

УДК 577.216.4:579.86 *Объектом исследований являлись мезофильные лактококки как обязательная микрофлора для производства творога и сметаны. Цель работы заключалась в получении фагоустойчивых ароматообразующих фузантов и подборе их в состав заквасок для творога и сметаны.*

Было составлено и исследовано 10 вариантов комбинаций бактериальных заквасок, состоящих из двух фагорезистентных ароматообразующих штаммов лактококков, полученных в ходе слияния протопластов. В результате были отобраны по одной комбинации бактериальных заквасок для творога и сметаны.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ЗАКВАСОЧНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОКОККОВ С УЛУЧШЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ

Т. В. Чаевская, Н. А. Белясова

УО «Белорусский государственный технологический университет»

Л. Л. Богданова, Н. В. Дудко,

Л. В. Сафроненко (кандидат технических наук)

РУП «Институт мясо-молочной промышленности»

Молочнокислые бактерии представляют собой одну из наиболее распространенных в природе групп микроорганизмов. В виде чистых культур эти бактерии широко используются не только при производстве кисломолочных продуктов, но и при хлебопечении, в виноделии, консервной промышленности, при силосовании кормов, ферментировании мясных продуктов. Важное промышленное значение этих микроорганизмов инициировало широкий спектр исследований по их генетике, биохимии и биофизике. Особый интерес к изучению молочнокислых бактерий появился после обнаружения у них плазмид, ответственных за важные технологические свойства культур: метаболизм лактозы, ферментацию цитрата, протеолитическую активность, секрецию низина и другие.

В последнее время бактерии рода *Lactococcus* наряду с другими микроорганизмами естественной микрофлоры человека представляют большой интерес как одна из составляющих пробиотических продуктов, оказывающих диетическое и лечебно-профилактическое действие.

В современном производстве биологически полноценных и экологически безопасных кисломолочных продуктов питания используются закваски, состоящие, как правило, из нескольких штаммов молочнокислых бактерий. Однако такие бактериальные закваски, приготовленные с использованием чистых культур лактококков, обладая комплексом ценных биологических свойств, имеют ряд недостатков. Бактерии рода *Lactococcus* в связи с высокой требовательностью к источникам питания, часто подвергаются неблагоприятному влиянию сезонных изменений молока. Кроме того, многие штаммы образуют нежелательный посторонний привкус и большинство из них чувствительны к фаголизису, что затрудняет создание заквасок, стабильно работающих на производстве длительный период времени. Известно также, что при длительном культивировании лактококков в молоке их популяция становится гетерогенной: появляются клоны с пониженной кислотообразующей активностью. При этом в культуре могут возникнуть негативные по протеиназной активности варианты, что отрицательно сказывается на органолептических показателях готового продукта. В связи с вышеперечисленными проблемами, необходима постоянная ротация заквасочных штаммов на молокоперерабатывающих предприятиях. С этой целью отделом микробиологии РУП «Институт мясо-молочной промышленности» ведется непрерывная работа по обновлению и расширению коллекции молочнокислых бактерий.

Для получения высококачественных продуктов необходимо использовать штаммы, характеризующиеся высокой продуктивностью, с определенными, наиболее ценными свойствами.

В свою очередь совершенствование отдельных признаков исследуемых бактерий становится доступным при наличии систем генетического обмена между ними.

На современном этапе развития биотехнологии при создании новых штаммов микроорганизмов наиболее распространенными и перспективными являются методы генной инженерии. При этом один из основных инструментов для конструирования новых геномов — векторные молекулы — получают, обычно используя системы бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* как наиболее изученные и имеющие широкий круг хозяев. Применение генно-инженерных штаммов в промышленной микробиологии не вызывает проблем, так как после выделения целевого продукта (фермента, антибиотика, экзополисахарида и др.) культура-продукцент, как правило, уничтожается. Однако использование генетически модифицированных микроорганизмов в пищевой промышленности вызывает опасение в их бионадежности при попадании в макроорганизм и окружающую среду. Согласно международным требованиям GRAS, все генетические элементы, применяемые для создания рекомбинантных штаммов лактококков, должны быть получены исключительно из клеток бактерий, относящихся к видам, традиционно используемым при производстве ферментированных молочных продуктов. Такие условия существенно ограничивают применение методов генной инженерии для создания новых штаммов бактерий рода *Lactococcus*, включаемых в состав заквасок для кисломолочных продуктов.

Перенос генетической информации у бактерий может осуществляться посредством четырех механизмов: конъюгацией, трансдукцией, трансформацией, слиянием протопластов. Последний из указанных способов имеет самостоятельное значение, поскольку позволяет объединять не только геномы, но и цитоплазмы клеток, принадлежащих не только к одному, но и к разным видам, родам и семействам микроорганизмов.

В процессе слияния могут участвовать сразу несколько клеток, и формирующееся рекомбинантное потомство часто наследует признаки более чем двух родительских клеток. Эта особенность может оказаться весьма полезной при конструировании штаммов молочнокислых бактерий, используемых в качестве полифункциональных заквасок. В данном случае появляется возможность ограничить количество видов микроорганизмов в закваске с сохранением свойств и лучших качеств продукта, что в свою очередь должно упростить процедуры производства заквасок, производства кисломолочных продуктов, а, следовательно, и стоимость соответствующих технологий.

Среди разных способов отбора производственно-ценных микроорганизмов (выделение штаммов дикого типа из окружающей среды, автоселекция в производственных условиях, генетический обмен) генетическая селекция отличается рядом преимуществ. Во-первых, появляется возможность комбинировать признаки родительских бактерий в клетках одного штамма, во-вторых, этот процесс более направленный и требует меньших временных затрат, в-третьих, можно получить варианты, не присутствующие в окружающей среде.

Конструирование штаммов молочнокислых бактерий проводится рядом зарубежных лабораторий. Однако в связи с различными подходами к подбору заквасок и к характеристикам конечного продукта в отдельных странах, разнообразием технологических процессов, наличием проблемы фаголизиса создание универсальных бакзаквасок не представляется возможным. Поэтому существует необходимость в конструировании усовершенствованных штаммов в каждом конкретном регионе.

Целью данного исследования являлось создание улучшенных штаммов лактококков методом слияния протопластов для дальнейшего использования в составе заквасок и концентратов при производстве творога и сметаны.

В работе использовали бактерии заквасочных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetilactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, а также лактофаги из коллекции отдела микробиологии РУП «Институт мясо-молочной промышленности». Бактерии инкубировали в среде Tetr [1]. Получение протопластов, их слияние и реверсию в исходные клеточные формы осуществляли по разработанным ранее методикам [2, 3].

На молокоперерабатывающих предприятиях при производстве кисломолочных продуктов широко распространено такое явление как фаголизис, которое создает немалые проблемы

специалистам и сказывается на качестве продукции, а также на ее себестоимости [4]. Явление фаголизиса состоит в массовом выходе зрелых фаговых частиц из клеток микроорганизмов, который сопровождается инфицированием соседних клеток бактерий и их лизисом.

Чтобы снизить риск развития фаговой инфекции, на предприятиях постоянно осуществляют ротацию штаммов, формирующих закваски. Для этого необходимо иметь большую коллекцию промышленных микроорганизмов. С этой целью в отделе микробиологии РУП «Институт мясо-молочной промышленности» постоянно ведется работа по выделению из окружающей среды новых штаммов молочнокислых бактерий. В то же время существует возможность получения устойчивых к бактериофагам штаммов лактококков методами генетического обмена.

Анализ культур мезофильных лактококков показал, что из 43 штаммов с удовлетворительными производственными характеристиками 24 оказались чувствительными к широкому спектру коллекционных бактериофагов, что исключает возможность их использования в составе заквасок. Кроме того, выявлено, что наиболее подвержены поражению фагами культуры *L. diacetylactis*, которые участвуют в создании вкуса и аромата конечного продукта. Поэтому дальнейшая работа была направлена на получение фагоустойчивых ароматобразующих штаммов.

Среди имеющихся культур лактококков следовало выявить штаммы, различающиеся признаками, которые можно использовать для селекции фузантов. Проще всего осуществлять селекцию по устойчивости к антибиотикам, поэтому в первой серии экспериментов характеризовали потенциальные родительские бактерии по устойчивости к антибиотикам, что позволило определить препараты, к которым партнеры имеют перекрестную устойчивость. Лактококки проверяли на резистентность к следующим антибиотикам: тетрациклин (2,5; 5 мкг/мл), рифампицин (12,5; 25; 37,5; 50 мкг/мл), пенициллин (0,5; 1; 1,5; 2,5 мкг/мл), стрептомицин (100; 200 мкг/мл), эритромицин (2; 5 мкг/мл). Основные производственно-ценные свойства выделенных антибиотикорезистентных клонов были проверены сразу при пересеве с селективной среды в молоко после трех пассажей.

Большая часть клонов обладала удовлетворительными производственно-ценными свойствами, которые сохранялись практически без изменений в процессе трех пассажей. Для получения новых штаммов молочнокислых бактерий методом слияния протопластов было отобрано несколько родительских пар лактококков. В каждую пару включался штамм *L. diacetylactis*, отличающийся чувствительностью к большинству коллекционных фагов, но имеющий оптимальные показатели по остальным свойствам, и штамм *L. lactis*, устойчивый к фагам. Кроме того, штаммы каждой пары отличались между собой чувствительностью хотя бы к одному антибиотику. Показатели процессов слияния представлены в табл. 1.

Для выявления фагорезистентных форм производили смыв фузантов с селективной гипертонической среды и обработку полученных суспензий бактериофагами, к которым чувствительны *L. diacetylactis*. Затем осуществляли высевы бактерий на полноценную среду для получения изолированных колоний, клетки которых тестировали на способность сквашивать молоко и устойчивость к используемым бактериофагам.

В результате было выявлено 122 клон молочнокислых бактерий, обладающих указанными признаками, для которых определяли производственно-ценные свойства (время сквашивания молока, активность ароматобразования, органолептические свойства сгустка) непосредственно после пересева с плотной среды в молоко и сохранение этих свойств в результате пассажей.

Среди полученных в результате слияния протопластов клонов 95 обладали удовлетворительными производственно-ценными свойствами (время сквашивания — не более 6,5 часов, общий балл органолептической экспертизы — не ниже 4,5, способность к газо- и ароматобразованию) и сохраняли их при пересевах. Такие клоны были проверены на устойчивость к типовым бактериофагам (40 штаммов). 57% исследованных клонов оказались устойчивыми к большинству фагов.

Для дальнейшей работы по составлению заквасок из ряда полученных клонов были отобраны те, которые имели хорошие органолептические и технологические свойства и обладали характерными признаками обоих родительских штаммов: давали плотный, ровный сгусток и были устойчивы к коллекционным бактериофагам (унаследованные от штаммов *L. lactis*), и способность к образованию ароматических веществ (полученную от штаммов *L. diacetylactis*).

Параметры процессов слияния протопластов

| Партнерские штаммы | Факторы отбора фузантов | Эффективность слияния протопластов, % | Эффективность реверсии протопластов к клеточным формам, % | Частота формирования фузантов по отношению к <i>L. lactis</i> | Кол-во полученных фузантов |
|--|------------------------------|---------------------------------------|---|---|----------------------------|
| <i>L. lactis</i> L 141/2-T <i>L. diacetylactis</i> 105/7-S4 | тетрациклин, стрептомицин | 98,6 98,3 | 8,6 8,7 | $0,3 \cdot 10^{-4}$ | 35 |
| <i>L. lactis</i> 591/10-P1 <i>L. diacetylactis</i> 628/9-T | пенициллин, тетрациклин | 98,6 97,3 | 17,8 10,0 | $0,2 \cdot 10^{-4}$ | 34 |
| <i>L. lactis</i> 561/4-P2 <i>L. diacetylactis</i> 621/12-T3 | пенициллин, тетрациклин | 99,1 96,8 | 13,6 14,4 | $0,4 \cdot 10^{-4}$ | 31 |
| <i>L. lactis</i> 590/10-S <i>L. diacetylactis</i> 621/12-T3 | стрептомицин тетрациклин | 99,2 97,0 | 8,6 16,2 | $0,3 \cdot 10^{-4}$ | 22 |

Совмещение при слиянии протопластов геномов, а, следовательно, и признаков двух и более клеток в одной позволяет уменьшить количество штаммов и видов микроорганизмов в закваске и при этом сохранить качество конечного продукта. Поэтому при составлении бакзаквасок на основе рекомбинантных штаммов их количество было решено ограничить двумя, взятыми от разных родителей.

Составление комбинаций культур в состав поливидовых бактериальных заквасок и бактериальных концентратов проводят в три этапа:

- составление кислотообразующей основы;
- подбор газо- и ароматообразующих культур;
- составление и испытание полной комбинации культур.

Вкус готового продукта определяют не только ароматические вещества, но и количество продуцируемой лактобактериями молочной кислоты. Поэтому для отобранных клонов определяли предельное кислотообразование, которое должно составлять не более 140°T . Как правило, для составления основы используют штаммы с близкими показателями активности по данному признаку. В результате развитие микроорганизмов в составе закваски происходит синхронно, а нарастание кислотности – равномерно. При составлении комбинаций старались придерживаться этих принципов. Кроме того, все отобранные фузанты лактококков были исследованы на взаимный антагонизм друг к другу. Среди отобранных штаммов антагонисты не были выявлены, что позволило варьировать состав комбинаций.

В результате было составлено 10 вариантов бактериальных заквасок, включающих по два ароматообразующих рекомбинантных штамма. Для каждого определяли время сквашивания и органолептические показатели, особое внимание уделялось газо- и ароматообразованию. Отбраковывались те комбинации, для которых данные показатели ухудшались по сравнению с показателями штаммов, взятых по отдельности.

В результате проведенных исследований было отобрано по одной комбинации бактериальных заквасок для творога и сметаны на основе сконструированных штаммов. В состав закваски для сметаны вошли фузанты от родительских пар L 141/2-T Ч 105/7-S4 и 590/10-S Ч 621/12-T3; для творога – 591/10-P1 Ч 628/9-T и 561/4-P2 Ч 621/12-T3.

На заключительном этапе исследований был проведен подбор количественного соотношения штаммов в заквасках. Отбор проводился на основании органолептических показателей получаемого сгустка и активности ароматообразования в комбинации. Для каждой закваски использовались пять вариантов соотношения штаммов – 1:1, 1:2, 2:1, 3:2, 2:3 (*L. lactis*: *L. diacetylactis*). Выбранные соотношения штаммов в составе заквасок: бакзакваска для сметаны – (3:2); бакзакваска для творога – (2:1), где в соотношении указана доза вносимой в пробирку культуры. Производственно-ценные свойства заквасок приведены в табл. 2.

Характеристика бактериальных заквасок

| Вид закваски | Время сквашивания, ч. | Микроскопический препарат | Органолептические показатели | | Газообразование, мм | Ароматобразование, мин |
|--------------|-----------------------|--|------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|
| | | | консистенция | вкус | | |
| для сметаны | 5,5 | кокки, диплококки, короткие цепочки кокков | плотная, ровная | чистый, кисломолочный | 10 | 5 |
| для творога | 5,5 | кокки, диплококки, короткие цепочки кокков | плотная, ровная, колющаяся | чистый, кисломолочный | 10 | 7 |

Опытные партии бактериальных концентратов мезофильных лактококков были переданы для производственной проверки при выработке творога и сметаны. Производство сметаны 25%-ной жирности и творога 10%-ной жирности осуществляли путем непосредственного внесения бактериального концентрата в подготовленное сырье. Процесс проводили в соответствии с действующей технологической инструкцией на данный продукт. Физико-химические и микробиологические показатели выработанной продукции соответствовали требованиям действующей нормативной документации.

Образцы сыворотки и готовой продукции были исследованы на наличие в них бактериофага, затем штаммы, входящие в состав бакконцентратов, были проверены на устойчивость к выделенным бактериофагам. Индекс фагоустойчивости составил 100%, что свидетельствует о сохранении стабильности свойств полученных штаммов при производстве кисломолочных продуктов.

Таким образом, использование метода слияния протопластов позволяет получать заквасочные штаммы лактококков с улучшенными свойствами. Работа по созданию таких микроорганизмов должна вестись непрерывно, так как на производстве требуется постоянная ротация штаммов в составе заквасок. Наличие фагорезистентных микроорганизмов не устраняет полностью проблему фаголизиса, а длительное культивирование в молоке приводит к появлению в культуре лактококков слабых кислотообразователей. Кроме того, при создании рекомбинантных штаммов в качестве исходного материала выступают идентифицированные и охарактеризованные микроорганизмы, тогда как при выделении лактококков из окружающей среды требуются значительные затраты материальных средств и времени для получения чистых культур бактерий, определения их видовой принадлежности и производственно-ценных свойств.

Литература

1. Беясова, Н. А. Получение маркированных штаммов лактококков, пригодных для генетического обмена / Н. А. Беясова [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* — 2001. — №4. — С. 57–61.
2. Беясова, Н. А. Получение и реверсия протопластов у некоторых штаммов бактерий рода *Lactococcus* / Н. А. Беясова [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* — 2002. — №1. — С. 68–72.
3. Беясова, Н. А. Разработка метода слияния протопластов и селекция гибридных бактерий у лактококков / Н. А. Беясова [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* — 2002. — №2. — С. 84–87.
4. Банникова, Л. А. Микробиологические основы молочного производства / Л. А. Банникова, Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина. — М.: Агропромиздат, 1987. — 400 с.

Проведены исследования по оптимизации условий получения биомассы лактобацилл *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*. Показано, что введение в питательную среду 20–30 % молочной сыворотки, 5 % грожжевого автолизата и 10 % солодового экстракта стимулировало рост культур. Для активного роста лактобацилл концентрация лактозы в среде не должна превышать 5 %, более высокое содержание лактозы снижало скорость их роста. Целесообразно внесение молочного сахара в среду дробно: 1–2 % лактозы в начале культивирования и 1–2 % в конце логарифмической или в начале стационарной стадии роста культуры. Оптимизирована питательная среда для наращивания биомассы лактобацилл. Разработана технология производства сухих моновидовых бактериальных концентратов лактобацилл *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*.

МОНОВИДОВЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КОНЦЕНТРАТЫ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* И *LACTOBACILLUS CASEI*

**Л. А. Богданова, Н. Н. Фурик (кандидат технических наук),
Л. В. Сафроненко (кандидат технических наук), Н. В. Дудко**
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»

Для получения качественных кисломолочных продуктов используются *бактериальные закваски и бактериальные концентраты (БК)*, видовой состав микрофлоры которых играет решающую роль в формировании вкусовых качеств различных кисломолочных продуктов [4]. БК молочнокислых бактерий являются обязательным элементом современной технологии производства ферментированных молочных продуктов. Моновидовые БК мезофильных лактобацилл позволяют улучшить качество и свойства вырабатываемой продукции по микробиологическим показателям и придать пищевым продуктам функциональные свойства. Большой интерес представляет использование гомоферментативных мезофильных лактобацилл (*Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*) для регулирования микробиологических процессов при выработке и созревании сыров. Мезофильные лактобациллы сбрасывают лактозу молочной основы, оставшуюся после размножения лактококков, чем лишают технически вредную микрофлору энергетических источников [8, 2, 5]. Кроме того, многие штаммы *Lbc. plantarum* обладают специфической антагонистической активностью по отношению к маслянокислым бактериям и энтеробактериям. Это позволяет использовать лактобациллы для получения сыров высокого качества весной и осенью, когда молоко наиболее загрязнено спорами маслянокислых бактерий.

Цель исследований — разработка отечественных технологий изготовления моновидовых БК мезофильных лактобацилл с целью их дальнейшего использования для создания ферментированных молочных продуктов функциональной направленности и сыров.

Исследования проводились в отделе микробиологии РУП «Институт мясо-молочной промышленности». Все штаммы поддерживаются в Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий и используются при изготовлении ферментированных молочных продуктов. Первичный отбор культур проводился на основании следующих показателей: микроскопический препарат, органолептическая оценка, время образования сгустка, антибиотикоустойчивость, устойчивость к фенолу, желчи, поваренной соли, антагонистическая активность по отношению к маслянокислым бактериям и кишечной палочке.

Подсырную или творожную (после предварительного раскисления) сыворотку осветляли путем тепловой обработки при $+95 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30–40 минут, затем фильтровали на ультрафильтрационной установке, оснащенной поливолоконными мембранами «Мифил».

Оптическая плотность бактериальной суспензии на разных этапах процесса определялась на спектрофотометре СФ-46 (кювета толщиной 1 мм) при длине волны 460 нм.

Замораживание проводили при температуре $(-40 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 3–4 ч.