

УДК 579.8.06(047.31)(476)

*Н.С. Романович, С.Л. Василенко, к.б.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ИЗУЧЕНИЕ ИСТОЧНИКОВ ВЫДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

(Поступила в редакцию 7 апреля 2016 г.)

Охарактеризованы традиционные источники выделения молочнокислых бактерий. Показана возможность использования нетрадиционных источников (пресноводной и морской рыбы) для выделения промышленно-ценных культур.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, лактококки, лактобациллы, источники выделения.

Для получения продукции стабильно высокого качества требуется использование заквасок в наиболее активном состоянии, для чего в коллекциях, поддерживающих промышленно-ценные штаммы, необходимо производить регулярное пополнение и обновление заквасочных культур, поскольку промышленно-ценные свойства заквасочных микроорганизмов могут изменяться при их длительном культивировании и хранении, а так же из-за существующей проблемы бактериофагии на предприятиях. Поэтому необходимо получать новые фагоустойчивые штаммы, расширяя арсенал уже имеющихся, и иметь в распоряжении коллекции штаммов, которые в любой момент могут быть использованы для замены подвергнувшихся фаголизису, как в моноштаммовых, так и в полиштаммовых заквасках.

Выделение чистых культур молочнокислых бактерий включает ряд этапов, от выбора источников выделения, до исследования свойств выделенной культуры. Традиционными источниками выделения молочнокислых бактерий являются сырое молоко и самоквасные кисломолочные продукты, а также различные надземные части растений. В то же время, некоторыми исследователями начаты работы по выделению штаммов молочнокислых бактерий, обладающих производственно-ценными свойствами, и из таких нетрадиционных источников, как прикорневая почвенная зона растений, фекалии здоровых людей. Выделяемые при этом культуры обеспечивают быструю ферментацию молочного сырья, также как и штаммы, выделенные из традиционных источников. В связи с тем, что для выделения штамма используют другой образец, штаммы могут отличаться по своим свойствам, в частности обеспечивать высокую скорость ферментации молочного сырья при пониженных температурах, при сквашивании молока обладать низкой предельной кислотностью, быть устойчивыми к циркулирующим в настоящее время на предприятиях бактериофагам.

Целью работы являлось изучение источников выделения молочнокислых микроорганизмов.

Молочнокислые бактерии, включаемые в состав микрофлоры заквасок, используемых в производстве ферментированных молочных продуктов, по таксономическим, физиолого-биохимическим и функциональным признакам можно разделить на следующие группы [1]:

- мезофильные гомоферментативные молочнокислые лактококки, сбраживающие лактозу преимущественно до молочной кислоты, – *Lc. lactis*, *Lc. lactis*

subsp. cremoris и молочнокислые палочки рода *Lactobacillus* видов *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*.

- мезофильные гомоферментативные молочнокислые лактококки *Lc. lactis subsp. diacetylactis*, сбразивающие цитраты в присутствии углеводов с образованием углекислого газа, уксусной кислоты, ацетоина, диацетила;

- мезофильные гетероферментативные молочнокислые бактерии рода *Leuconostoc* (*Leu. cremoris*, *Leu. dextranicum*, *Leu. lactis*), сбразивающие лактозу с образованием молочной и уксусной кислот, этилового спирта и углекислого газа;

- термофильные гомоферментативные молочнокислые стрептококки (*Str. thermophilus*) и молочнокислые палочки видов *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis*.

Традиционными источниками выделения молочнокислых бактерий, в частности лактококков и термофильных стрептококков, являются сырое молоко, самоквасные кисломолочные продукты, а также растения – их корневая система, цветы (полевые, лесные, садовые), трава, силос, зерно (свежее и замороженное), овощи (свежие и квашеные) и фрукты (свежие и высушенные) [2, 3]. По данным М. Teuber и соавторов лактококки постоянно присутствуют в сыром молоке, на вымени, коже и в слюне коров [2]. В природных источниках северных и средних стран преобладают мезофильные молочнокислые бактерии, а в южных – термофильные молочнокислые бактерии [3].

Существуют отдельные районы, в которых преобладают те или иные разновидности молочнокислых бактерий, но не существует единого мнения о периоде их выделения. Весеннее молоко содержит различные вещества, задерживающие рост молочнокислых бактерий. Кроме того, оно беднее по содержанию свободных аминокислот. Следовательно, в такой среде могут развиваться гораздо более устойчивые формы молочнокислых бактерий, которые могут расщеплять белки молока [3]. Так, лактококки, выделенные из природных источников, обогащение которых проводили в весеннем молоке, наиболее устойчивы к пенициллину, фенолу и другим неблагоприятным факторам [3].

В лаборатории заквасок ВНИИМСа за 12 лет работы из естественных источников выделено 4 штамма *L. lactis subsp. diacetylactis*, образующих значительное количество диацетила. Наибольшей активностью обладали культуры, выделенные из цветка ольхи, самоквасной сметаны и яблока [4].

Культуры *L. lactis subsp. cremoris*, выделенные из естественных источников Сибири, не совсем типичны по температурному оптимуму развития, а хвойная растительность в холодное время года не всегда надежный источник выделения этого вида микроорганизмов [3].

Наиболее легко выделить производственно-ценные штаммы молочнокислых бактерий в летнее время года, когда качество молока и самоквасных молочнокислых продуктов выше, и в изобилии есть и другие источники выделения – цветы, растения, фрукты и овощи, однако некоторые из них довольно быстро теряют активность и выбраковываются [3].

Следовательно, наиболее перспективными источниками выделения молочнокислых бактерий (в частности, лактококков и термофильных стрептококков) являются сырое молоко и самоквасные молочные продукты, надземные части растений, свежие, замороженные и квашеные овощи и фрукты.

Лактобациллы – грам-положительные, неспорообразующие палочки со сложными пищевыми потребностями. Лактобациллы осуществляют метаболизм строго по типу брожения и обладают сложными пищевыми требованиями, нуждаясь в углеводах, аминокислотах, пептидах, эфирах жирных кислот, солях, производных аминокислот и витаминах. Продуктами метаболизма углеводов являются большое количество молочной кислоты и небольшое количество других соединений.

Лактобациллы растут в различных средах обитания, в которых содержатся в большом количестве растворимые углеводы, продукты расщепления белков, витамины, и характеризующихся низким давлением кислорода. Они способны расти в кислой среде, многие виды адаптированы к росту в широко варьирующих условиях среды, а продуцируемая ими в больших количествах молочная кислота снижает уровень pH субстрата и подавляет развитие многих других видов бактерий. Эти особенности привели к широкому распространению лактобацилл и освоению ими многих заметно различающихся сред обитания [5].

Ротовая полость человека является участком слизистой оболочки, постоянно испытывающим на себе воздействие внешних факторов, особенно во время дыхания и приема пищи. В этой большей частью анаэробной среде преобладают грамотрицательные анаэробы и стрептококки, в то время как лактобактерии составляют лишь около 1% от общего числа микроорганизмов в ротовой полости здорового человека [6]. В основном, лактобациллы обнаруживаются в количестве <0,1% от всех микроорганизмов на поверхности щеки и языка, <0,005% на десневой бляшке и <0,1% на десневой борозде и в слюне [7]. У младенцев и детей младшего возраста лактобациллы присутствуют в очень небольших количествах или находятся в ротовой полости временно. Лактобациллы, развивающиеся во рту детей 2–5-ти летнего возраста, представлены в основном видами *Lb. casei* и *Lb. rhamnosus*, иногда видами *Lb. acidophilus* и *Lb. fermentum* [8].

Используя среду Рогоза с мелизитозой в качестве единственного источника углеводов, Claesson and Crossner определили, что *Lb. casei* является наиболее распространенным представителем *Lactobacillus* орального происхождения, причем у детей его доля среди лактобацилл слюны выше, чем у взрослых [9].

Таким образом, одним из традиционных источников для выделения лактобацилл является ротовая полость: слюна, поверхности языка, десен, щек, зубов.

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека служит местом обитания для 400–500 различных видов и подвидов бактерий, большая часть из которых (10^{10} – 10^{12} /г) содержится в толстом кишечнике [10, 11]. Лактобациллы доминируют в желудке и тонком кишечнике, но в тощей кишке и толстой преобладают строгие анаэробы, такие как бактероиды, а лактобациллы составляют только 0,07–1% от общего числа бактерий [10, 11].

Сравнивая фекальную микрофлору новорожденных, находящихся на грудном и искусственном вскармливании, значительно большее количество *Lb. acidophilus* обнаруживается в фекалиях последних. В фекалиях детей в возрасте 3–220 дней, находящихся как на грудном, так и на искусственном вскармливании, Mitsuoka с сотрудниками обнаружили *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum* и *Lb. salivarius*, в количестве от 10^3 до 10^{10} /г фекалий. *Lb. reuteri*, по всей видимости, является преобладающим видом среди гетероферментативных лактобацилл в ЖКТ человека и большинства животных, проявляет близкое физиологическое сходство, но не генетическое родство с *Lb. fermentum* [12].

У здоровой взрослой женщины pH влагалища в норме составляет $\leq 4,5$. Виды *Lactobacillus*, доминирующие во влагалище здоровых женщин, поддерживают такую низкую pH среды благодаря своим ферментативным системам, тем самым, защищая организм от проникновения нежелательных микроорганизмов [13]. Исследования, проведенные в конце XX века показали доминирование во влагалище *Lb. acidophilus* и *Lb. fermentum*, в то же время были выделены *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. lactis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. leishmanii* и *Lb. salivarius* [14]. Использование современных методов идентификации показало, что 60% штаммов, определенных по классическим фенотипическим признакам как *Lb. acidophilus* на самом деле принадлежат к *Lb. gasseri* или *Lb. crispatus*, а штаммы, идентифицированные как *Lb. fermentum* только по физиологическим критериям,

определены как *Lb. reuteri* [15].

Немногочисленные данные о наличии лактобацилл у растений, свидетельствуют, что лишь немногие виды встречаются в природном растительном материале. Молочнокислые бактерии могут встречаться на поверхности листьев в количестве 10–1000 в грамме и составлять 0,01–1% от общего числа микроорганизмов [16]. Лактобациллы встречаются у различных растений в субтропической зоне, в небольшом количестве обнаружен *Lb. brevis*, иногда встречаются *Lb. casei*, *Lb. viridescens*, *Lb. cellobiosus* и *Lb. salivarius*. Количество лактобацилл зависит от климата и времени года, достигая максимума в теплой и влажной среде, а также в период цветения. К тому же, цветы, плодоносные образования и поврежденные части растений, из которых выделяется сок, содержат большее число лактобацилл *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* и *Lb. fermentum* [17].

Лактобациллы не обнаружены в пресных и соленых водоемах, но встречаются в сточных водах, откуда выделяют большое число гомо- и гетероферментативных видов: 25% всех выделенных молочнокислых бактерий состояли из *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. brevis*, *Lb. confusus* и *Leuconostoc*; большая часть гомоферментативной группы состояла из *Lb. plantarum* и *Lb. ruminis*; также обнаружены *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. farciminis*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lb. lactis*, *Lb. salivarius* и *Lb. coryniformis*. Из этой же среды были выделены 2 новых вида *Lb. sharpeae* и *Lb. agilis*. Молочнокислые бактерии в сточных водах присутствуют в количествах 10^4 – 10^5 /мл и являются, как правило, признаком фекального загрязнения. То же можно сказать про органические удобрения, из которых первыми были выделены *Lb. curvatus*, *Lb. coryniformis* и *Lb. vaccinostercus* [18].

Молочнокислое брожение овощей и фруктов – процесс, обычно используемый для предотвращения порчи растительного сырья. В процессе брожения, под воздействием осмотически активных солей, анаэробноз, гибели клеток, увеличения доступности питательных веществ, поступающих из растения, снижения уровня pH и окислительно-восстановительного потенциала, молочнокислые бактерии начинают преобладать, и происходит качественная смена биологического сообщества. При квашении капусты (без внесения культур молочнокислых бактерий в ферментируемое сырье) процесс начинается с развития *Leuconostoc mesenteroides*, который сменяется развитием *Lb. brevis*. Затем, через период времени, продолжительность которого зависит от температуры, начинают преобладать гомоферментативные бактерии, которые представлены в основном *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* и *Lb. sake*. Другие лактобациллы, имеющие меньшее значение, включают *Lb. paracasei* (или *Lb. casei*). Также могут быть обнаружены лактококки, энтерококки и педиококки, но их число обычно невелико, в среднем менее 10% от общего числа молочнокислых бактерий, развивающихся в процессе квашения капусты [19].

При мариновании оливок и огурцов используются цельные плоды и рассол, поэтому питательные вещества не так доступны, как при квашении капусты или силосовании кормов, где они высвобождаются с помощью шинкования и измельчения соответственно. Как продемонстрировали М.А. Daeschel с сотрудниками, молочнокислые бактерии могут расти не только в рассоле, но и поступать из тканей растения, куда они, по всей видимости, попадают через устьица в эпидермисе [19]. Развитие молочнокислых бактерий при мариновании огурцов схоже с процессами квашения капусты: во время роста молочнокислых бактерий регистрировали смену доминирующих видов в следующем порядке: *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lb. brevis* и *Lb. plantarum*. Кроме *Lb. plantarum* при мариновании огурцов важную роль также играют виды лактобацилл *Lb. curvatus* и *Lb. sake* [19, 20].

При силосовании кормов необходимо обеспечить его сохранность в течение длительного времени. В зависимости от качества исходного сырья, содержания сухих

веществ и технологии силосования, начинает развиваться популяция молочнокислых бактерий, что и определяет конечное качество силоса. На начальных стадиях силосования в сырье преобладают стрептококки, лактококки и лейконостоки. На последующих стадиях в силосной микрофлоре начинается доминирование лактобацилл совместно с педиококками. Из силосов, полученных без использования консервирующих субстанций, выделены следующие виды лактобацилл: *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. coryniformis*, *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus* и *Lb. salivarius* [21].

Лактобациллы играют важную роль в порче переработанных продуктов. Они могут оказывать свое действие при переработке и, особенно, на стадии готового продукта. Пищевые продукты со значением рН ниже 4,1 обычно не стерилизуются, а только пастеризуются, чтобы избежать избыточного образования эндоспор *Bacillaceae* [22]. В случае нарушения технологии изготовления или герметичности пищевых консервов, соков и сокосодержащих напитков, лактобациллы могут начать размножаться и стать причиной образования слизи, газа, постороннего привкуса, помутнения или изменения кислотности. В таких случаях выделяют главным образом *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. confusus*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei* и *Lb. plantarum* [23]. В цитрусовых соках *Lb. brevis* и *Lb. plantarum* могут размножаться при рН менее, чем 3,5 и температуре 10°C [24].

Лактобациллы способны вызывать порчу ферментированных продуктов питания. В продуктах, получаемых путем молочнокислого брожения, эффект обычно проявляется во время процесса ферментации. В результате роста нежелательных штаммов продукт брожения может стать непригодным для употребления. Примерами могут являться образование красного цвета у квашеной капусты, вызванного *Lb. brevis* при повышенной рН среды, и бомбаж банок при консервировании огурцов – как результат выделения газа гетеро- и гомоферментативными лактобациллами, которые образуют CO₂ из малата [25].

При производстве сыра цитрат-утилизирующие виды *Lb. casei* и гетероферментативные *Lb. brevis* могут вырабатывать избыточные количества CO₂, приводя к образованию ненужных воздушных полостей в сыре и вспучиванию упаковок пакетированного сыра [26]. Нежелательные мелкие трещины образует в сырах Гоуда и эдамском *Lb. bifermens*, продуцирующий CO₂ и H₂. Оранжево-пигментированные штаммы (*L. plantarum* subsp. *rudensis* или *Lb. brevis* subsp. *rudensis*) могут размножаться в твердом сыре [5] и в брынзе [27]. Кроме того, наблюдалось образование лактобациллами биогенных аминов в сыре. *Lb. buchneri* были выделены из швейцарского сыра с высоким содержанием гистамина [28]. Из сыра Гоуда были изолированы штаммы *Lb. buchneri* и *Lb. brevis*, продуцирующие гистамин и тирамин, соответственно [29]. Также способность к образованию тирамина и гистамина среди бактерий, используемых в молочной промышленности, была обнаружена у *Lb. casei* (гистамин) и лактококков (тирамин) [30].

Сенсорные пороки ферментированных колбас связывают с ростом посторонних видов лактобацилл во время процесса созревания. К. Corretti выделил из испорченных колбас следующие штаммы: *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckei*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, лактококки и *Leuconostoc mesenteroides* [31].

Лактобациллы обычно встречаются во многих сортах вин, несмотря на высокое содержание этанола, низкий уровень рН 3,2–3,8 и присутствие вносимого SO₂. Присутствуя в большом количестве, они могут обуславливать целый спектр различных характерных пороков вина, преобладание какого-либо из них определяется присутствующими штаммами. Их способность метаболизировать яблочную, лимонную и виноградную кислоты может оказывать на качество конечного продукта как положительный, так и отрицательный эффект. Среди лактобактерий, ферментирующих яблочную кислоту, выделены *Lb. plantarum*,

Lb. casei, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. hilgardii*, *Lb. trichodes*, *Lb. fructivorans*, *Lb. desidiodus* и *Lb. mali*. Гомоферментативные виды исчезают в процессе спиртового брожения, уступая место педиококкам и гетероферментативным молочнокислым бактериям. [32]. Разложение виноградной кислоты обычно приводит к серьезной порче вина. Его могут осуществлять небольшое количество штаммов *Lb. plantarum* и *Lb. brevis* [33].

Кроме того, лактобациллы могут влиять на качество вина, продуцируя из лимонной кислоты диацетил – вещество, которое усиливает вкус вина, присутствуя в следовых количествах, но вызывает порчу, если находится в избытке. Такой порок как горечь появляется вместе с образованием избыточных количеств маннита при сбраживании фруктозы, а рост *Lb. trichodes* вызывает образование хлопьев [34].

Лактобациллы могут размножаться в готовом сидре, в процессе хранения, вызывая ряд изменений. Многие из выделенных штаммов могут утилизировать яблочную и лимонную кислоты, а также хинную кислоту – вещество, присутствующее в высоких концентрациях в яблочном вине. Они могут участвовать в малолактической ферментации, которая часто положительно влияет на вкус яблочного вина; могут метаболизировать цитрат и пируват, ацетат, лактат и ацетонин. Превращение фруктозы и хинной кислоты в ацетат, CO₂ и дигидроксишкимаат в процессе обмена веществ ведет к ухудшению вкуса вина [5]. Гетероферментными культурами, выделяемыми из сидра, обычно являются *Lb. brevis*. Для них оптимум pH составляет 4,0–5,0, и они активно осуществляют свой метаболизм только при таких низких значениях pH. Основными представителями гомоферментативных видов являются штаммы *Lb. plantarum* и *Lb. yamanashiensis* (*Lb. mali*), которые, однако, не утилизируют хинную кислоту [35].

В пивоварении гетероферментативные лактобациллы преобладают в испорченном пиве и предпочтительно утилизируют мальтозу [36]. Их устойчивость к перепадам содержания хумолоновых смол, не характерная для грам-положительных организмов, и быстрота приобретения этой устойчивости, позволили им отлично адаптироваться к пивоваренным заводам, которые и являются их естественной средой обитания [5]. W. Back выделил около 1000 штаммов бактерий из обсемененного пива которые являлись облигатными или факультативными участниками порчи пива. Наиболее распространенными видами были *Lb. brevis* (28%), *Pediococcus damnosus* (27%), *Lb. casei* (11%), *Lb. linderi* (9%) и *Lb. coryniformis* (6%). В незначительном количестве выделены *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. buchneri* [37].

При производстве плодовых бренди, пюре из фруктов (таких как яблоки, груши, сливы и вишня и т.д.) плоды ферментируют и перегоняют. Для того чтобы в процессе ферментации участвовали исключительно дрожжи, добавляют серную кислоту, снижая уровень pH до 3,0. В этих условиях растут высоко ацидофильные и спиртоустойчивые молочнокислые бактерии, которые могут понижать содержание спирта или вырабатывать нежелательные вещества, влияющие на вкус. Некоторые штаммы *Lb. plantarum* и *Lb. suebicus* растут при pH 2,5 в присутствии до 14% спирта. Также из ферментируемого суслу на этой стадии выделены *Lb. brevis* и *Lb. hilgardii* [38].

При производстве солодового виски лактобациллы могут размножаться в процессе спиртового брожения, достигая больших количеств. В отличие от пивоварения, при изготовлении виски солод не подвергается кипячению и лактобациллы часто присутствуют в осоложенном ячмене. Термофильные штаммы могут размножаться в процессе ферментации, при наличии большого количества питательных веществ в доступной форме. Это приводит к быстрому снижению pH до такого уровня, при котором ингибируются гидролазы и амилазы дрожжей, спиртовое брожение протекает не до конца, в результате чего наблюдается более низкое

содержание спирта. Кроме того, могут продуцироваться соединения, ухудшающие вкус (например, сероводород). На заводах, осуществляющих выпуск солодового виски, на стадии ферментации выделены *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* и *Lb. plantarum* [39].

В ряде продуктов (майонез, маринованное мясо, салаты) микробная стабильность (и вкус) в основном определяется консервирующими свойствами уксусной кислоты. В отсутствие доступа кислорода их порчу в большинстве случаев вызывают дрожжи и лактобациллы, обладающие исключительно высокой устойчивостью к уксусной кислоте. Наиболее устойчивым оказался *Lb. acetotolerance*, выделенный из содержимого ферментера при производстве рисового уксуса, который выдерживал 4–5% уксусной кислоты при pH 3,5 [40]. Из майонезного соуса выделен *Lb. fructivorans*, который вызывал его порчу при pH 3,7–3,8 [41]. Из 81 образца салатов с майонезом или соусом и такими ингредиентами как картофель, мясо, маринованная рыба, яйца, овощи и т.д. выделены 6 видов лактобацилл (в порядке их преобладания): *Lb. plantarum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* и *Lb. fructivorans*. Эти организмы оказались устойчивы к внесению бензойной, сорбиновой кислот и продуцировали газ, являясь причиной появления пороков вкуса продуктов [42].

При микробной порче соленой рыбы (в основном сельди) имеет значение не только устойчивость микроорганизмов к уксусной кислоте, но и к соли. Молочнокислые бактерии могут расти, вызывая образование пороков вкуса и вздутие банок за счет образования углекислого газа, который образуется в процессе метаболизма углеводов или, при их отсутствии, в результате декарбоксилирования аминокислот [43]. Из аминокислот образуются соответствующие биогенные амины: γ -аминомасляной кислоты, кадаверин, тирамин и гистамин [44]. Из образцов испорченной рыбы выделены следующие виды лактобацилл: *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. pastorianum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum* и *Lb. casei* [43, 45]. При попадании *Lb. plantarum* и *Lb. casei* в маринады, они могут вызывать вязкость готового продукта [43].

При производстве сахара молочнокислые бактерии могут снижать выход продукта и, благодаря выделению декстрана, негативно сказываться на процессе формирования кристаллов в частности и на эффективности производства в целом [5]. В случае тростникового сахара, основной урон наносят лейконостоки и сахароустойчивые, ацидофильные штаммы лактобацилл, способные расти в 15% сахарозе, представленные в основном *Lb. confuses*, а иногда *Lb. plantarum* и *Lb. casei*, которые, размножаясь в тростниковом соке, вызывают его закисление и порчу [46]. Большинство этих штаммов, включая *Lb. plantarum* и *Lb. casei*, продуцируют большое количество декстрана из сахарозы. Аналогично происходит порча на свекольносахарном производстве, где выделены следующие штаммы *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. cellobiosus* и *Lb. fermentum* [47].

Асептически выдоенное цельное молоко не содержит лактобацилл на момент выхода из вымени, но дальше происходит его быстрое обсеменение этими организмами от инструмента, пыли, травы, силоса и других кормов. Молоко является идеальным субстратом для роста бактерий, но условия, способствующие обсеменению и размножению, благоприятствуют также и развитию других организмов, а лактобациллы обычно подавляются. В Великобритании, молоко, полученное от одного стада, в хороших санитарных условиях, содержит небольшое число лактобацилл (около 1-50 КОЕ/мл), в то время как поступающее в продажу питьевое молоко от животных из разных поголовьев обычно содержит около 10^3 КОЕ/мл лактобацилл, которые представлены следующими видами: *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, *Lb. curvatus* и, иногда, *Lb. buchneri*, *Lb. lactis* и *Lb. fermentum* [5].

При поиске молочнокислых бактерий, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды и бактериофагам, необходимо использовать такие источники выделения, которые отличаются от используемых ранее, что позволит выделить штаммы, отличающиеся по своим физиолого-биохимическим характеристикам от используемых в настоящее время.

В последнее время возрастает интерес исследователей к выделению культур молочнокислых бактерий из источников водного происхождения: рыбы, моллюсков, креветок и т.д.

Что касается лактобацилл, то различные виды (335 штаммов, обладающих высокой антагонистической активностью) были выделены из радужной форели [48]. Три вида лактобацилл (*Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*) выделены из лосося холодного копчения, упакованного под вакуумом [49]. Как в период питания, так и в период зимовки, в микрофлоре стенки кишечника карпов обнаруживали культуры *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* [50].

Лактококки также обнаружены в рыбе. Из различных свежих субпродуктов рыбы, выловленной в средиземном море, выделены штаммы молочнокислых бактерий (в том числе и штаммы *Lc. lactis*), обладающие антагонистической активностью в отношении *Listeria innocua* [51]. Штамм *L. cremoris* WA2-67, выделенный из морской рыбы, оказался антагонистом против многих возбудителей заболеваний рыб [52]. Сравнительный анализ штаммов лактококков, выделенных из морской рыбы и пресноводной рыбы, а также из сыра показал, что «рыбные» штаммы более устойчивы к неблагоприятным условиям среды культивирования, чем «сырный» штамм, и при этом сохраняют свои производственно-ценные свойства [53, 54]. В 2014 г штамм *Lc. lactis subsp. diacetylactis* был выделен из жабр щуки, пойманной в реке Припять Гомельской области. Из оливковой камбалы выделены штаммы *Lc. lactis*, обладающие высокой антагонистической активностью в отношении *Streptococcus iniae*, развитие которого в аквакультуре данные штаммы лактококков ингибировали в течении трех часов [55]. Три штамма лактококков выделены из коричневой форели (*Salmo trutta*) и радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) [56]. Из пресноводной рыбы *Odontesthes platensis* выделены 53 штамма молочнокислых бактерий, четыре из которых, идентифицированные как *Lc. lactis*, показали высокую ингибиторную активность в отношении возбудителя заболеваний рыбы *Lactococcus garvieae* [57]. Из желудочно-кишечного тракта рыбы фугу, пойманной в Симода, Сидзуока (Япония), были выделены галотолерантные штаммы *Lc. lactis subsp. lactis*, которые были устойчивы к содержанию в среде 6% поваренной соли [58]. Штамм *Lc. lactis*, выделенный из пресноводного сома, обладал антагонистической активностью в отношении золотистого стафилококка, *Staphylococcus carnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* и *Lb. reuteri* за счет продукции бактериоцина F [59].

Таким образом, наиболее перспективными источниками выделения молочнокислых бактерий (в частности, лактококков и термофильных стрептококков) являются сырое молоко и самоквасные молочные продукты, надземные части растений, свежие, замороженные и квашеные овощи и фрукты. Большая часть видов, относящихся к роду *Lactobacillus*, выделена из человека или животных (ротовая полость, желудочно-кишечный тракт, влагалище, кожные покровы), а также из ферментированных овощей, соков, силосов, скисшего пива, вина и т.д.

В настоящее время ученые во всем мире активно используют нетрадиционные источники для выделения молочнокислых бактерий, которые имеют «рыбное» происхождение. Так, из лосося выделены *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*, у прудовой культуры карпов обнаруживали культуры *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, из радужной форели и другой рыбы получено большое количество молочнокислых бактерий, обладающих

антагонистической активностью к различным патогенным микроорганизмам.

Список использованных источников

1. Кузнецов, В.В. Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры. Том 3. Сыры. / В.В. Кузнецов, Г.Г. Шилер; под общ. ред. Г.Г. Шилера. – СПб: ГИОРД, 2003. – 512 с.

Kuznecov, V.V. Spravochnik tehnologa molochnogo proizvodstva. Tehnologija i receptury. Tom 3. Syry. [Reference book of dairy industry technologist. The technology and formulae. Volume 3. Cheese] / V.V. Kuznecov, G.G. Shiler; pod obshh. red. G.G. Shilera. – SPb: GIORД, 2003. – 512 s.

2. Teuber, M. The Genus *Lactococcus*. / M. Teuber, A. Geis // In: *The Prokaryotes* / ed.: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer. – 3d ed. – Springer-Verlag, New York, 2006. – P. 205–224.

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

Bannikova, L.A. Mikrobiologicheskie osnovy molochnogo pro-izvodstva: Spravochnik. [Microbiological basis of dairy industry: Reference book] / L.A. Bannikova, N.S. Koroleva, V.F. Semenihi-na. – M.: Agropromizdat, 1987. – 400 s.

4. Чужова, З.П. Подбор ароматобразующих стрептококков для заквасок / З.П. Чужова, Л.Е. Ковтунова, А.Н. Пчелкина // Основные направления селекции молочнокислых бактерий в молочной промышленности. – Москва, 1970. – С.73–79.

Chuzhova, Z.P. Podbor aromatobrazujushhih streptokokkov dlja zakvasok [Selection of aromaproducing streptococci for starter cultures] / Z.P. Chuzhova, L.E. Kovtunova, A.N. Pchelkina // Osnovnye na-pravlenija selekcii molochnokislyh bakterij v molochnoj promyshlennosti. – Moskva, 1970. – S.73–79.

5. Sharpe, M.E. The genus *Lactobacillus*. / M.E. Sharpe // In: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel. *The Prokaryotes*. — Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1981. – P. 1653–1679.

6. London, J. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. / J. London // Ann. Rev. Microbio, 1976. – Vol. 30. – P. 279–301.

7. Marsh, P. Oral Microbiology. / P. Marsh, M. Martin // Aspects of Microbiology, 1984. – Vol. 1. – 2nd ed. – Van Nostrand Reinhold (UK). London, UK.

8. Carlsson, J. Transmission of *Lactobacillus jensenii* and *Lactobacillus acidophilus* from mother to child at the time of delivery. / J. Carlsson, L. Gothefors // J. Clin. Microbiol, 1975. – Vol. 1. – P. 124–128.

9. Claesson, R. Presence of *Lactobacillus casei* in saliva from children and adults using a new medium. / R. Claesson, C.G. Crossner. // Scand. J. Dent. Res, 1985. – Vol. 93. – P. 17–22.

10. Goldin, B.R. The metabolism of the intestinal microflora and its relationship to dietary fat, colon, breast cancer. / B.R. Goldin // Prog. Clin. Biol. Res, 1986. – Vol. 222. – P. 655–685.

11. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание / Б.А. Шендеров. – М.: Изд. Грантъ, 2001. 288 с.

Shenderov, B.A. Medicinskaja mikrobnaia jekologija i funkcio-nal'noe pitanie. T. 3: Probiotiki i funkcional'noe pitanie [Medical microbial ecology and functional nutrition. Volume 3: Probiotics and functional nutrition] / B.A. Shenderov. – M.: Izd. Grant, 2001. 288 s.

12. Kandler, O. Regular non-sporing Grampositive rods. / O. Kandler, N. Weiss // In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; ed.: P.H. Sneath, N. Mair, M.E. Sharpe,

- J.G. Holt. – P William and Wilkins. Baltimore, MD, 1986. – Vol. 2. – P. 1208–1234.
13. Hill, G.B. Bacteriology of the vagina . / G.B. Hill, D.A. Eschenbach, K.K. Holmes // Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl, 1985. – Vol. 86. – P. 23–29.
14. Wylie, J.G. Identity and glycogenfermenting ability of lactobacilli isolated from the vagina of pregnant women. / J.G. Wylie, A. Henderson // J. Med. Microbiol, 1969. – Vol. 2. – P. 363–366.
15. Johnson, J.L. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. / J.L. Johnson, C.F. Phelps, C.S. Cummins et al. // Int. J. Syst. Bacteriol, 1980. – Vol. 30. – P. 53–68.
16. Daeschel, M.A. Microbial ecology of fermenting plant materials. / M.A. Daeschel, R.E. Andersson, H.R. Fleming // FEMS Microbiol. Rev., 1987. – Vol. 46. – P. 357–367.
17. Kvasnikov, E.I. Lactic acid bacteria in nature and the national economy. / E.I. Kvasnikov, N.K. Kovalenko, O.A. Nesterenko // Appl. Biochem. Microbiol, 1983. – Vol. 18. – P. 665–676.
18. Okada, S. A new heterofermentative *Lactobacillus* species with mesodiaminopimelic acid in peptidoglycan, *Lactobacillus vaccinostrercus* Kozaki and Okada sp. nov. / S. Okada, Y. Suzuki, M. Kozaki // J. Gen. Appl. Microbiol, 1979. – Vol. 25. – P. 215–221.
19. Daeschel, M.A. Microbial ecology of fermenting plant materials. / Daeschel, M.A., R.E. Andersson, H.R. Fleming. // FEMS Microbiol. Rev, 1987. – Vol. 46. – P. 357–367.
20. Etchells, J.L. Factors influencing the development of lactic acid bacteria during fermentation of brined cucumbers and olives. / J.L. Etchells, H.P. Fleming, T.A. Bell // In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*; ed.: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.C. Whiting. – Academic Press. London, UK, 1975. – P. 281–305.
21. Langston, C.W. Chemical and bacteriological changes in grass silage during the early stages of fermentation. II: Bacteriological changes. / C.W. Langston, C. Bouma, R.M. Conner // J. Dairy Sci, 1962. – Vol. 45. – P. 618–624.
22. Buckenhuskes, H. Optimierung des Pasteurisierungseffektes bei Sauergemüse. / H. Buckenhuskes, K. Gierschner, W.P. Hammes // Indust. Obst. Gemüseverwert, 1988. – Vol. 73. – P. 315–322.
23. Back, W. Schädliche Mikroorganismen in Fruchtsäften, Fruchnektaren und süssen, alkoholfreien Erfrischungsgetranken. / W. Back // Brauwelt, 1981. – Vol. 121. – P. 43–48.
24. Juven, B.J. Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3.5. / B.J. Juven // J. Food Prot, 1976. – Vol. 39. – P. 819–822.
25. McFeeters, R.F. Malic acid degradation and brined cucumber bloating. / R.F. McFeeters, H.P. Fleming, M.A. Daeschel // Malic J. Food Sci, 1984. – Vol. 49. – P. 999.
26. Keller, J.J. Lactobacilli and gas formation of film wrapped Cheddar cheese. / J.J. Keller, J. Jaarsman // South African J. Dairy Technol, 1975. – Vol. 7. – P. 183–185.
27. Chomakov, H.V. Rusty spots in brined white cheese. / H.V. Chomakov // Mikrobiol, 1962. – Vol. 31. – P. 726–730.
28. Sumner, S.S. Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. / S.S. Sumner, W. Speckhard, E.B. Somers, S.L. Taylor // Appl. Environ. Microbiol, 1985. – Vol. 50. – P. 1094–1096.
29. Joosten, H.M.L.J. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. / H.M.L.J. Joosten, M.D. Northolt // Neth.Milk Dairy, 1987. – Vol. 41. – P. 259–280.
30. Voigt, M.N. Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono- and diamine oxidases in amine buildup in cheese. / M.N. Voigt, R.R. Eitenmiller // J. Food Prot, 1978. – Vol. 41. – P. 182–186.
31. Coretti, K. Rohwurstfehlfabrikate durch Laktobazillen. / K. Coretti // Die

Fleischw, 1958. – Vol. 4. – P. 218–225.

32. Pilone, G.J. Chemical characterization of wines fermented with various malolactic bacteria. / G.J. Pilone, R.E. Kunkee, A.D. Webb // *Appl. Microbiol*, 1966. – Vol. 14. – P. 608–615.

33. Krumperman, P.H. Some lactobacilli associated with decomposition of tartaric acid in wine. / P.H. Krumperman, R.H. Vaughn // *Am. J. Enol. Vitic*, 1966. – Vol. 17. – P. 185–190.

34. Amerine, M.A. Microbiology of wine-making. / M.A. Amerine, R.E. Kunkee // *Ann. Rev. Microbiol*, 1968. – Vol. 22. – P. 323.

35. Carr, J.G. Microbiology of ciders and wines. / J.G. Carr // In: *Essays in Agricultural and Food Microbiology*; ed.: J.R. Norris, G.L. Pettipher. – John Wiley. Chichester, UK, 1987. – P. 291–307.

36. Rainbow, C. Beer spoilage lactic acid bacteria. / C. Rainbow // In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*; ed.: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.C. Whiting. – Academic Press. London, UK, 1975. – P. 149–158.

37. Back, W. Neubeschreibung einer bierschadlichen Laktobazillen-Art: *Lactobacillus brevisimilis* spec. nov. *Monatsschr.* / W. Back // *Brauwiss*, 1987. – Vol. 40. – P. 484–488.

38. Kleynmans, U. *Lactobacillus suebicus* sp. nov., an obligately heterofermentative *Lactobacillus* species isolated from fruit mashes. / U. Kleynmans, H. Heinzl, W.P. Hammes // *Syst. Appl. Microbiol*, 1989. – Vol. 11. – P. 267–271.

39. Simpson, K.L. Characterization of lactobacilli from Scotch malt whisky distilleries and description of *Lactobacillus ferintoshensis* sp. nov., a new species isolated from malt whisky fermentations. / K.L. Simpson, B. Petterson, F.G. Priest // *Microbiol*, 2001. – Vol. 147. – P. 1007–1016.

40. Entani, E. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth. / E. Entani, H. Masai, K.-I. Suzuki // *Int. J. Syst. Bacteriol*, 1986. – Vol. 36. – P. 544–549.

41. Kurtzman, C.P. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. C.P. Kurtzman, R. Rogers, C.W. Hesseltine // *Appl. Microbiol*, 1971. – Vol. 21. – P. 870–874.

42. Baumgart, J. Mikrobiologische stabilität von feinkosterzeugnissen. / J. Baumgart, B. Weber, B. Hanekamp // *Fleischwirtschaft*, 1983. – Vol. 63. – P. 93–94.

43. Meyer, V. Marinades. / V. Meyer // In: *Fish as Food*; ed.: G. Borgstrom. – Academic Press. London, UK, 1965. – 221 p.

44. Blood, R.M. Lactic acid bacteria in marinated herring. / R.M. Blood // In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*; ed: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.C. Whiting. – Academic Press. London, UK, 1975. – P. 195–208.

45. Blood, R.M. The Microbiology of Semi-preserved Fish Products / R.M. Blood // MSc thesis. – University of London. – London, UK, 1970.

46. Sharpe, M.E. Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. / M.E. Sharpe, E.I. Garvie, R.H. Tilbury // *Appl. Microbiol*, 1972. – Vol. 23. – P. 389–397.

47. Tilbury, R.H. Occurrence and effect of lactic acid bacteria in the sugar industry. / R.H. Tilbury // In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*; ed.: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.C. Whiting. – Academic Press. London, UK, 1975. – P. 177–191.

48. Perez-Sanchez, T. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. / T. Perez-Sanchez, J.L. Balcazar, Y. Garcia et al. // *J. Fish Dis*, 2011 – Vol. 34, N 7. – P. 499–507.

49. Tome, E. Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. / E. Tome, S.D. Todorov, P.A. Gibbs, P.C Teixeira // *Food Biotechnol*, 2009. – Vol. 23, N 1. – P. 50–73.

50. Jankauskiene, R. Defense mechanisms in fish: *Lactobacillus* genus bacteria of

intestinal wall in feeding and hibernating carps / R. Jankauskiene // *Ekologija*, 2000. – N 1. – P. 3–6.

51. Migaw, S. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. / S. Migaw, T. Ghairi, Y. Belguesmia et al. // *World J. Microbiol. Biotechnol*, 2014. – Vol. 30, N 4. – P. 1207–1217.

52. Araújo, C. Nisin Z Production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 of aquatic origin as a defense mechanism to protect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Lactococcus garvieae*. / C. Araújo, E. Muñoz-Atienza, T. Pérez-Sánchez et al. // *Mar. Biotechnol*, 2015. – Vol. 17, N 6. – P. 820–830.

53. Takanashi, S. Variations in bile tolerance among *Lactococcus lactis* strains derived from different sources. / S. Takanashi, A. Miura, K. Abe et al. // *Folia Microbiol. (Praha)*, 2014. – Vol. 59, N 4. – P. 289–293.

54. Itoi, S. Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. / S. Itoi, K. Yuasa, S. Washio et al. // *J. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 107, N 3. – P. 867–874.

55. Heo, W.S. Salt effect of nisin Z isolated from a marine fish on the growth inhibition of *Streptococcus iniae*, a pathogen of streptococcosis. / W.S. Heo, E.Y. Kim, Y.R. Kim et al. // *Biotechnol. Lett.* – 2012. – Vol. 34, N 2. – P. 315–320.

56. Pérez, T. *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). / T. Pérez, J.L. Balcázar, A. Peix // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2011. – Vol. 61, N 8. – P. 1894–1898.

57. Sequeiros, C. Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. / C. Sequeiros, M. Vallejo, E.R. Marguet, N.L. Olivera // *Arch. Microbiol*, 2010. – Vol. 192, N 4. – P. 237–245.

58. Itoi, S. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. / S. Itoi, T. Abe, S. Washio // *Int. J. Food Microbiol*, 2008. – Vol. 125, N 2. – P. 214.

59. de Kwaadsteniet, M. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). / M. de Kwaadsteniet, K. Ten Doeschate, L.M. Dicks // *Appl. Environ. Microbiol*, 2008. – Vol. 74, N 2. – P. 547–549.

60. Hammes, W.P. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* / W.P. Hammes, N. Weiss, W. Holzapfel // In: *The Prokaryotes*; ed.: A. Balows, H.G. Troper, M. Dworkin, W. Harder. – 2nd ed. – Springer-Verlag, New York, NY, 1992. – P. 1535–1594.

N. Ramanovich, S. Vasylenko, N. Furik
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

RESEARCH OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATION SOURSES

Summary

Traditional sources of lactic acid bacteria isolation are characterized. The possibility of using unconventional sources (freshwater and saltwater fish) for isolation of industrially-valuable strains is shown.

Keywords: lactic acid bacteria, lactococci, lactobacilli, sources for isolation.