УДК 577.215.3:579.22

Е.Н. Бирюк[1], Н.Н. Фурик[1], Д.П. Бажанов [2], К.К. Яцевич[2], С.Л. Василенко[1], С.Б. Борунова[1]
[1]РУП «Институт мясо-молочной промышленности»
[2]ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЗАКВАСОЧНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОКОККОВ И ТЕРМОФИЛЬНЫХ СТРЕПТОКОККОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Из природных источников изолированы 61 культура мезофильных и 7 культур термофильных молочнокислых бактерий. На основании характеристики морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств все мезофольные изоляты были отнесены к подвиду Lactococcus lactis subsp. *lactis, а термофильные бактерии идентифицированы как Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus. Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК подтвердил результаты фенотипической идентификации.*

По результатам проведенных исследований были отобраны 13 мезофильных и 2 термофильных изолята, перспективных для использования в качестве заквасочных культур.

Введение

Производство ферментированных молочных продуктов основано на использовании бактериальных заквасок (БЗ) и бактериальных концентратов (БК), которые могут включать в свой состав как микроорганизмы разных таксономических групп, так и монокультуры. Получение готовых продуктов с заданным комплексом свойств во многом определяется составом и свойствами применяемых микроорганизмов.

Для производства ферментированных молочных продуктов (в частности, творога, сметаны, ряда кисломолочных напитков и т. п.) используются бактериальные концентраты и закваски, в состав которых входят штаммы лактококков *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* и термофильного стрептококка *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus.* В составе БЗ и БК обычно используется от 3 до 7 штаммов *Lactococcus lactis* ssp. и от 1 до 3 штаммов *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* [1].

Источниками выделения молочнокислых микроорганизмов в основном являются растения, фрукты, овощи, сырое молоко и молочные продукты, в том числе самоквасные. Очень важно правильно провести все этапы выделения и идентификации для определения видовой принадлежности бактерий, в дальнейшем планируемых для использования в качестве заквасок [3].

Селекция молочнокислых бактерий включает ряд этапов: отбор образцов, содержащих молочнокислые бактерии, и их обогащение молочнокислой микрофлорой; высев обогащенной культуры на плотную питательную среду и термостатирование посевов; выделение колоний в стерильное обезжиренное молоко и исследование выделенных изолятов по ряду признаков, позволяющих установить их принадлежность к тому или иному виду молочнокислых бактерий и их производственную ценность [3].

Традиционно идентификацию и классификацию молочнокислых бактерий проводили на основе изучения морфологических, физиологических и биохимических признаков [2]. В последние годы наряду с традиционными методами исследования для идентификации микроорганизмов используют изучение их геномных характеристик. В специализированных лабораториях, занимающихся выделением, изучением и отбором наиболее перспективных в производстве культур молочнокислых бактерий, применяют различные молекулярно-генетические методы, позволяющие устанавливать точную видовую принадлежность штаммов, а также типировать и паспортизировать производственные культуры [4, 5].

Наиболее универсальным молекулярно-генетическим методом, позволяющим проводить корректную генотипическую идентификацию бактериальных изолятов, является анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Он рекомендован в качестве одного из стандартов и общепринят в наиболее авторитетных коллекциях культур микроорганизмов [6–8].

Изучение молочнокислых бактерий с использованием комплексного подхода к идентификации и оценке производственно-ценных свойств, включающее как классические микробиологические, так и современные молекулярно-генетические методы, дает возможность выделить штаммы, перспективные для использования в качестве заквасок.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись изоляты молочнокислых микроорганизмов, выделенные из накопительных культур и планируемые для пополнения Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

В работе использовали питательные среды: ВОМ-10 (10 %-е восстановленное молоко); лакмусовое молоко (в 1000±10 $см^3$ среды ВОМ-10, подогретой до 80±2 °С добавляют стерильный раствор лакмуса до образования интенсивного фиолетового цвета); среда ГО (молоко, гидролизованное панкреатином или поджелудочной железой крупного рогатого скота); пастеризованное молоко – молоко, отвечающее требованиям СТБ 1598 для молока не ниже высшего сорта; агаризованная среда ГО (к приготовленному гидролизованному молоку добавляют агар-агар до концентрации 1,5 %); плотная питательная среда для выделения

ароматобразующих лактококков (гидролизованное молоко с 1 % лимоннокислого кальция и 1,5 % агара); среда М17 с аргинином.

Микроскопирование препаратов проводили по ГОСТ 10444.11.

Биохимическая идентификация проводилась с использованием тест-системы API-50CHL (bioMerieux, Франция) и программного обеспечения к ней API WEB.

Определение и анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили, придерживаясь ранее приведенных методик [9].

Результаты и их обсуждение

Для выделения молочнокислых бактерий, в частности, лактококков и термофильного стрептококка, использовали накопительные культуры, полученные из различных источников, включающие надземные части культурных растений, плоды, дикорастущие лиственные и хвойные растения и заложенные на хранение при температуре не выше −18 °С в Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий (табл. 1).

В рамках проводимой работы были изучены культурально-морфологические и производственно-ценные свойства накопительных культур мезофильных и термофильных микроорганизмов (табл. 2–3).

В микроскопических препаратах накопительные культуры мезофильных микроорганизмов были представлены грамположительными кокками, расположенными поодиночке, парами или в цепочках. Исследуемые культуры сквашивали пастеризованное молоко в течении 5–5,5 ч. Культуры Р5 и Р68, не сформировавшие молочный сгусток в течение 6 ч, были исключены из дальнейшего исследования (см. табл. 2).

Нами также были исследованы пять накопительных культур термофильных молочнокислых бактерий (см. табл. 3). Четыре накопительные культуры, клетки которых представлены грамположительными цепочками кокков, сквашивали цельное молоко за 3–3,5 ч (при 42±2 ºС). Одна культура термофильных бактерий формировала сгусток в пастеризованном цельном молоке за 6 ч (при 42±2 ºС) и была исключена из дальнейших исследований.

На следующем этапе для получения изолятов был проведен рассев накопительных культур. Всего было получено 230 изолятов мезофильных и 20 изолятов термофильных молочнокислых микроорганизмов.

Полученные изоляты заквасочных культур изучали по культурально-морфологическим и производственно-ценным свойствам (форма и расположение клеток в микроскопическом препарате, фагочувствительность, способность сквашивать 10 %-е восстановленное молоко, газо- и ароматообразование). Все отобранные изоляты молочнокислых бактерий оказались фагоустойчивыми, за исключением штамма Р62/9 б/з (фагочуствительность 35,7 %), который был исключен из дальнейших исследований.

Таблица 1. Источники выделения накопительных культур молочнокислых бактерий

№ п/п	Рабочий номер накопительной культуры	Наименование объекта для выделения	Географический пункт отбора образца
1	Р1	сосна (хвоя)	Чернигов, Украина
2	Р5	черника (листья)	Барселона, Испания
3	Р50	плоды яблони	Дрогичин, Брестская обл.
4	Р51	плоды яблони	Молодечно, Минская обл.
5	Р54	плоды яблони	Дрогичин, Брестская обл.
6	Р55	плоды груши	Молодечно, Минская обл.
7	Р57	плоды груши	Щучин, Гродненская обл.
8	Р59	плоды яблони	Янушковичи, Логойский р-н
9	Р62	эхинацея (листья)	Янушковичи, Логойский р-н
10	Р63	плоды яблони	Узда, Минская обл.
11	Р68	донник белый (листья)	Нарочь, Минская обл.
12	Р75	сосна (хвоя)	Нарочь, Минская обл.
13	Р91	плоды яблони	Верхнедневинск, Витебская обл.
14	Р92	плоды яблони	Браслав, Витебская обл.
15	Р93	яблоко (антоновка)	Минск
16	Р97	клюква (ягоды)	Высокая Гора, Пуховичский р-н
17	Р98	плоды яблони	Богино, Витебская обл.
18	Р99	виноград (ягоды)	Глуск, Могилевская обл.
19	Р108	мох	Шацк, Минская обл.
20	Р118	молоко	ГМЗ № 2, г. Минск
21	Р126	ель (хвоя)	Залесье, Минский р-н
22	Р129	лук (перо)	Лысовичи, Минская обл.
23	Р130	роза (бутон)	Янушковичи, Логойский р-н
24	Р133	плоды яблони	Лысовичи, Минская обл.
25	Р134	плоды груши	Большие Пруссы, Копыльский р-н

Отбирали изоляты мезофильных микроорганизмов, сильных кислотообразователей, сквашивающих пастеризованное цельное молоко при 30±2 °С в течение 5–6 ч (по результатам трех экспертиз). Слабые кислотообразователи (образцы Р62/1 d, Р62/2 d, Р62/6 d, Р62/7 d) формировали сгусток в стерильном молоке в течение 24 ч, а с основой - сильным кислотообразователем за 5,5–7,5 ч, при этом время окрашивания по щелочной пробе составило 5–8 мин. в обоих случаях.

Изоляты термофильных микроорганизмов сквашивали пастеризованное цельное молоко за 2,5–3,5 часа (при 42±2 °С) и за 5,5–6,5 часов (при 30±2 °С) (по результатам трех экспертиз).

Активность свертывания и органолептические свойства выделенных штаммов являются наиболее важными и решающими показателями, определяющими их пригодность для использования в производстве. Поэтому была изучена сквашивающая способность для 16 мезофильных

изолятов (по одному из каждого образца) на различных видах молочного сырья (цельное молоко, сливки, обезжиренное молоко) (рис. 1).

Таблица 2. Культурально-морфологические и производственно-ценные свойства накопительных культур мезофильных микроорганизмов

Рабочий номер культуры	Морфология клеток	Время сквашивания пастеризованного цельного молока, ч при 30±2 ºС	Рост при 47±2°С	Определение образования диацетила, мин	Каталаза	Фаго-чувствительность, %
Р1, Р62, Р118, Р129, Р133	грамположительные кокки, диплококки, короткие цепочки кокков	5	не растет	обр.	не обл.	0
Р5, Р68	грамположительные кокки, диплококки, короткие цепочки кокков	>6,5	не растет	не обр.	не обл.	0
Р50, Р51, Р54, Р55, Р57, Р59, Р63, Р75, Р92, Р93, Р97, Р98, Р99, Р108, Р126, Р130, Р134	грамположительные кокки, диплококки, короткие цепочки кокков	5	не растет	не обр.	не обл.	0
Р91	грамположительные кокки, диплококки, короткие цепочки кокков	5,5	не растет	не обр.	не обл.	0

Установлено, что для большинства изолятов сквашивающая активность цельного молока при 30±2°С составила 5 ч – 5 ч 30 мин, а обезжиренного молока – 5 ч 30 мин – 5 ч 45 мин, за исключением изолята Р62/2 d, у которого время сквашивания цельного и обезжиренного молока составляет 6 ч 30 мин. Сливки, исследуемые изоляты, сквашивали в течение 5 ч 30 мин – 6 ч.

Для установления видовой принадлежности молочнокислых бактерий определяли следующие физиолого-биохимические характеристики изолятов: способность бактерий к росту при температурах 10 и 40 °С, способность бактерий к росту в лакмусовом молоке и в молоке с 0,1 % метиленовым голубым, способность бактерий к росту в среде с содержанием NaCl 2, 4 и 6,5 %, в среде с pH 9,2 и 9,6, способность бактерий образовывать NH_3 из аргинина, способность образовывать кислоту из сахаров.

Метаболизм сахаров у 13 изолятов мезофильных культур был изучен с использованием стрип-систем API 50 CH. Использование таких тест-систем позволяет быстро определить наличие сахаролитической реакции.

Результаты показали, что все изученные культуры обладают способностью утилизировать рибозу, галактозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, лактозу, трегалозу, N-ацетил-глюкозамин, арбутин, салицин, целлобиозу, мальтозу. В то же время только некоторые из исследуемых изолятов ферментируют амигдалин, манит, гентобиозу. И только один

изолят (Р62/2d) утилизирует сахарозу. Полученные данные говорят о гетерогенной сахаролитической активности исследуемых изолятов.

Таблица 3 – Культурально-морфологические и производственно-ценные свойства накопительных культур термофильных микроорганизмов

Рабочий номер культуры	Морфология клеток	Грампринадлежность	Время сквашивания пастеризованного цельного молока, ч при 42±2 ºС	Наличие каталазы
Р369	цепочки кокков	грамположительные	3,5 ч 30 мин	не обнар.
Р409	кокки, диплококки, цепочки кокков	грамположительные	6 ч	не обнар.
Р469, Р472, Р475	цепочки кокков	грамположительные	3 ч	не обнар.

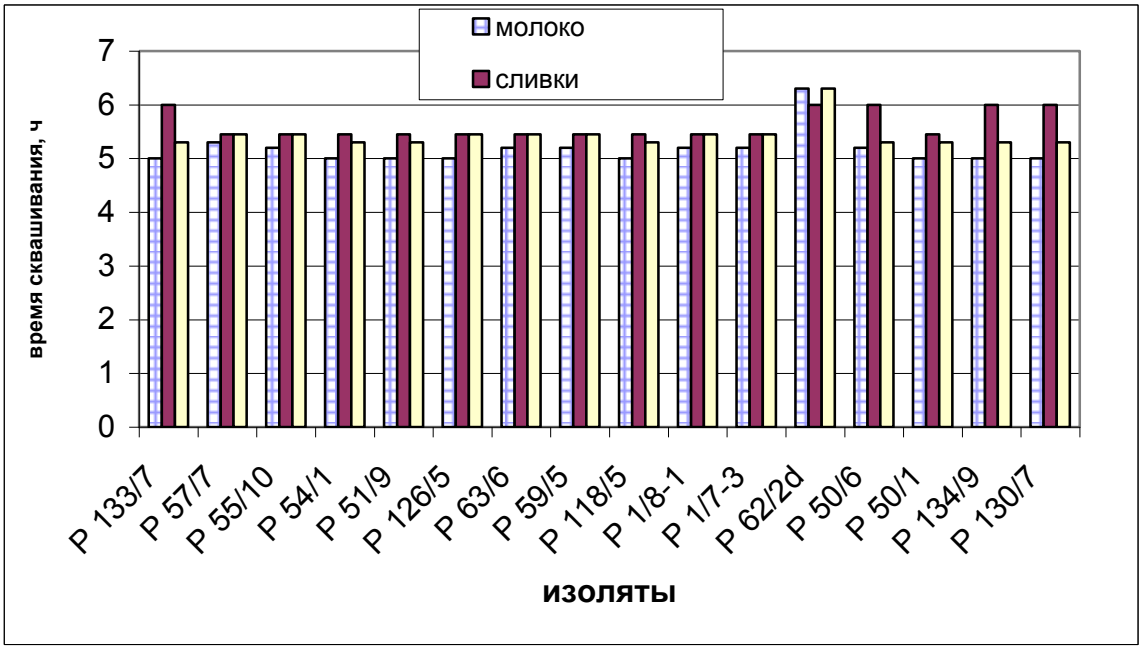

Рис. 1. Сквашивающая способность изолятов мезофильных молочнокислых бактерий

Интерпретацию полученных данных осуществляли при помощи специального программного обеспечения ATB-plus. По способности ферментировать сахара все исследуемые изоляты отнесены к подвиду *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (табл. 4).

Нами также были изучены физиолого-биохимические характеристики термофильных молочнокислых бактерий. Согласно определителю Берджи бактерии вида *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, как и другие стрептококки, не способны расти при содержании в среде NaCl = 6,5 % и выше [10]. Согласно нашим данным

все исследуемые изоляты способны к росту на среде с 2 % NaCl и не растут на среде с 4 % и 6,5 % NaCl.

Таблица 4. Результаты идентификации изолятов мезофильных культур с помощью набора API 50 CH.

№ изолята	Оценка уровня идентификации	
	% id	T*
P 57/7	64,1	0,90
P 55/10	92,3	0,94
P 50/6	87,7	0,96
P 133/7	64,1	0,90
P 130/7	64,1	0,90
P 134/9	64,1	0,90
P 1/7-3	97,9	1,00
P 1/8-1	97,9	1,00
P 54/1	92,3	0,94
P 59/5	84,5	0,84
P 63/6	84,5	0,84
P 118/5	75,6	0,88
P 62/2d	92,5	0,94

Особенностью термофильного стрептококка является относительно слабо выраженная сахаролитическая активность: считается, что типичные штаммы этого вида сбраживают только лактозу, глюкозу, сахарозу и не ферментируют мальтозу, маннозу, манит, арабинозу, сорбит, ксилозу, галактозу и многие другие углеводы [10,11]. Все исследуемые нами из них за исключением 469/6-8, ферментировали галактозу, а четыре изолята ферментировали раффинозу. С другой стороны, изоляты 475/2-2, 475/2-5 и 469/6-8 не сбраживали глюкозу.

По совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик все исследуемые изоляты термофильных молочнокислых бактерий отнесены к подвиду *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus.*

На следующем этапе наших исследований была проведена молекулярно-генетическая идентификация 15 изолятов с помощью анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, которая предусматривает определение таксономического положения идентифицируемого организма путем определения сходства между нуклеотидными последовательностями генов 16S рРНК идентифицируемых организмов и типовых, а также точно идентифицированных штаммов наиболее родственных видов или подвидов бактерий.

В результате молекулярно-генетического анализа 10 изолятов мезофильных лактококков идентифицированы как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (табл. 5). Изоляты P133/7, P134/9 и P63/6 по результатам оценки сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК занимали

промежуточное положение между подвидами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae.* Два изолята термофильного стрептококка были идентифицированы как *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (см. табл. 5).

Таблица 5 - Идентификация исследуемых культур по результатам анализа генов 16S рРНК.

Штамм (рабочее обозначение)	Идентификация по фенотипу	Протяженность участков секвенирования	Идентификация по результатам анализа генов 16S рРНК
Р133/7	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	498 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* или *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*
Р57/7	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	500 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р134/9	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	443 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* или *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*
Р55/10	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	498 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р54/1	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	422 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р51/9	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	493 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р50/6	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	770 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р63/6	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	495 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* или *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*
Р59/5	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	499 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р118/5	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyactis*	500 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р1/8-1	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyactis*	501 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р1/7-3	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyactis*	500 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р62/2d	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyactis*	490 п.о.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Р475/2-5	*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*	500 п.о.	*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*
Р469/6-8	*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*	500 п.о.	*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Вывод

В результате проведенных исследований выделены из природных источников 13 изолятов мезофильных и 2 изолята термофильных молочнокислых бактерий, перспективных для использования в качестве заквасочных культур. На основании характеристики культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств мезофильные изоляты были идентифицированы как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, а все полученные термофильные бактерии – как *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Оценка сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК полностью подтвердила результаты фенотипической идентификации термофильных бактерий и 10 мезофильных штаммов. Три мезофильных штамма по результатам генотипической идентификации занимали промежуточное положение между подвидами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae.*

Литература

1. Банникова, Л.А. Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

2. Банникова, Л.А. Селекция молочнокислых бактерии и их применение в молочной промышленности / Банникова, Л.А. // – Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.

3. Ботина, С.Г. Видовая идентификация и паспортизация молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования / С.Г. Ботина // Молочная промышленность. – 2008. – № 3. – С. 52–54.

4. Ботина, С.Г. Генетическое многообразие штаммов термофильных бактерий на территории стран СНГ / С.Г. Ботина [и др.] // Биотехнология. – 2004. – № 2. – С. 3–12.

5. Ботина, С.Г. Идентификация и характеристика отечественных штаммов термофильных молочнокислых бактерий: автореф. дис. канд. биол. наук: – М:, 2004. – 22 с.

6. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Дж. Хоулта [и др.]– М.: «Мир», 1997. – Т. 2. – 368 с.

7. Stackebrandt E, Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. 52: 1042-1047.

8. Teuber, M. The Genus Lactococcus / M. Teuber, A. Geis // In: The Prokaryotes. – M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, (Eds.), 3d ed., Springer-Verlag, New York, NY. – 2006. – P. 205–228.

9. Turenne C.Y., Tschetter L., Wolfe J. Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases: Identifying Nontuberculous Mycobacterium Species // Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – V. 39. – № 10. – P. 3637-3648.

11. Weisburg, W.G., 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173. – № 2. – P. 697–703.

A. Biruk[1], N. Furik[1], D. Bazhanov [2], K. Yatsevich[2], S. Vasilenko[1], S. Barunova[1]
[1]Institute of Meat and Dairy Industry
[2]Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus

OBTAINING OF STARTER CULTURES LACTOCOCCUS AND STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS FOR PRODUCTION BACTERIAL STARTER AND CONCENTRATES.

Summary

61 cultures of mesophilic and 7 cultures of thermophilic lactic acid bacteria were isolated from natural sources.

Based on the morphological, cultural and biochemical traits, all the mesophilic strains were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and all the thermophilic bacteria were affiliated to *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus.* Analysis of 16S rRNA gene nucleotide sequences confirmed the results of phenotypic identification.

Candidate starter strains of 13 mesophilic and 2 thermophilic lactic acid bacteria were obtained in as a result of our research.