УДК 579.2:578.2:57.063:663.18

SELECTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE STRAINS–PRODUCERS AS ALTERNATIVE FOR ARTIFICIAL PRESERVATIVES AND BUILDERS

O. Naumenko, N. Kigel
Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
A. Bovkun
Institute of Post-Diploma Training of the National University of Food Technologies

Key words:
Streptococcus thermophilus
Lactobacillus acidophilus
Exopolysaccharides
Producers
Preservatives

Article history:
Received 13.05.2019
Received in revised form 31.05.2019
Accepted 13.06.2019

Corresponding author:
O. Naumenko
E-mail:
ovnaumenko1@gmail.com

ABSTRACT

Microbiotyping of non-commercial food products was conducted, from which pure cultures of microorganisms were isolated. Based on the results of morphological and biochemical tests, genetic studies of bacterial isolates are identified, namely: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*. The active strains were screened for biotechnological characteristics such as: the ability to form aromatic compounds and viscous components, the level of lactic acidity and bacterial yield, the energy of acid formation, the resistance to aggressive compounds of the intestinal tract, the ability to reduce the level of lactose for milk fermentation, organoleptic, antagonistic activity regarding technically harmful and opportunistic microflora. Selection of resistant strains for virulent phages circulating in dairy processing enterprises of Ukraine was carried out. It has been shown that the ability to produce exopolysaccharides and, thus, to influence the rheological properties of fermentation products is a straw-specific characteristic that varies widely.

Recommendations for use: selected strains — producers of biologically active compounds can be used in the form of starters or monocultures in the processes of milk fermentation as natural thickeners, stabilizers, gel forming and water-absorbing agents; artificial preservatives. The strains of *S. thermophilus*, selected according to phage resistance and the ability to produce exopolysaccharides, can be used as “technical” strains to stabilize the fermentation process, even with phage infection and to improve the texture of fermented milk. In addition, it is expedient to involve such strains in starters in order to increase the stability of the product, increase rheological properties, etc.

DOI: 10.24263/2225-2924-2019-25-3-5

СЕЛЕКЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ ЯК АЛЬТЕРНАТИВА ШТУЧНИМ КОНСЕРВАНТАМ І ЗГУЩУВАЧАМ

О. В. Науменко, Н. Ф. Кігель
Інститут продовольчих ресурсів НААН України
А. О. Бовкун
Інститут післядипломної освіти Національного університету харчових технологій

У статті досліджено мікробіоту некомерційних харчових продуктів, з яких виділено чисті культури мікроорганізмів. На підставі результатів морфологічних, біохімічних тестувань, генетичних досліджень бактеріальні ізоляти ідентифіковано до видів Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus. Проведено скринінг активних штамів за такими біотехнологічними характеристиками: здатність до утворення ароматичних сполук і в'язких компонентів, рівень молокозсідальної активності та урожайність бактерій, енергія кислотоутворення, стійкість до агресивних сполук кишкового тракту, здатність знижувати рівень лактози за ферментації молока, органолептика, антагоністична активність щодо технічно-шкідливої та умовно-патогенної мікрофлори. Відібрано резистентні штами до вірулентних фагів, що циркулюють на молокопереробних підприємствах України. Показано, що здатність продукувати екзополісахариди та у такий спосіб впливати на реологічні властивості продуктів ферментації є штамоспецифічною характеристикою, яка варіює в широких межах.

Рекомендації щодо застосування: селекціоновані штами Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus — продуценти біологічно активних сполук, можуть використовуватись у формі заквашувальних культур або монокультур у процесах молочної ферментації як природні згущувачі, стабілізатори, гелеутворювальні та водозв'язувальні агенти; штучні консерванти. Штами S. Thermophilus, відібрані за фагорезистентністю та здатністю до продукції екзополісахаридів, можуть бути застосовані як «технічні» штами для стабілізації процесу ферментації навіть за умови фагової інфекції та покращення текстури ферментованого молока. Крім того, такі штами доцільно залучати до мультиштамових заквасок з метою підвищення реологічних властивостей, збільшення стабільності продукту при зберіганні.

Ключові слова: *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, екзополісахариди, продуценти, консерванти.*

Постановка проблеми. Найрозповсюдженіші проблеми, які виникають при виробництві кисломолочних продуктів (низька в'язкість продукту, високий рівень синерезису, незадовільні органолептичні властивості та швидке псування), часто вирішуються завдяки додаванню сухого знежиреного молока чи сироватки, штучних консервантів, ароматизаторів або стабілізаторів струк-

тури. Зазвичай, додають желатин або рослинні (наприклад, крохмаль, пектин, гуарова камедь і альгінат) та мікробні полісахариди (наприклад, ксантан і геллан). Полісахариди збільшують в'язкість і стійкість, поліпшують текстуру, зменшують схильність до синерезису і поліпшують смак нежирних продуктів. Деякі полісахариди, наприклад, ксантан і геллан, мають додаткову перевагу, оскільки придатні до хімічної модифікації, що може поліпшити їхні реологічні властивості [1]. Проте ці добавки-загущувачі є загрозою здоров'ю людини та можуть негативно позначатись на органолептичних властивостях продуктів. У більшості країн Європейського Союзу додавання стабілізаторів у виробництві питних кисломолочних продуктів без фруктових наповнювачів заборонено.

Альтернативним методом покращення текстури, якості та стабільної здатності до зберігання кисломолочних продуктів є застосування штамів-продуцентів біологічно активних сполук — натуральних функціональних полімерів, біоцинів, ароматичних сполук тощо. Багато досліджень присвячено вивченню біорізноманіття екзополісахаридів, що продукують молочнокислі бактерії в процесі виробництва йогурту, ферментованої молочної продукції, овочів, крупи, і умов для їх оптимальної продукції, технологічної реалізації в промисловій продукції. Перспективними є функціональні екзополісахаридсинтезуючі штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lactobacillus acidophilus* та *Streptococcus thermophilus* [2].

Мета дослідження: провести цілеспрямований пошук штамів лактобактерій, домінуючою ознакою яких є здатність продукувати біологічно активні сполуки (функціональні полімери, біоцини тощо), які є альтернативою штучним консервантам і загущувачам.

Матеріали і методи. У зразках кисломолочних згустків, одержаних шляхом вирощування штамів в ультрапастеризованому молоці 2,6% жиру, визначали ряд біотехнологічних параметрів: чисельність лактобактерій, межу кислотоутворення згідно з [3]. Реологічні характеристики незруйнованих кисломолочних згустків визначали на ротаційному віскозиметрі "RHEOTEST II" з вимірювальною системою циліндр-циліндр (S/S_3). Використовуючи показники приладу, знаходили числові значення ефективної в'язкості згустку, які виражали коефіцієнтом В (дорівнює значенню ефективної в'язкості при коловій швидкості 1м/с) [4]. Відношення культур до бактеріофагів досліджували методом подвійного агару з додаванням 10 мМ $CaCl_2$ [5]. У дослідах використовували вірулентні видоспецифічні бактеріофаги, виділені на підприємствах України, з колекції молочних фагів ІПР. Вуглеводний склад зразків визначали за методом високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі LC-5 (фірми Shimadzu). Антагоністичну активність молочнокислих бактерій щодо тест-культур патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів досліджували *in vitro* за методом лунок. Результати досліджень представлено у вигляді середньоарифметичних значень показників з похибкою не більше 5%.

Викладення основних результатів дослідження. Екзополісахарид продукуючі (ЕПС) штами молочнокислих бактерій відіграють провідну роль у реологічній поведінці та формуванні текстури ферментованого молока,

зокрема шляхом пришвидшення процесів зсідання молока, збільшення в'язкості, посилення пластичності згустку та його стійкості до синерезису при механічному втручанні, яке є неминучим у технологіях резервуарного способу виробництва кисломолочних продуктів [2]. Отже, залучення до складу заквашувальних препаратів штамів-продуцентів екзополісахаридів є природним, дієвим і безпечним засобом формування текстури ферментованого молока та покращення реологічних властивостей кисломолочних продуктів.

Досліджували мікробіоту некомерційних харчових продуктів і виділяли чисті культури різних мікроорганізмів. Розподіл виділених ізолятів за морфологією клітин та джерелом виділення наведено у табл. 1.

Найбільше ізолятів виділено з некомерційних молочних продуктів: кокової форми та палички, відповідно, 22,2% і 31,2% від загальної кількості. Досліджено комплекс культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак нових бактеріальних ізолятів традиційними мікробіологічними, біохімічними методами, сучасними методами за допомогою тестових систем API 50 CHL та API 20 STREP (bioMerieux, Франція) та генетичними методами із застосуванням специфічних олігонуклеотидних праймерів.

Таблиця 1. **Характеристика ізолятів, виділених з природних джерел**

Група	Морфологія клітин	Розміри клітин, мкм	Джерело виділення	Кількість ізолятів
I	Товсті палички різної довжини, окремі або в ланцюжках	0,6—0,9—1,4—6,0	Ферментована рослинна сировина	73
II	Товсті палички різної довжини, окремі або в ланцюжках	0,7—0,9—1,5—7,0	Некомерційні молочні продукти	115
III	Тонкі палички, іноді в ланцюжках	0,5—0,6—1,0—4,4	Сири	52
IV	Коки, диплококи, ланцюги	0,6—0,8	Некомерційні молочні продукти	82
V	Клітини сферичної чи овальної форми	2,0—5,0—5,4—7,5	Ферментована рослинна сировина	47

У результаті виділено та ідентифіковано до виду чисті культури мікроорганізмів, а саме: *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus acidophilus.* Отриманий банк чистих культур далі використовували як селекційне поле для скринінгу штамів лактобактерій, здатних до утворення молочних згустків щільної, в'язкої консистенції.

За показником ефективної в'язкості проведено скринінг 12 штамів *S. thermophilus* та 7 штамів *L. acidophilus*. Показано, що здатність продукувати ЕПС і в такий спосіб впливати на реологічні властивості продуктів ферментації є штамоспецифічною характеристикою, яка варіює в широких межах (рис. 1).

Так, у штамів *S. thermophilus* величина коефіцієнта B знаходилась у діапазоні від 25,3 Па·с (штам St/1) до 64,0 Па·с (штам CT-гр); у штамів *L. acidophilus* — у діапазоні від 2,3 Па·с (штам Lb1) до 51,7 Па·с (штам LF).

Найменші значення ефективної в'язкості показали згустки, утворені штамом *S. thermophilus* St/1 та штамами *L. acidophilus* Lb1, Lb2, Lb4, Lb5 (рис. 1). Структурно-механічні характеристики згустків, ферментованих штамами *S. thermophilus* CT-гр, *S. thermophilus* O-4, *S. thermophilus* Et-1 та штамами *L. acidophilus* LF, Lb3, були більш прийнятними порівняно з іншими варіантами. Ці згустки характеризувались стійкістю до механічного руйнування та високою тиксотропністю, що свідчить про перспективу залучення цих штамів до складу заквасок для кисломолочних напоїв, як природних згущувачів консистенції.

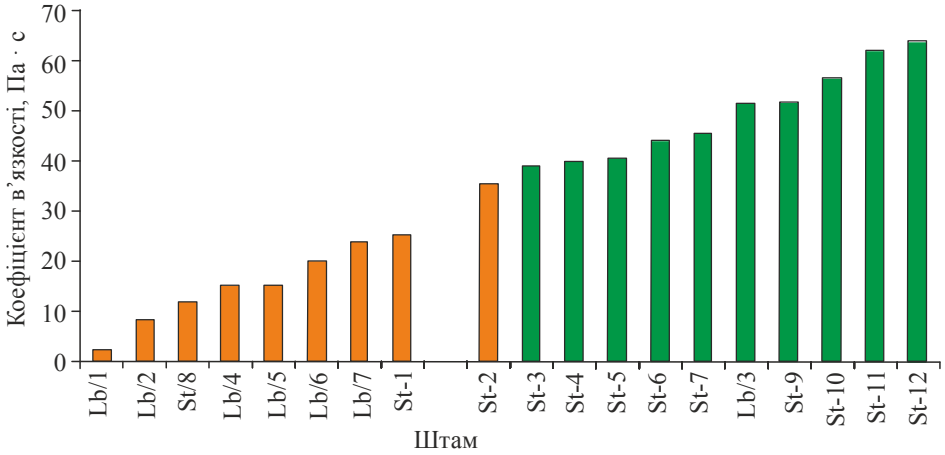

Рис. 1. Розподіл штамів *S. thermophilus* та *L. acidophilus* за показником ефективної в'язкості утворених ними кисломолочних згустків

Відомо, що хімічні харчові добавки, такі як: нітрит, сульфіт, пропіонова кислота, сорбінова та бензойна кислоти, застосовуються в технології збереження продуктів харчування. Як альтернативу показано ефективність використання штамів лактобактерій з високою антимікробною активністю для довготривалого збереження продуктів харчування завдяки їх мікробіологічним, фізіологічним і технологічним властивостям [6].

Тому другим напрямом наших досліджень був пошук штамів-антагоністів, які б проявляли інгібуючу активність щодо розвитку патогенних бактеріальних штамів та запобігали псуванню ферментованих молочних продуктів. У табл. 2 подано результати досліджень штамів за показниками технологічної та функціональної активності.

Таблиця 2. **Показники технологічної та функціональної активності штамів**

Показник	*L. acidophilus* (*n* = 17)	*S. thermophilus* (*n* = 32)
1	2	3
Чисельність у молоці*, *lg* КУО/см^3	8,20—8,47	8,34—8,50
Зниження вмісту лактози*, %	28,6—31,1	26,3—25,5
Межа кислотоутворення**, °*T*	280±5	110±5
Фагостійкість	+	+

Продовження табл. 2

1	2	3
Антагоністична активність**, *зона відсутності росту тест-культур у мм*		
Escherichia coli 0113	28±1	26±1
Proteus vulgaris 2029	27±2	23±1
Staphylococcus aureus 209	24±1	18±1
Enterococcus cloaceae	25±1	19±1
Shigella sonnei 12S	19±1	15±1
Bacillus subtilis	20±1	18±1
Pseudomonas aeruginosa 9027	22±1	19±1

* — мінімальне та максимальне значення; ** — середнє значення; $P < 0,05$

Встановлено, що відібрані штами лактобактерій були активними продуцентами молочної кислоти, проявляли високу антагоністичну активність стосовно широкого спектра патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, які належали до таких родів: *Esherichia, Proteus, Pseudomonas, Enterococcus, Shigella, Bacillus* та *Staphylococcus*.

Відомо, що ферментативна дія специфічних штамів лактобактерій призводить до усунення токсичних або антипоживних чинників, таких як лактоза та галактоза з ферментованих молочних продуктів. Тому було досліджено такі біотехнологічні характеристики штамів, як: рівень молокозсідальної активності та урожайність бактерій, енергію кислотоутворення, здатність знижувати рівень лактози за ферментації молока. Показано, що відібрані штами знижували вміст лактози на 26—31% залежно від штаму (табл. 2). Споживання продуктів із такими культурами буде запобігати непереносимості лактози та накопиченню галактози у ферментованих продуктах.

Особливу увагу приділили відбору штамів лактобактерій, що характеризуються стійкістю до вірулентних бактеріофагів, оскільки останні становлять серйозну проблему для молочної промисловості. Для дотримання суворих санітарних умов виробництва, рішенням є використання фагорезистентних культур. Нині в молочній промисловості застосовуються у великих масштабах штами, які набули фагостійкості саме природними механізмами, без генної модифікації [7].

Ми відібрали штами, що характеризувались стійкістю до видоспецифічних вірулентних фагів (21 шт.), виділених на підприємствах України. У підсумку проведених досліджень за комплексом ознак відібрано біотехнологічно активні штами *L. acidophilus* 3138, *S. thermophilus* О-4, СТ-гр та Et-1, які задепоновано у Національному депозитарії промислових мікроорганізмів ІМВ НАН України.

Висновки

У результаті дослідження відібрано 3 штами *S. thermophilus* та 1 штам *L. acidophilus*, які характеризувались низкою біотехнологічних властивостей та є перспективними для промислового впровадження. Штами, відібрані за здатністю до продукції екзополісахаридів, високою антимікробною активністю та фагорезистентністю, можуть бути застосовані у складі комплексних заквашувальних культур у виробництві йогуртів, біойогуртів, кисломолочних

напоїв для забезпечення процесу ферментації навіть за умови фагової інфекції, для покращення текстури ферментованого молока, підвищення його реологічних властивостей і стабілізації продуктів при зберіганні.

Література

1. De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F., Degeest B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2001.Vol. 11. P. 687—707.

2. Duboc P., Mollet B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 2001.Vol. 11. P. 759—768.

3. Інструкція щодо організації виробничого мікробіологічного контролю на підприємствах молочної промисловості / Єресько Г. О. та ін. Київ: ННЦ «ІАЕ», 2014. 372 с.

4. Касьянова Н. О., Скорченко Т. А. Дослідження реологічних властивостей кисломолочних десертів з натуральними соками. *Молочна промисловість*. 2004. № 1(10). С. 20—23.

5. Everson T. C. Control of phage in dairy plant. 1991. *Bull. IDF*. Vol. 263. P.24—28.

6. Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., Chikindas M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001. Vol. 71. P. 1—20.

7. Moineau S. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 1999. Vol. 76. P. 377—382.