

УДК 637.1

Е.С. Масежная

ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Углич

АНАЛИЗ ИСТОЧНИКОВ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУР ЛАКТОКОККОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СОСТАВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАКВАСОК

*Приведены результаты выделения культур лактококков с технологически важными свойствами из различных источников: 292 образца растений, 7 образцов квашеной капусты, 143 образца сырого молока, 441 образец самоквасной сметаны и 23 образца творога из сырого молока домашнего изготовления. В изученных источниках выделения доминирующее положение занимает *L. lactis* subsp. *lactis*. Для всех источников выделения характерно меньшее содержание *L. cremoris* и *L. lactis* subsp. *biovar diacetylactis**

Ключевые слова: заквасочные микроорганизмы, источники выделения культур, лактококки, производственно ценные свойства, характеристика, коллекция

Молочнокислые бактерии традиционно применялись в течение многих веков при получении пищевых продуктов самопроизвольного брожения. К настоящему времени для промышленного изготовления ферментированных молочных продуктов используются хорошо контролируемые определённые заквасочные микроорганизмы, которые сохраняются в коллекциях различных научных организаций и производителей бактериальных заквасок, в том числе в коллекции микроорганизмов ВНИИМС.

Исходным этапом в деятельности коллекций является выделение чистых культур из среды их обитания. Традиционно выделение культур осуществляется из природных и производственных объектов, генетическим модификациям и геномному редактированию культуры не подвергаются.

К числу основных бактерий для ферментированных молочных продуктов относятся лактококки видов *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus cremoris* и *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, которые входят в состав заквасок для простокваши, сметаны, творога и многих видов сыров. Микроорганизмы распространены в природе повсеместно, однако лактококки выделяются далеко не из всех природных объектов.

Для выделения лактобактерий широко используются растения [1]. Видовой состав лактобактерий в эпифитной микрофлоре разнообразен и представлен микроорганизмами родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*. Численность, таксономический состав и свойства эпифитной молочнокислой микрофлоры зависят от географического положения и климатических (экологических), метеорологических условий произрастания растений, времени года, места произрастания, вида, фазы развития и состояния растения.

Значительное количество лактобактерий присутствует в растительных субстратах, подвергнутых биоконсервации: в силосе, квашеной капусте и других ферментированных овощах [2]. В протекающих при силосовании микробиологических процессах большую роль играют молочнокислые бактерии, численность и видовой состав которых постоянно изменяется. На ранней фазе силосования она представлена лактококками, энтерококками, лейконостоками, педиококками и молочнокислыми палочками, в зрелом силосе – в основном палочками, а также могут присутствовать пропионовокислые и бифидобактерии. В процессе квашения капусты при самопроизвольном брожении выделяются лейконостоки, *L. plantarum*, *L. brevis*. В квашеной капусте нередко обнаруживаются также педиококки, энтерококки, реже лактококки.

При засолке (квашении) разнообразных овощей и фруктов самопроизвольное развитие микробиологических процессов происходит за счет присутствующих на них микроорганизмов – лейконостоков и молочнокислых палочек. Постоянно присутствуют молочнокислые бактерии и в микрофлоре теплокровных животных, птиц и человека. В целом она представлена энтерококками, стрептококками и лактобациллами. Широкий спектр микроорганизмов, составляющих микрофлору кишечника животных и человека, усложняет выделение отдельных групп микроорганизмов, требует использования селективных питательных сред.

Молочнокислые бактерии являются обитателями внешних покровов, жабр и нормальной микрофлоры кишечного тракта пресноводных и морских рыб. Количественное содержание и качественный состав молочнокислых бактерий рыб зависят, от места их вылова, систематического положения, стадии развития и возраста, характера питания, сезона года. Чаще всего молочнокислые бактерии в микрофлоре рыб представлены гомоферментативными и гетероферментативными лактобациллами, стрептококками, бифидобактериями. В последнее время в рыбе обнаруживаются лактококки. Из различных видов морской и пресноводной рыбы выделены штаммы *L. lactis subsp. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis* [3].

Важным естественным микробным резервуаром является почва. Однако в связи с низкой плотностью популяции молочнокислых микроорганизмов почва не всегда может служить источником чистых культур с ценными для сыроделия свойствами [4]. Поэтому почва редко используется как источник выделения молочнокислых бактерий для включения в состав заквасок для молочных продуктов.

Особый интерес представляют материалы о распространении лактобактерий в молоке и молочных продуктах. Микрофлора сырого молока весьма разнообразна и переменчива. В сыром молоке часто встречаются грамположительные факультативно-анаэробные кокки родов *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, численность которых варьирует от нескольких клеток до миллионов в 1 мл и зависит от состояния здоровья животных, рационов и режимов кормления, санитарно-гигиенических условий получения и обработки молока, температурных и временных режимах хранения сырого молока [5].

Развитию микрофлоры молока присуща определённая фазовость, включающая бактерицидную фазу (от 1,5 до 48 ч в зависимости от температуры хранения), фазу смешанной микрофлоры (от 12 ч до 48 ч), фазу развития молочнокислых бактерий (с момента начала нарастания кислотности до 7–10 суток), фазу дрожжей и плесеней. Наибольший интерес представляет фаза развития молочнокислой микрофлоры. На начальных этапах этой фазы (1–2 суток) преобладают лактококки (до титруемой кислотности 60–100 °Т), число которых достигает 10⁹ КОЕ в 1 мл. Далее при увеличении кислотности выше 100 °Т лактококки начинают отмирать и преобладают молочнокислые палочки, достигающие доминирующего положения через 4–5 суток.

Сырое молоко, выдержанное определенное время при оптимальной для различных видов бактерий температуре, может служить хорошим источником для выделения различных культур грамположительных кокков и палочек. Особый интерес для выделения лактококков представляют различные кисломолочные продукты самопроизвольного брожения, в процессе приготовления которых создаются селективные условия для роста, размножения и жизнедеятельности отдельных групп и видов микроорганизмов, попадающих в молоко из окружающей среды. Состав микрофлоры самоквасных кисломолочных продуктов может быть достаточно сложным и переменчивым, но доминирующее положение в ней занимают молочнокислые бактерии. При промышленном производстве ферментированных молочных продуктов из пастеризованного молока состав и количественное содержание техно-

логически полезной микрофлоры в определённой степени известен и стабилен в связи с использованием бактериальных заквасок.

Целью выделения молочнокислых бактерий из природных источников является пополнение коллекции заквасочными микроорганизмами, их изучение, отбор перспективных штаммов с производственно ценными свойствами, поэтому с первых этапов выделения осуществляется тщательная отбраковка культур [6].

В качестве источников выделения лактококков специалисты ВНИИМС наиболее часто используют различные части растений, сырое молоко и самоквасные кисло-молочные продукты. В данной статье приведён анализ результатов выделения лактококков из различных источников: 292 образца растений⁶, 7 образцов квашеной капусты, 143 образца сырого молока, 441 образец самоквасной сметаны и 23 образца творога из сырого молока домашнего изготовления. Из исследованных образцов растений было выделено 1811 изолированных колоний, из квашеной капусты – 56 колоний, из молока – 1230 колоний, из самоквасной сметаны – 3472 колонии, из творога – 206 колоний.

В результате сложной и трудоёмкой работы по отбору культур с учётом всего комплекса технологически важных свойств паспортизуется и помещается в коллекционный фонд небольшое число штаммов, пригодных для включения в состав бактериальных заквасок. На рис. 1 представлен видовой состав лактококков, выделенных из различных источников.

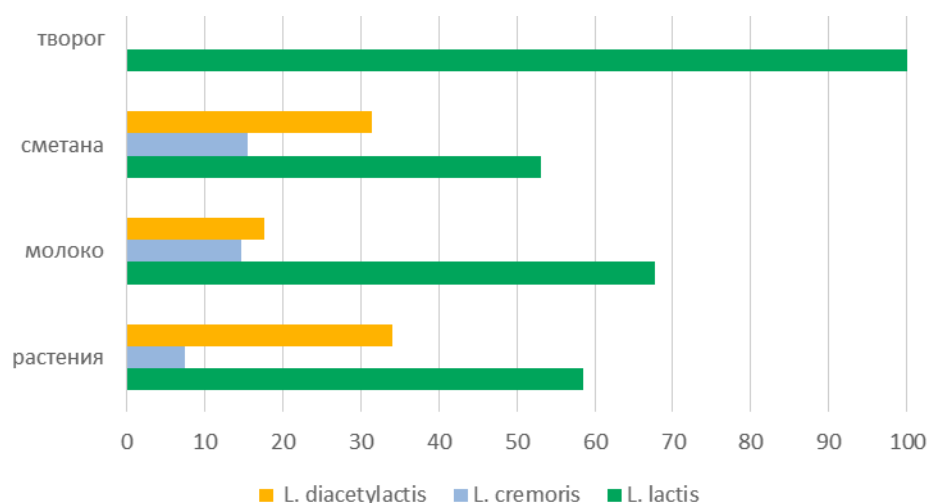


Рисунок 1. Видовой состав лактококков, выделенных из различных источников, % от общего числа отобранных культур

Результаты изучения выделенных из различных источников культур показали следующее. Низкой кислотообразующей активностью характеризовалось значительное число культур: 29,47 % – из растений, 41,84 % – из молока, 41,67 % – из тво-

⁶ Оценка различных видов растений как источников выделения лактококков показала, что производственно-ценные культуры были выделены в значительных количествах с цветов яблони (30,0 % из 10 изученных образцов), незабудки (33,3 % из 9 образцов), камнеломки (25,0 % из 8 образцов), примулы (16,7 % из 12 образцов); с хвойных растений (23,3 % из 30 образцов), одуванчика (25,0 % из 8 образцов), клевера (11,11 % из 9 образцов).

рога и 44,93 % – из сметаны. Органолептические пороки при развитии в молоке выявлены у 12,13 % культур из растений, у 19,30 % культур из молока, у 16,67 % культур из творога и у 21,30 % культур из сметаны.

Важным технологическим свойством лактококков является фагоустойчивость. Существенное количество штаммов оказались чувствительными к коллекционным бактериофагам. Наибольшее количество фагочувствительных культур обнаружено среди изолятов с растений – 25,60 %. Среди изолятов из молока их доля составила 8,91 %, из творога – 9,78 % и из сметаны – 13,20 %. Это явление может быть обусловлено тем, что в сыром молоке и сметане присутствуют бактериофаги лактококков и их контакты с клетками бактерий в жидкой среде происходят чаще, чем на поверхности различных частей растений. При взаимодействии с фагами у части популяции бактерий формируется иммунитет к бактериофагам и эти устойчивые к бактериофагам культуры становятся способными размножаться в молоке в условиях фаговой инфекции.

Выделенные культуры исследовались на способность образовывать горечь при культивировании в молоке с сычужным ферментом. Было установлено, что это свойство присуще небольшому количеству выделенных культур. По этому признаку не было включено в коллекционный фонд всего 2,13 % – из растений, 0,54 % – из молока и 0,78 % – из сметаны.

В результате проведённых исследований в коллекцию было отобрано 106 культур лактококков с растений, 102 культуры из молока, 175 культур – из сметаны и 4 культуры – из творога.

Прошедшие отбор культуры по фенотипическим признакам и биохимической активности были идентифицированы как лактококки видов *L. lactis subsp. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis*. Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о том, что в изученных источниках выделения доминирующее положение занимает молочный лактококк и довольно широко распространены сливочный и диацетильный лактококки. Для всех изученных источников выделения характерно меньшее содержание сливочного и диацетильного лактококков. Данный факт может быть обусловлен большей метаболической активностью молочного лактококка и его большей адаптированностью к неблагоприятным факторам внешней среды. В образцах творога сливочный и диацетильный лактококки вовсе не были обнаружены. Очевидно, это связано с тем, что при домашнем изготовлении практикуется отваривание молочного сгустка при более высоких температурах, чем в промышленных условиях, поэтому культуры с более низкой предельной температурой роста инактивируются [7].

Заслуживают внимания результаты выделения лактококков по сезонам года – рис. 2. Выделение микроорганизмов с растений осуществлялось только в весенне-летний период, поэтому оценку проводили только для образцов сырого молока и сметаны самопроизвольного брожения.

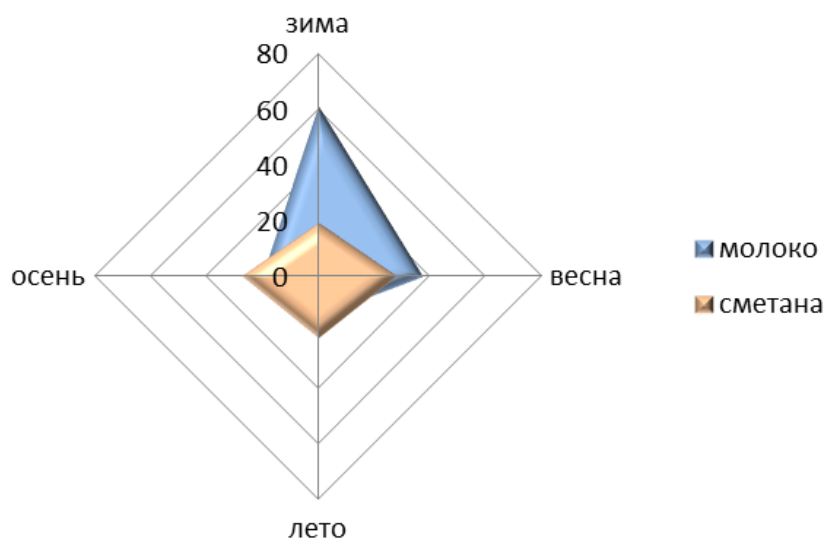


Рисунок 2. Количество выделенных культур с производственно-ценными свойствами по сезонам года, % от общего количества

Представленные на рис. 2 результаты свидетельствуют о том, что существенные различия по распространению производственно-ценных культур по сезонам года характерны только для сырого молока. При этом наибольшее количество культур было выделено из молока зимой и весной. Это может быть обусловлено более низким качеством молока как среды для развития молочнокислых бактерий в эти сезоны года и размножением в нем более метаболически активных культур, которые и являлись целью выделения.

Таким образом, результаты проведенной работы показали, что выделение лактококков для включения в состав бактериальных заквасок достаточно успешно можно осуществлять из надземной части различных культурных и диких растений, из сырого молока и молочных продуктов самопроизвольного брожения. Наибольшее количество культур с необходимыми биотехнологическими свойствами получено из образцов сырого молока – 5,7 % от общего числа выделенных колоний, незначительно меньше из сметаны – 5,1 % и с растений – 4,6 %. При выделении лактококков из молока и молочных продуктов не требуется применения элективных и накопительных сред или предварительной адаптации культур к развитию в молоке.

Список использованной литературы:

1. **Гриневич, А.Г.** Молочнокислые бактерии. Селекция промышленных штаммов / А.Г. Гриневич. – Минск: Высшая школа, 1981. – 164 с.
2. Handbook of plant-based fermented food and beverage technology / ed. By Y. H. Hui, E. Özgül Evranuz. – 2nd ed. – CRC Press, 2012. – 814 p. <https://doi.org/10.1201/b12055>
3. **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.] // Journal of Applied Microbiol. 2009. № 107(3). P. 867–874. <https://doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04266.x>
4. **Квасников, Е.И.** Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – С.384.
5. **Гудков, А.В.** Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А.В. Гудков. – М.: ДеЛи принт, 2003. – С. 800.

6. **Орлова, Т.Н.** Выделение и идентификация молочнокислых бактерий для ферментированных молочных продуктов / Т.Н. Орлова, И.А.Функ, Р.В.Дорофеев, Е.Ф.Отт, К.Е.Шевченко / Ползуновский вестник. 2019. №2. С. 47–50. <https://doi:10.25712/ASTU.2072-8921.2019.02.009>

7. **Свириденко, Г.М.** Влияние температуры на развитие и метаболизм основной кислотообразующей заквасочной микрофлоры / Г.М.Свириденко, О.М.Шухалова // Молочная промышленность. 2020. № 7. С. 49–51. <https://doi:10.31515/1019-8946-2020-07-49-51>