

*На правах рукописи*

**ХОХЛАЧЕВА АЛЕКСАНДРА АЛЕКСЕЕВНА**

**КЕФИРНЫЕ ГРИБКИ КАК АССОЦИАТИВНАЯ КУЛЬТУРА  
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».

**Научный руководитель:** **Градова Нина Борисовна**  
доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Стоянова Лидия Григорьевна,**  
доктор биологических наук, кафедра  
микробиологии биологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова», ведущий  
научный сотрудник

**Лойко Наталия Геннадиевна,**  
кандидат биологических наук, Федеральное  
государственное учреждение «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные  
основы биотехнологии» Российской академии  
наук», научный сотрудник лаборатории  
выживаемости микроорганизмов

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования «Северо-  
Кавказский федеральный университет»,  
г. Ставрополь, кафедра прикладной  
биотехнологии

Защита состоится 8 декабря 2015 года в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.  
Тел.: 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Пискункова Нина Федоровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Доминирующей, наиболее устойчивой и метаболически активной формой существования микроорганизмов в природе и ряде техногенных систем являются эволюционно сложившиеся структурно оформленные микробные сообщества [Свирижев, Логофет, 1978, Заварзин, 2003]. Исследование закономерностей формирования и функционирования таких микробных сообществ имеет не только общебиологическое значение для познания разнообразия закономерностей объединения микроорганизмов в ассоциативные культуры, но и для реализации промышленного потенциала используемых в практике сообществ микроорганизмов, разработки способов их управления, а также для создания новых промышленно значимых консорциумов [Свирижев, Логофет, 1978, Заварзин, 2003; Каллистова и др., 2014; Артюхова, 2006; Котова, 2013]. Исследование закономерностей формирования состава и функционирования ассоциативных культур является приоритетным направлением при решении проблем управления качеством пищевых продуктов, в технологии получения которых используются сообщества микроорганизмов, вовлечения в хозяйственный оборот вторичных ресурсов, увеличения глубины переработки сырья, повышения экологичности технологических решений.

В настоящее время выявлены различные формы взаимоотношений микроорганизмов в сообществах, основанные на образовании специфических антибиотических веществ, на химической коммуникации и др. [Хмель, 2006; Журина и др., 2013; Панкрушина, 2002; Стоянова, 2008]. Однако основной формой взаимоотношения микроорганизмов в сообществах являются трофические.

В качестве модели для исследования механизмов формирования и функционирования сообществ микроорганизмов в работе была использована структурно оформленная стабильно функционирующая, эволюционно сложившаяся ассоциативная культура микроорганизмов – кефирные грибки (кефирные зерна). Кефирные зерна длительное время используются в промышленных условиях и в течение многих лет являются предметом изучения как отечественных, так и зарубежных исследователей: Королев С.А., Феофилова Е.П., Семенихина В.Ф., Фильчакова С.А., Елинов Н.П., Хамнаева Н.И., Тулемисова Ж.К., Хамагаева И.С., Суходолец В.В., Ларина О.Г., Рябцева С.А., Зипаев Д.В., Еникеев Р.Р., Козырева И.И., Arihara K., Bosch A., Abraham A.G., Garrote G.L., Rimada P.S., Chen H.-C.,

Lin C-W., Farnworth E.R., Jianzhong Z., Leite A.M.O., Simova E., Witthuhn R.C., Zajsek K. и др.

В основном исследования кефирных грибков направлены на повышение их продуктивности при практическом их использовании и на улучшение качества получаемого продукта. Однако остается много нерешенных вопросов касательно основной структурной организации сообщества кефирных грибков. Авторами показан различный микробный состав кефирных грибков, используемых на разных предприятиях, описано присутствие более 20 разных видов молочнокислых бактерий, около 20 видов дрожжей как использующих для брожения лактозу, так и не использующих ее, что не дает возможности разработать концептуальную модель, включающую исследование микробного состава и трофических взаимоотношений компонентов [Свирижев, Логофет, 1978] сложившегося сообщества кефирных зерен. Разработка такой модели расширит общие представления о возможной структуре сообществ микроорганизмов, является необходимой для создания новых экспериментальных сообществ и разработки способов управления стабильностью кефирных грибков и качеством получаемых продуктов.

Структурирующую роль в ассоциативной культуре кефирных грибков выполняет экзополисахарид кефиран, обладающий высокой биологической активностью, свойства которого определяют перспективу его использования в фармацевтической, пищевой, косметической промышленности, а также для получения биоразлагаемых пленок.

**Целью работы** является разработка концептуальной модели ассоциативной культуры микроорганизмов кефирных грибков (кефирных зерен) и определение их биотехнологического потенциала.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

- исследовать микробный профиль кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях;
- изучить трофические взаимоотношения между микробными компонентами сообщества и определить продуцентов данной системы;
- определить биотехнологический потенциал кефирных зерен, как продуцентов экзополисахаридов (ЭПС) кефирана.

**Научная новизна.**

На основании впервые проведенных систематических исследований микробного профиля кефирных грибков и их функциональной активности разработана концептуальная модель микробного сообщества кефирных грибков

и определены в качестве продуцента этой системы молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus sp.*

Показана идентичность состава доминирующих форм молочнокислых бактерий кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях, при использовании молекулярно-генетических методов (без выделения чистых культур).

Определены новые закономерности формирования структуры сообществ микроорганизмов, обеспечивающие их стабильность и функциональную активность. Показана регулирующая роль индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы молочнокислых бактерий в обеспечении стабильности микробного сообщества при изменении углеводного питания. Выявлено присутствие двух физиологических групп молочнокислых бактерий кефирных грибков, отличающихся способностью к синтезу фермента  $\beta$ -галактозидаза: - синтезирующие  $\beta$ -галактозидазу и осуществляющие молочнокислое брожение при использовании лактозы; и вторая группа - не синтезирующие  $\beta$ -галактозидазу и осуществляющие молочнокислое брожение при использовании глюкозы. Впервые показано отсутствие различий в микробном профиле и функциональной активности кефирных зерен, культивируемых в течение длительного времени (более 4-х лет) на безлактозном молоке по сравнению с нативным молоком, содержащем лактозу.

Выявлена способность разных видов молочнокислых бактерий синтезировать водорастворимые экзополисахариды по своей структуре идентичные ЭПС кефирану, но различающие по молекулярной массе.

#### **Практическая значимость.**

Разработана концептуальная модель микробного сообщества кефирных грибков, что является основой для разработки алгоритма направленного создания ассоциативной культуры кефирных грибков и управления их функционированием.

Показана возможность получения биологически активного пробиотического продукта при культивировании кефирных зерен без изменения их микробного профиля и функциональной активности на безлактозном молоке (содержащем продукты гидролиза лактозы), перспективного для диетического питания.

Разработан лабораторный режим получения до 3.5 г/л экзополисахаридов кефирана при культивировании *Leuconostoc mesenteroides* как на молочной сыворотке с добавлением сахарозы, так и на синтетической среде MRS с

сахарозой (заявка на патент 2015112611 РФ, МПК С12 Р 19/04). Обоснованы направления практического использования полученных полисахаридов.

**Апробация работы.** Основные положения работы и результаты исследований представлены на международных и всероссийских конференциях: на VI, VII и VIII Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011, 2013, 2015); на VI и IX Международных конгрессах молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2010» и «МКХТ-2013» (Москва, 2010, 2013); на XVI научной конференции отдела полимеров и композиционных материалов Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва, 2015).

**Публикации.** По материалам исследований опубликовано 11 печатных работ (из них 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ) и подана 1 заявка на патент.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, заключения, списка литературы и приложений. Библиографический список содержит 210 источников. Работа изложена на 167 страницах (основная часть – 147 стр., приложения – 20 стр.), включает 27 таблиц и 25 рисунков.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследований, показана научная новизна и практическая значимость работы.

**В главе 1 «Обзор литературы»** представлен анализ имеющихся данных о механизмах и общих закономерностях функционирования ассоциативных культур микроорганизмов; результаты исследований микробного состава сообщества кефирных грибков и выявленные основные трофические взаимоотношения между компонентами; данные о способности синтеза экзополисахарида кефирана молочнокислыми бактериями, его химической структуре и биологической активности.

**В главе 2 «Объекты и методы исследования»** описаны объекты исследований и методы, применяемые в работе.

Основными объектами исследований являлись кефирные грибки, применяемые при производстве кефира на молочных предприятиях г.Ставрополя (КГС), г. Гагарина (КГГ) и лиофилизированные кефирные грибки, используемые на предприятиях г. Москвы (КГМ) и г. Владикавказа (КГВ), а также культуры бактерий, выделенные в процессе работы из кефирных зерен.

Кефирные зерна культивировали на нативном молоке Parmalat 0.5% жир. (lac+), на молоке со сниженным содержанием лактозы (обработанном

ферментным препаратом галактозим «Легбиотех»,  $\text{Iac}^{\pm}$ ) и на молоке, не содержащем лактозы, Valio Zero Lactose, 1.5% жир. ( $\text{Iac}^{-}$ ). В качестве критериев оценки функциональной активности кефирных грибков и культур микроорганизмов, выделенных из них, использовали стандартные показатели, применяемые в молочной промышленности: образование сгустка и его характер, изменение рН среды, показатели титруемой кислотности молока, на основании которой рассчитывали количество образуемой молочной кислоты и количество сброженной лактозы [Ганина и др., 2002].

Микробный профиль кефирных зерен определяли классическими микробиологическими методами на основании выделения чистых культур высевом растертых кефирных грибков на твердые питательные среды с последующей их идентификацией методом 16S рРНК с учетом культурально-морфологических свойств, а также использовали метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) «без выделения чистых культур». DGGE проводили на базе МГУ им. М.В. Ломоносова, института микробиологии им. В.Н. Виноградского, Южно-Китайского Университета (Шанхай). Электронно-микроскопические исследования проводили на электронном микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония) и JSM 6510LV (JEOL, Япония) на базе ИБФМ им. Г.К.Скрябина и МГУ им М.В. Ломоносова.

$\beta$ -галактозидазную активность микроорганизмов определяли по их кислотообразующей способности [Ганина и др., 2002] и при использовании хромогенного субстрата X-Gal [Миллер, 1967].

Для скрининга культур, способных синтезировать экзополисахариды, использовали плотную питательную среду с красителем рутениевым красным [Ботина и др., 2010]. Для количественного определения экзополисахаридов использовали метод, основанный на выделении полисахаридов из культуральной жидкости переосаждением этиловым спиртом и их количественного определения фенол-серным методом (по лактозе) [Piermaria et al., 2008]. Структуру синтезированных экзополисахаридов определяли при использовании ИК-спектрального анализа на базе ФБГУН ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН. Определение молекулярной массы и термодинамических параметров ЭПС производили методом динамического и статистического светорассеивания на базе ИБХФ им. Н. М. Эмануэля РАН.

При получении количественных показателей исследования проводились в не менее трех биологических повторностях и использовались средние показатели.

### Глава 3. «РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ»

#### 3.1. Исследование микробного профиля кефирных грибков, культивируемых на нативном молоке (КГлас+)

При исследовании морфофизиологических свойств кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах, было показано, что они различались по размеру и упругости, что учитывалось при подготовке кефирных грибков для выделения микробных изолятов при их измельчении и растирании.

Анализ поверхности кефирных зерен с помощью сканирующей электронной микроскопии показал, что наружная поверхность и приповерхностный внутренний слой зерна представлены тесно переплетенными нитями палочковидных (длинных и изогнутых) бактерий, погруженных в полисахаридный матрикс. Такая организация является составной частью стромы грибка, позволяющая включать в себя и удерживать в иммобилизованном состоянии другие микроорганизмы (рис. 1 а).

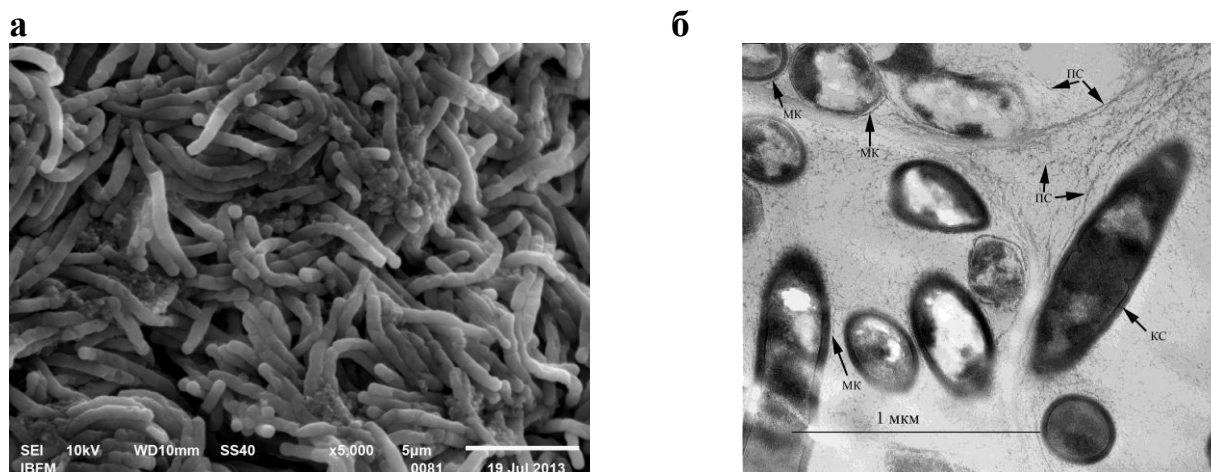


Рис. 1. Электронно-микроскопические исследования структуры кефирных грибков: **а** – сканирующая электронная микроскопия поверхности кефирных грибков, **б** – ультратонкие срезы кефирных грибков, где обозначения: КС – клеточная стенка; МК – микрокапсула; ПС – полисахаридные фибриллы.

При анализе ультратонких срезов кефирных грибков показано, что внутренняя область кефирного зерна заполнена фибриллярным матриксом полисахаридной природы, в котором локализованы крупные (до 5 мкм) и среднего размера клетки (как единичные, так и делящиеся) с типичным для грамположительных бактерий строением клеточной стенки. Внешняя поверхность клеточной стенки бактерий характеризуется наличием микрокапсулы, которая находится в тесном контакте с полисахаридным матриксом зерна (рис. 1 б).



При исследовании срезов кефирных грибков методом Life/Dead («живые/мертвые») при использовании световой микроскопии было отмечено, что наряду с живыми клетками в кефирном зерне присутствуют инактивированные клетки (рис. 2). Живые клетки локализованы в матрице инактивированных, что особенно характерно для бактериальных клеток, развивающихся на автолизатах дрожжей, что подтверждает роль дрожжей как источника ростовых факторов для молочнокислых бактерий.

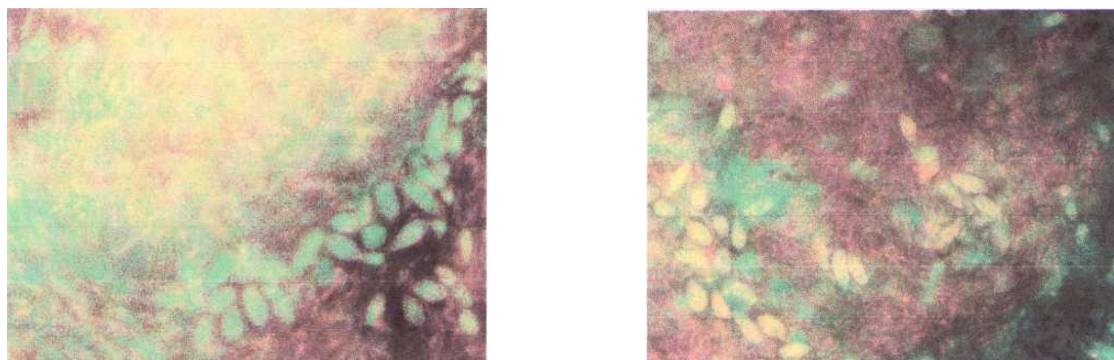


Рис. 2. Световая микроскопия срезов кефирных грибков, метод Life/Dead (живые клетки окрашены в зеленый цвет, мертвые – в красный).

При исследовании микробного профиля кефирных грибков было показано, что использование метода выделения чистых культур молочнокислых бактерий при их высеве на твердую среду не позволяет получить объективные результаты микробного профиля кефирных грибков в связи с однотипностью морфологии и малыми размерами их колоний. Так при использовании метода 16S рРНК анализа при первичном анализе изолятов было показано, что бактерии, выделенные из колоний с одинаковой морфологией, относились к разным морфологическим типам и видам (*Acetobacter fabarum*, *Lactococcus*) и наоборот, культуры, выделенные из казалось морфологически различающихся колоний, – относились к одному виду (*Lactococcus lactis*).

Исходя из этого, для определения микробного профиля молочнокислых бактерий кефирных грибков в настоящей работе был использован методический подход, основанный на выделении из рассевов кефирных грибков на твердой питательной среде изолятов, колонии которых морфологически имели даже незначительные различия, и определении их физиологических свойств и функциональной активности.

При сравнительной оценке микробного профиля кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах (КГС, КГГ, КГМ), при использовании классических микробиологических методов с выделением чистых культур (исследовано 80 изолятов) (табл. 1) и метода денатурирующего

градиентного геля электрофореза (DGGE), без выделения чистых культур (рис. 3), не выявлено различий среди доминирующих форм молочнокислых бактерий, исследованных кефирных грибков и культуральных жидкостей (заквасок) при их культивировании на молоке.

**Таблица 1 – Бактериальный профиль кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах**

Кефирные грибки (80 изолятов)		
КГС	КГГ	КГМ
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
<i>Lactobacillus sakei</i>		
<i>Lactobacillus sp.</i>		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		
<i>Leuconostoc gelidum</i>		
		<i>Lactobacillus kefir</i>

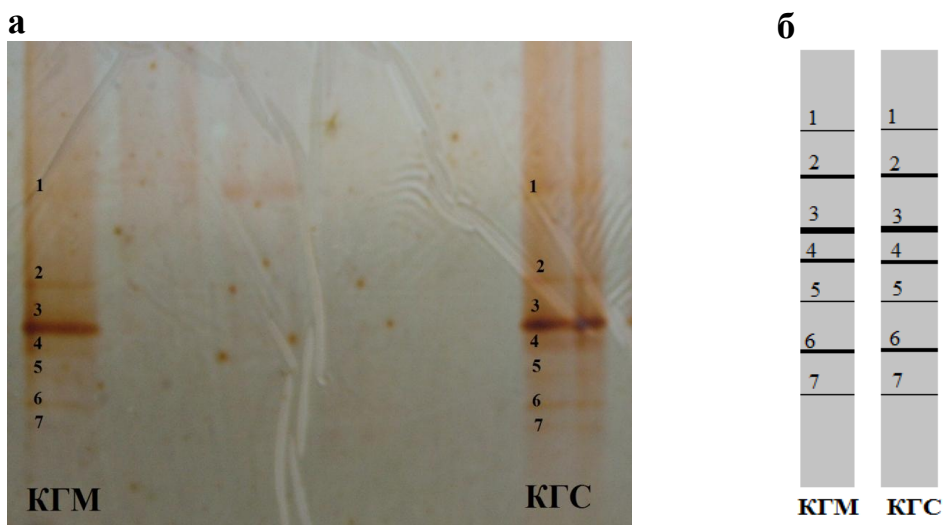


Рис. 3. DGGE бактериального профиля кефирных грибков КГМ и КГС:  
**а** – фореграмма DGGE, **б** – схема DGGE.

При исследовании трофических свойств микробных компонентов кефирных грибков показано, что молочнокислые бактерии представлены двумя физиологическими группами: (1) обладающие  $\beta$ -галактозидазной активностью, использующие лактозу для молочнокислого брожения; и (2) не обладающие  $\beta$ -галактозидазной активностью, а активно использующие глюкозу и галактозу для молочнокислого брожения (табл. 2).

Дрожжи, выделенные из исследованных кефирных грибков (55 изолятов), не обладали  $\beta$ -галактозидазной активностью, не использовали лактозу для спиртового брожения, а осуществляли активное спиртовое брожение при использовании глюкозы и с низкой активностью при использовании галактозы.

**Таблица 2 – Физиологическая активность бактериальных компонентов кефирного грибка при их культивировании на синтетических средах с различными источниками углерода**

Общее количество выделенных изолятов 33		Титруемая кислотность, °Т			$\beta$ -галактозидазная активность	
		лактоза	глюкоза	галактоза		
Из них, %	46	15	48	57	43	+
		31	25	51	28	+
	54	36	18	47	27	–
		18	18	40	18	–

Примечание:

«+» изоляты обладают  $\beta$ -галактозидазной активностью, то есть способны синтезировать фермент  $\beta$ -галактозидазу; «–» изоляты не обладают  $\beta$ -галактозидазной активностью, то есть не способны синтезировать фермент  $\beta$ -галактозидазу.

### **3.2. Определение функциональной активности и микробного профиля кефирных грибков (КГлас-), длительное время культивируемых на молоке, не содержащем лактозу**

Для выявления микроорганизмов продуцентов ассоциативной культуры кефирных грибков было исследовано влияние основного субстрата лактозы, поступающего в систему, на микробный профиль и функциональную активность кефирных грибков. Для этих целей был использован методический подход, основанный на предложенном С.Н. Виноградским методе накопительных культур, сравнении микробного профиля и функциональной активности кефирных грибков, культивируемых на нативном молоке (лас+) и молоке, в котором лактоза была гидролизована (лас-), но при этом сохранялось общее количество углеводов и не менялся состав других органических компонентов среды. Это предполагало возможность элиминирования из системы микроорганизмов, активно использующих лактозу для молочнокислого брожения.

При исследовании кефирных грибков, длительное время (более 4-х лет) культивируемых на молоке, не содержащем лактозы, не выявлено различий в функциональной активности (табл. 3) и их микробном профиле (табл. 4, рис.4) по сравнению с кефирными грибками, культивируемыми на нативном молоке.

Это объясняет присутствие в кефирных грибках микробных компонентов, способных синтезировать индуцибельный фермент  $\beta$ -галактозидазу, что позволяет изменять направленность метаболических процессов с использования лактозы на использование глюкозы, обеспечивая сохранение стабильности сообщества.

**Таблица 3 – Функциональная активность закваски КГлас+ и КГлас- (48 ч культивирования)**

год	закваска	Хар-р сгустка	pH	Титруемая кис-ть, °Т	Кол-во сброж. лактозы, г	Кол-во молочной кислоты, г
2010	лас+	++++	4.8	83	0.56	7.5
	лас-	++++	4.7	91	0.62	8.2
2011	лас+	++++	4.1	127	0.93	11.4
	лас-	++++	4.0	135	1.00	12.2
2012	лас+	++++	4.4	101	0.71	9.1
	лас-	++++	4.3	110	0.79	10.0
2013	лас+	++++	4.4	101	0.71	9.1
	лас-	++++	4.3	103	0.73	9.3
2014	лас+	++++	4.4	90	0.62	8.1
	лас-	++++	4.7	82	0.55	7.4

Примечание: «++++» – плотный однородный сгусток.

**Таблица 4 – Бактериальный профиль кефирных грибков КГлас- и КГлас+**

Основные фенотипические показатели	КГлас- (80 изолятов)		КГлас+ (73 изолята)	
	% ИЗОЛЯТОВ	ВИДЫ	% ИЗОЛЯТОВ	ВИДЫ
Обладают $\beta$ -гал., 40–100°Т	33	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus otakiensis</i>	30	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus otakiensis</i> <i>Lactobacillus sankii</i>
Обладают $\beta$ -гал., $\leq 38^\circ\text{T}$	35	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Не обладают $\beta$ -гал., 18°Т	32	<i>Acetobacter sp.</i>	48	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>

Длительное культивирование кефирных грибков на безлактозном молоке показало возможность использования кефирных грибков для получения

продуктов с пробиотическими свойствами не только на лактозе, но и других субстратах.

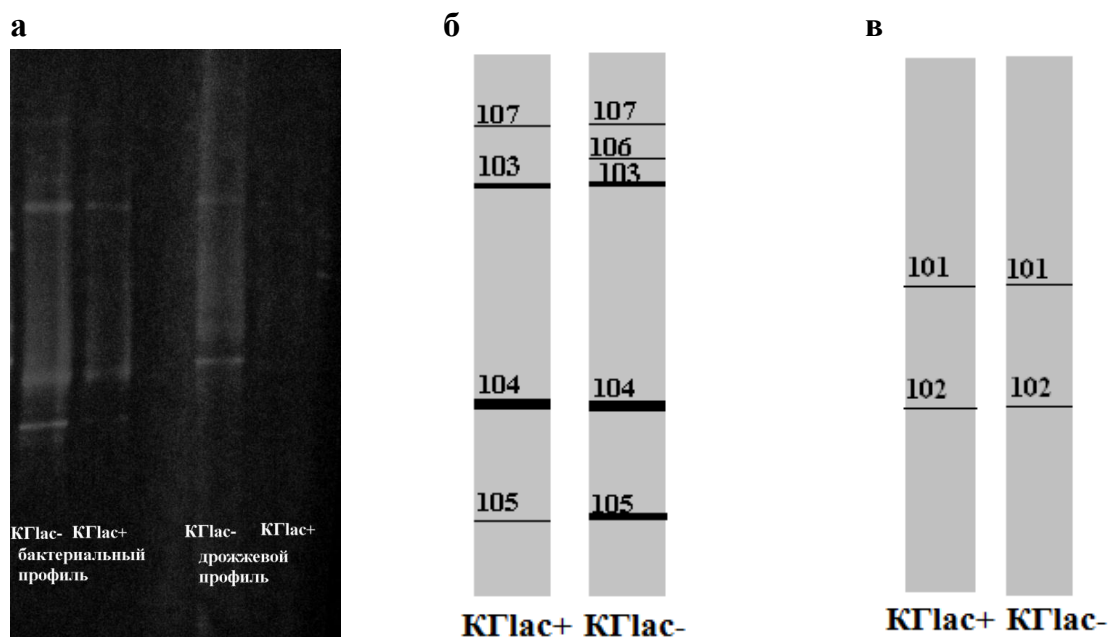


Рис. 4. DGGE микробного профиля кефирных грибов: КГЛас+ и КГЛас-, после 4-х лет культивирования (исследование проводили на базе лаборатории микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова): **а** – фореграмма DGGE; **б** – схема DGGE бактериального профиля; **в** – схема DGGE дрожжевого профиля.

### 3.3. Трофическая цепь ассоциативной культуры кефирных грибов

Результаты проведенных исследований позволяют охарактеризовать трофическую цепь и предложить функциональную модель микробного сообщества кефирных грибов (рис. 5).

Микробный состав и функциональные свойства кефирных грибов были предметом изучения на протяжении многих лет, в результате чего выявлены основные трофические потоки: молочнокислые бактерии, использующие лактозу, образующие молочную кислоту; дрожжи, использующие молочную кислоту в спиртовом брожении; уксуснокислые бактерии, использующие этанол [Феофилова, 1958; Фильчакова, 2005].

Подход, основанный на оценке физиологической активности выделенных изолятов молочнокислых бактерий, позволяет делать вывод, что продуцентом системы микробного сообщества кефирных грибов являются молочнокислые бактерии, относящиеся к первой физиологической группе, быстро закисляющие систему, обладающие  $\beta$ -галактозидазной активностью, активно использующие лактозу для молочнокислого брожения в микроаэрофильных условиях. Присутствие в системе нескольких видов функционально сходных молочнокислых бактерий, обладающих  $\beta$ -галактозидазной активностью,

определяет доминирование вида, кинетические характеристики которого более всего соответствуют складывающимся условиям в сообществе. Продуцентом системы является один из видов, обладающий наибольшей активностью использования лактозы в данных условиях, что подтверждается и в работе Хамнаевой Н.И. [Хамнаева, 2001]. Полученные данные показывают, что бактерии *Lactococcus lactis*, которые могут развиваться как при нейтральной реакции среды, так и при низком значении рН и уровне титруемой кислотности до 200°Т являются продуцентом данного сообщества. Используя лактозу для молочнокислого брожения, эти бактерии приводят к снижению рН среды ниже оптимального значения для их роста, что приводит к снижению активности их роста и повышению активности роста бактерий *p.Lactobacillus*, способных развиваться при более низких значениях рН [Определитель бактерий Берджи].

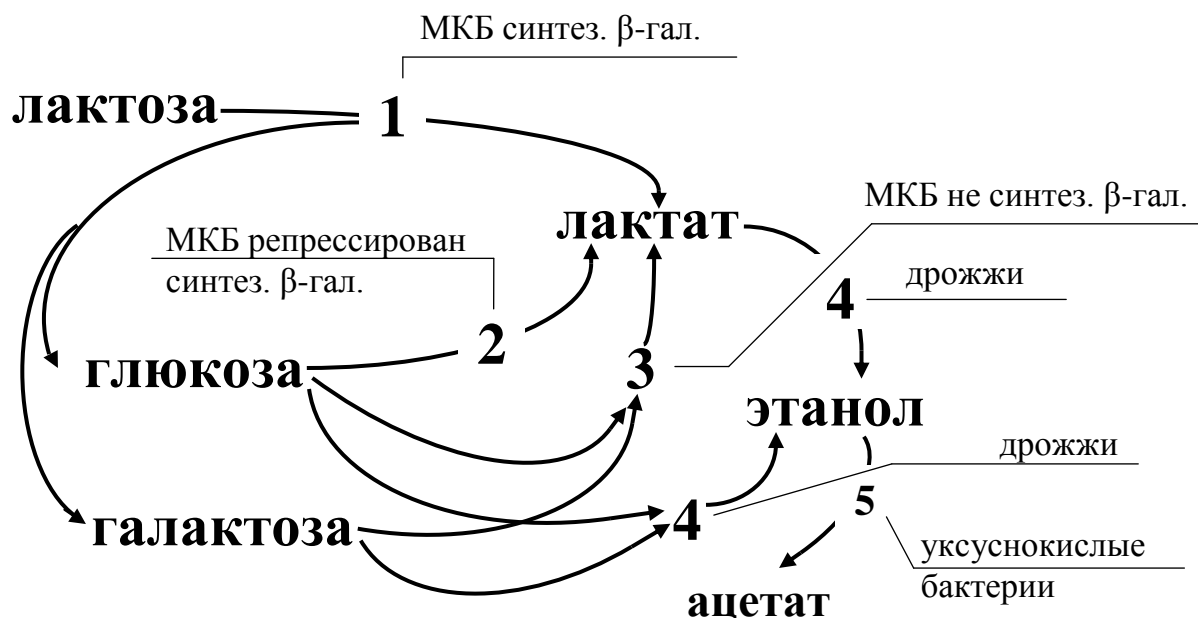


Рис. 5. Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен КГлас+ и КГлас-, где: **1** – молочнокислые бактерии, синтезирующие β-галактозидазу; **2** – молочнокислые бактерии группы 1, у которых синтез β-галактозидазы репрессирован глюкозой; **3** – молочнокислые бактерии не синтезирующие β-галактозидазу; **4** – дрожжи; **5** – уксуснокислые бактерии.

Присутствие в кефирных грибках микроорганизмов, не использующих лактозу для молочнокислого брожения, определяется возможностью выхода глюкозы и галактозы из клеток при транспорте лактозы в клетку и ее метаболизме [Молотов и др., 1994]. Бактерии второй физиологической группы, а также дрожжи в консорциуме кефирных грибков выполняют регуляторную функцию, удаляя из среды глюкозу, тем самым устраняют ее ингибирующее действие на синтез β-галактозидазы.

Роль дрожжей в микробном сообществе кефирных грибков заключается не только в использовании глюкозы, галактозы и молочной кислоты для спиртового брожения, но и в стимулировании роста бактериальных культур продуктами их метаболизма и автолиза. Образующийся спирт используется уксуснокислыми бактериями в аэробных условиях.

### **3.4. Кефирные грибки как продуценты экзополисахаридов**

ЭПС кефиран, продуцируемый кефирными грибами, является предметом практических исследований. Так в литературе описано несколько способов его получения: выделение путем термической обработки кефирных зерен [Рябцева, Маловичко, 2002; Zajsek et al., 2013]; культивирование чистых культур молочнокислых бактерий в оптимальных условиях для синтеза кефирана [Degeest et al., 2002; Cheirsilp et al., 2001; 2003; 2007; 2011].

При проведении скрининга полисахаридсинтезирующих молочнокислых бактерий компонентов кефирных грибков при использовании метода высева на твердую среду с красителем рутениевым красным показано, что около 60% из 119 выделенных изолятов способны синтезировать экзополисахариды (ЭПС). Было отобрано 9 изолятов, наиболее активно продуцирующих экзополисахариды.

Результаты определения функциональной активности отобранных культур показали, что они могут быть отнесены к двум разным физиологическим группам (табл. 5). Изоляты №№ 1–5 образуют плотный сгусток при росте на молоке и активно подкисляют среду. Вторая группа – изоляты №№ 6–9 не образуют сгустка при культивировании на молоке и в меньшей степени подкисляют среду.

При определении активности синтеза экзополисахаридов отобранными культурами при их культивировании на жидкой среде MRS с различными источниками углерода было показано, что культуры №№1–5, относящиеся к первой физиологической группе, синтезируют на среде с лактозой больше экзополисахаридов (0.24–0.30 г/л) по сравнению с культурами второй группы (0.08–0.20 г/л); культуры второй физиологической группы и культура №1 активно продуцируют полисахариды на среде с сахарозой.

На основании полученных результатов для дальнейшей работы были отобраны культура №1 из первой физиологической группы, как наиболее активный продуцент экзополисахаридов на среде с лактозой (до 0.30 г/л), и культура №6 из второй физиологической группы, продуцирующая наибольшее количество экзополисахаридов на среде с сахарозой (более 4.0 г/л),

соответственно идентифицированные как *Lactococcus lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*.

**Таблица 5 – Функциональная активность отобранных культур и активность синтеза ЭПС при культивировании их на среде MRS с разными источниками углерода и молочной сыворотке**

Куль- -ры	Функциональная активность			Концентрация ЭПС, г/л				
				Источники углерода				
	Обр-е сгустка	pH	Титр. кисл- ть, °Т	лактоза	глюкоза	галактоза	сахароза	МС
1	+	4.3	89	0.30	0.18	0.12	1.81	0.11
2	+	4.4	90	0.30	0.16	0.16	0.12	0.16
3	+	4.6	78	0.24	0.21	0.41	0.18	0.19
4	+	4.5	77	0.25	0.22	0.22	0.20	–
5	+	4.6	73	0.25	0.21	0.34	0.10	0.10
6	-	5.9	36	0.13	0.20	0.12	3.93	0.16
7	-	5.8	38	0.08	0.23	0.15	2.89	0.18
8	-	6.8	16	0.16	0.03	0.03	1.85	–
9	-	6.5	21	0.20	0.16	0.03	1.09	–

Примечание: «+» – изоляты способны образовывать сгусток на молоке, «-» – не способны образовывать сгусток на молоке, МС – молочная сыворотка.

При исследовании динамики роста и синтеза экзополисахаридов культурами *L.lactis* и *L.mesenteroides* показано, что ЭПС синтезируются в процессе их роста (рис.6).

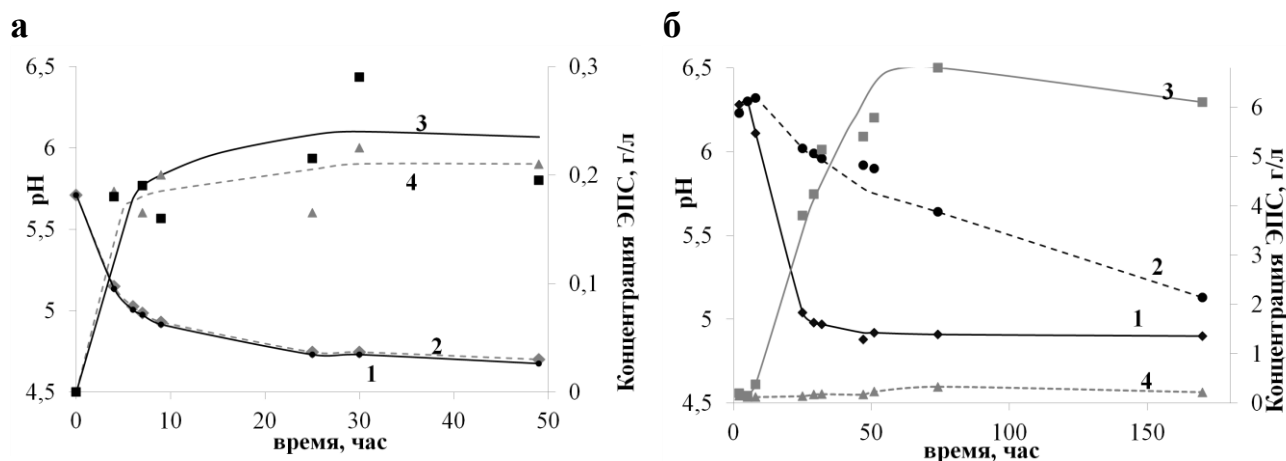


Рис. 6. Динамика роста и концентрации ЭПС при культивировании **а** – культуры *L.lactis*, **б** – *L.mesenteroides*, где кривые 1 и 3 соответствуют изменению pH и концентрации экзополисахаридов при культивировании на молочной сыворотке с добавлением сахарозы; кривые 2 и 4 – изменению pH и концентрации экзополисахаридов при культивировании на молочной сыворотке.



При использовании метода ИК-спектроскопии (рис. 7) установлено, что экзополисахариды, синтезируемые культурами *L.lactis* и *L.mesenteroides* на среде с лактозой и сахарозой, аналогичны по структуре экзополисахариду кефирану, синтезируемому кефирными грибами. Из сравнения полученных ИК-спектров очевидно, что образцы экзополисахаридов (№№ 1–4) по положению и интенсивности полос поглощения в ИК спектрах, практически, не отличаются.

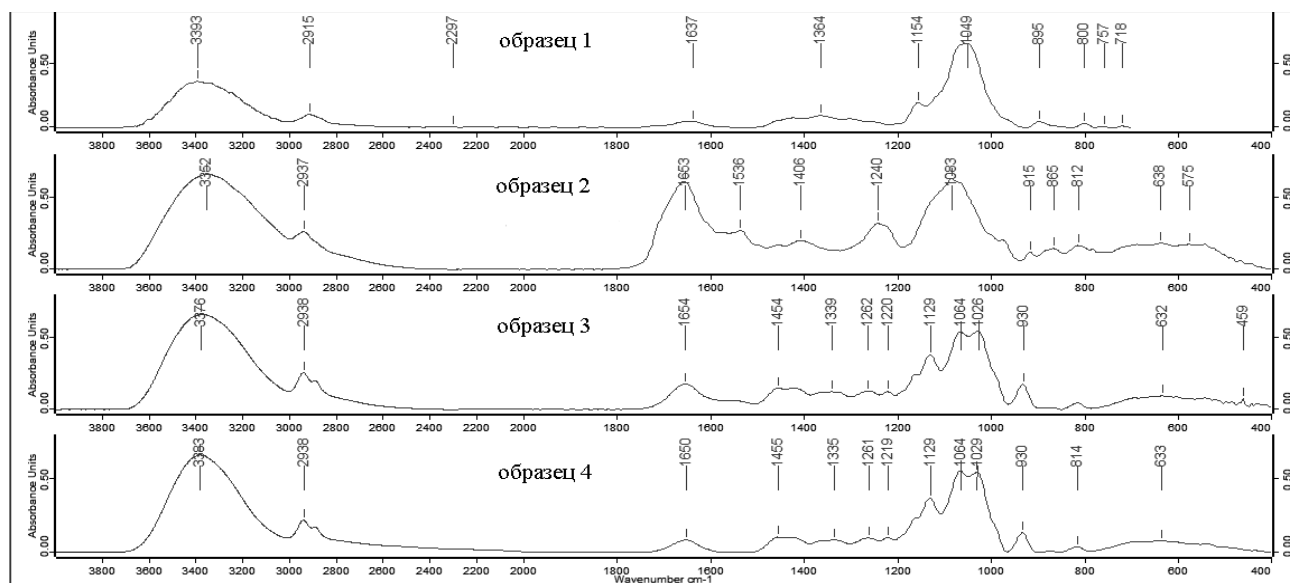


Рис. 7. ИК-спектры образцов: №1 – ЭПС из кефирного грибка; №2 – ЭПС, синтезированный культурой *L.lactis* на среде с лактозой; №3 – ЭПС, синтезированный культурой *L.mesenteroides* на среде с сахарозой; №4 – ЭПС, синтезированный культурой *L.lactis* на среде с сахарозой.

Разработаны режимы периодического и непрерывного (табл. 6) культивирования культуры *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с сахарозой и модифицированной среде MRS с сахарозой в условиях глубинного культивирования при постоянном pH и температуре, обеспечивающие уровень накопления ЭПС в среде до 3.5 г/л, что находится в пределах достигаемых концентраций ЭПС, описанных в литературе. Штамм *L.mesenteroides* депонирован в ВКПМ ФГУП ГосНИИгенетика.

При использовании метода динамического и статистического светорассеивания было показано различие молекулярных масс ЭПС, синтезированных чистой культурой *L.mesenteroides* и кефирными грибами, что определяет возможные направления их эффективного использования.

**Таблица 6 – Предлагаемый непрерывный режим культивирования  
молочнокислых бактерий *L. mesenteroides***

Состав среды культивирования	Модифицированная среда MRS
pH среды	6.0
Температура, t <sup>0</sup>	30 °С
Перемешивание	80 об/мин
Количество посевного материала	~ 3.5 · 10 <sup>9</sup> КОЕ/мл (10%)
Скорость протока (D)	~ 0.35 ч <sup>-1</sup>
Метод выделения ЭПС	Осаждение этанолом

### ВЫВОДЫ:

1. Исследована динамика роста и морфофизиологические свойства кефирных грибков, используемых на разных производствах. Не выявлено различий их функциональных свойств, отмечены различия их размеров и упругости, что учитывалось при растирании кефирных зерен при исследовании состава их микробного сообщества.

2. При использовании классических микробиологических методов с выделением чистых культур и их идентификации методом 16S рРНК определены доминирующие формы молочнокислых бактерий исследованных кефирных зерен: *L.lactis*, *L.mesenteroides*, *L.plantarum*, *L.sakei*, *Lactobacillus sp.* При этом выявлена трудность определения микробного профиля молочнокислых бактерий при использовании методов с выделением чистых культур ввиду мелкого размера схожих по морфологии их колоний и устойчивых симбиотических отношениях с дрожжами.

3. При сравнительной оценке микробного профиля кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах (КГС, КГГ, КГМ), и культуральных жидкостей (заквасок) при их культивировании на молоке при использовании метода денатурирующего градиентного гель электрофореза (DGGE) (без выделения чистых культур) не выявлено различий в микробном составе доминирующих форм микроорганизмов.

4. При исследовании трофических взаимоотношений микробных компонентов кефирных грибков:

- выявлено присутствие двух физиологических групп молочнокислых бактерии (исследовано 33 изолята). Бактерий, обладающих β-галактозидазной активностью, использующих лактозу для молочнокислого брожения; и бактерий, не обладающих β-галактозидазной активностью, активно использующих глюкозу и галактозу для молочнокислого брожения;

- показано, что выделенные дрожжи (55 изолятов) не обладали  $\beta$ -галактозидазной активностью, для спиртового брожения не использовали лактозу, а активно использовали глюкозу и с низкой активностью галактозу.

5. При исследовании микробного профиля и функциональной активности кефирных грибков, длительное время (более 4-х лет) культивируемых на молоке, не содержащем лактозы, не выявлено элиминирования из системы микроорганизмов, использующих лактозу. Не выявлено различий в микробном профиле и функциональной активности по сравнению с кефирными зернами, культивируемыми на нативном молоке. Это свидетельствует о роли индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы в саморегуляции активности микробного сообщества кефирных грибков.

6. Результаты скрининга микробных компонентов кефирных грибков (исследовано 119 изолятов), синтезирующих экзополисахариды, показали способность синтеза экзополисахаридов разными видами молочнокислых бактерий обеих физиологических групп. Отмечено повышение активности синтеза экзополисахаридов на среде с сахарозой молочнокислыми бактериями, способными сбрасывать сахарозу.

Отобраны культуры *L.lactis* и *L.mesenteroides*, как наиболее активные продуценты экзополисахаридов при культивировании их, соответственно, на среде с лактозой и сахарозой.

7. При исследовании динамики роста и синтеза экзополисахаридов культурами *L.lactis* и *L.mesenteroides* показано, что ЭПС синтезируются в процессе их роста. При использовании спектральных методов анализа установлено, что экзополисахариды, синтезируемые отобранными культурами, аналогичны по структуре экзополисахариду кефирану, синтезируемому кефирными грибами. А при использовании метода динамического и статистического светорассеивания показаны различия по их молекулярной массе.

8. Разработаны режимы периодического и непрерывного культивирования культуры *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с сахарозой и модифицированной среде MRS с сахарозой, обеспечивающие уровень накопления ЭПС в среде до 3.5 г/л.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК РФ:**

1. Градова Н.Б. Исследование микробного профиля структурированной ассоциативной культуры микроорганизмов – кефирных грибков / Н.Б. Градова,

А.А. Саранцева (**А.А. Хохлачева**) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – №5 (3). – С. 704–710. (ИФ РИНЦ – 0.151).

2. Саранцева А.А. (**Хохлачева А.А.**) Исследование трофических закономерностей функционирования ассоциативной культуры микроорганизмов – кефирного грибка / А.А. Саранцева, Н.Б. Градова, А.В. Мачулин // Известия Горского Государственного Аграрного Университета. – 2013. – Т. 50. – №4. – С. 265–272. (ИФ – нет).

3. Градова Н.Б. Микробные компоненты кефирных грибков, как продуценты экзополисахарида кефирана / Н.Б. Градова, **А.А. Хохлачева**, Е.Д. Мурзина, В.В. Мясоедова // Биотехнология. – 2014. – №6. – С. 18–26. (ИФ TR – 0.735).

4. **Хохлачева А.А.** Исследование микробного состава и функциональной активности культуральной жидкости кефирных грибков (закваски) / А.А. Хохлачева, М.А. Егорова, Н.Е. Сузина, Н. Б. Градова // Известия Горского Государственного Аграрного Университета. – 2015. – Т. 52. – Ч.1. – С. 228–234. (ИФ – нет).

5. **Хохлачева А.А.** Трофические закономерности функционирования и микробный профиль эволюционно сложившейся ассоциативной культуры кефирных зерен / А.А. Хохлачева, М.А. Егорова, А.Н. Калинина, Н.Б. Градова // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – №4. – С. 466–475. (ИФ РИНЦ – 0.789).

#### **Другие публикации и материалы конференций:**

6. Орлова Н.В. Влияние лактозы на функциональную активность ассоциативной культуры кефирных грибков / Н.В. Орлова, А.А. Саранцева (**А.А. Хохлачева**) // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. – 2010. – Т. XXIV. – №11(116). – С. 62–66.

7. Саранцева А.А. (**Хохлачева А.А.**) Разработка концептуальной модели структурированной ассоциативной культуры микроорганизмов – кефирных зёрен / А.А. Саранцева, Е.В. Бурмина // Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2011. – Ч.2. – С. 149–150.

8. Саранцева А.А. (**Хохлачева А.А.**) Исследование трофических связей микробных компонентов ассоциативной культуры кефирных грибков / А.А. Саранцева, Е.Д. Мурзина, Н.Б.Градова // Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2013. – Ч.2. – С. 68–69.

9. Саранцева А.А. (**Хохлачева А.А.**) Исследование кефирных грибков, как продуцентов полисахаридов / А.А. Саранцева, Е.Д. Мурзина, Н.Б.Градова // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. – 2013. – Т. XXVII. – № 9(149). – С. 22–25.

10. Мясоедова В.В. Влияние источника углерода на состав экзополисахаридов, продуцируемых микроорганизмами кефирных грибков / В.В. Мясоедова, Н.Б. Градова, **А.А. Хохлачева** // Полимеры 2015. Сборник трудов XVI Научной конференции отдела полимеров и композиционных материалов Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН. Москва. – 2015. – С. 36–38.

11. **Хохлачева А.А.** Разработка функциональной модели ассоциативной культуры микроорганизмов кефирных грибков / А.А. Хохлачева, Н.Б. Градова // Материалы VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2015. – Ч.1. – С. 427–428.

12. Заявка 2015112611 РФ, МПК C12 P 19/04. Способ получения экзополисахаридов кефирана / **Хохлачева А.А.**, Мурзина Е.Д., Градова Н.Б., Мясоедова В.В., Панфилов В.И. (РФ); заявитель ФГБОУ ВПО РХТУ им. Д.И. Менделеева; пат. поверенный Ветрова О.Б. – № 2015112611; заявл. 07.04.2015