

**ЗАСТОСУВАННЯ СЕЛЕКТИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ВСТАНОВЛЕННЯ  
ВИДОВОЇ НАЛЕЖНОСТІ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ**

Точна швидка диференціація мезофільних лактококів є нагальною проблемою, оскільки ці мікроорганізми мають велике промислове значення. У роботі було проведено співставлення поживних середовищ (Редді, Кемплера та Агару з кальцієм цитриновокислим) для ідентифікації молочнокислих бактерій роду *Lactococcus*, зокрема штамів *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* та *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Показано, що для ідентифікації культур роду *Lactococcus* через близькість їх метаболічних властивостей, доцільно застосовувати кілька селективних середовищ. Для достовірності перевірки належності штамів до *L. diacetylactis* рекомендовано висівати їх одночасно на середовище Кемплера та Агар з кальцієм цитриновокислим. Для посилення ароматоутворювальних властивостей *L. diacetylactis* доведена доцільність додавання у середовище з інокулятом 0,2% цитрату натрію.

Ключові слова: *Lactococcus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, селективні поживні середовища

Точная быстрая дифференциация мезофильных лактококков является насущной проблемой, поскольку эти микроорганизмы имеют большое промышленное значение. В работе проведено сопоставление питательных сред (Редди, Кемплера и Агар с кальцием цитриновокислым) для идентификации молочнокислых бактерий рода *Lactococcus*, в частности штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Показано, что из-за близости метаболических свойств культур рода *Lactococcus* для их идентификации целесообразно применять несколько селективных сред. Для достоверности проверки принадлежности штаммов к *L. diacetylactis* рекомендуется одновременно высевать их на среду Кемплера и Агар с кальцием цитриновокислым. Для усиления ароматообразующих свойств *L. diacetylactis* показана целесообразность добавления в среду с инокулятом 0,2% цитрата натрия.

Ключевые слова: *Lactococcus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, селективные питательные среды

Accurate and fast differentiation of mesophilic *Lactococcus* is an urgent issue, because these organisms are of great industrial importance. The research paper presents nutrient media comparative assessment data (Reddy, Kempler, Agar with calcium acid citrine) for the identification of lactic acid bacteria of the genus *Lactococcus*, in particular strains *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

It is shown that taking into account the similarity of the metabolic properties of the strains belonging to the genus *Lactococcus* the identification procedure should combine application of several selective media. In order to prove belonging to the *L. diacetylactis* simultaneous cultivation on Kempler and Agar with calcium acid citrine selective media is recommended. It was also featured the expediency of addition of 0.2% sodium citrate to the inoculated medium in order to enhance the flavor-forming properties of *L. diacetylactis*.

Key words: *Lactococcus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, selective medium

Молочнокислі бактерії відіграють важливу роль у виробництві ферментованих харчових продуктів, формуючи органолептичні властивості кисломолочних продуктів, сприяючи їх санітарно-гігієнічній безпеці тощо. *Lactococcus lactis* - грам-позитивні бактерії, які широко застосовують для ферментування різних харчових продуктів, зокрема, у промисловому виробництві кисломолочних продуктів: сирів, йогуртів, кисломолочних напоїв, кисловершкового масла.

Для правильного оцінювання живих культур у продукті важливим параметром є можливість диференційовано підрахувати кількість життєздатних клітин. Такий підрахунок є складним процесом, оскільки у продукті, як правило, наявні різні види молочнокислих бактерій. Також правильної ідентифікації вимагає визначення щойно ізольованих технологічно перспективних штамів. При проведенні класифікації та ідентифікації бактерій вказують їх характерне джерело поширення та походження. Назва виду чи, навіть, роду може свідчити про безпечність та технологічну придатність культур для використання їх у виробництві кисломолочних продуктів [1].

Для ідентифікації молочнокислих бактерій застосовують ряд тестів: морфолого-культуральних, визначення каталазної активності, утворення вуглекислоти з глюкози та цитратів, зброджування вуглеводів, визначення ізомерів молочної кислоти тощо. Також визначають тип бродіння (гомо- або гетероферментативний), ріст у середовищі з жовчю, з різним рН; солестійкість, вплив температури культивування, утворення ацетилметилкарбінолу та аміаку з аргініну та ін. Крім того, щоб розмежувати різні види мікроорганізмів застосовують спеціальні селективні середовища [2-5].

Надзвичайно складною задачею в ідентифікації є швидке розділення у рамках одного виду, особливо біовару, підвиду *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* від *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Зазвичай клітини *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* мають сферичну форму, як правило згруповані у диплококи, проте, за певних умов культивування, зокрема у молоці до утворення згустку, можуть мати вигляд коротких ланцюжків завдовжки від 0,5 мкм до 1,5 мкм. Культури *L. lactis* є неспороутворювальними та нерухомими. Оптимальна температура розвитку клітин знаходиться у межах 30-35 °C; за цієї температури вони згортають молоко упродовж 10-12 год. *L. lactis* відносять до гомоферментативних лактобактерій, здатних утворювати L(+) молочну кислоту. Однак є дані, що за низьких рН середовища деякі штами *L. lactis* можуть синтезувати L (-) молочну кислоту [3, 6]. Саме завдяки властивості швидко знижувати кислотність середовища і мати відносно низьку межу кислотоутворення *L. lactis* широко застосовують у молочній промисловості, при виготовленні вина, пива, деяких сортів хліба та інших ферментованих продуктів. Межа кислотоутворення зазвичай варіює від 110 °T до 120 °T, хоча зустрічаються і “слабкі” штами, що мають межу кислотоутворення не вище 90-110 °T. Найактивніше кислотоутворення відбувається у перші години культивування, яке потім уповільнюється і зупиняється за 120 °T. Крім того, *L. lactis* є терморезистентними за 60 °C упродовж 30 хв., стійкими до 0,1 % метиленового синього та до 40% жовчі, не утворюють CO<sub>2</sub> з глюкози, здатні утворювати аміак з аргініну. Культури *L. lactis* можуть розщеплювати глюкозу, галактозу, лактозу, декстрин [3, 5].

Форма та розмір колоній культур *L. lactis* subsp. *cremoris* подібні до *L. lactis* ssp. *lactis* і відрізняються тим, що їх клітини організовані переважно у ланцюжки. Є дані, що навесні та восени ланцюжки культури *L. cremoris* розпадаються на диплококи, що вказує на сезонні зміни якості молока. Ці клітини є нерухомими, грампозитивними та каталазонегативними. Щодо стійкості до жовчі усі штами добре ростуть у гідролізованому молоці із 20% жовчі і майже не ростуть за 30% жовчі. Штами *L. cremoris* краще розвиваються за температури 20-25 °C і через 12 годин утворюють рівний щільний згусток зі сметаноподібною консистенцією. Межа кислотоутворення цих мікроорганізмів у молоці становить 110-115 °T, молоко при цьому має чистий

кисломолочний, вершковий смак та аромат. За своїми біохімічними властивостями *L. cremoris* дуже близький до *L. lactis*, однак ці два підвиди розрізняються за спектром зброджувальних вуглеводів. *L. cremoris* активно зброджують глюкозу, фруктозу, галактозу, маннозу, лактозу, не розщеплюють ксилозу, рамнозу, рибозу, сорбіт, дульцин, рафінозу, крохмаль. Культури *L. cremoris*, як правило, не утворюють аміак з аргініну та не ростуть за температури вище 40 °C [3, 6].

Смак та аромат молочних продуктів утворюється за участі великої кількості сполук різних хімічних класів, зокрема, діацетилу, ацетоїну, ацетальдегіду, летких кислот, спиртів, ефірів, лактонів й інших метаболітів молочнокислих бактерій (МКБ). Провідна роль у створенні аромату належить діацетилу. Здатність до продукції діацетилу в результаті засвоєння цитрату молока властива молочнокислим бактеріям з роду *Lactococcus*, а саме, біовару *diacetylactis* і різним видам *Leuconostoc* [7].

На сьогодні *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* кваліфіковано як біовар підвиду виду *Lactococcus lactis*. Те, що цей мікроорганізм не виділений в окремий вид, зумовлено тим, що його основна особливість – здатність утилізувати цитрат, оскільки вона кодується плазмідною, є нестабільною властивістю, втрата якої призводить до того, що мікроорганізм фенотипічно не відрізняється від *L. lactis* subsp. *lactis* [8].

Для селективного підрахунку підвидів виду *Lactococcus* було запропоновано кілька поживних середовищ. У 1961 р. для ідентифікації цитрат-утилізуючих культур було розроблено середовище WACCA, що містило суспензію розчинного цитрату кальцію, утилізація якого призводила висвітлення зони навколо колоній [9].

Принцип використання знебарвлення каламутних суспензій цитрату також використано у середовищі Редді, застосування якого дозволяє відрізнити підвиди роду *Lactococcus* [10]. Середовище працює за наявності карбоксиметилцелюлози для запобігання осадження цитрату Са, а прозорі зони навколо цитрат-утилізуючих колоній формуються упродовж 6 днів.

У 1980 році була розроблена інша версія середовища [11], яка спростила приготування середовища і містила тільки знежирене молоко, глюкозу і гідролізат казеїну, до яких були додані розчини цитрату Fe, цитрату Na і фероціаніду К. В такому варіанті зони знебарвлення навколо цитрат-утилізуючих колоній формуються за 48 год.

При зростанні у напіврідкому поживному середовищі, що містить 3% агару, *L. lactis* subsp. *diacetylactis* утворює глибинні колонії у вигляді грудочок вати, що нагадують колонії молочнокислих паличок [5].

Оптимальна температура розвитку *L. lactis* subsp. *diacetylactis* в молоці 28-32 °C. Він здатний зростати за 39-40 °C, а за температури 45 °C ріст відсутній. Гранична кислотність у молоці становить 80-100 °Т. При внесенні петлею культури в 10 см<sup>3</sup> молока активні штами згортають його через 18-20 год, менш активні – за 24-48 год. У разі внесення в молоко 3 % закваски тривалість сквашування складає більше 16 годин. Утворений згусток молока має щільну консистенцію, часто з наявністю бульбашок газу. Смак його чистий, кислуватий, злегка щиплячий, іноді солодкуватий, аромат згустку обумовлений накопиченням діацетилу [12].

Дослідження 42 штамів *L. cremoris*, виділених з молока, сметани, квітів, дозволило поділити їх на три групи за характеристичними фенотиповими реакціями: перша група - типова (табл. 1), штами другої були здатні розщеплювати аргінін або не зброджували мальтозу, не росли у середовищі за 40 °C, до третьої групи належали культури, що росли за 40 °C, частина з них була здатна утворювати аміак з аргініну або не зброджувала мальтозу [13].

Однак є дані, що внаслідок фагової трансдукції у штаму *L. cremoris* 2204 було зафіксовано утворення аміаку з аргініну [14]. Також є штами *L. cremoris*, які здатні зростати у середовищі з 4% NaCl, з високим ступенем кислотоутворення та

організовані у диплококи, а не в ланцюжки. Слід зауважити, що такі культури зустрічаються переважно у рослинному матеріалі.

Таблиця 1

**Основні відмінності фенотипових властивостей між підвидами *Lactococcus***

| Підвид/біовар           | Утворення NH <sub>3</sub> з аргініну | Ріст у середовищі |          |            |   |       |   | Зброджування |           |
|-------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------|------------|---|-------|---|--------------|-----------|
|                         |                                      | за 40 °C          | за 45 °C | з NaCl (%) |   | за pH |   | мальтози     | декстрину |
| <i>L. lactis</i>        | +                                    | +                 | –        | +          | – | +     | – | +            | +         |
| <i>L. cremoris</i>      | –                                    | –                 | –        | –          | – | –     | – | –(+)         | –(+)      |
| <i>L. diacetylactis</i> | +                                    | +                 | –        | +          | – | +     | – | +            | –         |

**Метою даної роботи** було оцінити поживні середовища для селективного підрахунку молочнокислих бактерій роду *Lactococcus*.

**Матеріали та методи.** Об'єктом досліджень були культури лактококів з музею промислових мікроорганізмів відділу біотехнології ПП НААН: 3 штами *L. lactis* subsp. *diacetylactis*, 4 штами *L. lactis* та 5 штамів *L. cremoris*.

Штами були перевірені на чистоту мікроскопією препаратів фарбованих за Грамом [15]. Проведено їх трикратне пасажування в стерильне знежирене молоко за температури 32 °C упродовж 24 годин у кількості 1% інокуляту. Культури підтримувались за однакових умов за температури 4 °C. Інокулят культур готували на знежиреному молоці з додаванням 0,2% цитрату натрію та без нього.

Для дослідження було проведено глибинний посів розведень на середовища Редді, агар з гідролізованим молоком (ГА); агар з кальцієм цитриновокислим (ГА+Ca<sup>2+</sup>), середовище Кемплера [5, 16, 11]. Чашки з посівами витримували за 32 °C культивування упродовж 2-6 діб. Вміст діацетилю та ацетоїну визначали фотоколориметрично [17].

**Результати та обговорення.** Мезофільні мікроорганізми входять до складу заквашувальних препаратів для виготовлення багатьох видів кисломолочних продуктів. Таким чином, ідентифікація культур роду *Lactococcus* має прямий та опосередкований вплив на органолептичні, поживні та гігієнічні властивості продуктів, що робить дослідження у такому напрямку надзвичайно важливими для всіх споживачів молочної продукції.

Попередні результати реідентифікації культур підвидів *L. lactis* та *L. cremoris*, *L. diacetylactis* за морфологічними та фізико-хімічними показниками отримували шляхом їх культивування у відновленому знежиреному молоці (табл. 2).

Таблиця 2

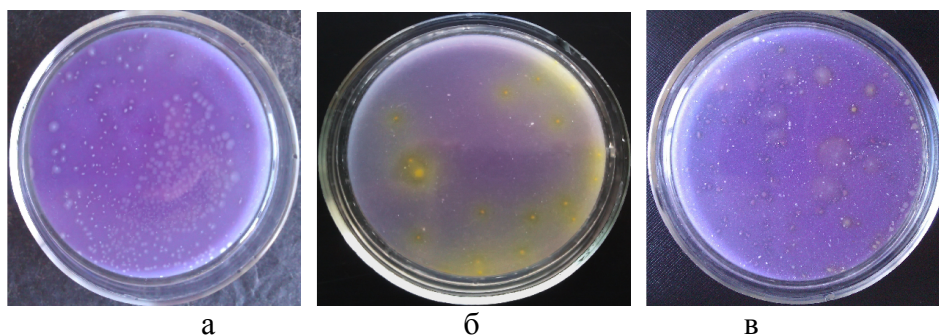
**Морфологічні та фізико-хімічні показники досліджених культур**

| № п/п | Штами                   | МЗА, год | ЕКУ, °T на момент згортання | Утворення аміаку з аргініну | Культуральні ознаки росту на середовищі Редді                                      |
|-------|-------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | 2                       | 3        | 4                           | 5                           | 6                                                                                  |
| 1     | <i>L. lactis</i> 1105   | 16       | 92                          | +                           | світло-бузкові, білуваті колонії, блискучі, округлі, без зон, діаметром 1 мм, 2 мм |
| 2     | <i>L. lactis</i> S 2-2  | 16       | 84                          | +                           |                                                                                    |
| 3     | <i>L. lactis</i> 1106   | 16       | 72                          | +                           |                                                                                    |
| 4     | <i>L. lactis</i> 1162   | 16       | 76                          | ±                           |                                                                                    |
| 5     | <i>L. cremoris</i> 1200 | 15       | 86                          | –                           | жовті колонії блискучі, без зон, еліпсоподібні діаметром 1 мм, 2 мм                |
| 6     | <i>L. cremoris</i> 1204 | 15       | 84                          | –                           |                                                                                    |
| 7     | <i>L. cremoris</i> 1210 | 15       | 80                          | –                           |                                                                                    |
| 8     | <i>L. cremoris</i> 1218 | 15       | 78                          | –                           |                                                                                    |
| 9     | <i>L. cremoris</i> 1227 | 15       | 96                          | –                           |                                                                                    |

|    |                              |    |     |   |                                                                     |
|----|------------------------------|----|-----|---|---------------------------------------------------------------------|
| 10 | <i>L. diacetylactis</i> 1310 | 17 | 100 | + | білі колонії, блискучі, круглі, із прозорою зоною, діаметром 1-2 мм |
| 11 | <i>L. diacetylactis</i> 1319 | 17 | 104 | + |                                                                     |
| 12 | <i>L. diacetylactis</i> 1331 | 17 | 110 | + |                                                                     |

Встановлено, що досліджені штами мали певні відмінності щодо вищеназваних показників. Культури *L. lactis* ssp. *lactis* та *L. lactis* subsp. *cremoris* мали однакову молокозсідальну активність (МЗА) та енергію кислотоутворення від 72 °Т до 96 °Т, а *L. lactis* subsp. *diacetylactis* - від 100-110 °Т у знежиреному молоці.

При культивуванні штамів *Lactococcus*: *L. lactis* subsp. *lactis* та *L. lactis* subsp. *cremoris* на середовищі Редді до підвиду *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* і *L. lactis* subsp. *diacetylactis* відносили білі округлі колонії без зон та із зонами, а до підвиду *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* – жовті еліпсоподібні (табл. 2, рис. 1).



**Рис. 1. Зовнішній вигляд колоній лактококів на середовищі Редді:**  
а - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, б - *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*,  
в- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Селективне середовище Редді застосовують для диференціації молочнокислих лактококів, а також для розмежування окремих підвидів роду *Lactococcus*: *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *diacetylactis* та *L. cremoris*. На середовищі Редді підраховують окремо жовті та білі колонії. До підвиду *L. lactis* відносять білі округлі колонії без зон, *L. diacetylactis* – білі із зоною просвітлення, а до підвиду *L. cremoris* – жовті еліпсоподібні. Загальну кількість лактококів вираховують за сумою жовтих та білих колоній.

Культури *L. lactis* subsp. *diacetylactis* та *L. cremoris* розрізняються за здатністю до гідролізу аргініну та утилізації цитрату. Колонії мікроорганізмів, які ферментують лактозу, забарвлюються у жовтий колір. Колонії *L. lactis* в результаті утворення кислоти спочатку забарвлюються у жовтий колір, а пізніше з накопиченням аміаку із аргініну, набувають білого кольору. Культури *L. lactis* subsp. *diacetylactis* утворюють більше аміаку, ніж *L. lactis*. Навколо колоній лактококів, які утилізують цитрат, утворюється прозора зона [16].

Для кількісного дослідження готували десятикратні розведення і матеріал засівали газонем на чашки з агаром. Через 36-40 год культивування за температури 32 °С підраховували жовті колонії *L. cremoris*. Чашки продовжували інкубувати упродовж 6 діб, після чого підраховували загальну кількість колоній, а також колоній з прозорими зонами (*L. lactis* subsp. *diacetylactis*).

Здатність утворювати аміак з аргініну методом вивчали з використанням реактиву Несслера [5]. Показано, що штами *L. lactis* 1162, *L. lactis* 1106 мали яскраво-жовте забарвлення, в той час як усі інші культури *L. Lactis* та *L. lactis* subsp. *diacetylactis* - бурий колір. Штами *L. cremoris* демонстрували відсутність реакції, що є типовою ознакою для цього підвиду.

У таблиці 3 надано диференціацію культур лактококів при застосуванні різних поживних середовищ.

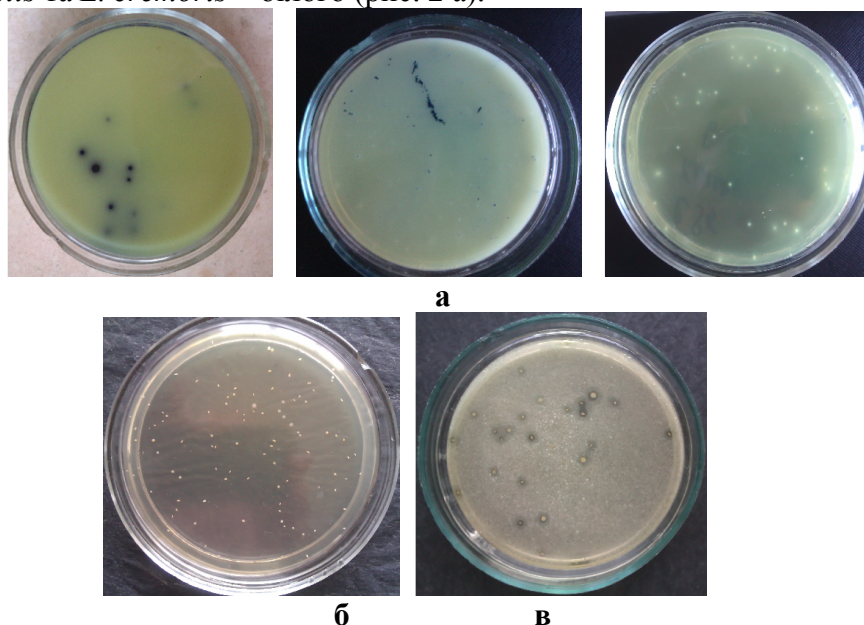
Для з'ясування ролі конкретного штаму у формуванні ароматичної композиції за ферментації молока необхідно було провести дослідження популяційної мінливості культур щодо здатності до утилізації цитрату та провести уточнення видової приналежності досліджуваних культур. Для посилення ефекту утилізації цитрату дослідні культури ферментували упродовж 17 год. у молоці з додаванням і без цитрату натрію.

Таблиця 3

**Диференціація культур роду *Lactococcus* із застосуванням різних поживних середовищ**

| Середовище виділення | Колір колоній                   | Утворення аміаку з аргініну | Утилізація цитрату | Ідентифікація                                                      |
|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Редді                | жовта, без зони або з зонами    | -                           | -                  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>                            |
|                      | біла, без зони                  | +                           | -                  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>                              |
|                      | біла, навколо зона просвітлення | +                           | +                  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> |
| ГА+Ca <sup>2+</sup>  | біла, навколо зона просвітлення | +                           | +                  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> |
|                      | біла, без зони                  | +/-                         | -                  | <i>L. lactis</i> , <i>L. Cremoris</i>                              |
| Кемплер              | синя                            | +                           | +                  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> |
|                      | біла                            | +/-                         | -                  | <i>L. lactis</i> , <i>L. Cremoris</i>                              |

На початку роботи доцільно було дослідити здатність відібраних культур розвиватись на селективному середовищі Кемплера. До складу середовища входили наступні інгредієнти: сухе знежирене молоко 1%, пептон 0,25%, глюкоза 0,5%, агар 1,5% та два індикатори – 10% калій залізосинеродистий, суміш цитрату заліза та цитрату натрію [11]. Культивування проводили за температури 32 °С упродовж 48 годин. Було показано, що досліджувані штами підвиду *L. diacetylactis* були здатні утилізувати цитрат – усі вони в процесі зростання набули синього забарвлення, тоді як культури *L. lactis* та *L. cremoris* – білого (рис. 2 а).



**Рис.2. Зовнішній вигляд колоній молочнокислих бактерій на селективних середовищах:**

а) Кемплера; б) ГА; в) Агар з кальцієм цитриновокислим ГА+Ca<sup>2+</sup>

Водночас штами були досліджені за ростом на інших середовищах: гідролізованому агарі (ГА) та поживному середовищі для визначення ароматоутворювальних бактерій (ГА+Ca<sup>2+</sup>), де виростили випуклі білі колонії без зон просвітлення та із ними, відповідно, діаметром від 1 до 3 мм (рис. 2 б, в).

Показано у табл. 4, що культивування штамів *L. diacetylactis* у молоці з цитратом значно посилювало їх здатність до розвитку на твердому середовищі, проте такої активної тенденції у *L. lactis* та *L. cremoris* не спостерігалось, що підтверджує дані, наведені у [18]. Найбільший приріст було зафіксовано у культур *L. diacetylactis* на всіх висіяних середовищах, інокульованих у молоці з додаванням цитрату натрію, їх чисельності варіював у діапазоні від 21,88 до 46,77 разів.

Таблиця 4

**Динаміка чисельності штамів *L. lactis* та *L. cremoris* у молоці на різних поживних середовищах**

| №<br>п/п | Зразки                       | Молоко                    |                      |                   | Молоко з цитратом         |                      |                  |
|----------|------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------|---------------------------|----------------------|------------------|
|          |                              | Чисельність,<br>КУО/1 см³ |                      | Приріс<br>т, рази | Чисельність,<br>КУО/1 см³ |                      | Приріст,<br>рази |
|          |                              | 0 год                     | 17 год               |                   | 0 год                     | 17 год               |                  |
|          |                              | ГА                        |                      |                   |                           |                      |                  |
| 1        | <i>L. diacetylactis</i> 1310 | 4,54·10 <sup>7</sup>      | 5,4·10 <sup>8</sup>  | 12,02             | 3,75·10 <sup>7</sup>      | 1,72·10 <sup>9</sup> | 46,77            |
| 2        | <i>L. diacetylactis</i> 1319 | 4,16·10 <sup>7</sup>      | 8,0·10 <sup>8</sup>  | 19,05             | 5,0·10 <sup>7</sup>       | 1,1·10 <sup>9</sup>  | 21,88            |
| 3        | <i>L. diacetylactis</i> 1331 | 2,2·10 <sup>7</sup>       | 4,6·10 <sup>8</sup>  | 20,89             | 3,15·10 <sup>7</sup>      | 8,0·10 <sup>8</sup>  | 43,65            |
| 4        | <i>L. cremoris</i> 1210      | 3,47·10 <sup>7</sup>      | 6,5·10 <sup>8</sup>  | 18,62             | 3,52·10 <sup>7</sup>      | 1,1·10 <sup>9</sup>  | 26,3             |
| 5        | <i>L. lactis</i> 1105        | 3,58·10 <sup>7</sup>      | 8,7·10 <sup>8</sup>  | 24,54             | 3,44·10 <sup>7</sup>      | 7,8·10 <sup>8</sup>  | 22,38            |
|          |                              | ГА+Ca <sup>2+</sup>       |                      |                   |                           |                      |                  |
|          | <i>L. diacetylactis</i> 1310 | 3,35·10 <sup>7</sup>      | 3,64·10 <sup>8</sup> | 15,50             | 3,0·10 <sup>7</sup>       | 1,28·10 <sup>9</sup> | 42,65            |
|          | <i>L. diacetylactis</i> 1319 | 3,15·10 <sup>7</sup>      | 6,0·10 <sup>8</sup>  | 19,05             | 4,0·10 <sup>7</sup>       | 9,3·10 <sup>8</sup>  | 23,44            |
|          | <i>L. diacetylactis</i> 1331 | 2,0·10 <sup>7</sup>       | 2,5·10 <sup>8</sup>  | 12,59             | 1,3·10 <sup>7</sup>       | 3,9·10 <sup>8</sup>  | 30,20            |
|          | <i>L. cremoris</i> 1210      | 3,5·10 <sup>7</sup>       | 4,3·10 <sup>8</sup>  | 13,18             | 3,7·10 <sup>7</sup>       | 8,5·10 <sup>8</sup>  | 22,9             |
|          | <i>L. lactis</i> 1105        | 1,8·10 <sup>7</sup>       | 3,7·10 <sup>8</sup>  | 14,79             | 2,5·10 <sup>7</sup>       | 4,2·10 <sup>8</sup>  | 16,60            |
|          |                              | Кемплер                   |                      |                   |                           |                      |                  |
|          | <i>L. diacetylactis</i> 1310 | 2,2·10 <sup>7</sup>       | 3,83·10 <sup>8</sup> | 17,38             | 2,0·10 <sup>7</sup>       | 8,0·10 <sup>8</sup>  | 39,8             |
|          | <i>L. diacetylactis</i> 1319 | 2,1·10 <sup>7</sup>       | 6,0·10 <sup>8</sup>  | 15,49             | 2,2·10 <sup>7</sup>       | 8,2·10 <sup>8</sup>  | 19,5             |
|          | <i>L. diacetylactis</i> 1331 | 1,7·10 <sup>7</sup>       | 3,0·10 <sup>8</sup>  | 17,37             | 2,0·10 <sup>7</sup>       | 5,0·10 <sup>8</sup>  | 25,12            |
|          | <i>L. cremoris</i> 1210      | 2,5·10 <sup>7</sup>       | 2,0·10 <sup>8</sup>  | 7,94              | 1,2·10 <sup>7</sup>       | 1,0·10 <sup>8</sup>  | 8,31             |
|          | <i>L. lactis</i> 1105        | 3,3·10 <sup>7</sup>       | 3,0·10 <sup>8</sup>  | 9,12              | 3,0·10 <sup>7</sup>       | 3,4·10 <sup>8</sup>  | 11,22            |

Аналізування здатності до продукування діацетилю та ацетоїну показало, що попереднє культивування культур у молоці з цитратом стимулювало цю властивість у штамів *L. diacetylactis* (табл. 5).

Таблиця 5

**Утворення діацетилю (ДА) та ацетону (АЦ) культурами *L. lactis* у молоці з цитратом та без**

| №<br>п/п | Зразки                       | ДА, мкг/100 г |                   | АЦ, мкг/100 г |                   |
|----------|------------------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
|          |                              | Молоко        | Молоко з цитратом | Молоко        | Молоко з цитратом |
| 1        | <i>L. diacetylactis</i> 1310 | 5,04          | 5,75              | 9,885         | 15,890            |
| 2        | <i>L. diacetylactis</i> 1319 | 3,07          | 5,52              | 9,642         | 10,260            |
| 3        | <i>L. diacetylactis</i> 1331 | 2,83          | 7,48              | 9,34          | 13,25             |
| 4        | <i>L. cremoris</i> 1210      | 0,32          | 0,24              | -             | -                 |
| 5        | <i>L. lactis</i> 1105        | 0,22          | 0,30              | -             | -                 |



Дослідні культури *L. diacetylactis*, інокульовані у молоці з цитратом натрію, збільшували продування діацетилу на 14-160 % і ацетоїну на 6-60 %. Отримані дані узгоджуються з літературними [19], які свідчать про цитратний механізм утворення ароматичних сполук в культурах *L. diacetylactis* за рН нижче 6,0 і за обмеженого вмісту лактози у середовищі.

### Висновки

Показано, що для ідентифікації культур роду *Lactococcus* через близькість їх метаболічних властивостей, доцільно застосовувати кілька селективних середовищ.

Для перевірки належності культури до *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* рекомендовано висівати їх паралельно на середовище Кемплера та Агар з кальцієм цитриновокислим.

Для посилення ароматоутворювальних властивостей *L. diacetylactis* можна попередньо готувати інокулят у середовищі з додаванням 0,2% цитрату натрію.

### Література

1. Özkalp, B. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey [Text] / B. Özkalp, B. Özden, Y. Tuncer, P. Sanlibaba, M. Akcelik // Lait. – 2007. – Vol. 87, № 6. – P. 521–534.
2. Barrette, J. The production of mixed cultures containing strains of *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* and *Lactobacillus rhamnosus*, on commercial starter media [Text] / J. Barrette, C.P. Champagne, D. Roy, N. Rodrigue // [Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology](#). – 2000. – Vol. 25, № 6. – P. 288–297.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 3: The Firmicutes [editors: P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer and W.B. Whitman (Eds.)]. - Second Edition. - USA: Springer-Verlag New York, 2009. – Vol. 3 – 1450 p. - ISBN: 978-0-387-95041-9 e-ISBN: 978-0-387-68489-5. - 379 b/w ill., 11 ill. in colour.
4. Nomura, M. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris* [Text] / M. Nomura, H. Kimoto, Y. Someya, I. Suzuki // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1999. – Vol. 49. – P. 163–166.
5. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности [Текст] / Л.А. Банникова. – М. : Пищевая пром-сть, 1975. – 256 с.
6. Samaržija D. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review [Text] / D. Samaržija, N. Antunac, J. L. Havranek // Mljekarstvo. - 2001. - Vol. 51, №. 1. – P. 35–48.
7. Starrenburg Marjo J.C., Hugenholtz J. Citrate Fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. [Text] / Marjo J.C. Starrenburg, J. Hugenholtz // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1991. – Vol. 57, № 12. – P. 3535–3540.
8. García-Quintáns N. The Citrate Transport System of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* Is Induced by Acid Stress [Текст] / Nieves García-Quintáns, Christian Magni, Diego de Mendoza, and Paloma López // Appl. Environ. Microbiol. – 1998, – Vol. 64, № 3. – P. 850–857.
9. Galesloot T.E. Agar media for the isolation and enumeration of aroma bacteria in starters [Text] / T. E. Galesloot, F. Hassing, and J. Stadhouders // Netherlands Milk and Dairy Journal – 1961. – Vol. 15. – P. 127–150.
10. Reddy M.S. Associative Growth Studies in Three-Strain Mixtures of Lactic Streptococci [Text] / M.S. Reddy, E.R. Vedamuthu, C.J. Washam, G.W. Reinbold // Appl. Microbiol. – 1972. – Vol. 24, No. 6. – P. 953–957.



11. Kempler G.M. Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* [Text] / G.M. Kempler, L.L. McKay // Appl. Environ. Microbiol. – 1980. - Vol. 39, №. 4 - P. 926-927.
12. Банникова Л.А. Микробиологические основы молочного производства / Л. А. Банникова, Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина; под ред. канд. техн. наук Я.И. Костина. - М.: Агропромиздат, 1987.- 400 с.: ил.
13. Van Kranenburg R. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis [Text] / R. van Kranenburg, M. Kleerebezem, Vlieg J. van Hylckama, B.M. Ursing, J. Boekhorst, B.A.Smit, E.H.E. Ayad, G. Smit, R.J. Siezen // Int. Dairy J. - 2002.- Vol. 12, № 2. - P. 111-121.
14. Davey G. P. Appearance of the arginine phenotype in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2204 following phage transduction [Text] / Graham P. Davey, Howard A. Heap // Canadian Journal of Microbiology. - 1993, Vol. 39, No. 8. – P. 754-758.
15. ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання [Текст]. - Чинний від 2014-01-01. - Київ: Мінекономрозвитку України, 2014. - III, 35 с.: табл. - (Національний стандарт України)
16. Reddy M.S. Agar Medium for Differential Enumeration of Lactic Streptococci [Text] / M.S. Reddy, E.R. Vedamuthu, C.J. Washam, G.W. Reinbold // Applied Microbiology. – 1972. – Vol. 24, No. 6. – P. 947-952.
17. Залашко М. Определение количества диацетила и ацетоина в закваске и сливочном масле [Text] / М. Залашко, Н. Макарына // Молочная промышленность. – 1962. - № 10. – С. 42-43.
18. McKay L.L., Baldwin K.A. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria [Text] / McKay L.L., Baldwin K.A. // FEMS Microbiol. Rev. – 1990, Vol. 7, № 1-2. – P.3 -14.
19. Sánchez C. Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at Low pH [Text] / [Claudia Sánchez](#), [Ana Rute Neves](#), [João Cavalheiro](#), [Margarida Moreira dos Santos](#), [Nieves García-Quintáns](#), [Paloma López](#) and [Helena Santos](#) // [Appl Environ Microbiol.](#) – 2008. -Vol. 74, № 4 – P. 1136-1144.