей обсемененности кормов.
8. Отобранные штаммы МКБ и дрожжей, на основе результатов научно-производственных испытаний, могут быть рекомендованы в качестве основы для получения пробиотиков, стартерных культур для производства напитка «Ричал» и в технологии совместного выращивания с целью получения новых продуктов функционального питания.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Karimpour F.**, Tkhruni F.N., Razavi S.H., Karapetyan K.J. The characteristic of microflora of iranian traditional dairy beverage. The First international Scientific-Research Conference of Iranian students. Abstract book. Yerevan -Armenia, 16-17 September, 2011, p. 150.
2. **Farzad S. Karimpour**, Flora N. Tkhruni, Sayed H. Razavi, Kristina J. Karapetyan. Isolation of Microbial Strains with Probiotic Properties from the Traditional Iranian Dairy Beverage Richal “Masti”. Modern state of biotechnological developments and ways of commercialization. Scientific seminar. Book of abstracts. Yerevan -Armenia, 11-12 September, 2012, p. 57.
3. Т.В. Хачатрян, А.С. Агаян, **Ф.С. Каримпур**, М.Г. Караханян. Сравнительная характеристика антимикробных свойств некоторых штаммов дрожжей. Известия Национального аграрного университета Армении. 2012. № 4, с. 117- 122.
4. **F. Karimpour** , F. N. Tkhruni, K. J. Karapetyan, S. H. Razavi. Certain probiotic properties of lactic acid bacteria from the Iranian dairy product “Richal”. Life Science Journal 2013;10(6s), p. 508-512.
5. **F. Karimpour**. Investigation of lactic acid bacteria isolated from domestic Iranian product Richal Masti. Life Science Journal 2013;10(6s), p. 513-516.
6. **Ф.С. Каримпур**. Исследование пробиотических свойств молочнокислых бактерий из иранского национального молочного продукта “Ричал”. Вопросы теоретической и клинической медицины. 2013, Т. 16, № 4 (80): с. 30-33.

Ֆարգադ Սադրոլլահ Կարիմյուր

ԱՎԱՆԴԱԿԱՆ ԻՐԱՆԱԿԱՆ ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԽՄՈՐՎՈՂ «ՌԻԶԱԼ» ԸՄՊԵԼԻՔԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԴՐԱ ԱՐՏԱԴՐՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ Ամփոփագիր

Բանալի բառեր. *Ավանդական իրանական «Ռիչալ» ըմպելիք, կաթնաթթվային բակտերիաներ, խմորասնկեր, հակամանրէային ակտիվություն, պրոբիոտիկներ, մերանային կուլտուրաներ, համատեղ աճեցում:*

Վերջին շրջանում առանձնահատուկ ուշադրություն է դարձվում ավանդական կաթնամթերքների միկրոֆլորայի ուսումնասիրությանը և մեկուսացված մանրէների հիման վրա (մեկական կամ համակցված) նոր արտադրատեսակների ստեղծման վրա: Դա հանդիսանում է մանրէների կենսաբազմազանության պահպանման, ինչպես նաև դրանց օրգանոլեպտիկ և սննդային հատկությունների օգտագործման առավել տարածված և գործնական մեթոդներից մեկը: Կանխարգելման և բուժման նպատակով պրոբիոտիկների ստեղծման դեպքում նպատակահարմար է օգտագործել արդյունաբերական շտամների սելեկցիայի համընդհանուր մոտեցումներ՝ համակցված պոպուլյացիաների աճեցման պայմաններում՝ ըստ անտագոնիստական ակտիվության, որոնք մոտ են բնական էկոլոգիական պայմաններին:

Իրանի Իսլամական Հանրապետության տարբեր մարզերում ազգային ավանդական կաթնաթթվային մթերքների արտադրությունում կիրառվող մերանների միկրոֆլորան բավարար ուսումնասիրված չէ: Այս առումով, արդիական է հանդիսանում Իրանի հարավային շրջանի Կոհգիլույեի մարզի տնային տնտեսություններում արտադրվող «Ռիչալ» կաթնաթթվային 3 տարբեր ըմպելիքների (1-«Ռիչալ» Մաստի, 2-«Ռիչալ» Շիրի, 3-«Ռիչալ» Դուդի) կաթնաթթվային բակտերիաների (ԿԹԲ) և խմորասնկերի մեկուսացումը, ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի այն շտամների ընտրությունը, որոնք հեռանկարային կարող են լինել պրոբիոտիկներ պարունակող նոր ֆունկցիոնալ սննդի ապրանքատեսակների արտադրության համար:

Անջատվել և ուսումնասիրվել են 77 կաթնաթթվային բակտերիաներ և 12 խմորասնկերի շտամներ: ԿԹԲ-ների նախնական ընտրությունը կատարվել է ըստ կաթի մերման ժամանակի որոշման: 17 ԿԹԲ-ներն օժտված են կաթի մերման բարձր արագությամբ (6-8 ժամ): Ինչպես ցույց են տվել մորֆոլոգիական հետազոտությունների արդյունքները, երեք նմուշներից անջատված բակտերիաները հիմնականում ներկայացված են գնդաձև (90%) և ցուպիկաձև (10%) մանրէներով: Անջատված մանրէների բոլոր շտամները հանդիսանում են գրամ-դրական, հոմոֆերմենտատիվ (n=66) և հետերոֆերմենտատիվ (n=11), տարբերվում են միմյանցից կատալազային ակտիվությամբ, ընդունակ են արգինինից ամոնիակ առաջացնել (n=18), հիմնականում ֆակուլտատիվ անաերոբ մանրէներ են, աճում են 37⁰C օպտիմալ ջերմաստիճանի պայմաններում: Որոշ մանրէներ (n=36) օժտված են հարաբերական բարձր ջերմակայունությամբ՝ կայուն են 65⁰C, 30 րոպե ջերմային մշակման հանդեպ: MRS հեղուկ սննդային միջավայրում NaCl-ի տարբեր քանակների հանդեպ անջատված ԿԹԲ-ների կայունության որոշումը ցույց է տվել, որ 1-ին և 2-րդ նմուշներից անջատված մանրէներն ավելի զգայուն են միջավայրի աղի տոկոսային (1-10%) պարունակության հանդեպ, քան 3-րդ նմուշից անջատված մանրէները:

Համեմատական մորֆոֆիզիոլոգիական, կենսաքիմիական հետազոտությունների հիման վրա ընտրվել են ԿԹԲ-ների թվով 28 շտամներ, որոնց վերնստվածքային հեղուկներն

ընդունակ են pH =6.0-ի պայմաններում ճնշել որոշ թեստ կուլտուրաների աճը (*Salmonella typhimurium* G-38 և *Bacillus subtilis* 17-89):

Ընտրված ԿԹԲ-ների զգայունության հետազոտությունը պեպսինի և տրիպսինի, լեդու տարբեր տոկոսային պարունակության, pH-ի լայն տիրույթի նկատմամբ, հակամանրէային ակտիվությունը, հակաբիոտիկների նկատմամբ ԿԹԲ-ների կայունությունը վկայում են այն մասին, որ ընտրված շտամներից որոշներն օժտված են պրոբիոտիկ հատկություններով:

Ֆունկցիոնալ սննդի արտադրատեսակների ստեղծման համար՝ ԿԹԲ-ների մայրական կուլտուրաների ստացման նպատակով, կատարվել է ընտրված ԿԹԲ-ների 28 շտամների համեմատական քննություն ըստ տեխնոլոգիական ցուցանիշների (համային, մակարդուկի տեսքի, բուրմունքի, տիտրվող թթվայնության), 37°C պայմաններում յուղազրկված և յուղայնությամբ (3.2%) կաթում աճեցման փուլի տևողության, հակամանրէային ակտիվության: Ըստ ստացված արդյունքների մանրէները ենթաբաժանվել են 12 խմբի: Վիճակագրական վերլուծությունը թույլ տվեց բացահայտել հավաստի տարբերություն խմբերի տեխնոլոգիական բնութագրերում՝ յուղազրկված և յուղայնությամբ կաթում, տարբեր հարաբերակցությամբ ջրով նոսրացված կաթի կիրառման դեպքում 8 ժամ (37°C) աճեցման պայմաններում: Ընտրվել են ԿԹԲ-ների *Lactobacillus pentosus* F85, *Lactobacillus plantarum* F81, *Lactobacillus plantarum* F15 մայրական կուլտուրաների համադրությունները: Եզրակացություն է արվել արդյունաբերական պայմաններում «Տիչալ»-ի արտադրման համար նշված համադրությունների կիրառման հնարավորության վերաբերյալ՝ որպես հակամանրէային հատկություններով օժտված մայրական կուլտուրաներ:

«Տիչալ»-ի 3 նմուշներից մեկուսացված 12 խմորասնկերի շտամները տարբերվում են միմյանցից գաղութների մորֆոլոգիայով: Դրանք ենթաբաժանվել են 6 խմբի: Ցույց է տրված, որ անջատված խմորասնկերից որոշները հակամանրէային հատկություններ են ցուցաբերում pH=6.0 պայմաններում՝ կախված սննդամիջավայրի բաղադրությունից, աճեցման ջերմաստիճանից և տևողությունից: Հետազոտվել են ընտրված խմորասնկերի շտամների գազագոյացման և բուրմունքի ձևավորման հնարավորությունները: *Kluyveromyces marxianus* FA25 և *Kluyveromyces marxianus* FA13 խմորասնկերի մոտ հակամանրէային հատկությունների, բուրմունքի, գազագոյացման առկայությունը հիմք է հանդիսանում դրանց հետագա հետազոտություններում օգտագործելու համար: Ընտրված ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի շտամների համատեղ աճեցումը յուղազրկված և 3.2% յուղայնությամբ կաթում և հեղուկ Սաբուռո սննդամիջավայրում ցույց է տվել, որ 8 ժամվա ընթացքում աճեցված նմուշները պահպանում է հակամանրէային հատկությունները, բուրմունքը, մակարդուկի տեսքը՝ սառնարանում +4°C ավելի քան 2 ամիս պահման դեպքում: Լավագույն արդյունքները ստացվել են ԿԹԲ-ների *Lactobacillus plantarum* F15, *Lactobacillus pentosus* F85 և *Kluyveromyces marxianus* FA13 խմորասնկի համատեղ աճեցման դեպքում: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի համատեղ աճեցման դեպքում աճեցման պայմանները (սննդամիջավայրի բաղադրություն, աճեցման փուլի տևողություն) ազդում են հակամանրէային ակտիվության դրսևորման վրա՝ նկատվում է թեստ կուլտուրաների աճի կասեցման արդյունավետության բարձրացում:

Մշակված է ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի համատեղ աճեցման հիման վրա հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված համակցված սննդամթերքի ստացման տեխնոլոգիան: Ստացված գիտա-արդյունաբերական տվյալները կարող են հիմք ծառայել նոր սերնդի ֆուկցիոնալ նշանակության սննդամթերքների ստացման, արդյունաբերական տեխնոլոգիայի ավելի խորը մշակման համար:

**STUDY OF IRANIAN TRADITIONAL FERMENTED DAIRY BEVERAGE “*RICHAL*”
AND INVESTIGATION OF ITS PRODUCTION POSSIBILITY**

SUMMARY

Key words: *Iranian traditional “Richal” beverage, lactic acid bacteria, yeasts, antimicrobial activity, probiotics, starter cultures, combined cultivation*

In recent years, special attention has been paid to the study of microflora of traditional fermented dairy products and creation of new products based on isolated bacteria (solitary or associated). This is one of the most practical and widespread methods for the preservation of microorganisms' biodiversity and use of their organoleptic and nutritive properties. In creating probiotics for treatment-and-prophylactic application, it is advisable to use common methods for selection of industrial strains by the criterion of antagonistic activity under conditions of cultivation of mixed populations close to the natural ecological ones.

The microflora of the used starters for manufacture of national products of different regions of Iran is insufficiently explored. In this context the isolation of LAB and yeasts from three different samples of the “*Richal*” beverage manufactured in natural farms of the Southern region of Iran (Kohgiluyeh region) (1-“*Richal*” Masti, 2-“*Richal*” Shiri, 3-“*Richal*” Dooghi), selection of LAB and yeasts prospective for manufacturing functional products containing probiotics are of interest.

77 strains of lactic acid bacteria and 12 strains of yeasts have been isolated and investigated. The primary selection of LAB was conducted by determination of the time of milk fermentation. 17 LAB strains had high rate of milk fermentation (6-8 hrs). According to the microscopic results, the bacteria isolated from three samples were mainly represented by cocci (90%) and rod-shaped bacteria (10%). All isolated bacteria strains were gram-positive, homofermentative (n=66) and heterofermentative (n=11), differed by catalase activity, formed ammonia from arginine (n=18), were mainly optional anaerobes, grew at optimal temperature of 37°C. Some had relatively high thermal stability (n=36), withstood 65°C for 30 min. Determination of resistance of isolated LAB to various content of NaCl in liquid MRS nutrient medium showed that the bacteria from samples 1 and 2 were more sensitive towards the salt percentage (1-10%) than the bacteria isolated from sample 3.

Based on the comparative morphophysiological and biochemical analyses, 28 LAB strains, supernatants of which at pH=6.0 inhibited the growth of some test cultures (*Salmonella typhimurium* G-38 and *Bacillus subtilis* 17-89) were selected.

Investigations on the sensitivity of the selected LAB to trypsin and pepsin, various concentrations of bile, pH range, availability of antimicrobial activity at pH=6.0, resistance to antibiotics proved that some of the selected LAB strains had probiotic properties.

To obtain starter cultures of LAB for creation of products of functional nutrition, screening of the selected 28 strains was carried out by technological parameters (taste, clot consistence, flavour, titrated acidity), time of growth at 37°C in skimmed and fat milk, preservation of antimicrobial properties. As a result, 12 groups were composed. Statistical analysis allowed to establish the true

difference between groups by technological parameters at 8-hour cultivation at 37 °C in skimmed and fat milk, at different ratios of watered milk. Combinations of LAB starter cultures (*Lactobacillus pentosus* F85, *Lactobacillus plantarum* F81, *Lactobacillus plantarum* F15) was used. It was concluded about the possibility to use these combinations as starter cultures with antimicrobial properties for production of beverage “*Richal*”.

The isolated 12 strains of yeasts from 3 samples of the product “*Richal*” differed by the colony morphology. They were divided into 6 groups. It was shown that some of the selected yeasts had antimicrobial properties at pH=6.0 depending on the growth medium composition, temperature and time of growth. The flavour-forming and gas-forming properties of the selected strains of yeasts were studied. Availability of flavour, gassing, antimicrobial properties of the selected strains of yeasts *Kluyveromyces marxianus* FA 25 и *Kluyveromyces marxianus* FA13 served the basis for further research. The combined growth of the selected LAB strains and yeasts in fat and skimmed milk and in Sabouraud’s liquid medium showed preservation of antimicrobial properties, flavour, texture of the obtained 8-hour grown product at more than two-month storage in a refrigerator (+4⁰ C). The best results were obtained at the combined growth of LAB (*Lactobacillus pentosus* F85 + *Lactobacillus plantarum* F15) and yeasts *Kluyveromyces marxianus* FA13. The obtained data showed that at the combined growth of bacteria and yeasts, the cultivation conditions (medium composition and time of growth) affected the display of antimicrobial activity – increase of efficiency of test culture growth inhibition was observed.

The technological scheme for production of a complex preparation with antimicrobial properties based on the combined LAB and yeasts growth has been developed. The obtained scientific production data may serve the basis for thorough elaboration of the production technology for obtaining products of functional assignment of a new generation.