



Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies

doi:10.15421/nvlvet8018

ISSN 2519–268X print
ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 579.222:637.3

Скринінг технологічних властивостей природних штамів молочнокислих бактерій

О.Й. Цісарик, І.М. Сливка, Л.Я. Мусій
tsisaryk_o@yahoo.com, slyvka.88@ukr.net, musiyluba@ukr.net

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,
вул. Пекарська, 50, Львів, 79010, Україна

У статті висвітлені результати досліджень технологічних властивостей молочнокислих бактерій (МКБ). Проведено скринінг 106 культур МКБ виділених із традиційної бринзи виготовленої у непромислових умовах із овчого молока у Карпатському регіоні України. При дослідженні технологічних властивостей МКБ враховували ферментативну і кислотоутворювальну активність штамів на 3,6,9 та 24 год. культивування, розраховували кількість молочної кислоти, визначали здатність до росту мікроорганізмів за різних температурних режимів +10 °C, +15 °C, +45 °C та стійкість культур мікроорганізмів до різних концентрацій NaCl – 2,4 і 6,5%. В результаті проведених досліджень встановлено, що ріст за температури +10 °C і +15 °C та концентрації NaCl 2 і 4% був властивий для більшості лактобактерій. Відзначено активний ріст і розвиток штамів *Enterococcus faecium* за температури +45 °C і концентрації NaCl 6,5%.

Щодо кислотоутворювальної здатності, встановлено, що найактивнішим був вид *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* з енергією кислотоутворення 80–100 °T. Найменш вираженою здатністю до утворення молочної кислоти характеризувались штами виду *Lactococcus garvieae* та *Enterococcus faecium* 60–80 °T.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, мікробіологічні показники, технологічні властивості, кислотоутворювальна активність, солестійкість, молочна кислота, ферментативна активність.

Скрининг технологических свойств природных штаммов молочнокислых бактерий

О. Цисарык, И. Сливка, Л. Мусий
tsisaryk_o@yahoo.com, slyvka.88@ukr.net, musiyluba@ukr.net

Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого,
ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

В статье представлены результаты исследований технологических свойств молочнокислых бактерий (МКБ). Проведен скрининг 106 культур МКБ выделенных из традиционной бринзы изготовленной в непроизводственных условиях с овечьего молока в Карпатском регионе Украины. При исследовании технологических свойств МКБ учитывали ферментативную и кислотопродуцирующую активность штаммов на 3,6,9 и 24 час культивирования, рассчитывали количество молочной кислоты, определяли способность к росту микроорганизмов при различных температурных режимах +10 °C, +15 °C, +45 °C и устойчивость культур микроорганизмов к различным концентрациям NaCl – 2,4 и 6,5%. В результате проведенных исследований установлено, что рост при температуре +10 °C и +15 °C и концентрации NaCl 2 и 4% был характерен для большинства лактобактерий. Отмечено активный рост и развитие штаммов *Enterococcus faecium* при температуре +45 °C и концентрации NaCl 6,5%.

Установлено, относительно способности к образованию молочной кислоты, что наиболее активным был вид *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* с энергией кислотообразования 80–100 °T. Наименее выраженной способностью к образованию молочной кислоты характеризовались штаммы вида *Lactococcus garvieae* и *Enterococcus faecium* 60–80 °T.

Citation:

Tsisaryk, O., Slyvka, I., Musiy, L. (2017). Screening of technological properties of natural strains of lactic acid bacteria. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(80), 88–92.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, микробиологические показатели, технологические свойства, кислотопродуцирующая активность, солеустойчивость, молочная кислота, ферментативная активность.

Screening of technological properties of natural strains of lactic acid bacteria

O. Tsisaryk, I. Slyvka, L. Musiy
tsisaryk_o@yahoo.com, slyvka.88@ukr.net, musiyluba@ukr.net

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine

The article presents the results of research the technological properties of lactic acid bacteria (LAB). Conducted a screening 106 cultures of lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditional cheese made in non-industrial conditions with ewe's milk in the Carpathian region of Ukraine. During the study of the technological properties of the IBC, enzymatic activity of the strains and activity to form lactic acid at 3, 6, 9 and 24 hours of cultivation were taken into account. The calculation method has determined the amount of lactic acid, which forms microorganisms. The ability of microorganisms to grow at different temperature regimes + 10 °C, +15 °C, +45 °C and the resistance of microorganisms to different concentrations of NaCl – 2.4 and 6.5% were determined. As a result of the research, it was found that for most lactobacilli the growth was characteristic at temperatures of + 10°C and +15 °C and concentration NaCl 2 and 4%. The established active growth and development of Enterococcus faecium strains at temperature +45 °C and concentration of NaCl 6.5%.

Regarding acid-forming ability, it was found that the most active was the appearance of Lactococcus lactis ssp. lactis with an energy of acid formation of 80–100 °T. The lowest ability to form lactic acid characterized strains of Lactococcus garvieae species and Enterococcus faecium 60–80 °T.

The Further, strains of LAB, which characterized the best technological properties can be used to construct a bacterial preparation for production of cheese in industrial conditions.

Key words: lactic acid bacteria, microbiological parameters, technological properties, acid forming activity, salt stability, lactic acid, enzyme activity.

Вступ

Для ефективного використання молочнокислих продуктів надзвичайно важливим є відтворення природного видового і штамового різноманіття бактерій традиційних національних кисломолочних продуктів і сирів у бактеріальних препаратах для промислового застосування. Це є передумовою не тільки контролюваного здійснення технологічних процесів і отримання продуктів з бажаними властивостями, але й збереження природних мікробіоценозів. Вони формувалися в еконішах упродовж століть природним добром і пристосовані як до кліматичних умов, так і до технологічних особливостей виробництва традиційних продуктів. Важливо, що мікрофлора таких джерел може бути наділена важливими технологічними і спеціальними функціональними властивостями, насамперед пробіотичними, вивчення яких має важливе теоретичне і прикладне значення (Kihel', 2003; Didukh and Chaharovskyy, 2006; Didukh et al., 2008; Merzlov and Snizhko, 2013; Musiy et al., 2017).

Потенційним джерелом пошуку нових штамів молочнокислих бактерій (МКБ) перспективних для використання в складі бактеріальних і пробіотичних препаратів є вітчизняні кисломолочні продукти та сир, мікрофлора яких в Україні не вивчена (Chagarovskij and Zholkevskaja, 2003). Дослідження мікрофлори традиційних національних молочних продуктів може слугувати не тільки збереженню природних біоценозів, які формувалися упродовж століть в конкретних умовах, але й створенню бактеріальних препаратів для промислового використання.

Бринза, як традиційний український продукт, є абсолютно невивченим мікробіологічним об'єктом, а в останні роки до традиційних національних продуктів

прикута особлива увага науковців. Створення «регіональних» заквасок на основі штамів, які виділяють із природних еконіш є перспективним, адже «місцеві» штами краще пристосовані до еколого-географічних умов конкретної кліматичної зони.

Важливим етапом у створенні бактеріального препарату є підбір бактеріальних культур за симбіотичними та технологічними властивостями, характерними для певного кисломолочного продукту чи сиру (Chagarovskij and Zholkevskaja, 2003; Cocolin et al., 2004).

При відборі штамів МКБ для сирів за технологічними властивостями важливо враховувати ступінь і швидкість кислотоутворення та солестійкість бактеріальних мікроорганізмів, так як це безпосередньо впливає на смак, фізичні якості, швидкість отримання готового продукту та його зберігання (Vasylyuk et al., 2014).

Завданням нашої роботи було проаналізувати технологічні властивості домінуючих видів МКБ, виділених із традиційної карпатської бринзи, ідентифікованих за молекулярно-генетичними ознаками, та в подальшому сконструювати на їх основі бактеріальний препарат для виробництва бринзи у промислових умовах.

Матеріал і методи досліджень

У наукових дослідженнях використано культури МКБ виділені із бринзи, що виготовляється із овчого молока у непромислових умовах Карпатського регіону України.

Культури бактерій ідентифіковано із використанням класичних мікробіологічних і сучасних молеку-

лярно-генетичних методів (RAPD-PCR, RFLP-PCR, секвенування гену 16S рРНК).

За основні критерії оцінки придатності культур МКБ як складових майбутнього бактеріального препарату було взято необхідні технологічні параметри, які включали здатність ферментувати молоко, кислотоутворювальну активність, стійкість до високих концентрацій NaCl та температурні оптимуми культивування штамів бактерій.

Ферментативну активність культур оцінювали, використовуючи стерильне знежирене молоко. В пробірки, що містили молоко, вносили рівну кількість рідкої культури бактерій і відзначали час, протягом якого культура сквашувала молоко.

Кислотоутворювальну активність оцінювали за зниженням рН молока, сквашеного відповідним бактеріальним штамом. Бактерії інкубували в стерильному знежиреному молоці без внесення додаткових компонентів у термостаті при оптимальній для кожного штаму температурі інкубації протягом 3, 6, 9, 24 год. Вимірювання рН проводили за допомогою електронного рН-метра «Muttler Toledo MP220». Титровану кислотність молока визначали за ГОСТ 3624-92 «Молоко і молочні продукти. Титриметричні методи визначення кислотності».

Розрахунковим методом визначено кількість молочної кислоти в залежності від титрованої кислотності, виходячи з того, що 1 °Т відповідає 0,009% молочної кислоти. Опираючись на значення титрованої кислотності молока, розраховано приблизну кількість молочної кислоти, яка утворюється в процесі ферментації. Розрахунок кількості молочної кислоти проведено для штамів МКБ, які були активними килоутворювачами. Розрахунки проведено на 3, 6, 9 і 24 години ферментації знежиреного молока досліджуваними МКБ.

Ріст МКБ за різних температур. 0,5 мл інокульованого бактеріями бульйону MRS вносили в пробірки із 5 мл спеціально приготовленого бульйону для визначення здатності бактерій рости за різних температур. Після інокуляції культуральної рідини, пробірки інкубували протягом 7 днів за різних температурних режимів +10 °С, +15 °С +45 °С. Ріст клітин за кожною з цих температур визначався за зміною забарвлення бульйону – від фіолетового до жовтого.

Ріст за різних концентрацій NaCl. 0,5 мл інокульованого бактеріями бульйону MRS вносили в про-

бірки із 5 мл спеціально приготовленого бульйону. Ріст бактерій визначали за концентрацій NaCl 2%, 4% і 6,5%. Інкубування здійснювали за температури +30 °С протягом 7 днів. Зміна забарвлення бульйону в пробірці від фіолетового до жовтого вказувала на здатність бактерій розвиватись при певних концентраціях NaCl.

Культивування мікроорганізмів проводили протягом 24 год на спеціальних живильних середовищах (MRS та M17) Культивували кожную культуру окремо протягом 24 год за температури 30 °С. Після закінчення процесу вирощування культуральну рідину нейтралізували до рН (6,5–6,6) та відокремлювали біомасу шляхом центрифугування на суперцентрифугі при 15000 об/хв фірми *Thermo Scientific*, після чого змішували із захисним середовищем.

Результати та їх обговорення

Проведено скринінг 106 культур МКБ, виділених із традиційної бринзи, що виготовлена у непромислових умовах із овечого молока у Карпатському регіоні України. Досліджувані культури МКБ відносилися до таких видів: рід *Lactococcus* (26 культур), з них вид *Lactococcus Lactococcus lactis ssp. lactis* (13 культур) та вид *Lactococcus garvieae* (13 культур), рід *Lactobacillus* вид *Lactobacillus plantarum* (31 культура), рід *Enterococcus* вид *Enterococcus faecium* (25 культур), рід *Leuconostoc* вид *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* (24 культури).

Аналіз основних фізіолого-біохімічних властивостей 106 досліджуваних штамів МКБ виявив їх гетерогенність.

Встановлено, що близько 90 і 93% штамів *Lactobacillus plantarum* росли за температури +10 °С та +15 °С, тоді як за температури +45 °С ріст не відзначався. Аналогічний ріст спостерігали у *Lactococcus lactis ssp. lactis* – 83 і 87% за температури +10 °С і +15 °С відповідно; у *Lactococcus garvieae* – 81 і 89% та у *Leuconostoc mesenteroides* 85 і 92%. Слід зазначити, що найактивніше проявлявся ріст штамів *Enterococcus faecium*, відзначено ріст 87 і 90% за температури +10 °С і +15 °С, а також 90% проявляли ріст за температури 45 °С. Результати дослідження наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння ростових характеристик досліджуваних штамів в залежності від температури та концентрації NaCl

Вид МКБ	Ріст за температури			Ріст за концентрації NaCl		
	+10 °С	+15 °С	+45 °С	2 %	4 %	6,5 %
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n = 31)	90%	93%	-	98%	87%	59%
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> (n = 13)	83%	87%	-	95%	83%	-
<i>Lactococcus garvieae</i> (n = 13)	81%	89%	-	96%	84%	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n = 25)	87%	90%	98%	100%	98%	93%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n = 24)	85%	92%	-	97%	89%	43%

Досліджувані штами по різному проявляли ріст за концентрації NaCl від 2 до 6,5% у середовищі. Відзначено, що 2 і 4% NaCl здебільшого не впливали на життєдіяльність досліджуваних лактобактерій.

При дослідженні технологічних властивостей важливо враховувати ступінь і швидкість кислотоутворення бактеріальних мікроорганізмів, так як це безпосередньо впливає на смак продукту, його фізичні

якості, швидкість отримання готового продукту, його збереження і взаємодію з іншими компонентами бактеріального препарату (Fortina et al., 2007).

Активна кислотність кисломолочного продукту (pH), особливо сиру прямо пов'язана з вмістом у ньому і формою кальцію. Повільніше утворення кислоти знижує швидкість переходу однієї форми кальцію, що знаходиться в комплексі з двома іонами кальцію, в іншу форму, що утворює комплекс з одним іоном кальцію (*dicalcium para-casein в monocalcium para-casein*), що призводить до зниження тягучості кінцевого продукту. Якщо pH молочного згустку продовжує падати до значень 5,1–5,3, то втрачається більше кальцію, згусток стає менш щільним

(Siegumfeldt et al., 2000). Активна кислотність (pH) для свіжого молока становить 6,47–6,67. Така кислотність сприятлива для стійкості колоїдної системи молока і розвитку молочної мікрофлори. Кислотоутворювальна здатність слугує критерієм відбору штамів для використання у виробництві ферментованих молочних продуктів та сирів.

Кислотоутворювальну активність штамів щодо зброджування молока вимірювали кількісно. Результати динаміки змін титрованої і активної кислотності молока (°T і pH) при культивуванні в ньому культур МКБ та результати кількості молочної кислоти представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Кислотність та швидкість утворення згустку в молоці досліджуваними штамми МКБ

Вид МКБ	Швидкість утворення згустку, год	К-сть штамів, %	Титрована кислотність, °T	Активна кислотність, pH	К-сть штамів, %	% молочної кислоти
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n = 31)	3 ± 1	5	≤ 60–80	5,5	4	≤ 54–72
	6 ± 1	30	≤ 80–90	5,3	36	≤ 72–81
	9 ± 1	42	≤ 90–100	5,0	41	≤ 81–89
	>24	23	≤ 100–120	4,8	19	≤ 90–99
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> (n = 13)	3 ± 1	14	≤ 60–80	5,5	9	≤ 54–72
	6 ± 1	29	≤ 80–90	5,3	31	≤ 72–81
	9 ± 1	55	≤ 90–100	5,0	49	≤ 81–89
	> 24	2	≤ 100–120	4,8	19	≤ 90–99
<i>Lactococcus garvieae</i> (n = 13)	3 ± 1	–	≤ 60–80	5,5	35	≤ 54–72
	6 ± 1	3	≤ 80–90	5,3	39	≤ 72–81
	9 ± 1	21	≤ 90–100	5,0	20	≤ 81–89
	>24	76	≤ 100–120	4,8	6	≤ 90–99
<i>Enterococcus faecium</i> (n = 25)	3 ± 1	–	≤ 60–80	5,5	39	≤ 54–72
	6 ± 1	19	≤ 80–90	5,3	35	≤ 72–81
	9 ± 1	27	≤ 90–100	5,0	19	≤ 81–89
	>24	54	≤ 100–120	4,8	7	≤ 90–99
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n = 24)	3 ± 1	–	≤ 60–80	5,5	49	≤ 54–72
	6 ± 1	12	≤ 80–90	5,3	27	≤ 72–81
	9 ± 1	40	≤ 90–100	5,0	14	≤ 81–89
	> 24	48	≤ 100–120	4,8	10	≤ 90–99

Досліджувані штами МКБ сквашували молоко протягом 12–48 годин, титрована кислотність згустку коливалася в діапазоні від 60 °T до 120 °T. Більшість штамів виду *Lactococcus lactis ssp. lactis* сквашували молоко за 3–9 годин, тоді як *Lactococcus garvieae* та *Enterococcus faecium* – понад 24 години.

Висновки

Температура культивування та концентрація NaCl у середовищі по різному впливали на ріст штамів МКБ. Встановлено, що ріст за температури +10 °C і +15 °C та концентрації NaCl 2 і 4% був властивий для більшості лактобактерій. Відзначено активний ріст і розвиток штамів *Enterococcus faecium* за температури +45 °C і концентрації NaCl 6,5%.

Щодо кислотоутворювальної здатності, встановлено, що найактивнішим був вид *Lactococcus lactis ssp. lactis* з енергією кислотоутворення 80–100°T. Найменш вираженою здатність до утворення молочної кислоти характеризувались штами виду *Lactococcus garvieae* та *Enterococcus faecium* 60–80 °T.

В подальшому, штами МКБ, які характеризувались найкращими технологічними властивостями, можуть бути використані для конструювання бактеріального препарату для виробництва бринзи у промислових умовах.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть скеровані на вивчення антибіотикорезистентності штамів МКБ та їх патогенності.

Публікація містить результати досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом (Ф-70/122-2017) Державного фонду фундаментальних досліджень.

Бібліографічні посилання

- Didukh, N.A. Chaharovs'kyi, O.P., Lysohor, T.A. (2008). Zakvashuvani kompozitsiyi dlya vyrobnytstva molochnykh produktiv funktsional'noho pryznachennya.. Odesa: Polihraf (in Ukrainian).
- Didukh, N.A., Chaharovs'kyi, O.P. (2006). Nanotehnolohiyi produktiv funktsional'noho pryznachennya na molochniy osnovi. Materialy I Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii

- «Nauka i tehnologii: shag v budushhe». Sel'skoe hazjajstvo. Belgorod: Rusnauchkniga. 1, 33–36 (in Ukrainian).
- Kihel', N.F. (2003). Tekhnolohiyi bakterial'nykh preparativ dlya funktsional'nykh produktiv i biolohichno aktyvnykh dobavok. Avtoreferat dysertatsiyi na zdobuttya naukovooho stupenya doktora tekhnichnykh nauk, Kyiv (in Ukrainian).
- Merzlov, S.V., Snizhko, O.O. (2013). Pidbir optimal'noyi zakvasky za biotekhnolohiyi novoho kyslomolochnoho napoyu – yohurtu. Naukovyy visnyk Bilotserkivs'koho natsional'noho universytetu. 10(105), 76–80 (in Ukrainian).
- Musiy, L., Tsisaryk, O., Slyvka, I., Mykhaylytska, O., Gutyj, B. (2017). Research into probiotic properties of cultured butter during storing. Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 3, 11(87), 31–36.
- Musiy, L., Tsisaryk, O., Slyvka, I., Mykhaylytska, O., Gutyj, B. (2017). Study of keeping probiotic properties of sour-cream butter at storage. EUREKA: Life Sciences. 2, 27–33.
- Chagarovskij, V.P., Zholkevskaja, I.G. (2003). Biotehnologija poluchenija biojogurtov i biokefira, izuchenie ih vlijanija na zdorov'e cheloveka. Mikrobiologichnij zhurnal. 65(6), 67–73 (in Russian).
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C., Soti, G. (2004). Study of ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. Appl. Environ. Microbiol. 70(3), 1883–1894.
- Vasylyuk, O.M., Kovalenko, N.K., Harmasheva, I.L., Oleshchenko, L.T. (2014). Vydilennya ta identyfikatsiya bakteriy rodu Lactobacillus z fermentovanykh produktiv riznykh rehioniv Ukrayiny. Mikrobiolohichnyy zhurnal. 76(2), 2–9 (in Ukrainian).
- Fortina, M.G., Ricci, G., Foschino, R., Pacozzi, C. (2007). Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of Lactococcus garvieae strains from dairy environments. J. of Applied Microbiology. 103, 445–453.
- Siegmundfeldt, H., Recliinger, K.B., Jakobsen, M. (2000). Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Appl. Environ. Microbiol. 66(6), 2330–2335.

Received 20.09.2017

Received in revised form 23.10.2017

Accepted 27.10.2017