

УДК 579.8; 579. 67

SELECTION OF PROMISING LACTIC ACID BACTERIA WITH FERMENTED VEGETABLE RAW MATERIALS

Ts.O. Korol

Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

I.O. Kozachok

National University of Food technologies

Key words:

flora,
lactic acid bacteria, brine,
selective medium, strains

Article history:

Received 12.01.2015
Received in revised form
25.03.2015
Accepted 30.03.2015

Corresponding author:

tmipt_xp@ukr.net

ABSTRACT

One of the promising areas receiving probiotic cultures is the use of fermented plant materials. The problems of lactose intolerance and elevated cholesterol increase the demand for non-dairy probiotic culture. Therefore, the actual problem is the selection of lactic acid microorganisms from fermented vegetable products with a wide range of biological and technological properties. The microflora composition of brines from fermented vegetables, in particular, two types of sauerkraut and brine of cucumbers were studied. To obtain pure cultures of microorganisms applied general microbiological methods on appropriate selective media. Allocated 48 isolates with investigational products and selected 7 high-performance cultures which were gram-positive, risperadone and morphologically homogeneous with high milk-clotting activity. The data obtained will be the basis for a detailed study of their biochemical properties and taxonomic position.

СЕЛЕКЦІЯ ПЕРСПЕКТИВНИХ ЛАКТОБАКТЕРІЙ ІЗ ФЕРМЕНТОВАНОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

Ц.О. Король, канд. техн. наук[®]

Інститут продовольчих ресурсів НААН

I.O. Козачок, студент

Національний університет харчових технологій

Одним із перспективних напрямів отримання пробіотичних культур є використання ферментованої рослинної сировини.

На даному етапі роботи досліджено склад мікрофлори розсолів з ферментованих овочів, зокрема, квашеної капусти двох видів та розсолу з огірків. Визначено, що найпоширенішими є молочнокислі бактерії родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Для виділення чистих культур мікроорганізмів застосовано загальні мікробіологічні методи на відповідних селективних середовищах. Одержані дані слугуватимуть підґрунтям для ретельного вивчення їх біохімічних властивостей та визначення їх таксономічного положення.

Ключові слова: мікрофлора, молочнокислі бактерії, розсіл, селективні середовища, штами

Вступ. Сучасні методи прикладної мікробіології дозволяють відбирати з природних джерел штами мікроорганізмів, які володіють широким спектром корисних властивостей із

різною технологічною метою [1]. Детальне дослідження особливостей взаємовідносин між окремими видами і штамми мікроорганізмів дозволяє формувати асоціації бактерій зі специфічними властивостями [1, 2].

Незважаючи на велику кількість функціональних продуктів технологи постійно проводять скринінг серед штамів молочнокислих бактерій для створення нових високоактивних заквашувальних композицій, які б мали не лише добрі смакові якості, а й володіли б пробіотичними властивостями.

Капуста споживається у величезних кількостях по всьому світі і має важливе значення у харчуванні людини. При її вживанні знижується ризик виникнення деяких видів раку, що пов'язано, в першу чергу, з наявністю в ній глюкозинолатів та їхніх похідних [3]. Також у капусті міститься велика кількість мінералів, вітаміну С, харчових волокон, антиоксидантних фіторечовин [4]. І тому, останнім часом, перспективним є використання капусти для отримання пробіотичних продуктів.

Немолочні пробіотичні продукти мають велике значення у зв'язку з поширеною тенденцією вегетаріанства і високим ступенем несприйняття лактози у багатьох людей по всьому світі [5]. Проблема несприйняття лактози і підвищений вміст холестерину постійно збільшує попит на біологічно активні культури немолочного походження. Приблизно від 5 до 15 % населення Європи — це люди з вадою несприйняття лактози, і ця кількість людей постійно збільшується до 80 % в деяких частинах світу, наприклад, в Центральній Азії та Африки [6].

Наразі відомо, що молочнокислі бактерії, вилучені із ферментованої рослинної сировини володіють високою здатністю ферментування лактози.

Тому було надано увагу саме пошуку біологічно активних штамів з природних джерел, зокрема, з ферментованої рослинної сировини.

Матеріали та методи. Об'єктами наших досліджень були квашена капуста, розсіл, штами мікроорганізмів, селективні та поживні середовища.

Чисті культури мікроорганізмів одержували за загальними мікробіологічними методами на відповідних селективних середовищах. Для одержання ізольованих колоній використовували такі поживні середовища: МРС, Лі, Рогози, Блікфельда, Редді, поживний агар з сахарозою [7], МРСД [8].

За наявності в мікропрепаратах сторонніх мікроорганізмів або значної морфологічної гетерогенності процес очищення повторювали шляхом послідовних висівів у рідкі та агаризовані селективні середовища.

Подальший контроль чистоти культур здійснювали мікроскопічно відповідно до ДСТУ 7357:2013 [9]. Для цього готували препарати фіксованих клітин, фарбували за Грамом і переглядали їх з імерсійною системою за допомогою мікроскопу Motic (Fischer Bioblock) із вмонтованою відеокамерою Top View 1000 зі збільшенням у 1000 разів.

Результати досліджень. Дослідження проводились у відділі біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН з метою поповнення банку культур цього відділу штамми різних таксономічних груп для наступного використання у біотехнології ферментованих немолочних продуктів.

Вилучення мікроорганізмів із продуктів: розсолу огірків та квашеної капусти здійснювали у кілька послідовних етапів. Спочатку одержували нагромаджувальні культури, висіваючи зразки розсолів у 3 поживні середовища (МПБ, МРС, ГБ) та культивуючи їх за температури 32 °С. Такий підхід має високий ступінь вибірковості та сприяє вилученню і нагромадженню молочнокислих стрептококів та лактобактерій.

За ферментативної переробки овочів та фруктів мікробіологічні процеси є результатом життєдіяльності природної мікрофлори, яка зазвичай присутня в них. На поверхні сировини завжди наявна велика кількість різноманітних мікроорганізмів, тому за ферментації можна спостерігати різноманітні процеси — молочнокисле, спиртове, оцтовокисле, маслянокисле, мурашинокисле бродіння, а також пліснявіння [10].

Мікрофлора і мікробіологічні процеси при квашенні капусти схожі з такими при квашенні огірків. Спостерігається декілька етапів сквашування [3]. У розсолі овочі піддаються послідовному впливу різних мікроорганізмів:

- спочатку відбувається переважний розвиток аеробної мікрофлори, присутньої на поверхні овочів. Вони продукують оцтову, мурашину, молочну кислоти, спирт і вуглекислий газ. Завдяки споживанню кисню, а також виділенню CO₂ і газів, створюються анаеробні умови, сприятливі для росту молочнокислих бактерій.

• потім переважає розвиток молочнокислої мікрофлори, яка спільно з дріжджами (*Saccharomyces* і *Torulopsis*) здійснює бродіння з утворенням молочної й оцтової кислот, що пригнічує розвиток небажаної мікрофлори. Спочатку розвиваються бактерії роду *Leuconostoc mesenteroides*, які надають квашеному продукту характерний запах завдяки утворенню ефірів. Далі розвиваються інші паличкоподібні молочнокислі бактерії, гомоферментативні (переважно *Lactobacillus plantarum*) та гетероферментативні бактерії роду *L. brevis*, *L. fermentum*.

На третьому етапі — спостерігається переважний розвиток дріжджів, оскільки для них створюються сприятливіші умови, ніж для молочнокислих бактерій; бродіння закінчується після вичерпання вуглеводів.

У складі розсолів квашеної капусти (домашньої (зразок № 11) та придбаній у торговельній мережі (зразок № 12) та з огірків (зразок № 13) було визначено наявність молочнокислих бактерій (МКБ); дріжджів (ДП), плісені, спороутворювальних бактерій (СУ) та бактерії групи кишкових паличок (БГКП). В усіх зразках було відзначено домінування корисної спонтанної мікрофлори різних таксономічних груп та відсутність протею, сальмонел.

У всіх досліджених продуктах встановлено високу кількість мікроорганізмів — на рівні десятків мільйонів клітин у 1 г (табл. 1).

Таблиця 1. Мікрофлора обстежених зразків

Зразок	Загальна чисельність мікроорганізмів, КУО/г	Співвідношення груп мікроорганізмів, %				
		МКБ	ДП	Плісені	СУ	БГКП
Розсіл з квашеної капусти (зразок № 11)	5,1·10 ⁹	64	12	0	19	5
Розсіл з квашеної капусти (зразок № 12)	2,3·10 ⁹	78	7	0	14	1
Розсіл з огірків (зразок № 13)	2,0·10 ⁹	67	17	4	6	5

Примітка. МКБ — молочнокислі бактерії; ДП — дріжджі, СУ — спороутворювальні бактерії; БГКП — бактерії групи кишкових паличок.

Більшу частину від загальної кількості мікрофлори у розсолі домашньої капусти (зразок № 12) складала молочнокислі бактерії. Їхня частка від загальної кількості мікроорганізмів складала 78 %. У розсолі з огірків та капусти, придбаній у торговельній мережі молочнокислі бактерії були на рівні 64—67 % поряд з дріжджами (7—17 %). Частка спороутворювальних бактерій та дріжджів у всіх продуктах коливалась від 6 % до 19 % від загальної кількості мікрофлори (див. табл. 1).

У результаті проведеного мікробіологічного дослідження було показано, що мікрофлора розсолів була різноманітною, що впливає на формування продуктів. Аналіз літературних даних [4, 5] свідчить про те, що молочнокислі бактерії, які найширше використовують у виробництві ферментованих фруктів та овочів, відносяться до родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. Для бактерій родини *Lactobacillaceae* характерним є утворення ряду антимікробних сполук, які забезпечують природний консервувальний ефект. Також у ферментуванні рослинної сировини беруть участь дріжджі та оцтовокислі бактерії.

Оскільки аналіз наявної інформації свідчить, що головним чинником ферментаційного процесу рослинної сировини виступають молочнокислі бактерії, тому роботу було націлено на пошук цих мікроорганізмів.

Для виділення молочнокислих бактерій було проведено глибинний посів розведень на середовища Лі, Редді, Рогози, Блікфельдта, МРСД. Чашки з посівами витримували упродовж 5 діб за різних температур культивування.

Було зафіксовано ріст колоній різних розмірів і форм як круглі, так і видовжені, мали різний колір із зонами просвітлення на середовищах Лі за температури 37 °С, МРСД (25 °С), та Блікфельдта (37 °С). При культивуванні за температури 45 °С на середовищах Лі, Рогози (30 °С та 37 °С), Редді (37 °С) колонії не вирости.

На середовищі Лі (37 °С), вирости білі та жовті колонії із зонами просвітлення, як ми припускаємо, що це можуть бути культури бактерії роду *Lactobacillus* та *Streptococcus thermophilus*, оскільки дане середовище є елективним для таких мікроорганізмів. На середовищі МРСД (25 °С) вирости колонії круглі, формою «човників» довжиною 1—5 мм, або дисків жовтого і зеленого кольору. На середовищі Блікфельдта вирости білі колонії здебільшого маленького розміру круглі та у формі дисків (рис. 1).

Із досліджених зразків було отримано 48 ізолятів мікроорганізмів — 30 з капусти і 18 із розсолу з огірків (табл. 2). Дослідженнями мікрофлори квашеної капусти та розсолу огірків

було встановлено, що вона представлена як грамнегативними, так і грампозитивними бактеріями. Зокрема, із розсолу капусти було вилучено 22 % грамнегативних і 40 % грампозитивних мікроорганізмів; із розсолу огірків — 8 % і 30 %, відповідно, від загальної кількості вилучених ізолятів.

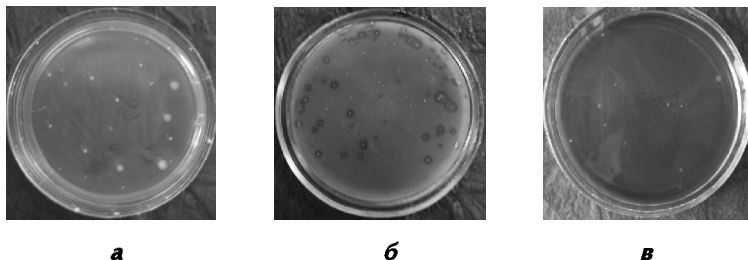


Рис. 1. Зовнішній вигляд колоній молочнокислих бактерій на селективних середовищах: а — МРСД; б — Лі; в — Блікфельдта

Таблиця 2. Характеристика ізолятів, вилучених із розсолів капусти та огірків

Джерело вилучення	Середовище та температура культивування	Кількість ізолятів	Морфологічні ознаки	Наявність зони просвітлення
Розсіл з квашеної капусти (зразок № 11)	Лі, 37 °С	3	жовта кругла, d від 1 до 2 мм	+
		3	біла видовжена d = 2 мм	+
		1	білий човник, d = 1 мм	+
		2	жовтий човник, d = 1 мм	+
	МРСД, 25 °С	5	жовта кругла, d від 1 до 3 мм	—
		2	біла кругла, d від 1 до 2 мм	—
Розсіл з квашеної капусти (зразок № 12)	Лі, 37 °С	2	жовтий човник, d = 1 мм	+
	МРСД, 25 °С	3	жовтий човник, d = 2 мм	—
		3	жовта, кругла, d від 3 до 5 мм	—
		2	зелена, кругла, d від 3 до 5 мм	—
	Блікфельдта, 37 °С	2	біла, диск, d від 1 до 2 мм	—
		2	біла, кругла, дрібна d < 1 мм	—
Розсіл з огірків (зразок № 13)	МРСД, 25 °С	3	жовта d від 1 до 5 мм	—
		5	біла, кругла, d від 1 до 5 мм	—
	Блікфельдта, 37 °С	5	біла, кругла, d від 1 до 2 мм	—
		2	жовта, d від 1 до 4 мм	—
	Поживний агар з сахарозою	3	біла, кругла, d від 1 до 3 мм	+

При аналізуванні отриманих результатів звертали увагу на колонії, що є типовими для лактобактерій, виділених із рослинної сировини. Наприклад, термофільні стрептококи утворюють поверхневі колонії округлої форми з чітко вираженою зернистістю, глибинні — човникopodobні. Стрептобактерії та бетабактерії на твердих поживних середовищах формують гладкі, блискучі колонії сферичної форми. Лейконостоки у товщі агару утворюють дрібні колонії з сіруватим відтінком [11].

Більшість ізолятів паличкоподібних форм було отримано з розсолу № 11 — 23 %, з розсолу № 12 — 4,2 %, а з розсолу № 13 — 18,75 % від загальної кількості вилучених ізолятів, які виділено із середовищ Лі та МРСД. Найбільшу кількість культур кокової форми (17 %) одержали з розсолу з капусти (зразок № 12) та із розсолу для огірків (№ 13) — 12,5 %, які виділено із середовища Блікфельдта. Решту — із розсолу № 11 — 4,2 % ізолятів виділено із поживного агару із сахарозою. Слід зазначити, що частина отриманих паличок ізолятів (8,4 % від загальної кількості вилучених ізолятів) утворювали з коками стійкі сполучення. У кожному зразку таких сполучень було від 1,1 до 8,4 % від усіх відокремлених колоній. Спороутворювальні мікроорганізми становили 10,5 % із вилучених паличкоподібних ізолятів.

Мікроскопічні дослідження цих ізолятів показали наявність у досліджуваних зразках товстих та тонких паличок, розміщених поодинокі, або групами; дрібних та крупних коків,

розміщених поодинокі, попарно, ланцюжками або великими скупченнями; спороносних паличок; паличок неправильної форми, а також поліморфних бактерій.

Після проведення мікроскопії препаратів, для подальшої роботи відбирали тільки ті культури, в яких спостерігалися грампозитивні, неспороносні, морфологічно однорідні мікроорганізми. Стійкі сполучення коків з паличками та зі спороутворювальними мікроорганізмами було вилучено з наступних досліджень.

Ізольовані колонії з середовищ Лі і поживного агару з сахарозою переносили у стерильне знежирене молоко. Надалі посіви з середовища Лі поміщали в термостат за 42 °С, посіви з поживного середовища з сахарозою — в термостат за 25 °С до утворення згустку; культивування вели не довше 48 год. Ізольовані колонії з середовища МРСД, Блікфельдта переносили у рідке середовище МРС, посіви поміщали в термостат за 37 °С та у термостат за 30 °С до утворення рівномірної каламуті на 48 год. Завдяки цим операціям було вилучено чисті культури мезофільних та термофільних лактобактерій.

Із 48 ізолятів було відібрано 20 однорідних культур (42 %), серед яких 4 кокових культур і 6 паличкоподібних, виділених із капусти, та 5 кокових культур і 5 паличкоподібних, виділених із розсолу огірків.

Для наступного дослідження основним фактором відбору штамів була їхня молокозсі-дальна активність упродовж 24 год. Пасажі здійснювали щоденно, доти доки культура не сквашувала молоко з рівним щільним згустком без розриву і пухирців газу. Чистоту культур досягали шляхом щоденних пасажів.

Із 20 відібраних ізолятів 13 культур втратили здатність до зсідання молока. Після цього для наступних досліджень було відібрано 7 найактивніших, які були грампозитивними, неспороносними, та морфологічно однорідними.

Висновки.

1. Охарактеризовано склад мікрофлори 3 зразків розсолу з квашених овочів, зокрема, квашеної капусти двох видів та розсолу з огірків. Визначено, що найпоширенішими родами є *Lactobacillus*, *Leuconostoc* *Pediococcus*. Показано, що загальна чисельність бактерій у 1 г дослідної продукції не перевищує десятки мільйонів клітин.

2. Із дослідної продукції було вилучено 48 ізолятів. Відібрано 7 високопродуктивних культур, які були грампозитивними, неспороносними, та морфологічно однорідними з високою молокозсідальною активністю. Встановлено, що мікрофлора розсолу представлена як коками так і паличками.

3. Наступним етапом відбору цих штамів буде ретельне вивчення їх біохімічних властивостей та визначення їх таксономічного положення.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Машкін М.І.* Технологія молока і молочних продуктів: навчальне видання / М.І. Машкін, Н.М. Париш. — К.: Вища освіта, 2006. — 351 с.: іл. М38 ISBN 966-8081-53-6.

2. *Vinderola C.G.* Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products / *Vinderola C.G., Mocchiutti P., Reinheiner J.A.* // *Dairy Sci.* — 2002. — Vol. 85, № 4. — P. 721—729.

3. *Chun O.K.* Antioxidant properties of raw and processed cabbages / *Chun O.K., Smith N., Sakagawa A., Lee C.Y.* // *Int. J. Food Sci. Nutr.* — 2004. — Vol. 55, No. 3. — P. 191—199.

4. *Yoon K.Y.*, Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria / *Yoon K.Y., Woodams E., Hang Y.D.* // *Bioresource Technol.* — 2006. — Vol. 97, № 12. — P. 1427—1430.

5. *Granato D.* Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products / *Granato D., Branco G.F., Nazzaro F.* // *Compr. Rev. Food Sci. F.* — 2010. — Vol. 9. — P. 292—302.

6. *De Vrese M.* Probiotics-compensation for lactase insufficiency / *de Vrese M., Stegelmann A., Richter B.* // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2001. — Vol. 73, № 2. — P. 421—429.

7. *ГОСТ 10444.11-1989.* Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов [Текст]. — Введ. 1991-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 1989. — 13 с.

8. *Holley R.A.* Use of MRSD medium and the hydrophobic grid membrane filter technique to differentiate between pediococci and lactobacilli in fermented meat and starter cultures / *Holley R.A., Millard George E.* // *International Journal of Food Microbiology.* — 1988. — Vol. 7, № 2. — P. 87—102.

9. ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання.
10. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підруч.; 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. — К.: НУХТ, 2010. — 632 с.
11. Банникова Л.А. Микробиологические основы молочного производства: підруч. / Л.А. Банникова. — М.: Агропромиздат, 1987. — 400 с.

СЕЛЕКЦИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ С ФЕРМЕНТОВАНОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Ц.А. Король

*Институт продовольственных ресурсов
Национальной Академии Аграрных наук Украины, Киев*

И.А. Козачок

Национальный университет пищевых технологий

*Одним из перспективных направлений получения пробиотических культур является использование ферментированного растительного сырья. На данном этапе работы исследован состав микрофлоры рассолов из ферментированных овощей, в частности, квашеной капусты двух видов и рассола с огурцов. Определено, что наиболее распространенными являются молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Для выделения чистых культуры микроорганизмов применены общие микробиологические методы на соответствующих селективных средах. Полученные данные послужат основой для тщательного изучения их биохимических свойств и определения их таксономического положения.*

Ключевые слова: микрофлора, молочнокислые бактерии, рассол, селективные среды, штаммы