

ВЫДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ, С ЦЕЛЬЮ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ

В.А. ЩЕТКО¹, В.Ю. ФЕЩЕНКО²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь, microbio@mbio.bas-net.by
²Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь, feshenko_valentina@mail.ru

Введение. Для производства и консервации различных продуктов широко используются молочнокислые бактерии.

Молочнокислые бактерии – группа микроаэрофильных грамположительных микроорганизмов, сбраживающих углеводы с образованием молочной кислоты как одного из основных продуктов. Классификация молочнокислых бактерий разработана недостаточно. Признаки бактерий могут значительно варьировать, что создает трудности при их классификации. В зависимости от характера образующихся продуктов, при сбраживании гексоз, молочнокислые бактерии делятся на гомотренергические и гетеротренергические. По форме клеток молочнокислые бактерии бывают: кокковые и палочковидные. Диаметр кокковых форм от 0,5–0,6 до 1 мкм; они располагаются одиночно, парами или в виде цепочек различной длины. Палочковидные бактерии разнообразны по форме – от коротких коккообразных до длинных нитевидных различной длины (от 0,7–1,1 до 3,0–8,0 мкм), расположенных одиночно или цепочками. Традиционно к молочнокислым бактериям относят представителей отряда *Lactobacillales* (например, *Lactococcus lactis* или *Lactobacillus acidophilus*). В эту группу входят бактерии, которые используются в ферментации молочных продуктов, овощей и мяса (в колбасном производстве). Молочнокислые бактерии играют важную роль в приготовлении теста, вина, кофе, какао и силоса. Значение их особенно велико в молочной промышленности [1]. Своеобразное специфическое управление биохимическими процессами во внутренней среде организма осуществляется кисломолочными продуктами, получаемыми с помощью молочнокислых микроорганизмов. При их недостатке происходит заселение кишечника патогенными и условно-патогенными микроорганизмами [4]. Для получения молочнокислых продуктов стерилизованное молоко или сливки сквашивают путем внесения чистых культур. Они носят название «стартовых заквасок». В зависимости от типа закваски получают разные продукты. К кисломолочным продуктам относятся кисломолочные напитки, сметана, творог и творожные изделия. К кисломолочным напиткам относятся различные виды простокваш (обыкновенная, мечниковская, южная ацидофильная, варенец, ряженка, йогурт и др.), кефир (жирный, таллинский нежирный и др.), кумыс (из кобыльего, коровьего молока и др.), ацидофильные напитки (ацидофилин, ацидофильное и ацидофильно-дрожжевое молоко и др.) [6].

Лечебно-профилактические препараты-пробиотики и ферментированные молочные продукты на основе молочнокислых и бифидобактерий все шире используются в медицине, ветеринарии, пищевой и фармацевтической промышленности для поддержания баланса кишечной микрофлоры и предупреждения дисфункций желудочно-кишечного тракта организма хозяина.

В настоящее время в развитии микробных биотехнологий особое внимание уделяется выделению новых, перспективных штаммов молочнокислых и бифидобактерий для получения ферментированных молочных продуктов.

Получение новых штаммов осуществляется на основе чистых культур микроорганизмов, обладающих заданными свойствами, с улучшенными органолептическими, технологическими характеристиками, оказывающими положительное воздействие на здоровье человека. Для этого используются бактерии, обладающие высокой скоростью роста и активностью кислотообразования, продуцирующие антимикробные, ароматические соединения, полисахариды, витамины, ферменты и другие биологически активные соединения [1].

Одним из главных свойств, которым должны обладать новые полученные штаммы, является высокая антагонистическая активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Антагонистические взаимоотношения молочнокислых бактерий и бифидобактерий с патогенными микроорганизмами проявляются в процессе конкуренции за питательные вещества, сайты адгезии

и продукции ингибирующих веществ [2]. На протяжении многих лет в механизме антагонистической активности бифидобактерий и молочнокислых бактерий большое значение придавалось продукции органических кислот, оказывающих ингибирующий эффект на гнилостную и патогенную микрофлору кишечника. Известно, что многие штаммы бифидобактерий и молочнокислых бактерий являются антагонистами сальмонелл, а также ингибируют рост бактерий родов *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Gardnerella* и др. [7, 8]. Установлено, что молочнокислые бактерии и бифидобактерии способны продуцировать бактерицины – вещества пептидно–белковой природы, обладающие антибиотическим действием на патогенные и условно–патогенные микроорганизмы [3].

Выделение молочнокислых бактерий и бифидобактерий осуществляется из различных источников (самоквасные кисломолочные продукты, растения, овощи, фрукты, каловые массы грудных детей и др.). Включает ряд этапов, в том числе, отбор образцов, посев на жидкие и плотные питательные среды для обогащения молочнокислой микрофлорой и выделения чистой культуры, поддержание чистой культуры, исследование биологических свойств выделенных штаммов, их идентификация и определение производственной эффективности.

Наибольшую практическую ценность для использования имеют бактерии, относящиеся к родам *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*. Род *Lactococcus*, тесно ассоциированный с производством пищевых продуктов, является одним из самых значимых среди них.

Методика и объекты исследования. Исследования проводились 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 и штамм *Lactococcus lactis* 5739, полученный из коллекции непатогенных промышленно–ценных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси, а также штаммы *Staphylococcus aureus* 2098, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium*, полученные из отдела бактериальных инфекций Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси.

Исследования включали изучение динамики роста, кислотообразования и изучение антагонистической активности молочнокислых бактерий по отношению к различным группам микроорганизмов. Для изучения динамики роста, кислотообразования в течение 48 часов производился отбор проб. Каждые 6 часов определялось число КОЕ. Каждые 2 часа определялась биомасса, активная и титруемая кислотность, а также кинетические параметры роста культур: скорость экспоненциального роста (μ , час⁻¹), константа скорости деления (V , час⁻¹), время генерации (g , час).

$$\mu=1/x \times dx/dt,$$

где μ – удельная скорость экспоненциального роста, dx – изменение биомассы x за промежуток времени dt .

$$V=\lg N-\lg N_0/\lg 2(t-t_0),$$

где V – константа скорости деления, N и N_0 – количество клеток в момент времени t и t_0 логарифмической фазы роста культуры.

$$g=1/V,$$

где g – время генерации, V – константа скорости деления.

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 использовали 5 об% 18–ти часовых культур 3–й генерации.

рН определялось потенциметрически с помощью мембранного рН–метра HI–8314 (Hanna instruments, Португалия). Титруемая кислотность определялась титрометрическим методом. Результат выражался в градусах Тернера (°Т). Число колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом предельных разведений. Посевы инкубировались в течение 2–3 суток. Количество колоний подсчитывали по двум последним разведениям, в которых наблюдался рост молочнокислых бактерий. Бактериальную биомассу определяли нефелометрическим методом. Оптическую плотность суспензии измеряли при 590нм. Биомассу выражали в мг сухих клеток на мл среды. Для

расчета использовали калибровочную кривую зависимости оптической плотности культуральной жидкости от биомассы. Антагонистическую активность молочнокислых бактерий по отношению к патогенным и условнопатогенным микроорганизмам определяли с помощью метода лунок [3]. Через 24 часа вокруг лунок с исследуемыми образцами определяли размеры зон ингибирования роста индикаторного штамма. В качестве тест-организмов использовали культуры *St. aureus* 2098, *St. aureus*, *St. saprophyticus*, *S. typhimurium*.

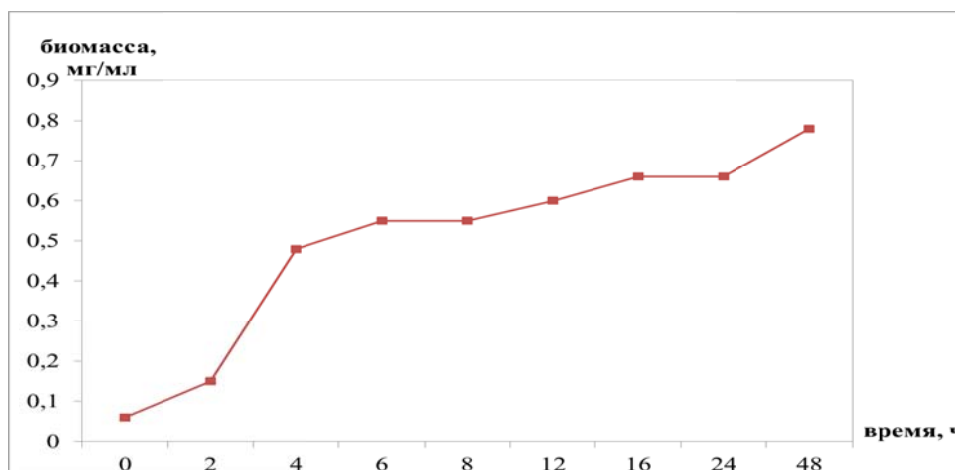
Результаты и их обсуждение. Культивирование молочнокислых бактерий осуществлялось на среде MRS, содержащей в качестве источника углерода лактозу при 37°C. В ходе исследований установлены достоверные различия в активности роста и кислотообразования молочнокислых бактерий.

Изучение динамики роста культур показало, что активный прирост биомассы наблюдается в первые 12 часов культивирования для штамма *Lactococcus lactis* 5739 и достигает 1,2 мг/мл, а для штамма 28 – в первые 16 часов и достигает 0,66 мг/мл. Однако не отличаются между собой длительностью экспоненциального роста – 6 часов (рисунок 1).

Следует отметить, что количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) к началу стационарной фазы достаточно велико у всех штаммов и составляет $2,2 \times 10^{10}$ у *Lactococcus lactis* 5739 и $5,4 \times 10^{10}$ у штамма 28 (рисунок 2).

Развитие молочнокислых бактерий сопровождается накоплением органических кислот в среде культивирования. Исследуемые штаммы значительно отличаются по активности ацидогенеза. При достижении стационарной фазы роста pH культуральной жидкости *Lactococcus lactis* 5739 составляет 4,35 ед. и далее не изменяется на протяжении 36 часов культивирования, а штамма 28 составляет 5,98 ед. и далее плавно снижается на протяжении 36 часов культивирования и составляет 5,32 ед. к 48 часам.

а



б

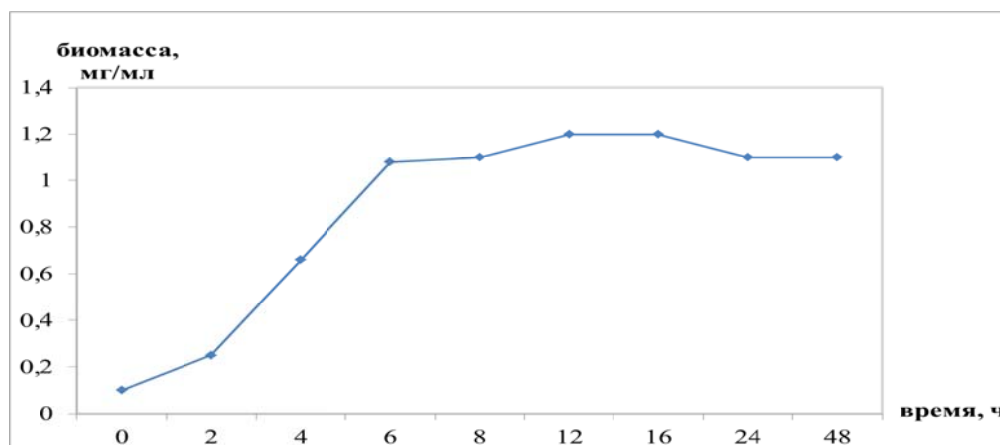
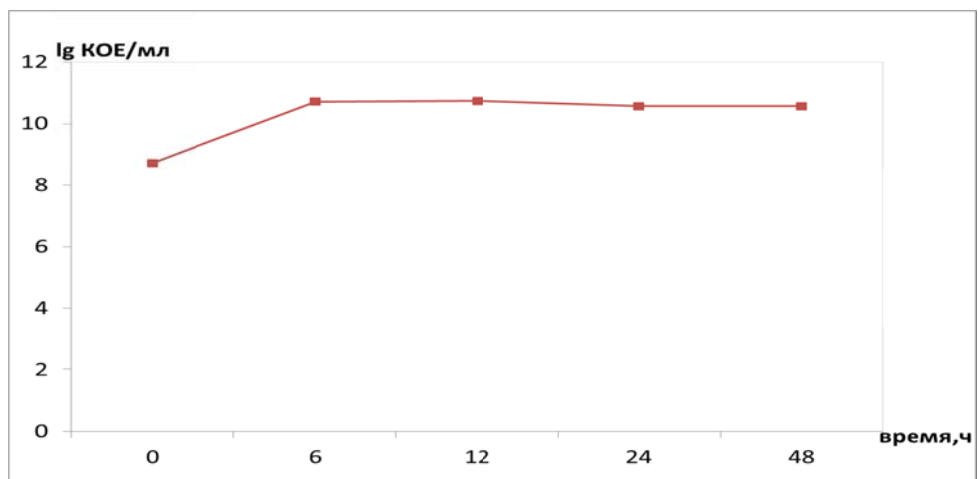


Рисунок 1 – Динамика роста бифидо- и молочнокислых бактерий
а – 28; б – *Lactococcus lactis* 5739

а



б

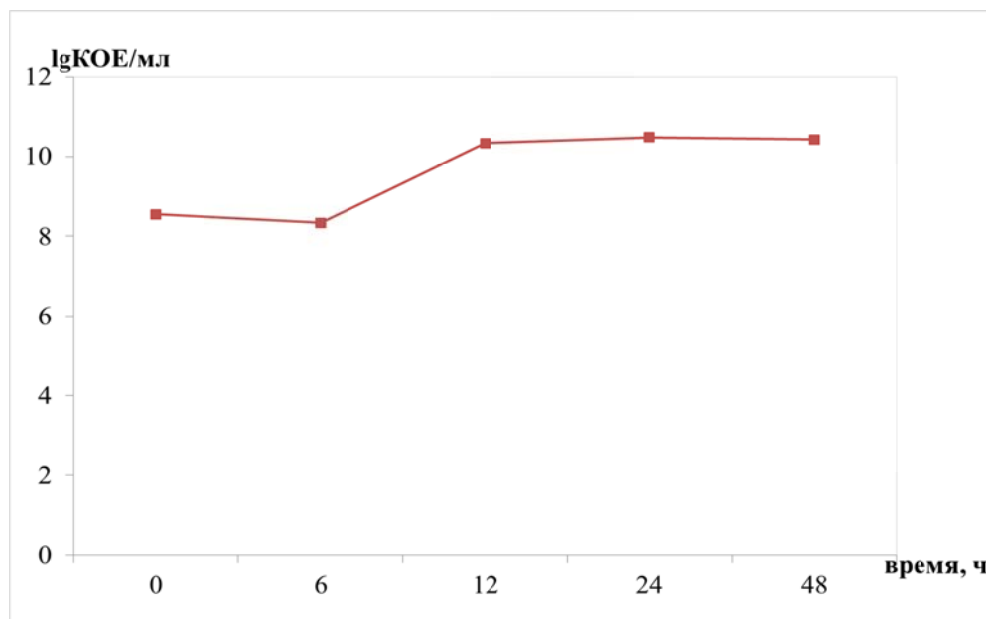
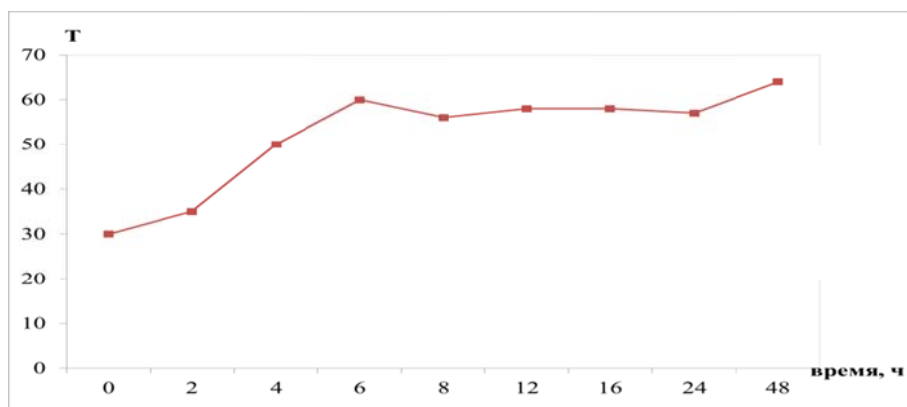


Рисунок 2 – Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл)
а – 28; б – *Lactococcus lactis* 5739

Наибольшая кислотообразующая активность обнаружена у штамма *Lactococcus lactis* 5739, его максимальное значение титруемой кислотности составляет 108 и достигается к 16 часам роста, а у штамма 28 составляет 60 и достигается к 6 часам роста (рисунок 3, таблицы 1 и 2).

а



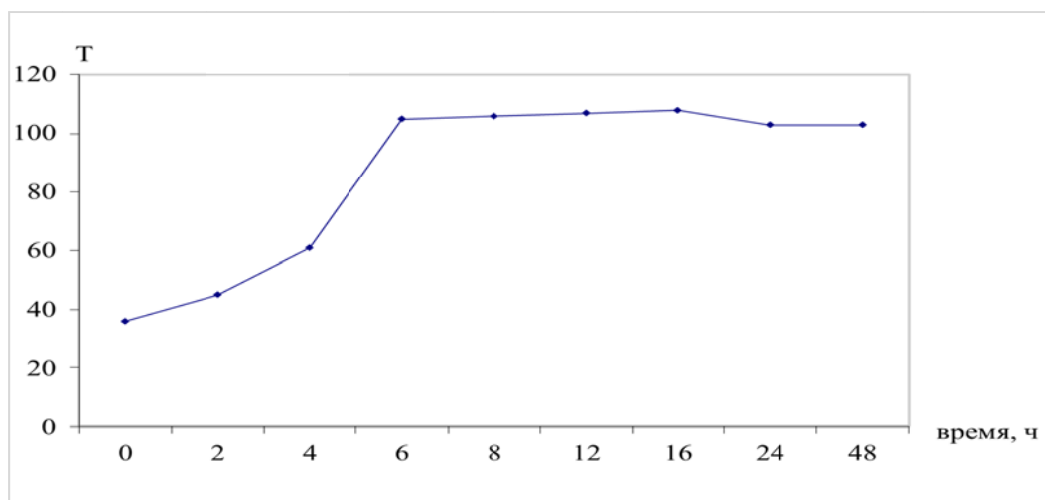


Рисунок 3 — Значение титруемой кислотности
а – 28; б – *Lactococcus lactis* 5739

Таблица 1 – Результаты исследования штамма 28

Часы	pH	°T	Биомасса, мг/мл	КОЕ, lgКОЕ/мл
0	6,98	30	0,06	$5,46 \times 10^8$ 8,737
2	6,70	35	0,15	
4	6,19	50	0,48	
6	6,19	60	0,55	$5,3 \times 10^{10}$ 10,724
8	6,19	56	0,5	
12	5,98	58	0,56	$5,55 \times 10^{10}$ 10,744
16	5,76	58	0,66	
24	5,60	57	0,6	$3,8 \times 10^{10}$ 10,579
48	5,32	64	0,78	$3,8 \times 10^{10}$ 10,579

Таблица 2 – Результаты исследования штамма *Lactococcus lactis* 5739

Часы	pH	°T	Биомасса, мг/мл	КОЕ, lgКОЕ/мл
0	6,76	36	0,1	$1,8 \times 10^8$ 8,555
2	6,27	45	0,25	
4	5,74	61	0,66	
6	5,35	105	1,08	$2,15 \times 10^8$ 8,332
8	4,64	106	1,1	
12	4,35	107	1,2	$2,2 \times 10^{10}$ 10,342
16	4,40	108	1,2	
24	4,42	103	1,1	$3,1 \times 10^{10}$ 10,491
48	4,48	103	1,1	$2,75 \times 10^{10}$ 10,439

Для более детальной характеристики развития бактерий на среде MRS с лактозой было важным определить некоторые кинетические параметры роста (таблица 3). Из полученных данных видно, что штамм 28 характеризуется наибольшим значением константы скорости деления (ν) – $1,06 \text{ час}^{-1}$ при наименьшем времени генерации (g) – 0,94. Гораздо медленнее развивается штамм *Lactococcus lactis* 5739, у которого значение константы скорости деления (ν) – $0,149 \text{ час}^{-1}$ и отличается наибольшим временем генерации (g) – 6,71.

Таблица 3 – Кинетические параметры экспоненциального роста молочнокислых бактерий

Бактерии	V, час ⁻¹	g, час	μ, час ⁻¹
<i>Lactococcus lactis</i> 5739	0,149	6,71	0,32
28	1,06	0,94	0,32

Исследование антагонистической активности молочнокислых бактерий проводилось по отношению к различным группам микроорганизмов. Для этого исследовалась эффективность культуральной жидкости с клетками и без с уровнем рН 7 и 5 ед.

Бесклеточные супернатанты культуральной жидкости исследуемых бактерий ингибируют рост штаммов *Staphylococcus aureus* 2098, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* и *Salmonella typhimurium* при рН 5 ед.

Для того чтобы исключить влияние органических кислот на рост индикаторных штаммов, дальнейшие исследования проводились с нейтрализованными до рН 7 супернатантами культуральной жидкости.

Зоны задержки роста составляют 6–7 мм.

Штаммы 28, 36 не обладают антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium*, а штамм *Lactococcus lactis* 5739 по отношению *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* 2098.

Анализируя данные таблицы 2, следует признать, что штаммы 28 и 36 являются наиболее антагонистически активными из проверенных штаммов.

Анализ результатов, полученных при использовании метода лунок, показывает, что ингибирование роста тест-штаммов в данных условиях вызвано, преимущественно, присутствием органических кислот. Активностью обладают изоляты, характеризующиеся активным кислотообразованием.

Выводы.

1. Изучена динамика роста, а также кинетические параметры роста культур. Было выявлено, что исследуемые штаммы обладают высокой скоростью деления при наименьшем времени генерации и продуктивным незатухающим во времени ростом, что является производственно ценными свойствами для использования в пищевом производстве.

2. Изучена кислотообразующая активность штаммов при культивировании в течение 48 часов. Показано, что у всех штаммов образование кислоты увеличивается в процессе культивирования. У изолята 28 значение рН держится на одном уровне в течение двух суток, что является полезным свойством при использовании в пищевом производстве.

3. Изучена антагонистическая активность выделенных культур в отношении *Staphylococcus aureus* 2098, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*. Зоны задержки роста составляют 6–7 мм. Штаммы 28 и 36 обладают антагонистической активностью в отношении *Staphylococcus aureus* 2098, что является одним из главных свойств, которым должны обладать штаммы, используемые в пищевой промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Емцев, В.Т. Микробиология: учебник для бакалавров / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишутин. – М: Юрайт, 2012. – 445 с.
2. Егоров, Н.С. Бактериоцины. Образование, свойства, применение / Н.С.Егоров // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 6 – С. 168–175.
3. Егоров, Н.С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н.С. Егоров. – М.: Высшая школа, 1965. – 131 с.
4. 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.
5. П.П. Степаненко. Микробиология молока и молочных продуктов. Москва, 1999, с.127.
6. Полищук П.К., Дербинова Э.С., Казанцева Н.Н. Лабораторный практикум по микробиологии молока и молочных продуктов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 200 с.
7. Servin, A.L. Antagonistic activities of Lactobacilli and Bifidobacteria against microbial pathogens / A. L.Servin // Microbiology Reviews. – 2004. – Vol. 28, № 4 – P. 405–440.
8. Davidson, P.M. Antimicrobial substance / P.M. Davidson // Microbial Ecology in Health and Disease. – 1992. – Vol. 5, № 6 – P. 3–4.

THE SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA PERSPECTIVE FOR THE FOOD INDUSTRY FOR THE SUBSEQUENT THEIR IDENTIFICATION

V.A. SHCHETKO, V.Y. FESHCHENKO

Summary

The conducted research allowed to carry out the primary selection of lactic acid bacteria with production of valuable properties for use in the food industry. Found that cultures characterized by high growth activity, acid formation, antagonistic activity. The obtained data allow the use of strains in further studies and identification.

© Щетко В.А, Фещенко В.Ю.

Поступила в редакцию 6 октября 2015г.