

Е.А. ОЛЕЙНИКОВА, Л.Т. РАЙЫМБЕКОВА, А.Ж. АЛЫБАЕВА, А.К. АЙТЖАНОВА,  
М.Е. ЕЛУБАЕВА, Т.В. КУЗНЕЦОВА

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы

## **ВЛИЯНИЕ ЗЕРНОВЫХ И БОБОВЫХ ДОБАВОК НА АНТИБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИЙ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

### **Аннотация**

Исследовано влияние зерновых и бобовых добавок на антибактериальную активность двух ассоциаций молочнокислых микроорганизмов. Показана возможность повышения антагонистической активности ассоциаций молочнокислых микроорганизмов введением в обезжиренное молоко большинства добавок. Эффект зависел от температуры культивирования и тест-культуры. Полученные данные будут полезны в разработке функциональных кисломолочных продуктов питания, нормализующих кишечную микрофлору.

**Ключевые слова:** зерновые добавки, бобовые добавки, антибактериальная активность, молочнокислые микроорганизмы

Антагонистическая активность молочнокислых бактерий широко исследуется как с точки зрения защиты макроорганизма от патогенов и создания функциональных продуктов питания [1, 2], так и для предохранения продуктов питания от порчи [3-5]. Большая часть работ, касающихся антагонизма молочнокислых бактерий, посвящена отбору активных микроорганизмов из различных источников. Относительно возможности управления антагонизмом молочнокислых бактерий с помощью различных добавок к среде культивирования в литературе мало сведений [6, 7].

Целью настоящей работы было исследование возможности повышения антагонистической активности ассоциаций молочнокислых микроорганизмов с помощью пищевых, а именно зерновых и бобовых, добавок к молоку, на котором культивируются микроорганизмы.

### **Материалы и методы**

Для исследования антибактериальной активности были взяты отобранные ранее ассоциации молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей 10 и КГ, обладающие противогрибковой активностью в отношении тестовых культур условно-патогенных дрожжей рода *Candida*. В состав ассоциации 10 входят *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Saccharomyces sp.*; ассоциация КГ состоит из *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Candida kefir*.

В качестве тестовых культур взяты *Salmonella dublin* Т-4 (У), *Sarcina flava*, *S. Flava* Т-5 (У), *Escherichia coli*, *E. coli* (У), *Mycobacterium citreum*, I вакцина Ценковского.

Размолотые зерновые и бобовые добавки (горох, фасоль, соя, нут, маш, чечевица, рис, гречиха, ячмень, пшеница, овес, пшено, кукурузная крупа, сбор зерновых культур «Тамаша», ржано-пшеничная мука, отруби) вносили в обезжиренное молоко в количестве 1%. Посевы культивировали в течение 1 сут. при температурах 30° и 40°С. Антагонистическую активность ассоциаций определяли диффузионным методом лунок. Заквашенное молоко вносили в лунки диаметром 8 мм, подготовленные в газоне тест-культуры, в количестве 0,3 мл. Культивировали при 30° в течение 2 суток.

### **Результаты и их обсуждение**

Исследовано влияние различных добавок зерновых и бобовых культур на антибактериальную активность отобранных ассоциаций. Результаты исследований

представлены в таблицах 1 и 2.

При внесении в обезжиренное молоко зерновых и бобовых добавок у ассоциации 10, характеризующейся наличием антибактериальной активности только по отношению к двум штаммам *Sarcina flava*, был выявлен антагонизм и к другим тест-культурам. Ассоциация подавляла все исследованные бактериальные тесты при внесении всех добавок, лишь кукурузная крупа не влияла на антагонизм в отношении сальмонеллы, вакцины Ценковского и одного штамма кишечной палочки, а также *M. citreum* при 40°C. Добавка пшена при температуре 40°C также не стимулировала антагонистическую активность ассоциации. Активность же ассоциации по отношению к *S. flava* либо оставалась на том же уровне, как в контроле, либо незначительно снижалась при введении большинства добавок. Однако были выявлены и добавки, повышающие активность ассоциации в отношении этой культуры, особенно штамма Т-5 (У). При введении в обезжиренное молоко пшена и сои антагонистическая активность была наиболее выраженной при обеих температурах культивирования.

Ассоциация КГ в контроле проявляла невысокую активность в отношении пяти из семи исследованных бактериальных тестов. При введении зерновых и бобовых добавок ее активность значительно повышалась. Также выявлена активность в отношении вакцины Ценковского при обеих температурах культивирования и микобактерий - при 30°C. Лишь введение сои полностью подавляло активность ассоциации в отношении одного штамма сарцин как при 30° С так и при 40°C. При 40° С выявлено также отрицательное влияние добавок чечевицы, пшена и кукурузной крупы на антагонистическую активность в отношении *S. flava* Т-5 (У), сои и кукурузной крупы - сальмонеллы, а также гречихи - в отношении одного штамма кишечной палочки.

В результате исследования показана возможность повышения антагонистической активности ассоциаций молочнокислых микроорганизмов введением в обезжиренное молоко зерновых и бобовых добавок. Также выявлена неоднозначность воздействия вносимых добавок на антагонизм ассоциаций и зависимость эффекта от температуры культивирования и тест-культуры.

Данные о повышении антагонистической активности молочнокислых микроорганизмов введением пищевых добавок будут полезны при разработке функциональных кисломолочных продуктов питания, нормализующих кишечную микрофлору.

Таблица 1 - Влияние зерновых и бобовых добавок на антибактериальную активность ассоциации 10

Тест-культура	Зоны подавления роста тест-культур, мм (30 <sup>0</sup> С/40 <sup>0</sup> С)																
	Контроль	Горох	Фасоль	Соя	Нут	Маш	Чечевица	Пшеница	Овес	Гречиха	Ячмень	Рис	Пшено	Кукрузная крупа	«Тамаша» зерновой сбод.	Ржано-пшеничная мука	Отруби
<i>S. flava</i> Т-5 (У)	18/15	16/16	17/15	21/21	18/15	19/16	13/18	16/25	17/17	15/18	15/24	16/14	23/18	20/17	16/16	17/13	18/16
<i>S. flava</i>	20/16	16/14	17/19	19/15	17/15	18/14	13/17	13/20	10/14	15/14	14/14	14/11	17/17	16/13	26/15	10/21	15/16
<i>Salm. dublin</i> Т-4(У)	0/0	14/21	19/24	13/12	15/19	16/18	13/13	20/18	15/17	22/22	22/17	16/19	12/12	0/0	14/18	21/23	17/16
<i>E. coli</i> (У)	0/0	25/25	24/24	12/12	25/25	26/25	13/13	25/24	22/20	27/26	20/25	26/25	12/13	0/0	21/24	23/23	22/22
<i>E. coli</i>	0/0	15/26	25/23	22/17	27/20	25/17	15/16	28/20	25/14	24/25	25/25	26/27	23/15	25/15	26/20	25/20	26/24
<i>M. citreum</i>	0/0	15/27	14/24	19/17	19/18	19/17	13/16	12/19	15/14	12/20	15/12	10/23	17/15	17/0	16/13	11/13	13/23
I Вакцина Ценковског о	0/0	14/12	15/10	13/13	11/18	9/18	12/0	14/17	10/25	14/11	15/18	16/10	12/0	0/0	12/24	16/16	14/16

Таблица 2 - Влияние зерновых и бобовых добавок на антибактериальную активность ассоциации КГ

Тест-культура	Зоны подавления роста тест-культур, мм (30 <sup>0</sup> С/40 <sup>0</sup> С)																
	Контроль	Горох	Фасоль	Рис	Гречиха	Ячмень	Отруби	Пшеница	Ржано-пшеничная мука	«Тамаша» зерновой сбор	Овес	Нут	Маш	Чечевица	Пшено	Соя	Кукурузная крупа
<i>S. flava</i> T-5 (У)	13/10	28/24	26/22	24/23	23/20	20/22	26/20	24/16	27/22	22/25	22/26	24/21	23/24	16/0	10/0	0/0	14/0
<i>S. flava</i>	10/11	24/20	22/19	21/20	24/20	21/20	25/25	23/21	23/20	22/20	23/21	20/20	22/21	15/17	14/21	22/15	19/20
<i>Salm. dublin</i> T-4(У)	11/12	26/22	25/24	29/25	30/24	22/20	25/21	24/22	25/20	12/14	14/16	14/14	14/16	12/13	12/14	13/0	13/0
<i>E. coli</i> (У)	10/13	27/27	28/27	25/27	18/0	25/25	23/24	25/25	24/23	16/24	13/25	13/25	14/28	20/15	12/13	13/14	12/15
<i>E. coli</i>	10/12	25/26	20/13	24/20	26/25	25/26	23/22	27/23	22/20	16/14	16/14	14/14	15/17	12/15	14/15	13/17	12/18
<i>M. citreum</i>	0/0	20/0	25/0	22/0	26/0	22/0	29/0	27/0	27/0	15/0	17/0	15/0	18/0	24/0	24/0	25/0	26/0
I Вакцина Ценковск ого	0/0	20/25	22/13	15/20	17/25	24/25	22/20	20/20	23/18	18/14	18/20	18/16	17/17	14/18	14/18	16/17	12/16

### **Литература:**

- 1 Servin A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens // FEMS Microbiology Reviews. - 2004. - Vol. 28, №4. - P.405–440.
- 2 Pang G., XieJ., ChenQ., HuZ. How functional foods play critical roles in human health // Food Science and Human Wellness. - 2012. - Vol . 1, №1. - P. 26–60.
- 3 Ammor S., TauveronG., DufourE., ChevallierI. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds // Food Control. - 2006. - Vol . 17, №6. - P.454–461.
- 4 Gálvez A., Abriouel H., López R. L., Omar N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation // International Journal of Food Microbiology. - 2007. - Vol . 120, №1–2. - P.51–70.
- 5 Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review // Food Control. - 2010. - Vol .21,№4 . - P. 370–380.
- 6 Kouakou P.,Ghalfi H., Destain J., Dubois-Dauphin R., Evrard P., Thonart P. Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28 // Food Microbiology. - 2009. - Vol .26, №6. - P.623–628.
- 7 Castro M.P., Palavecino N.Z., Herman C., Garro O.A., Campos C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production // Meat Science. - 2011. - Vol .87, №4. - P.321–329.

### **Түйін**

Е.А. ОЛЕЙНИКОВА, Л.Т. РАЙЫМБЕКОВА, А.Ж. АЛЫБАЕВА,  
А.К. АЙТЖАНОВА, М.Е. ЕЛУБАЕВА, Т.В. КУЗНЕЦОВА

ҚР ҒБМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК

### **СҮТҚЫШҚЫЛДЫ МИКРООРГАНИЗМДЕР АССОЦИАЦИЯСЫНЫҢ БАКТЕРИЯҒА ҚАРСЫ БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ДӘНДІ ЖӘНЕ БҰРШАҚ ТҰҚЫМДАСТАРЫ ҚОСПАЛАРЫНЫҢ ӘСЕРІ**

Сүтқышқылды микроорганизмдердің екі ассоциациясына қосылған дәнді және бұршақ тұқымдастарының қоспаларының бактериалиялық белсенділікке әсері зерттелді. Майсыз сүтке түрлі қоспалар қосу арқылы сүтқышқылды микроорганизмдер ассоциациясының антагонистік белсенділігін жоғарылату мүмкіндігі көрсетілді. Қоспалардың әсері тест-культура мен температураға байланысты болатындығы анықталды. Алынған нәтижелер, асқазан-ішек микрофлорасын қалыптастыратын функционалды сүтқышқылды өнім өндіруде пайдасы оразан зор.

OLEINIKOVA Y.A., RAYIMBEKOVA L.T., ALYBAYEVA A. ZH., AITZHANOVA A.A.,  
YELUBAYEVA M. E., KUZNETSOVA T.V.

Republic State Enterprise «Institute of Microbiology and Virology» Science Committee,  
Ministry of Sci. and Ed., Republic of Kazakhstan, Almaty

### **EFFECT OF GRAIN AND BEAN ADDITIONS ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ASSOCIATIONS OF LACTIC ACID MICROORGANISMS**

#### **Summary**

The effect of grain and legume supplements on the antibacterial activity of two associations of lactic acid microorganisms was investigated. The possibility of increasing the antagonistic activity of

associations of lactic acid microorganisms by introduction in skim milk the majority of studied additives was shown. However, an effect depended on the temperature of cultivation and test culture. The data obtained will be useful in the development of functional dairy foods, normalizing the intestinal microflora.

**Key words:** antibacterial activity, lactic acid, microorganisms

### **Introduction**

The antagonistic activity of lactic acid bacteria are widely studied both from the point of view of protecting the microorganism from pathogens and development of functional foods [1, 2], as well as for prevention food from spoiling [3-5]. The most of the works relating to the antagonism of lactic acid bacteria is devoted to the selection of active microorganisms from different sources. Few studies presented in the literature concerning the possibility of control lactobacilli antagonism using various additives to the culture medium [6, 7].

The aim of the present work was to study the possibility of increasing the antagonistic activity of associations of lactic acid microorganisms by means of food additives, namely cereals and legumes, to the milk, in which microorganisms were cultivated.

### **Subjects and methods of investigation**

Earlier selected associations 10 and KG of lactic acid bacteria and lactose fermenting yeast, possessing antifungal activity against opportunistic yeast *Candida*, were taken to study the antibacterial activity. The association 10 consists of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Saccharomyces sp.*; association KG includes *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Candida kefyr*.

*Salmonella dublin* T-4 (U), *Sarcina flava*, *S. flava* T-5 (U), *Escherichia coli*, *E. coli* (U), *Mycobacterium citreum*, 1<sup>st</sup> Tsenkovsky vaccine were taken as a test cultures.

Milled grains and legumes supplements (peas, haricot, soybeans, chickpeas, mung beans, lentils, rice, buckwheat, barley, wheat, oats, millet, corn grits, mixture of crops "Tamasha", rye-wheat flour, bran) were added to skim milk in an amount of 1%. Cultures were grown for 1 day at temperatures 30° and 40° C. Antagonistic activity of associations were determined by well diffusion assay. Fermented milk was added in amount of 0.3 ml in 8 mm wells prepared in the lawn test culture. Cultures were grown at 30° C for 2 days.

### **Results and Discussion**

The effect of various additives of cereals and legumes on the antibacterial activity of selected associations was investigated. The research results are shown in the Tables 1 and 2.

Association 10 had antagonistic activity only against two strains of *Sarcina flava* when cultured in milk without additives. When cereals and legumes were supplemented in low-fat milk, the association showed activity against other test cultures too. The association inhibited all used tests with adding of each supplement except corn grits. Addition of corn grits had no effect on the antagonism against salmonella, Tsenkovsky vaccine, and one strain of *E. coli*, as well as against *M. citreum* at 40°C.

The addition of millet at 40 ° C also did not stimulate the antagonistic activity of the association.

The activity towards *S. flava* remained at the same level as in the control or slightly decreased with the majority of additives. However, some additives that enhance the association activity in respect of *S. flava*, especially the strain T-5 (U), have been identified. The antagonistic activity was most pronounced with the introduction of wheat and soybeans in low-fat milk at both temperatures of cultivation.

KG association showed low activity against five of the seven studied bacterial tests when cultivated in the control medium. But its activity significantly increased with the introduction of grain and legume supplementations. The activity against Tsenkovsky vaccine at both temperatures of cultivation was also found. Mycobacteria were suppressed at 30°C. Only a single

supplement of soy beans completely inhibited the association activity in respect of one strain of *Sarcina* at 30° and 40° C. A negative influence of the additions of lentils, millet and corn grits on antagonistic activity against *S. flava* T-5 (U), soybean and corn grits - towards *Salmonella*, and buckwheat - against one *E. coli* strain was also found at 40° C.

The study demonstrated the possibility of increasing the antagonistic activity of associations of lactic acid microorganisms by introduction to skimmed milk cereal and legume supplements. It was also revealed that the impact of introduced additives on the antagonism of associations was ambiguous and depended on temperature and test culture.

Data on increasing the antagonistic activity of lactic acid microorganisms by introduction of food supplements will be useful in the development of functional dairy foods, normalizing the intestinal microflora.

Table 1 - The influence of grain and legume supplements on the antibacterial activity of the association 10

Test culture	Zones of inhibition test cultures, mm (30°C/40°C)																
	Control	Peas	Haricot	Soybeans	Chick peas	Mung beans	Lentil	Wheat	Oat	Buckwheat	Barley	Rice	Millet	Corn grits	«Tamasha» crops	Rye-wheat flour	Bran
<i>S. flava</i> T-5 (U)	18/1 5	16/1 6	17/1 5	21/2 1	18/1 5	19/1 6	13/1 8	16/2 5	17/17	15/18	15/24	16/14	23/18	20/17	16/16	17/13	18/16
<i>S. flava</i>	20/1 6	16/1 4	17/1 9	19/1 5	17/1 5	18/1 4	13/1 7	13/2 0	10/14	15/14	14/14	14/11	17/17	16/13	26/15	10/21	15/16
<i>Salm. dublin</i> T-4(U)	0/0	14/2 1	19/2 4	13/1 2	15/1 9	16/1 8	13/1 3	20/1 8	15/17	22/22	22/17	16/19	12/12	0/0	14/18	21/23	17/16
<i>E. coli</i> (U)	0/0	25/2 5	24/2 4	12/1 2	25/2 5	26/2 5	13/1 3	25/2 4	22/20	27/26	20/25	26/25	12/13	0/0	21/24	23/23	22/22
<i>E. coli</i>	0/0	15/2 6	25/2 3	22/1 7	27/2 0	25/1 7	15/1 6	28/2 0	25/14	24/25	25/25	26/27	23/15	25/15	26/20	25/20	26/24
<i>M. citreum</i>	0/0	15/2 7	14/2 4	19/1 7	19/1 8	19/1 7	13/1 6	12/1 9	15/14	12/20	15/12	10/23	17/15	17/0	16/13	11/13	13/23
1-st Tsenkovsky vaccine	0/0	14/1 2	15/1 0	13/1 3	11/1 8	9/18	12/0	14/1 7	10/25	14/11	15/18	16/10	12/0	0/0	12/24	16/16	14/16



Table 2 - The influence of grain and legume supplements on the antibacterial activity of the association KG

Test culture	Zones of inhibition test cultures, mm (30°C/40°C)																
	Control	Peas	Haricot	Soybeans	Chick peas	Mung beans	Lentil	Wheat	Oat	Buckwheat	Barley	Rice	Millet	Corn grits	«Tamasha» crops mixture	Rye-wheat flour	Bran
<i>S. flava</i> T-5 (Y)	13/1 0	28/24	26/22	24/23	23/20	20/2 2	26/20	24/16	27/22	22/25	22/26	24/2 1	23/2 4	16/0	10/0	0/0	14/0
<i>S. flava</i>	10/1 1	24/20	22/19	21/20	24/20	21/2 0	25/25	23/21	23/20	22/20	23/21	20/2 0	22/2 1	15/1 7	14/21	22/1 5	19/2 0
<i>Salm. dublin</i> T-4(Y)	11/1 2	26/22	25/24	29/25	30/24	22/2 0	25/21	24/22	25/20	12/14	14/16	14/1 4	14/1 6	12/1 3	12/14	13/0	13/0
<i>E. coli</i> (Y)	10/1 3	27/27	28/27	25/27	18/0	25/2 5	23/24	25/25	24/23	16/24	13/25	13/2 5	14/2 8	20/1 5	12/13	13/1 4	12/1 5
<i>E. coli</i>	10/1 2	25/26	20/13	24/20	26/25	25/2 6	23/22	27/23	22/20	16/14	16/14	14/1 4	15/1 7	12/1 5	14/15	13/1 7	12/1 8
<i>M. citreum</i>	0/0	20/0	25/0	22/0	26/0	22/0	29/0	27/0	27/0	15/0	17/0	15/0	18/0	24/0	24/0	25/0	26/0
1-st Tsenkovsk y vaccine	0/0	20/25	22/13	15/20	17/25	24/2 5	22/20	20/20	23/18	18/14	18/20	18/1 6	17/1 7	14/1 8	14/18	16/1 7	12/1 6

### References:

- 1 Servin A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens // FEMS Microbiology Reviews. - 2004. - Vol.28, №4. - P.405–440.
- 2 Pang G., Xie J., Chen Q., Hu Z. How functional foods play critical roles in human health // Food Science and Human Wellness. - 2012. - Vol.1, №1. - P.26–60.
- 3 Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds // Food Control. - 2006. - Vol.17, №6. - P. 454–461.
- 4 Gálvez A., Abriouel H., López R. L., Omar N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation // International Journal of Food Microbiology. - 2007. - Vol.120, №1–2. - P. 51–70.
- 5 Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review // Food Control. - 2010. - Vol.21, №4. - P.370–380.
- 6 Kouakou P., Ghalfi H., Destain J., Dubois-Dauphin R., Evrard P., Thonart P. Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28 // Food Microbiology. - 2009. - Vol.26, №6. - P. 623–628.
- 7 Castro M.P., Palavecino N.Z., Herman C., Garro O.A., Campos C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production // Meat Science. - 2011. - Vol.87, №4. - P.321–329.