

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СОЗДАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

В.Ю. Фещенко, 5 курс,

Полесский государственный университет

Научный руководитель – В.А. Щетко, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник

Институт микробиологии НАН Беларуси

Молочнокислые бактерии — группа микроаэрофильных грамположительных микроорганизмов, сбраживающих углеводы с образованием молочной кислоты как одного из основных продуктов [1].

В настоящее время лечебно-профилактические препараты-пробиотики и ферментированные молочные продукты на основе молочнокислых бактерий все шире используются в медицине, ветеринарии, пищевой и фармацевтической промышленности для поддержания баланса кишечной микрофлоры и предупреждения дисфункций желудочно-кишечного тракта организма хозяина [2].

В последние годы особое внимание уделяется выделению новых, перспективных штаммов молочнокислых бактерий с высоким биотехнологическим потенциалом, для получения ферментированных молочных продуктов и пробиотических препаратов [3].

Целью работы являлось выделение и характеристика новых штаммов молочнокислых бактерий, перспективных для использования в пищевой промышленности и создания пробиотических препаратов.

Исследования проводили на базе лаборатории молочнокислых и бифидобактерий ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси.

Объектами исследований служили штаммы молочнокислых бактерий с присвоенными им названиями 28 и 36, выделенные из молока коров.

Исследования включали изучение культурально-морфологических свойств полученных изолятов – форму колоний, морфологию клеток, изучение динамики роста и кислотообразования, изучение антагонистической активности молочнокислых бактерий по отношению к различным группам микроорганизмов, определение протеолитической и β -галактозидазной активности молочнокислых бактерий, а также идентификация выделенных изолятов методом MALDI TOF масс-спектрометрии с использованием системы Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

Для культивирования бактерий использовались питательные среды MRS с лактозой и РПА с различной концентрацией агара – жидкие, полужидкие (0,2%), плотные (2%), и с различной концентрацией водородных ионов (рН 5,0; 7,0). В качестве посевного материала использовала 5 об% 18-ти часовых культур 3-й генерации.

Для определения чистоты, грампринадлежности и изучения морфологии клетки окрашивали по Граму. Форму колоний определяли при посеве микроорганизмов на агаризованных средах. Мор-

фологию молочнокислых бактерий изучали на препаратах живых и фиксированных окрашенных клеток с использованием светопольной и фазово-контрастной микроскопии.

Для изучения динамики роста, кислотообразования в течение 48 часов производился отбор проб. Каждые 6 часов определялось число жизнеспособных клеток (КОЕ). Каждые 2 часа определялась биомасса, активная и титруемая кислотность, а также кинетические параметры роста культур.

pH определялось потенциометрически с помощью мембранного pH-метра HI-8314 (Hanna instruments, Португалия). Титруемая кислотность определялась титриметрическим методом. Результат выражался в градусах Тернера (°Т). Число колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом предельных разведений. Бактериальную биомассу определяли нефелометрическим методом. Измеряли оптическую плотность суспензии при 590 нм.

Антагонистическую активность молочнокислых бактерий по отношению к патогенным и условнопатогенным микроорганизмам определяла с помощью метода лунок. Для этого исследовали эффективность культуральной жидкости с клетками и без с pH 7 и 5. В качестве тест-организмов использовала культуры: *St. aureus* 2098, *St. aureus*, *St. saprophyticus*, *S. typhimurium*.

Активность β-галактозидазы определяли по количеству освобожденного о-нитрофенола из о-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды, при 37°C после 5-15 мин инкубации. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 мкмоль субстрата в минуту при 37° С. Рассчитывали в единицах Миллера.

Протеолитическую активность выделенных культур при культивировании их на молоке оценивали по методике Белозерского в модификации ВНИМИ, определяя накопление в молоке свободных аминокислот тирозина и триптофана с использованием реактива Фолина. Результат выражали в мкмоль тирозина в 1 мл молока.

В результате изучения морфологических признаков установлено, что клетки выделенных культур неподвижны, не образуют спор, окрашиваются по Граму положительно, по морфологии клеток являются кокками.

Исследования показали, что штамм 36 характеризуется большим уровнем накопления биомассы по сравнению с 28 штаммом. Максимальное количество биомассы образуется к 16 часам культивирования и достигает у 36 штамма 0,84 мг/мл, а у 28 – 0,66 мг/мл соответственно. Штаммы также различаются длительностью экспоненциального роста: для штамма 36 – 10 часов, а для штамма 28 – 6 часов. Следует отметить, что количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) к началу стационарной фазы достаточно велико у обоих штаммов и составляет $5,4 \times 10^{10}$ у штамма 28 и $7,05 \times 10^{10}$ у штамма 36. Штамм 36 характеризуется также наибольшим значением константы скорости деления (ν) – $2,01 \text{ час}^{-1}$ при наименьшем времени генерации (g) – 0,497. Гораздо медленнее развивается штамм 28 – $1,06 \text{ час}^{-1}$ и 0,94 соответственно.

Штамм 36 характеризуется более высокой активностью кислотообразования, pH его культуральной жидкости плавно снижается и к 48 часам культивирования составляет 5,09 а для штамма 28 – 5,32. Отличаются штаммы и по значению титруемой кислотности: для штамма 28 максимальное значение достигает к концу логарифмической фазы роста и составляет 60°Т, а для штамма 36 максимальное значение достигает к 48 часам культивирования и составляет 90°Т.

Изучение антагонистической активности штаммов показало что, оба штамма ингибируют рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* 2098 при pH 5 и 7 с клетками и без клеток. Зоны задержки роста составляют 6-7 мм.

Определение ферментативной активности выделенных штаммов молочнокислых бактерий показало, что штамм 36 обладает высокой внутриклеточной β-галактозидазной активностью которая достигает 22,05 ед., а внеклеточная активность фермента в 5 раз ниже и составляет 4,89 ед. У штамма 28 отсутствует внутриклеточная β-галактозидазная активность, но обнаруживается вне клеток и достигает 10,4 ед. Наибольшая протеолитическая активность обнаружена у штамма 36, ее максимальное значение составляет 1,3 мкмоль/мл, а у штамма 28 – 1,05 мкмоль/мл соответственно.

В результате идентификации выделенных штаммов методом MALDI TOF масс-спектрометрии с использованием системы Bruker Daltonik MALDI Biotyper установлено, что они относятся к *Enterococcus faecalis*.

Таким образом, в результате проведенных исследований выделены и охарактеризованы 2 штамма молочнокислых бактерий, с высоким биотехнологическим потенциалом, перспективных

для последующего использования в пищевой промышленности, а также при создании лечебно-профилактических препаратов – пробиотиков разного назначения.

Список использованных источников

1. Квасников Е.И., Нестеренко О. А., Молочнокислые бактерии и пути их использования. М., «Наука», 1975, стр.1–384.
2. Емцев, В.Т. Микробиология: учебник для бакалавров / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишутин. – М: Юрайт, 2012. – 445 с
3. Magnusson J., Ström K., Roos St., Sjögren J., Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria // FEMS Microbiology Letters. - 2003. - Vol. 219. - P. 129-135.