

*Н.Н. Фурик, к.т.н., доцент, Е.Н. Бирюк, к.с.-х.н., Н.К. Жабанос, к.т.н., доцент,  
А.А. Соглаева, Д.С. Корягина  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ЕСТЕСТВЕННЫХ КОМБИНАЦИЙ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ МОЛОКА И САМОКВАСНЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

*N. Furyk, A. Biruk, N. Zhabanos, A. Soglaeva, D. Koryagina  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

## **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NATURAL COMBINATIONS OF LACTIC ACID MICROORGANISMS FROM MILK AND SPONTANEOUSLY FERMENTED DAIRY PRODUCTS**

*e-mail: furik\_nn@tut.by, biohimbel@yandex.by, nzhabanos@tut.by, alla\_r@tut.by,  
koryagina.darya06@gmail.com*

*Из образцов сырого коровьего молока и самоквасных молочных продуктов выделено 19 образцов естественных комбинаций молочнокислых бактерий. С помощью молекулярно-генетических методов проведена идентификация полученных образцов. Исследованы производственно-ценные свойства и фагоустойчивость естественных комбинаций.*

*Nineteen samples of natural combinations of lactic acid bacteria were isolated from raw cow's milk and spontaneously fermented dairy products. The obtained samples were identified using molecular genetic methods. The production-related properties and bacteriophage resistance of the natural combinations were investigated*

**Ключевые слова:** естественные комбинации, молочнокислые бактерии, идентификация методом ПЦР, биотехнологический потенциал, фагоустойчивость.

**Key words:** natural combinations, lactic acid bacteria, identification by PCR, biotechnological potential, phage resistance.

**Введение.** Качество готового молочного продукта во многом зависит от качества бактериальной закваски, используемой для приготовления этого продукта. Ассортимент бактериальных заквасок сегодня очень разнообразный, но все же поиск новых штаммов молочнокислых бактерий, перспективных в качестве заквасок и пробиотиков, остается приоритетным направлением развития различных отраслей пищевой промышленности [1, 2]. Вне зависимости от типа биотехнологического процесса использование консорциумов микроорганизмов встречается чаще, чем использование чистых культур, и, зачастую, они вносят важный вклад в обеспечение продукта желаемыми характеристиками. В целом, было отмечено, что сложные консорциумы более универсальны и устойчивы, чем чистые культуры, и обеспечивают большую устойчивость к воздействиям бактериофагов [3, 4].

Особую ценность представляют микробные штаммы и консорциумы, способные длительное время сохранять жизнеспособность и биохимическую активность. Эти свойства зависят не только от внешних факторов производства, таких как состав питательной среды и температурный режим, но и от баланса биохимически активных микробных клеток в популяциях. Именно этот баланс определяет жизнеспособность культур, их выживаемость и практическую значимость в современных производственных условиях [5, 6].

Известно также, что природные симбиозы микроорганизмов отличаются от чистых культур большей устойчивостью к изменениям качества молока-сырья и циркулирующим бактериофагам. Поэтому учеными постоянно предпринимаются попытки извлечь чистые культуры из естественного симбиоза [7].

Таким образом, изучение видового состава, свойств и взаимодействия заквасочных культур в естественных микробных ассоциациях остается важной задачей. Природные закваски могут рассматриваться как перспективный источник лактобактерий, обладающих ценными для перерабатывающей промышленности свойствами и необходимой стабильностью для использования в качестве заквасочных культур.

**Материалы и методы исследований.** Объектами исследования являлись 39 образцов молока коровьего сырого и 14 образцов самоквасных молочных продуктов, а также выделенные из них естественные комбинации молочнокислых бактерий.

В настоящих исследованиях применены общепринятые микробиологические, органолептические, микроскопические и молекулярно-генетические методы.

Для культивирования естественных комбинаций использованы среды ВОМ-10 и ГО 0,15 %.

Для контроля наличия БГКП, дрожжей, споровых микроорганизмов – среды Кесслер, Эндо, Сабуро, Ласса.

Видовой состав полученных естественных комбинаций микроорганизмов определяли методом ПЦР с использованием специфичных праймеров лактобацилл и лактококкам.

**Результаты и их обсуждение.** Для получения естественных комбинаций молочнокислых бактерий отобраны 39 образцов молока коровьего сырого и 14 образцов самоквасных молочных продуктов, из которых получены 50 накопительных культур.

Проведены исследования по изучению чистоты полученных накопительных культур (рисунок 1).

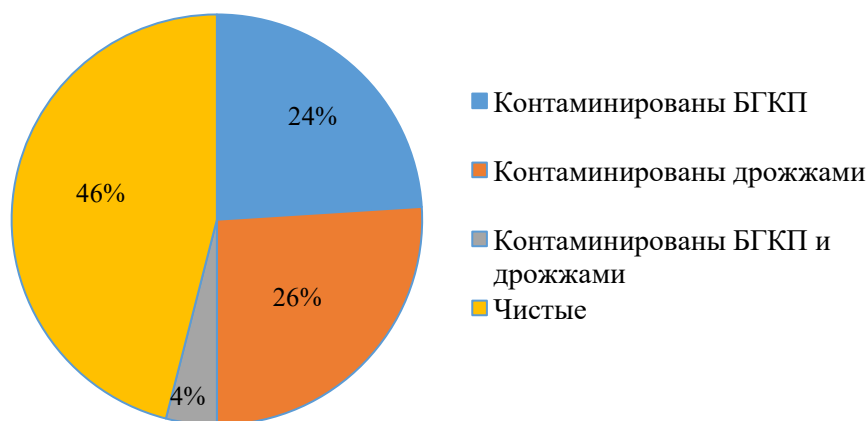


Рисунок 1 – Исследование накопительных культур на наличие посторонней микрофлоры

Источник данных: собственная разработка

Результаты исследований накопительных культур на наличие посторонней микрофлоры показали, что среди исследуемых накопительных культур у 24 % установлено наличие бактерий группы кишечной палочки (БГКП), у 26 % присутствовали культуры дрожжей, у 4 % – дрожжи и БГКП, у 46 % культур не обнаружено наличие посторонней микрофлоры.

Результаты проведенных исследований явились основой разработки схемы выделения естественных комбинаций микроорганизмов из сырого молока и самоквасных молочных продуктов, при этом выделено 19 естественных комбинаций молочнокислых бактерий, не содержащих посторонних микроорганизмов.

Проведена молекулярно-генетическая идентификация полученных естественных комбинаций. По результатам высокопроизводительного секвенирования (NGS) во всех исследуемых естественных комбинациях наибольшую долю прочтений составляет род *Lactococcus* – в среднем 73,06 %. Исследование методом ПЦР со специфичными праймерами к подвидам *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* подтвердило наличие лактококков, а со специфичными праймерами *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* выявило наличие термофильного стрептококка. Электрофореграммы представлены на рисунках 2–4.

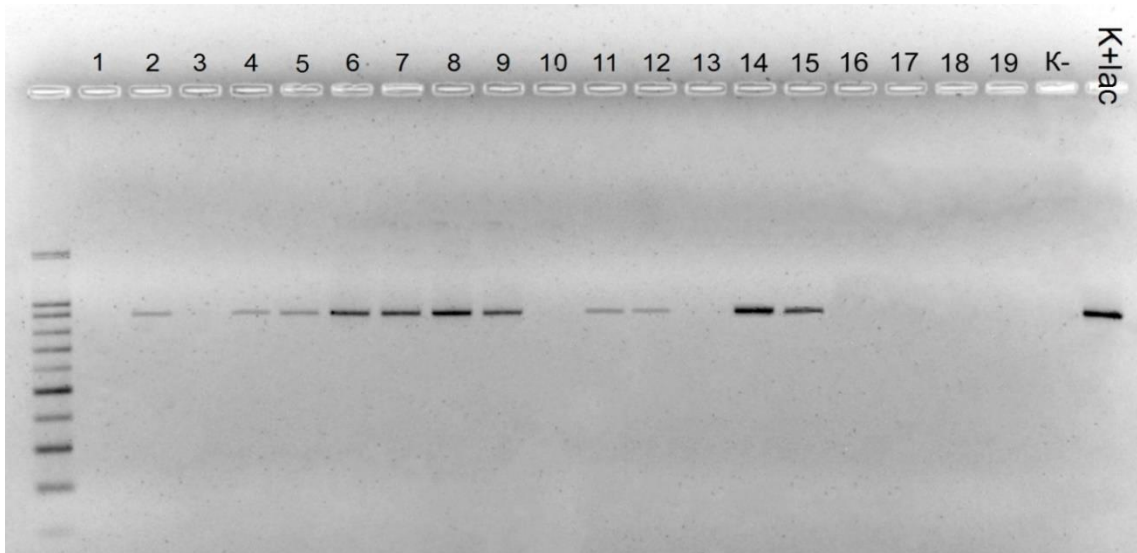


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК из образцов естественных комбинаций с праймерами *lac-F* и *lacL-R* для идентификации *L. lactis* subsp. *lactis*

Источник данных: собственная разработка.

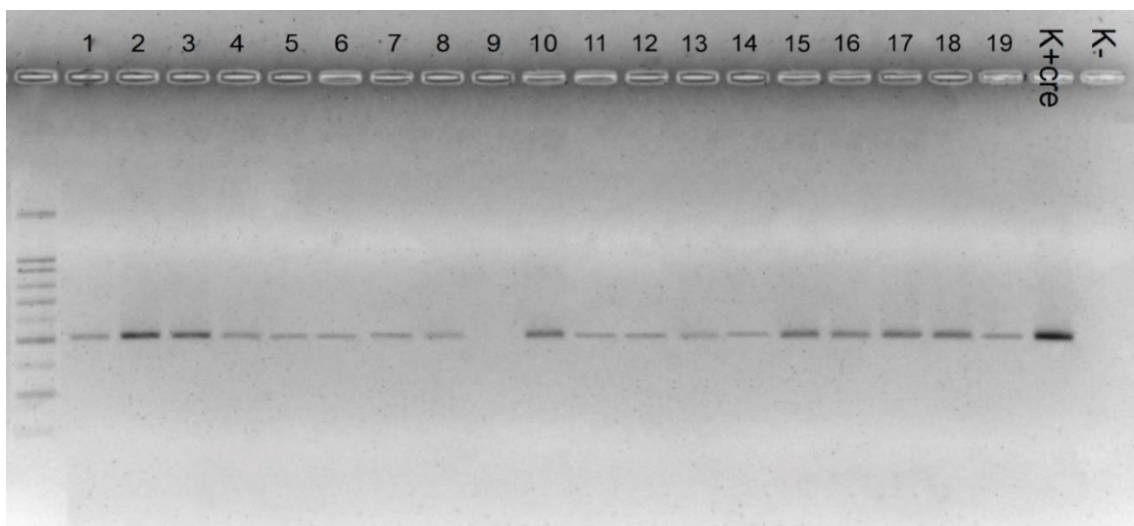


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК из образцов естественных комбинаций с праймерами *Lcre-F* и *Lcre-R* для идентификации *L. lactis* subsp. *cremoris*

Источник данных: собственная разработка.

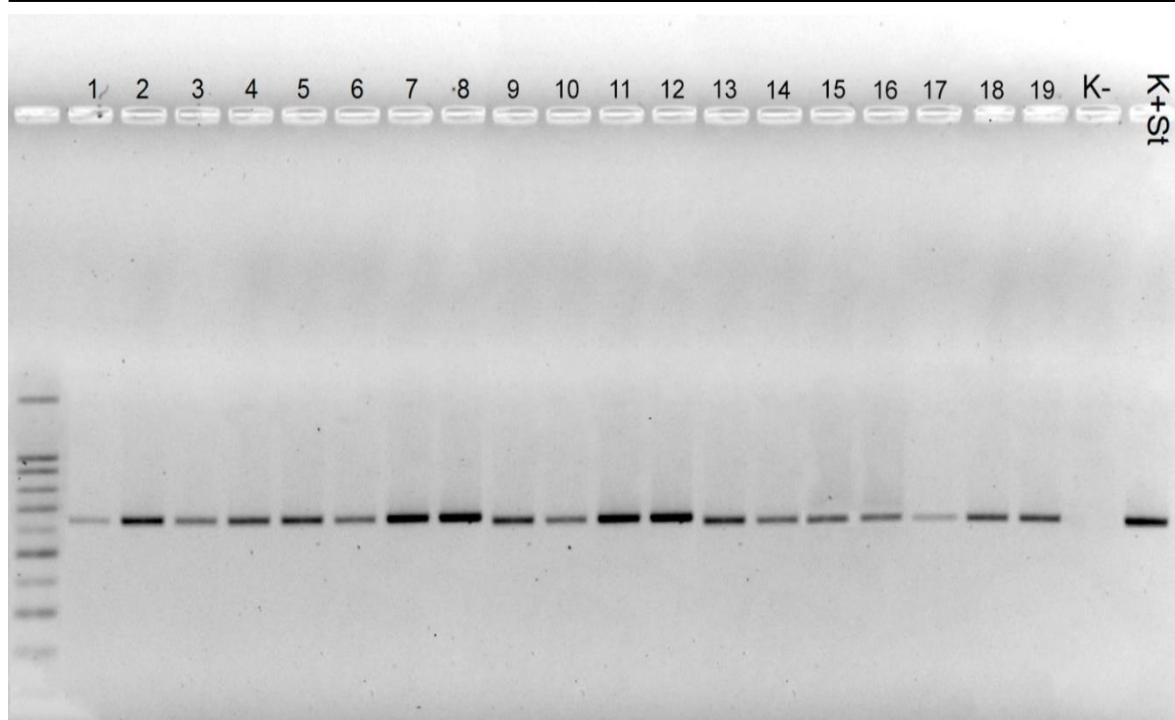


Рисунок 4 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК из образцов естественных комбинаций с праймерами St-FiSt-R для идентификации *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
 Источник данных: собственная разработка.

При этом наличие бактерий подвида *L. lactis* subsp. *lactis* установлено в 11 образцах естественных комбинаций, а бактерий подвида *L. lactis* subsp. *cremoris* – в 18 образцах. Исключение составила комбинация №9. Бактерии термофильного стрептококка выявлены во всех 19 образцах естественных комбинаций.

Результаты ПЦР со специфичными праймерами к бактериям вида *Lactococcus lactis* подтверждают ранее полученные результаты с использованием NGS – данные виды молочнокислых бактерии составляют основу естественных комбинаций.

Методом ПЦР со специфичными праймерами к различным видам лактобацилл определено наличие грамположительных молочных палочек в составе данных естественных комбинаций. Видовой состав 19 образцов естественных комбинаций представлен в таблице 1.

Среди грамположительных молочнокислых палочек в составе всех естественных комбинаций, кроме комбинации №9, обнаружен *Lactobacillus helveticus*. В четырех образцах выявлены микроорганизмы вида *Lactobacillus acidophilus*. В 16 естественных комбинациях установлено наличие *Lactobacillus casei*, в 13 – *Lactobacillus rhamnosus*. В одной естественной комбинации выявлено наличие бактерий *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Таблица 1 – Видовой состав естественных комбинаций микроорганизмов

№ п/п	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
3	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
13	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
15	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
16	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
18	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
19	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Источник данных: собственная разработка.

На рисунке 5 представлено количество видов молочнокислых бактерий, обнаруженных в естественных комбинациях.

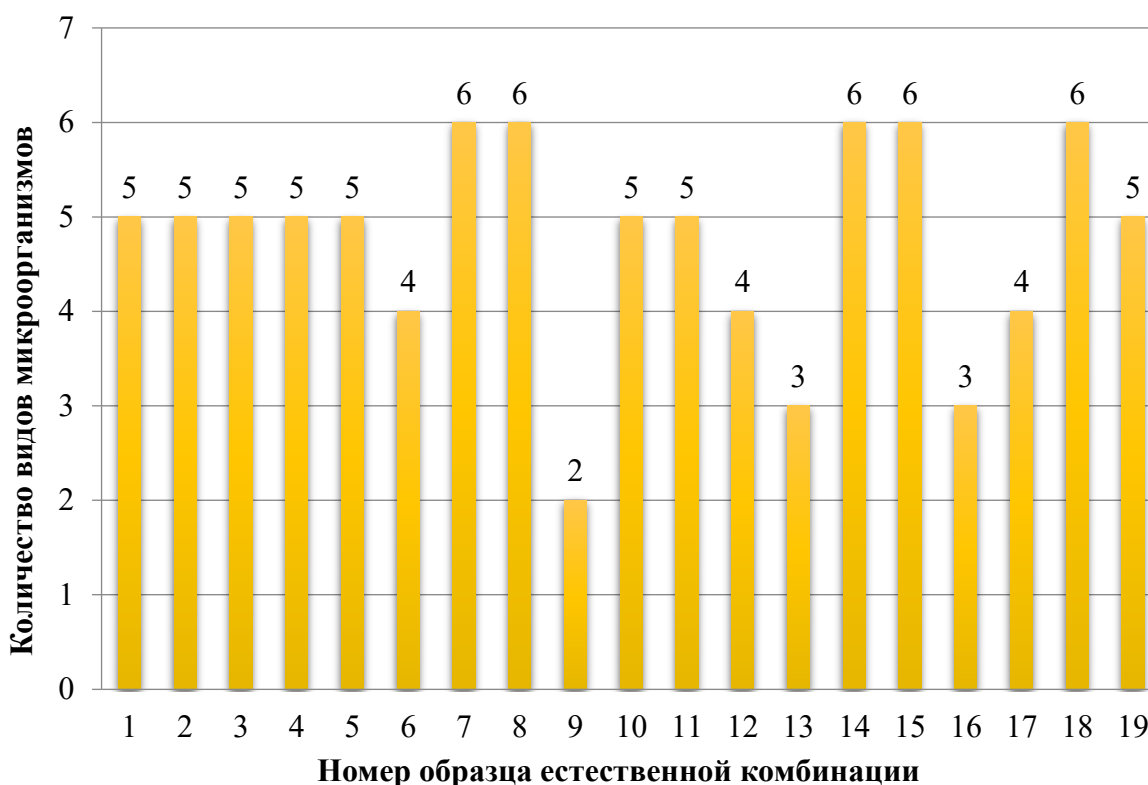


Рисунок 5 – Видовое разнообразие изученных естественных комбинаций микроорганизмов

Источник данных: собственная разработка.

Видовое разнообразие комбинации №7, №8, №14, №15, №18 обеспечено шестью видами молочнокислых бактерий, что позволяет считать его характеристики более устойчивыми. Консорциум №9 представлен только 2 видами молочнокислых бактерий. Несмотря на то, что консорциумы №7, №8 и №9 получены из одного исходного образца сырого молока, вследствие разных температурных режимов получения накопительных культур данные консорциумы имели разный видовой состав.

Исследование производственно-ценных свойств изучаемых 19 образцов естественных комбинаций показало, что:

- 8 комбинаций сквашивают цельное молоко за 5 ч – 6 ч 30 мин при температуре +30°C, с образованием сгустка с чистым кисломолочным вкусом, невязкой консистенции, из них 5 образцов способны к газообразованию (0,3-0,7 см);
- 7 естественных комбинаций сквашивают цельное молоко за 5 ч 30 мин – 6 ч 30 мин при температуре +37°C, с образованием сгустка с чистым кисломолочным вкусом, невязкой консистенции, из них два газообразующие (0,3–0,4 см);
- 4 естественные комбинации сквашивают цельное молоко за 3 ч 30 мин – 4 ч при температуре +47°C с образованием сгустка с чистым кисломолочным вкусом, невязкой консистенции.

Термофильные консорциумы №16–18 на стерильном молоке формировали предельная кислотность в 164–206 °Т, остальные консорциумы – предельную кислотность не выше 122 °Т.

Все образцы естественных комбинаций проявили способность к росту в питательной среде с содержанием NaCl в количестве 2 % и 4 %. Как показали исследования, при 6 % NaCl зарегистрирован активный рост всех исследуемых консорциумов, за исключением комбинаций №17 и №19.

Установлено, что исследуемые естественные комбинации микроорганизмов обладают способностью развиваться в среде MRS (значения оптической плотности и активной кислотности варьировали от 0,99 до 1,64 ед. ОП и от 4,72 до 4,17 ед. pH соответственно).

Оценка фагочувствительности естественных комбинаций показала, что все 19 образцов проявили устойчивость к 29 бактериофагам 18 группы, относящиеся к видам *Ceduovirus*, *Skunavirus* и *Moineavirus*.

Выделенные естественные комбинации микроорганизмов направлены на лиофилизацию и хранение с последующей оценкой производственно-ценных характеристик после хранения.

**Выводы.** Выделены из сырого коровьего молока 19 естественных комбинаций, способные сквашивать молочное сырье с образованием сгустка с чистым кисломолочным вкусом, невязкой консистенции. Видовой состав естественных комбинаций представлен 2–6 видами молочнокислых бактерий. Способность к газообразованию отмечена у 8 комбинаций. Подтверждена способность естественных комбинаций развиваться в питательной среде MRS, установлена их фагоустойчивость к 29 бактериофагам молочнокислых бактерий 3 видов (*Ceduovirus*, *Skunavirus* и *Moineavirus*).

### Список использованных источников

1. Ганина, В. И. Производство заквасок в России / В. И. Ганина, С. А. Фильчакова // Переработка молока. – 2018. – № 3. – С. 38–41.
1. Ganina, V. I. *Proizvodstvo zakvasok v Rossii [Starter culture production in Russia]* / V. I. Ganina, S. A. Fil'chakova // *Pererabotka moloka*. – 2018. – № 3. – S. 38–41.
2. Орлова, Т. Н. Выделение молочнокислых бактерий из объектов природного происхождения и отбор среди них штаммов, наиболее перспективных для создания бактериальных заквасок и концентратов / Т. Н. Орлова, А. Н. Иркитова // Биотехнология и общество в XXI веке : сб. ст. конф., г. Барнаул, 15-18 сент. 2015 г. / Изд-во АлтГУ ; редкол.: А.А. Ильичев (гл. ред.) [и др.] – Барнаул, 2015. – С. 232–235.
2. Orlova, T. N. *Vydelenie molochnokislykh bakterij iz ob'ektov prirodного proishozhdenija i otbor sredi nih shtammov, naibolee perspektivnyh dlja sozdaniya bakterial'nyh zakvasok i koncentratov [Isolation of lactic acid bacteria from natural sources and selection of the most promising strains for the creation of bacterial starters and concentrates]* / T. N. Orlova, A. N. Irkitova // *Biotekhnologiya i obshchestvo v XXI veke : sb. st. konf., g. Barnaul, 15-18 sent. 2015 g. / Izd-vo AltGU ; redkol.: A.A. Il'ichev (gl. red.) [i dr.]* – Barnaul, 2015. – S. 232–235.
3. Parente, E. *Starter Cultures: General Aspects* / E. Parente, T.M. Cogan, I.B. Powell // *Cheese* / P. L.h. Mcsweeney, P. F. Fox, D. W. Everett [et. al.] ; editor Paul L.h. Mcsweeney. – London, 2017. – Chap. 8. – P. 201–226.
4. Smid, E. J. *Microbe – microbe interactions in mixed culture food fermentations* / E. J. Smid, C. Lacroix // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2013. – Vol. 24, № 2. – P. 148–154.
5. Решетник, Е. И. Влияние компонентного состава на пищевую и биологическую ценность комбинированного продукта / Е. И. Решетник, Е. А. Уточкина // Вестник ВСГУТУ. – 2013. – Т. 2, № 41. – С. 63–67.
5. Reshetnik, E. I. *Vlijanie komponentnogo sostava na pishhevuyu i biologicheskuyu cennost' kombinirovannogo produkta [The influence of component composition on the nutritional and biological value of a combined product]* / E. I. Reshetnik, E. A. Utochkina // *Vestnik VSGUTU*. – 2013. – T. 2, № 41. – S. 63–67.

6. Сидоренко, О. Д. Использование некоторых признаков природных штаммов лактобактерий для заквасок / О. Д. Сидоренко, О. Н. Пастух // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30, № 8. – С. 94–98.

7. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий для ферментированных молочных продуктов / Т. Н. Орлова, И. А. Функ, Р. В. Дорофеев, [и др.] // Ползуновский вестник. – 2019. – № 2. – С. 47–50.

6. Sidorenko, O. D. Ispol'zovanie nekotoryh priznakov prirodnyh shtammov laktobakterij dlja zakvasok [Using some features of natural lactobacillus strains for starter cultures] / O. D. Sidorenko, O. N. Pastuh // Dostizhenija nauki i tehniki APK. – 2016. – T. 30, № 8. – S. 94–98.

7. Orlova, T. N. Vydelenie i identifikacija molochnokislyh bakterij dlja fermentirovannyh molochnyh produktov [Isolation and identification of lactic acid bacteria for fermented dairy products] / T. N. Orlova, I. A. Funk, R. V. Dorofeev [i dr.] // Polzunovskij vestnik. – 2019. – № 2. – S. 47–50.