

БІОЛОГІЧНІ Й ТЕХНОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

М.О. Шугай, к.б.н., с.н.с.,
Н.А. Чорна, н.с.,

Інститут продовольчих ресурсів НААН

*Статтю присвячено дослідженню біологічних і технологічних властивостей селекціонованих з природних субстратів штамів молочнокислих бактерій (МКБ). На основі фенотипових і метаболічних характеристик визначено таксономічне положення лактобактерій – десять штамів віднесено до виду *L. casei*, один – до *L. acidophilus*. Культури характеризувались високим рівнем антагоністичної активності до умовно патогенної мікрофлори – їх метаболіти спричиняли утворення стерильних зон на газонах тест-культур діаметром від 18 мм до 25 мм.*

Визначено важливі для виробництва властивості культур: активність кислотоутворення, граничну кислотність, термо- і солестійкість, протеолітичну активність, рівень збереження життєздатності за умов ліофільного висушування.

Нові штами лактобактерій можуть бути використані у складі заквасок чи як захисні культури для виробництва молочних ферментованих продуктів, у тому числі сичужних сирів.

Ключові слова: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, селекція, технологічні властивості.

BIOLOGICAL AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF NEW STRAINS OF LACTOBACILLI

M. Shugai, Ph.D.Biology,
N. Tshorna, res. worker,

Food Resources Institute NAAS

*This article is dedicated to the biological and technological properties of selected substrates from natural strains of lactic acid bacteria (LAB). There are ten species classified as *L. casei* and one - as *L. acidophilus* on the basis of phenotypic and metabolic characteristics *Lactobacillus* defined taxonomic position. The cultures were characterized by high antagonistic activity to conditionally pathogenic. Their metabolites formed sterile zones on lawns test cultures diameter from 18 mm to 25 mm.*

Characteristics of cultures important for production (the activity and limit of acidity, stability for temperature and for salt, proteolytic activity, level preservation viability under conditions of freeze-drying) were identified.

New strains of lactic acid bacteria can be used as a part of sourdough or as protective culture for production of fermented dairy products, including cheese.

Key words: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, selection, technological properties.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

М.А. Шугай, к.б.н., с.н.с.,

Н.А. Чорна, н.с.,

Институт продовольственных ресурсов НААН

*Статья посвящена исследованию биологических и технологических свойств селекционированных из природных субстратов штаммов молочнокислых бактерий (МКБ). На основании фенотипических и метаболических характеристик определено таксономическое положение лактобактерий – десять штаммов отнесено к виду *L. casei*, один – к *L. acidophilus*. Культуры характеризовались высоким уровнем антагонистической активности по отношению к условно патогенной микрофлоре – под действием их метаболитов на газонах тест-культур появлялись стерильные зоны диаметром от 18 мм до 25 мм.*

Определены важные для производства свойства культур: активность кислотообразования, граничная кислотность, термо- и солеустойчивость, протеолитическая активность, уровень сохранения жизнеспособности в условиях лиофильной сушки.

Новые штаммы лактобактерий могут быть использованы в составе заквасок, или как защитные культуры, для получения молочных ферментированных продуктов, в том числе сычужных сыров.

Ключовые слова: *Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, селекция, технологические свойства.*

Упродовж тисячоліть людина використовувала молочнокисле бродіння для зберігання сільськогосподарської продукції. Згодом було встановлено, що ключову роль у процесах ферментації молока, м'яса та рослинної сировини відіграють лактобактерії. Протягом останніх десятиліть знання щодо властивостей МКБ та їх функцій у різноманітних біотехнологічних системах значно розширилися. Встановлено, що ці мікроорганізми є продуцентами багатьох біологічно активних речовин – органічних кислот, бактеріоцинів, ферментів, вітамінів та ін.

Якщо раніше ферментування здійснювалось за рахунок наявної в сировині спонтанної молочнокислої мікрофлори, то нині, з виникненням нових методів досліджень, з'явилась можливість проводити цілеспрямовану селекцію лактобактерій за спектром ознак, необхідних для отримання того чи іншого продукту із заданими властивостями й належної якості, який задовольняв би запити споживачів.

Під час селекції нових промислово цінних штамів лактобактерій звертають увагу на такі критерії: висока енергія кислотоутворення, антагонізм до патогенної й умовно патогенної мікрофлори, фагостійкість, здатність до синтезу ароматичних сполук. При цьому штам має характеризуватись високою швидкістю росту і синтезувати необхідні метаболіти у достатній кількості.

Для використання в промисловості культура має характеризуватись генетичною однорідністю і стабільністю властивостей, що забезпечить необхідну спрямованість процесу виробництва продукту [1]. Цінними вважаються штами, які незалежно від зовнішніх факторів, наприклад, складу поживного середовища, температури, тривалий час зберігають біохімічну активність.

Важливими є вимоги, продиктовані технологією виробництва того чи іншого продукту, або визначаються його властивостями. Наприклад, відбір культур для виробництва сиру проводять за ознаками соле- і термостійкості, помірної протеолітичної активності без утворення гірких пептидів, достатнього рівня синерезису молочного згустку.

Мета даної роботи – виділити чисті культури лактобактерій з природних субстратів, визначити їх видову належність, дослідити біологічні особливості та важливі для виробництва властивості.

Матеріали та методи досліджень.

Вилучення МКБ проводили з самоквасних кисломолочних продуктів (кисляку, сметани, кисломолочного сиру) з добрими смаковими якостями, отриманих на основі коров'ячого молока в домашніх умовах. Чисті культури лактобактерій отримували методом десятикратних розведень з окремих колоній. Висів проводили на середовища – агаризоване MRS, агар з гідролізованим молоком (ГА) та ГА з цитратом кальцію. Чашки з засіяними середовищами культивували упродовж трьох діб за температур 37 і 30 °С. Чисті культури МКБ підтримували шляхом субкультивування у відновленому знежиреному стерильному молоці, між пересівами зберігали за температури холодильника. Чистоту культур контролювали мікроскопіюванням.

Таксономічне положення штамів визначали за ідентифікаційними ключами Bergey [2].

Кислотоутворення оцінювали за активною і титрованою кислотністю, культивуючи штами у стерильному знежиреному молоці. Титровану кислотність молочних згустків визначали згідно з ГОСТ 3624-92, активну кислотність – потенціометрично за допомогою електронного рН-метра згідно з ГОСТ 3224-84, молокозгортальну активність – за кількістю часу, необхідного для утворення згустка. Синеретичні властивості визначали згідно з [3].

Рівень антагоністичної активності МКБ щодо сторонньої мікрофлори досліджували методом "дифузії з лунок" [4]. Як тест-культури використали штами *E. coli*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *Penicillium* spp., *Candida* spp., вилучені під час проведення моніторингу мікробіологічної якості вітчизняних сирів. Інтенсивність антагоністичної активності оцінювали за діаметром зон відсутності росту тест-культури навколо лунок з метаболітами МКБ. Контролями слугували лунки (K_1) зі стерильними середовищами, у яких культивували тестовані штами лактобактерій. Крім цього, для виявлення антагоністичного впливу інших, ніж молочна кислота факторів, до контрольних лунок (K_2) вносили стерильний розчин молочної кислоти (рН 3,7). Протеолітичну здатність лактобактерій визначали на агарі Ейкмана, стійкість до солі й температури – згідно з [5] у гідролізованому знежиреному молоці за 55 °С та з додаванням хлориду натрію у концентраціях 3 % і 6 %.

Вакуум-сублімаційне сушіння культур здійснювали на сушарці ТГ-15. Дана модель сушарки передбачає попереднє заморожування біомаси за температури мінус 40 °С. Процес сушіння розпочинається за температури мінус 30 °С. У перші три години сушіння температуру підвищують щогодини на 10 °С, доводячи її до 0 °С. Потім щогодини підігрівують на 5 °С. Кінець сушіння визначають за досягненням температури 30 °С на датчиках. Упродовж наступних 4-6 годин біомасу досушують.

Для сушіння культури нарощували у стерильному відновленому знежиреному молоці до початку стаціонарної фази, змішували з захисним середовищем (сахарозо-цитратним) у співвідношенні 1:2, охолоджували та розливали у стерильні флакони по 1 см³. Обчислення рівня збереження життєздатних клітин після сублімаційного сушіння (N) проводили згідно з [6] за формулою:

$$N = \frac{\lg N_2}{\lg N_1} \cdot 100\%, \text{ де}$$

N_1 – чисельність клітин до висушування біомаси з захисним середовищем, КУО/см³;

N_2 – чисельність клітин після висушування біомаси з захисним середовищем, КУО/см³. (До початкового об'єму сухої біомаси доводили фізіологічним розчином).

Результати та їх обговорення

Нові штами лактобактерій отримували на основі чистих культур мікроорганізмів. Первинний відбір проводили за здатністю мікроорганізмів стабільно репродукуватись у стерильному знежиреному молоці з утворенням прийнятеного за органолептичними показниками згустку. Штами, які втрачали молокозгортальну активність вилучали.

Відбирали культури з високою й помірною активністю кислотоутворення, що утворювали не більше як за дві доби культивування однорідні згустки приємного кисломолочного смаку. Про належність ізолятів до МКБ робили висновок на підставі позитивної реакції клітин при фарбуванні за Грамом, за ознаками відсутності рухливості, а також нездатністю до спороутворення й синтезу каталази.

Дуже бажаною властивістю нових штамів є висока антагоністична активність до патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів. Цю природну здатність лактобактерій можна розглядати як важливу їх технологічну характеристику. Адже залучення до складу закваски активних культур-антагоністів сторонньої мікрофлори дозволяє поліпшити мікробіологічні показники якості продукту, подовжити термін його зберігання. Тому наступним етапом дослідної роботи стало визначення антагоністичних властивостей лактобактерій. За результатами дослідів зроблено висновок, що за даною ознакою кокові форми МКБ значно поступаються представникам роду *Lactobacillus*. Водночас серед лактобацил відмічено наявність штамів з низьким, помірним і високим ступенем антагонізму до використаних тест-культур.

До подальшої роботи залучили одинадцять штамів високоактивних лактобацил-антагоністів, метаболіти яких спричиняли утворення стерильних зон навколо лунок з тест-культурами діаметром не менше ніж 18 мм (див. табл. 1). Відсутність стерильних зон навколо контрольних лунок з молочною кислотою (К₂) дозволила зробити висновок, що пригнічувальний вплив лактобактерій на розвиток тест-культур обумовлений дією інших, ніж молочна кислота чинників.

Таблиця 1

Антагоністична активність штамів *Lactobacillus* spp.

Вид МКБ	Величина зон затримки росту тест-культур, мм					
	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. casei</i> (10шт)	23–25	22–25	24–25	22–24	22–24,5	19–22
<i>L. acidophilus</i>	25±0,5	24±0,5	25±0,5	22±0,5	20±0,5	18±0,5
Контроль 1	0	0	0	0	0	0
Контроль 2	0	0	0	0	0	0

Усім МКБ притаманна виражена сахаролітична активність. Як джерело енергії лактобактерії використовують вуглеводи і розщеплюють їх з утворенням молочної кислоти. На здатності ферментувати вуглеводи ґрунтується класична система класифікації цих мікроорганізмів – біохімічні властивості штамів є основою їх видової ідентифікації [2].

На підставі морфо-фізіологічних і метаболічних характеристик штам 411 віднесено до виду *L. acidophilus*, решту – до *L. casei*. Як видно з таблиці 2, на відміну від *L. acidophilus*, штами *L. casei* здатні ферментувати значно більшу кількість вуглеводів, оскільки їх ферментні системи дозволяють метаболізувати цукри двома шляхами: гексоз – по гліколітичному, пентоз – по пентозофосфатному.

Таблиця 2

Фенотипові й метаболічні характеристики штамів *Lactobacillus* spp.

№	Характеристики	Штами										
		401	402	403	04	405	406	407	408	409	410	411
1.	Реакція за Грамом	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	Морфологія клітин	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П
3.	Рухливість клітин	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4.	Наявність каталази	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5.	CO ₂ з глюкози	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6.	NH ₄ з аргініну	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7.	Ріст за: 15 °С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
	45 °С	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
8.	Ріст у молоці за 48 °С	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9.	Ріст у МПБ (рН 8,3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
10.	Ріст у MRS за наявності NaCl:											
	4 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
	5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
	6,5 %	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11.	Ферментування:											
	Арабіноза	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
	Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ксилоза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Манітол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
	Манноза	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
	Мелібіоза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Рамноза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Рафіноза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
	Рибоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
	Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Сорбітол	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+	–
	Фруктоза	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–
	Целобіоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка. + ферментують вуглевод;
 – не ферментують вуглевод;
 П паличкоподібна форма клітин.

Важливою технологічною властивістю лактобактерій є молокозгортальна активність. Біохімічно активні штами, здатні до швидкого біосинтезу молочної кислоти, забезпечують швидке сквашування молока, прискорене визрівання сиру. Це дає змогу поліпшити якість продукту за рахунок зменшення ризику розвитку сторонньої мікрофлори та інтенсифікувати процес виробництва. Хорошу молокозгортальну активність мала ацидофільна паличка – за температури 37 °С сквашувала молоко через 8,5 год. з утворенням однорідного помірно в'язкого згустку. Натомість, для отримання згустку *L. casei* за тих самих умов потрібно було від 16-ти до 24-х годин, залежно від штаму. Слід відмітити, що загалом, порівняно з термофільними молочнокислими паличками, бактерії групи *casei* характеризуються повільнішим розвитком у молоці й потребують більше часу для його сквашування [7].

Не менш важливим для виробництва є показник граничної кислотності. Особливе значення він має при підборі культур до заквасок для йогурту, ряжанки, сметани, адже

необхідно, щоб за час зберігання продукт не набрав надлишкової кислотності. Як видно з таблиці 3, штами *L. casei* характеризувались помірним рівнем граничної кислотності, дещо вищою була кислотність згустку, утвореного ацидофільною паличкою – 250 °Т.

Одним з показників якості кисломолочних продуктів є вміст живих клітин лактобактерій. У стерильному знежиреному молоці штами накопичували біомасу в межах 8,2–8,6 одиниць (lg КУО/см³). Отже, ці культури добре адаптовані до молока як середовища існування, і доволі висока щільність популяції дає їм змогу синтезувати метаболіти у необхідній з точки зору виробництва кількості.

Лактобацили виявили порівняно високу стійкість до фізико-хімічних факторів, що мають місце під час виробництва сиру і пригнічують життєдіяльність заквашувальних культур – високої температури та солі. Водночас різна чутливість штамів до цих факторів пов'язана, насамперед, з їх видовими особливостями (див. табл. 3).

Досліджувані штами мали незначну протеолітичну активність, утворювали помірно в'язкі молочні згустки з синерезисом на рівні (48 – 51) %. Дані характеристики дозволять контролювати процес відокремлення сироватки під час формування сирного зерна та мінімізувати втрату сухих речовин з сироваткою.

Серед вимог, що висуваються до сучасних заквашувальних препаратів, є можливість тривалого їх зберігання без втрати властивостей. Зручним і найбільш поширеним методом довготривалого зберігання мікроорганізмів, за якого вдається зберегти високу активність бактеріального препарату, є метод сублімаційного висушування (ліофілізації). Рівень виживання мікроорганізмів під час висушування залежить від багатьох факторів, серед яких, окрім технологічних характеристик процесу ліофільного сушіння, важливе значення мають видова специфічність та біологічні особливості штамів – чутливість до заморожування, здатність зберігати фізіологічні функції за різного вмісту води та ін. [8, 9]. Тому рівень збереження життєздатності лактобактерій за сублімаційного сушіння можна розглядати як важливу характеристику при відборі культур для виробництва бактеріальних препаратів.

Під час ліофільного сушіння гинула незначна частка популяції – штами мали високий і середній рівень виживання клітин. Отже, селекціоновані культури задовольняють технологічні вимоги і за цим показником.

Таблиця 3

Технологічні характеристики штамів *Lactobacillus* spp.

Показник	<i>L. casei</i> (10 штамів)	<i>L. acidophilus</i> 411
Молокозгортальна активність, год	16–24	8,5± 0,5
Активна кислотність у молоці через 24 год, од. рН	4,3–3,9	3,4± 0,2
Гранична кислотність у молоці, °Т	200 – 230	250 ± 10
Синерезис молочного згустку, %	46– 51	50 ± 2
Протеолітична активність	+	+
Термостійкість за температури 55 °С, 1 год	+	+
Розвиток за наявності NaCl: 3 %	+	+
6 %	+/-	–
Максимальна чисельність клітин у молоці, lg КУО/см ³	8,2–8,6	8,3± 0,2
Рівень збереження життєздатності за умов ліофільного висушування, %	85,3–94,4	86,7± 0,5

Висновки

За спектром важливих для виробництва характеристик селекціоновані лактобактерії задовольняють вимоги, що ставляться до культур у біотехнології. Штами можна рекомендувати до використання у складі заквашувальних композицій для виробництва молочних ферментованих продуктів, у тому числі сичужних сирів. З огляду на високий рівень антагоністичної активності штами також можна використовувати як захисні культури.

Література

1. Рябцева С.А. Сохранение жизнеспособности заквасочной микрофлоры / С.А. Рябцева, М.А. Брачихина, В.И. Ганина // Молочная промышленность. – 2010. – № 1. – С. 22–23.
2. Vos P. Bergey's manual of systematic bacteriology / P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. Whitman. – Vol. 3. – 1422 p.
3. Panesar P.S. Effect of Storage on Syneresis, pH, Lactobacillus acidophilus Count, Bifidobacterium bifidum Count of Aloe Vera Fortified Probiotic Yoghurt / P.S. Panesar and, C. Shinde // Current Research in Dairy Science. 2012. – № 1. – P. 17–23.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд. / Н.С. Егоров – М.: Изд МГУ; Наука, 2004. – 258 с.
5. Скородумова А.М. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов / А.М. Скородумова – М.: Пищепромиздат, 1963. – 308 с.
6. Kimprasit T., In Vitro Selection of Potential Lactic Acid Bacteria Isolated from Ducks and Geese in Thailand / T. Kimprasit, S. Sukontasing and P. Amavisit // Kasetsart J. (Nat. Sci.). 2013. – № 47. – P. 261–270.
7. Morandi S. Technological, phenotypic and genotypic characterization of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese / S. Morandi, M. Brasca // Dairy Sci. and Technol. 2011 – № 91. – P. 341–359.
8. Carvalho A.S. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria / A.S. Carvalho, J. Silva, P. Hob, P. Teixeira, F.X. Malcata, P. Gibbs // International Dairy Journal 2004. – Vol. 14. – № 10. – P. 835–847.
9. Fonseca F. Freeze-drying of lactic acid bacteria / F. Fonseca, S. Cenard, S. Passot // Methods Mol. Biol. 2015. – Vol. 1257. – P. 477–488.