

**Ц.О. Король**, кандидат технічних наук  
Інститут продовольчих ресурсів НААН України  
**Д.О. Науменко**, студент  
Національний університет харчових технологій

## ВИДІЛЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ШТАМІВ ІЗ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТУ НАРОДІВ КАВКАЗУ

Традиційний грузинський мацоні або вірменський мацун - це природний кисломолочний продукт, який у Закавказзі називають напоєм довголіття, завдяки унікальній комбінації мікроорганізмів з високою біохімічною активністю. Мацун виробляються з давніх часів, його якість і стабільність залежить від спонтанного неконтрольованого ферментування, що може призвести до змін мікрофлори продукту. Тому нагальним питанням є збереження автентичності продукту шляхом вивчення складу мікрофлори "материнської" закваски та селекціонування біологічно активних штамів для стандартизації та покращення його якості, не змінюючи специфічність ферментування.

Досліджено мікрофлору некомерційного кисломолочного продукту мацун. Визначено, що домінуючими групами були молочнокислі бактерії родів *Lactobacillus*, *Streptococcus* та дріжджі. Для виділення чистих культур мікроорганізмів застосовано загальні мікробіологічні методи. Із дослідної продукції було вилучено 50 ізолятів. Комплекс морфологічних і біохімічних властивостей дозволив ідентифікувати наступні види молочнокислих бактерій: *S. thermophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. delbrueckii ssp. lactis*, *L. helveticus* та *E. durans*.

Ключові слова: мікрофлора, молочнокислі бактерії, мацоні, селекція, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, селективні середовища.

Традиционный грузинский мацони или армянский мацун - это природный кисломолочный продукт, который на Закавказье называют напитком долголетия, благодаря уникальной комбинации микроорганизмов с высокой биохимической активностью. Мацун производят с давних времен, его качество и стабильность зависит от спонтанной неконтролируемой ферментации, что может привести к изменениям видового состава продукта. Поэтому актуальным вопросом является сохранение подлинности продукта путем изучения микрофлоры "материнской" закваски и селекции биологически активных штаммов для стандартизации и улучшения его качества, не меняя специфичность ферментации.

Исследовано микрофлору некомерческого кисломолочного продукта мацун. Установлено, что доминирующими группами были молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Streptococcus* и дрожжи. Для выделения чистых культур микроорганизмов применены общие микробиологические методы. С опытной продукции было выделено 50 изолятов. Комплекс морфологических и биохимических свойств позволил идентифицировать следующие виды молочнокислых бактерий: *S. thermophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. delbrueckii ssp. lactis*, *L. helveticus* и *E. durans*.

Ключевые слова: микрофлора, молочнокислые бактерии, мацони, селекция, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, селективные среды.

*Georgian matsoni or Armenian matsun - is a traditional fermented milk product, which is referred to a popular the Caucasus drink for longevity, thanks to a unique combination of microorganisms with high biochemical activity.*

*Matsun is produced for a long time, the quality and stability depends on uncontrolled spontaneous fermentation, which can lead to changes in species composition of the product. Therefore, an important issue is to preserve the authenticity of the product by studying the*

*microflora of the "mother" of the leaven and selection of biologically active strains to standardize and improve its quality, without changing the specificity of fermentation.*

*The microflora of the non-commercial fermented milk product matsun have been Investigated. It was found that the dominant lactic acid bacteria groups were genera Lactobacillus, Streptococcus and yeast. General microbiological methods were applied to obtain pure cultures of microorganisms. Allocated 50 isolates with investigational product. Complex morphological and biochemical properties allowed to identificate the following species of lactic acid bacteria: S. thermophilus, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. delbrueckii ssp. lactis, L. helveticus and E. durans.*

*Key words: microorganisms, lactic acid bacteria, matsoni, selection, Lactobacillus, Streptococcus, selective medium.*

Традиційний грузинський мацоні або вірменський мацун - це природний кисломолочний продукт, який у Закавказзі називають напоєм довголіття, завдяки унікальній комбінації природних мікроорганізмів з високою біохімічною активністю.

Напій вперше був створений на Кавказі понад 200 років тому. Він широко розповсюджений в країнах кавказького регіону, в Азії і на Близькому Сході. Мацоні також популярний в Японії під назвою йогурт Каспійського моря [1].

Мацоні або мацун сприяє оздоровленню клітин, підвищує діяльність імунної системи, усуває причини передчасного старіння, і визнано як природний пробіотик. Він позитивно впливає на кровотворну функцію організму, на нервову і серцево-судинну систему, нирки, печінку, і застосовується для стимуляції травлення, особливо у людей похилого віку, для нормалізації вуглеводного і водно-сольового балансу людини.

Готується з коров'ячого, буйволячого, овечого або козячого молока або їх суміші із застосуванням спеціальної закваски, в якій переважають стрептококи і болгарська паличка. По складу закваски мацун можна віднести до одного з різновидів йогурту. Для приготування цього продукту необхідна не тільки "правильна" закваска, але і молоко абхазьких корів. Справжній мацун має своєрідний кисломолочний смак з досить вираженою кислотністю та щільним згустком.

На основі мацуна при додаванні 30-50 % джерельної води і 1 % солей виходить напій "Тан", який дуже популярний в Албанії, Болгарії, Македонії, Сербії та Туреччині.

Хоча мацун в даний час виробляються з давніх часів, його якість і стабільність, як і раніше залежить від спонтанного неконтрольованого ферментування, що може призвести до змін мікрофлори продукту. В результаті чого отримують продукт з дуже кислим і гірким смаком та коротким терміном зберігання (70-120 год.).

Для збереження автентичності продукту Мацун необхідно вивчення складу мікрофлори "материнської" закваски та селекціонування біологічно активних штамів з метою створення нової заквашувальної культури для стандартизації та покращення його якості, не змінюючи типовість ферментування.

На сьогодні досить обмаль даних щодо комплексного вивчення мікрофлори Мацуна [2, 3, 4]. Він є продуктом складного молочнокислого і спиртового бродіння. Відомо, що основними представниками мікрофлори продукту є молочнокислі палички *Lactobacillus* (зокрема, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*), стрептококи *Streptococcus thermophilus* у співвідношенні (1:3), а також дріжджі [2]. Поряд із домінуючою мікрофлорою можуть бути присутні культури інших видів, зокрема, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc*, *Enterococcus durans* [2, 5]. При цьому молочнокислі бактерії, в залежності від співвідношення самих мікроорганізмів, відіграють важливу роль у процесі визрівання і надання продукту особливих смакових і ароматичних відтінків.

Пробіотичний ефект мацоні визначається культурою *Lactobacillus delbrueckii ssp.*, яка має високу антагоністичну активність щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій, таких видів як *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella* і дріжджів роду *Candida lucitaniae*.

У сучасних умовах розвитку молокопереробної галузі виробники повинні знаходити нові засоби для управління процесом ферментації, стабілізуючи мікрофлору, при цьому подовжуючи термін зберігання продукту без змін його традиційного смаку і аромату. Одним із важливих напрямів щодо вирішення таких задач є пошук нових заквашувальних препаратів на основі біологічно активних штамів мікроорганізмів, завдяки яким не втрачаються свою унікальність. Джерелом вилучення цих штамів виступають природні некомерційні кисломолочні продукти.

**Метою даної роботи** було визначення видового складу мікрофлори закваски – мацун.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були вірменська закваска мацун, ізоляти мікроорганізмів, селективні та поживні середовища.

Чисті культури мікроорганізмів одержували за загальними мікробіологічними методами із застосуванням відповідних селективних середовищ. Для виділення термофільних молочнокислих бактерій було проведено глибинний посів розведень на середовища Лі, агар з рН 5,6 (АЦ), агар з гідролізованим молоком (ГА); для виділення дріжджів - дріжджове середовище; для ароматоутворювальних мікроорганізмів – агар з кальцієм цитриновокислим (ГА+Ca<sup>2+</sup>). Чашки з посівами витримували упродовж 3 діб за різних температур культивування [6].

Контроль чистоти культур здійснювали мікроскопічно відповідно до ДСТУ 7357:2013 [7]. Таксономічне положення виділених штамів визначали за ідентифікаційними ключами Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009 р. [8].

#### **Результати досліджень.**

Дослідження мікрофлори мацуна проводили у відділі біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН з метою виявлення біологічно-активних штамів для наступного використання їх у біотехнології ферментованих молочних продуктів.

Мікрофлора даного продукту була представлена молочнокислими бактеріями, а саме лактобацилами - на рівні  $2,7 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>, термофільними стрептококами –  $1,0 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>, а також дріжджами -  $1,6 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>. У продукті були відсутні бактерії групи кишкових паличок. Наші дані співпадають з даними (Uchida K., Chanishvili N., Quero G. та ін.), що у самоквасних грузинських зразках мацоні кількість молочнокислих бактерій варіювала від  $10^5$  до  $10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup> [2, 3, 5].

Вилучення мікроорганізмів із продукту здійснювали у кілька послідовних етапів. Такий підхід дозволив із дослідженого зразку отримати 50 ізолятів мікроорганізмів (табл. 1).

Встановлено, що колонії виділених мікроорганізмів, були різноманітними за морфологією та кольором. При культивуванні за температури 30-45 °С у товщі агаризованих середовищ (ГА, АЦ) колонії були круглі, опуклі, гладкі, блискучі найчастіше з рівним краєм, діаметром 1-2 мм та до 5 мм, мали форму “човників” або “грудочок вати” довжиною від 1 до 3 мм.

*Таблиця 1*

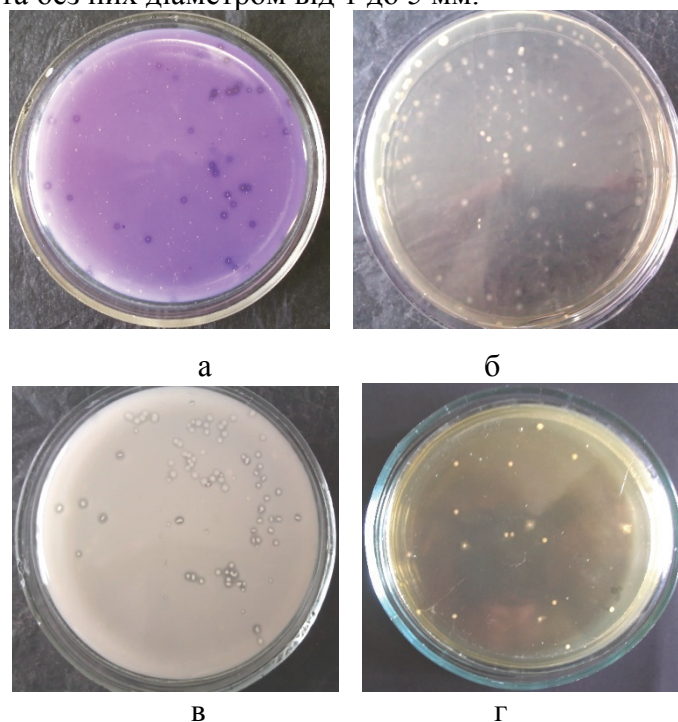
**Характеристика ізолятів, вилучених із мацуна**

Середовище та температура культивування	Кількість ізолятів	Морфологічні ознаки	Наявність зони просвітлення
АЦ, 45 °С	6	грудочка вати d від 1 до 3 мм	-
	2	кругла біла, глибинна d від 2 до 4 мм	-
	3	білий човник d від 1 до 2 мм	-
ГА, 45 °С	2	кругла біла, глибинна d від 1 до 3 мм	-
	3	білий човник d від 1 до 2 мм	-
ГА, 30 °С	1	грудочка вати d=1 мм	-
	1	кругла біла, поверхнева d<1 мм	-
	2	білий човник d=1 мм	-
Лі, 37 °С	5	жовта кругла, d від 1 до 4 мм	+

	1	біла видовжена, d=2 мм	+
	2	біла кругла, d від 1 до 3 мм	+
Лі, 45 °С	1	жовтий човник, d=1 мм	+
	3	жовта кругла, d від 1 до 3 мм	+
	2	біла, кругла, d від 1 до 5 мм	+
	1	жовта видовжена, d=2 мм	+
Дріжджове, 22°С	2	білий човник, d від 1 до 2 мм	+
	3	біла, кругла, d від 1 до 4 мм	-
	1	випукла, поверхнева, біла d=1 мм	-
ГА+Ca <sup>2+</sup> , 30 °С	2	біла, кругла, d від 1 до 2 мм	-
	2	випукла, поверхнева, кругла, біла d=1 мм	+
	5	біла, кругла, випукла, d від 3 до 5 мм	-

Відомо, що селективне середовище Лі використовується для розмежування культур бактерій родів *Lactobacillus* (білі колонії із зонами просвітлення) та *Streptococcus thermophilus* (жовті колонії із зонами просвітлення) [6]. За поверхневого росту на вказаному середовищі було виділено 5 білих круглих дрібних ізолятів із зонами просвітлення та 10 жовтих ізолятів із зоною просвітлення діаметром до 3 мм (рис. 1).

Для виділення ароматоутворювальних молочнокислих бактерій було проведено глибинний посів продукту в агар з кальцієм цитриновокислим. На цьому середовищі після культивування за температури 30 °С упродовж 48–72 год. виростили випуклі білі колонії із зонами просвітлення та без них діаметром від 1 до 5 мм.

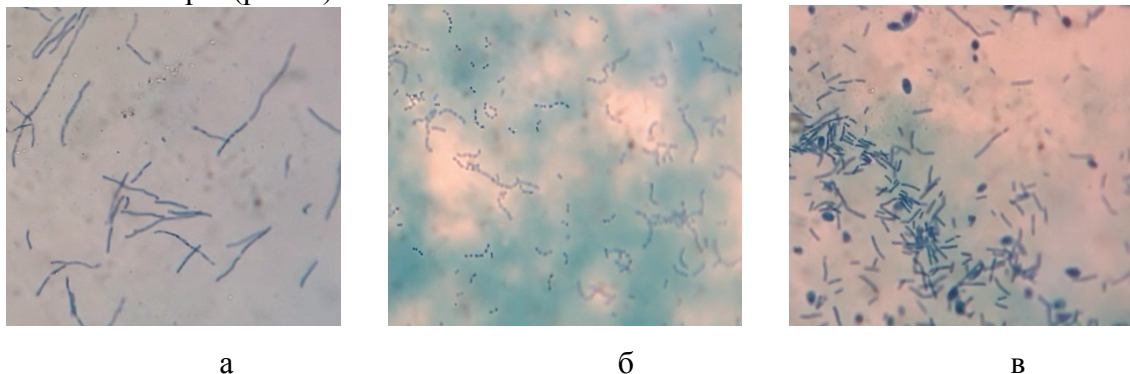


**Рис.1. Зовнішній вигляд колоній молочнокислих бактерій на селективних середовищах:**

а) Лі; б) середовище ГА з рН 5,6; в) дріжджове середовище; г) ГА.

При аналізі мікрофлори самоквасного мацуна було виявлено різні групи мікроорганізмів за грамприналежністю. Встановлено, що домінуюча мікрофлора мацуну представлена грамположитивними бактеріями (92 %), і лише 8 % було виявлено грамнегативних.

Вдалося виділити 26 % ізолятів кокоподібної форми у вигляді коків, розміщених поодинокі, попарно, ланцюжками або великими скупченнями; 14 % - паличкоподібної форми у вигляді довгих зернистих паличок, розміщених поодинокі, або групами та 8 % - дріжджів. А також було виявлено суміш паличок з коками та дріжджами (16 % від загальної кількості вилучених ізолятів). Спор не утворювали. В цілому, кокоподібних мікроорганізмів вдалося виділити більше ніж паличкоподібних, ймовірно, з-за їх вищої життєздатності за низьких значень рН (рис. 2).



**Рис. 2. Морфологічні ознаки виділених ізолятів:** а – лактобацили; б – стрептококи, в – продукт “Мацун” (світловий мікроскоп, збільшення 10x100)

Більшість ізолятів паличкоподібних форм було отримано із середовищ АЦ та ГА – 10 %, і 4%, відповідно, від загальної кількості вилучених ізолятів. Найбільшу кількість культур кокової форми (20 %) одержали із середовища Лі. Із дріжджового середовища вдалося виділити 8 % дріжджів.

Таким чином, після перевірки чистоти виділених культур мікроорганізмів та їх здатності до багаторазових пересівів з 50 ізолятів для подальших досліджень було відібрано 22 однорідні культури, серед яких 13 кокових культур і 5 паличкоподібних, 4 культури дріжджів.

За попередніми даними було визначено, що 10 % ізолятів, вилучених паличкоподібних форм належить до роду *Lactobacillus*, 26 % ізолятів кокоподібної форми – до *Streptococcus*, *Enterococcus*, та 8 % дріжджів, з яких 6 % - лактозоброджувальні.

Виділені штами мікроорганізмів аналізували за біохімічними ознаками, а саме, солестійкістю, ростом у молоці за різних температур, рН, утворенням аміаку з аргініну, зброджуванням вуглеводів, каталазна та молокозсідальна активності. За проведеними біохімічними тестами з 22 культур нам вдалося визначити до виду лише 10 культур (табл. 2).

Таблиця 2

**Фізіолого-культуральні ознаки ізольованих штамів молочнокислих бактерій**

1	2 Характеристика	Під <i>Lactobacillus</i>			<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>E. durans</i>
		<i>delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>delbrueckii ssp. lactis</i>	<i>helveticus</i>		
1	2	3	4	5	6	7
1	Кількість штамів	2	1	1	4	2
2	Фарбування за Грамом	+	+	+	+	+
3	Форма клітини	Палички сині довгі товсті, зернисті	Палички довгі зернисті	Палички довгі	Коки, диплококи короткі і довгі ланцюжки коків	Коки, диплококи, короткі ланцюжки коків

1	2	3	4	5	6	7
4	Температура росту оптимальна, °С	40-45	40	40	37-40	38-40
5	Ріст у гідролізованому молоці: - з 20 % жовчі; - з 40 % жовчі	- -	- -	- -	+ -	+ -
6	Ріст у гідролізованому молоці з: - 2 % NaCl - 4 % NaCl - 6,5 % NaCl	+ - -	- - -	- - -	± - -	+ + +
7	Ріст у м'ясопептонному бульйоні з - рН 8,3 - рН 9,2 - рН 9,6	- - -	- - -	- - -	+ - -	+ - -
8	Утворення аміаку з аргініну	-	-	-	-	+
9	Продуктування ацетоїну (Voges-Proskauer reaction)	+	+	+	+	+
10	Утворення каталази	-	-	-	-	-
11	Ріст у молоці за температури, °С - 10-15 - 37 - 45 - 48	- + + +	- + + +	- + + +	- + + -	- + + -
12	Гранична кислотність у молоці упродовж 7 діб, °Т	250-280	226	300	110-120	80-100
13	Зброджування вуглеводів					
	целлобіоза	-	±	-	-	+
	фруктоза	-	-	-	+	+
	галактоза	-	+	+	±	+
	глюкоза	+	+	+	+	+
	гліцерин	-	-	-	-	-
	інозит	-	-	-	-	-
	інулін	-	-	-	-	-
	лактоза	+	+	+	+	+
	мальтоза	-	+	±	-	+
	манноза	-	+	±	+	+
	манніт	-	-	-	-	-
	мелібіоза	-	-	-	±	-
	меліцитоза	-	-	-	±	-
	раффіноза	-	-	-	±	±
	рамноза	-	-	-	-	-
	рібоза	-	-	-	±	+
	сорбіт	-	-	-	-	-
	сахароза	-	+	-	+	±
	трегалоза	-	+	±	-	+
	D-ксілоза	-	-	-	-	-

Встановлено, що рівень граничної кислотності для видів *L. bulgaricus* і *L. helveticus* був вищим у порівнянні з термофільними стрептококами і складав 250-300 °Т. Для термофільних стрептококів цей показник коливався в межах 80–120 °Т.

Характерними ознаками для молочнокислих паличок був ріст за високих температур (45-48 °С), відсутність росту за високих значень рН (8,3-9,6 од. рН) та хлориду натрію на рівні (4–6,5 %), не утворювали аміак з аргініну та були каталазонегативні. Термофільні молочнокислі палички, на відміну від інших видів, не ростуть за температури 15 °С і добре розвиваються за (45-48) °С. Штами *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* відрізняються від інших видів молочнокислих паличок за спектром зброджуваних вуглеводів: вони ферментують тільки глюкозу та лактозу.

Виділені термофільні стрептококи були каталазонегативними, і не росли у поживних середовищах з рН 9,6 та 6,5 % хлориду натрію, не утворювали аміак з аргініну.

Таким чином, було проаналізовано мікрофлору Мацуна та визначено таксономічне положення 10 виділених культур згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, а саме: 2 штами належать до виду *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 1 штама до *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, 1 штама до *L. helveticus*, 4 штами до *S. thermophilus* та 1 штама до *E. durans*.

### Висновки

1. Охарактеризовано склад мікрофлори вірменського самоквасного мацуна. Домінуючими видами мікрофлори є грампозитивні, неспороутворювальні довгі зернисті палички, коки, диплококи, ланцюжки коків різної довжини та дріжджі. Визначено, що найпоширенішими родами є *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* і дріжджі. Показано, що співвідношення між видами *Lactobacillus* та *Streptococcus thermophilus* знаходилось майже в рівних частинах і досягало сотні мільйонів клітин у 1 г продукту.

2. Із дослідного продукту було вилучено 50 ізолятів. За комплексом морфологічних і біохімічних властивостей ідентифіковано наступні види бактерій: *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. helveticus* та *E. durans*.

### Література

1. <http://www.wisegEEK.com/what-is-matsoni.htm>.
2. Uchida K., Urashima T., Chamnashvili N., Arai I., Motoshima H. Major microbiota of lactic acid bacteria from Matsoni, a traditional Georgian fermented milk // Animal Science Journal. – 2007. – Vol. 78, № 1. – P. 85-91.
3. Chanishvili N. Identification of the lactic acid bacterial cultures isolated from the samples of the caucasian Matsoni // Proc Georgian Acad Sci Biol Ser – 2001. – Vol. 27. – P. 91-95.
4. Soomro A.H., Masud T: Selection of yoghurt starter culture from indigenous isolates of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the basis of technological properties // Ann Microbiol. - 2008. – Vol. 58. – P. 67-71.
5. Quero G. M., Fusco V., Cocconcelli P. S., Owczarek L., Borcakli M., Fontana C., Skapska S., Jasinska U. T., Ozturk T., Morea M. Microbiological, physico-chemical, nutritional and sensory characterization of traditional Matsoni: Selection and use of autochthonous multiple strain cultures to extend its shelf-life // Food Microbiology – 2014. – Vol. 38, № . – P. 179-191.
6. ГОСТ 10444.11-1989. Продукты пищевые. Методы определения молочно-кислых микроорганизмов. — Введ. 1991-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 1989. — 13 с.
7. ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання — Введ. 2014-01-01. — Київ: Мінекономрозвитку України, 2014. - 31 с.
8. De Vos P. Bergey's manual of systematic bacteriology / De Vos P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K-H. Schleifer, W. D. Whitman. - Second edition. Springer: New York, 2009. – Vol. 3. – 1422 p.