

А. Е. Кротович, аспирант; Н. А. Белясова, доцент;
А. А. Масилевич, студентка; Н. В. Гриц, доцент

СТАБИЛЬНОСТЬ НАСЛЕДОВАНИЯ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ ПРИ ХРАНЕНИИ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Bacteria of *Lactococcus* have been stored in different conditions. 12 months later it revealed that the optimum ways of storage are freezing in milk with cryoprotector or in a solution of 40% glycerine.

Сквашивание молока микроорганизмами использовалось тысячи лет назад как естественный процесс. Однако до начала 20-го столетия он не был управляем, и его усовершенствование осуществлялось эмпирически, путем проб и ошибок. Открытие и характеристика молочнокислых бактерий существенно изменили технологию получения кисломолочных продуктов. Накопление знаний о физиологии, биохимии, генетике этих микроорганизмов дало возможность отбирать лучшие штаммы, что позволило увеличить спектр выпускаемых продуктов, а также повлияло на их качество и безопасность производства.

Поиск новых штаммов молочнокислых бактерий осуществляют в природных экологических нишах, но штаммы дикого типа часто не удовлетворяют всем тем требованиям, которые необходимы для производства, и поэтому все чаще при изготовлении традиционных продуктов питания используют бактерии родов *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*, полученные методами генетической инженерии [1]. Однако более широкому применению молочнокислых бактерий в качестве объектов для генетической модификации препятствует слабая по сравнению с другими классическими продуцентами (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*) генетическая изученность и отсутствие удобных векторов для клонирования. Следует отметить, что при создании заквасочных бактериальных штаммов необходимо использовать генетические инструменты, которые удовлетворяют «food-grade» критерию, на котором основана система GRAS (generally recognized as safe) [2]. Этот критерий подразумевает, что получение генетически модифицированных штаммов, которые планируется применять в пищевой и фармацевтической промышленности, должно осуществляться исключительно с использованием генетического материала бактерий — традиционных объектов ферментативных производств, а также с использованием только тех маркеров и репликонов, которые ни прямым, ни косвенным путем не смогут нанести вред организму человека.

В качестве селективных маркеров, которые соответствует «food-grade» критерию, допустимо использовать устойчивость к ионам металлов, сбраживание углеводов, синтез экзополисахаридов и некоторые другие [3, 4].

Объектами исследования служили наиболее перспективные с точки зрения производства ферментированных молочных продуктов бактерии *Lactococcus lactis*, выделенные в разное время из природных источников. Характеристика промышленно важных свойств этих штаммов представлена в табл. 1.

Таблица 1
Производственные характеристики
выделенных из окружающей среды
бактерий *L. lactis*

Штамм	Время сквашивания молока, ч	Кислотность, °Т
400/1	7	100
401	6	108
402	6	100
404/2	7	104
405/1	6	104
406/2	7	100
407/1	7	98
408/1	6	100
411	6	101
415	7	108

* Время сквашивания определялось с момента внесения 10% закваски в молоко.

Целью исследования являлось определение селективных признаков, удовлетворяющих «food-grade» критерию, и характеристика стабильности наследования их детерминант при хранении в различных условиях.

Как видно из табл. 1, все исследуемые бактерии сквашивают молоко за короткий промежуток времени, что является важным показателем в производстве, поскольку позволяет интенсифицировать процесс формирования молочного сгустка и уменьшает риск развития посторонней микрофлоры. Большинство из перечисленных бактерий обеспечивают достаточный высокий показатель титруемой кислотности сквашенного молока. Таким образом, можно констатировать, что отобранные штаммы пригодны для использования в составе заквасок при производстве кисломолочных продуктов.

В табл. 2 представлены результаты определения устойчивости исследуемых бактерий к

ионам металлов – признака, годного для селекции рекомбинантных штаммов и удовлетворяющего требованиям системы GRAS.

Таблица 2
Отношение бактерий *L. lactis* к ионам металлов в различных концентрациях

Штамм	Отношение к ионам металлов, мМ				
	Cr ⁺⁶ (3)	Co ⁺² (4)	Pb ⁺² (10)	Cd ⁺² (1)	Cu ⁺² (3)
400/1	s	r	r	s	s
401	s	r	r	s	s
402	s	s	r	s	s
404/2	s	s	r	s	s
405/1	s	s	r	s	s
406/2	r	s	r	s	s
407/1	r	r	r	s	s
408/1	r	r	r	s	s
411	r	s	r	s	s
415	r	r	r	s	s

Примечание. r – проявили устойчивость к ионам металла в исследуемой концентрации; s – чувствительны в ионам металла в исследуемой концентрации.

Представленные в табл. 2 данные позволяют судить о широком распространении среди молочнокислых бактерий устойчивости к ионам свинца, кобальта и хрома. Несколько штаммов (407/1, 408/1, 415) проявляют множественную резистентность к различным ионам металлов, в то же время в отобранной группе есть бактерии, чувствительные к большинству исследованных факторов (402, 404/2, 405/1). Данное наблюдение можно использовать для селекционной работы среди характеризующих штаммов.

Анализ стабильности наследования свойств коллекционными бактериями показал, что после двенадцати последовательных пересевов из молока в молоко (с интервалом 27 суток) у одного из штаммов (402) произошло изменение характеристик: способность сквашивания молока снизилась до 12 ч, а общая титруемая кислотность уменьшилась до 68°Т. Кроме того, у бактерий *L. lactis* 402 обнаружена утрата способности сбраживать лактозу.

Таким образом, приходится констатировать, что хранение культур в молоке с периодическими пересевами приводит к изменению их свойств. Поэтому на следующем этапе исследования определяли, какой из способов длительного хранения обеспечивает наилучшую выживаемость и стабильное наследование признаков лактококков.

Десять охарактеризованных штаммов *L. lactis* хранили в течение 12 месяцев в следующих условиях:

1) в столбиках с полужидкой агаризованной пептонно-дрожжевой средой под слоем вазелинового масла (+5°С);

2) в молоке при +5°С с периодическими пересевами (1 раз в месяц);

3) в молоке в замороженном состоянии (-20°С);

4) в молоке в присутствии криопротектора (20%-ный раствор сахарозы) в замороженном состоянии (-20°С);

5) в 40%-ном растворе глицерина в замороженном состоянии (-20°С).

По окончании срока хранения культуры переносили в подходящие условия и определяли их признаки. Одним из наиболее важных показателей пригодности того или иного способа для хранения определенной группы микроорганизмов является выживаемость клеток [5], которая определяется пропорцией жизнеспособных клеток в хранящейся культуре (см. табл. 3).

Таблица 3
Выживаемость бактерий *L. lactis* при хранении в различных условиях

Штамм	Выживаемость, %, при способе хранения				
	под слоем вазелинового масла (+5°С)	в молоке (+5°С)	в молоке (-20°С)	в молоке с криопротектором (-20°С)	в растворе глицерина (-20°С)
400/1	2,1	23,1	3,8	53,0	47,0
401	1,7	35,2	5,6	41,0	58,0
402	1,3	31,5	6,4	68,0	37,0
404/2	1,6	29,2	5,4	24,0	46,0
405/1	2,3	26,7	7,5	45,0	46,0
406/2	1,5	32,1	2,9	54,0	64,0
407/1	1,3	28,6	4,5	48,0	51,0
408/1	1,5	33,2	6,8	65,0	58,0
411	1,2	25,1	4,8	55,2	48,1
415	1,1	28,6	5,7	52,1	53,1

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что самую низкую выживаемость клеток обеспечивает метод хранения в толще полужидкой агаризованной среды под слоем вазелинового масла, в то время как самую высокую, в рамках данного эксперимента, показали методы замораживания в растворе глицерина и в молоке в присутствии криопротектора.

Кроме этого, у реанимированных после хранения бактерий были исследованы скорость сквашивания молока и общая титруемая кислотность (см. табл. 4 и 5).

Таблица 4
Скорость сквашивания молока бактериями *L. lactis*

Штамм	Скорость сквашивания молока, ч, при способе хранения				
	под слоем вазелинового масла (+5°C)	в молоке (+5°C)	в молоке (-20°C)	в молоке с криопротектором (-20°C)	в растворе глицерина (-20°C)
400/1	7,0	6,0	7,0	6,0	6,0
401	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
402	12,0	6,5	8,0	6,5	6,5
404/2	7,0	6,5	6,0	6,0	7,5
405/1	6,0	6,0	7,0	6,0	6,0
406/2	8,5	7,5	6,0	6,5	6,5
407/1	6,0	7,0	6,5	6,5	6,5
408/1	7,0	7,5	7,0	6,0	6,5
411	6,5	6,5	6,0	6,5	7,0
415	7,0	7,0	6,0	6,0	6,0

Таблица 5
Титруемая кислотность молока, сквашенного бактериями *L. lactis*

Штамм	Титруемая кислотность, °Т, при способе хранения				
	под слоем вазелинового масла (+5°C)	в молоке (+5°C)	в молоке (-20°C)	в молоке с криопротектором (-20°C)	в растворе глицерина (-20°C)
400/1	78	95	100	95	98
401	74	96	98	100	100
402	95	98	100	90	100
404/2	65	100	90	95	105
405/1	79	96	103	95	100
406/2	100	100	90	101	101
407/1	92	95	96	100	100
408/1	69	98	85	98	99
411	96	94	97	99	100
415	95	95	98	100	101

Из табл. 4 видно, что у двух штаммов *L. lactis* (402 и 406/2) изменилась скорость сквашивания молока при хранении в течение года в некоторых условиях. У бактерий *L. lactis* 402 она уменьшилась до 12 ч при хранении под слоем вазелинового масла, а у клеток *L. lactis* 406/1 – до 8,5 ч в аналогичных условиях. В остальных случаях этот параметр не изменился.

Из данных табл. 5 видно, что у пяти из исследуемых культур, хранившихся в толще полужидкой агаризованной среды под слоем вазелинового масла, титруемая кислотность изменилась очень существенно и не достигает показателя 80°Т. Культуры заквасочных бактерий с таким показателем обычно не используются в производстве кисломолочных продуктов. Другие способы хранения также могут приводить к снижению титруемой кислотности (см. табл. 5), однако не в таких широких пределах, как для первого метода.

Анализ других свойств бактерий, в том числе и отношения культур к ионам металлов, не выявил никаких изменений после хранения. Сопоставление выживаемости и других характеристик реанимированных после годичного хранения культур *L. lactis* свидетельствуют о наибольшей пригодности метода замораживания исследуемых бактерий в молоке с сахарозой в качестве криопротектора, а также в глицерине. Эти методы длительного хранения лактококков обеспечивают хорошую сохранность свойств даже таких нестабильно наследующих признаки бактерий, как *L. lactis* 402.

Литература

1. Wing Yee Wong, Ping Su, Gwen E. Allison. A Potential Food-Grade Cloning Vector for *Streptococcus thermophilus* that uses Cadmium Resistance as the Selectable Marker // A. and E. Microbiology. – 2003. – Vol. 69. – № 10 – P. 5767–5771.
2. Kim I. Sorensen, Rasmus Larsen, Annette Kibenich, Mette P. Junge, and Eric Johansen. A Food-Grade Cloning System for Industrial Strains of *Lactococcus lactis* // A. and E. Microbiology. – 2000. – Vol. 66. – № 4. – P. 1253–1258.
3. Boucher I., Parrot M., Gaudreau H., Champagne C. P., Vadeboncoeur C., Moineau S. Novel Food-Grade Plasmid Vector Based on Melibiose Fermentation for the Genetic Engineering of *Lactococcus lactis* // A. and E. Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – P. 6152–6161.
4. B. Henrich, J. R. Klein, B. Weber. Food-grade delived system for controlled gene expression in *Lactococcus lactis* // A. and E. Microbiology. – 2002. – Vol. 68. – № 11. – P. 1029–1038.
5. Куплетская М. Б., Аркадьева З. А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ // Микробиология. – 1997. – № 2. – С. 283–288.