УДК.637.146.34

Б. Луговий, В. Юкало

ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ЛАКТОКОКІВ

Проведено дослідження фізіологічних властивостей 27-ми промислових штамів лактококів підвидів Lactococcus lactis ssp.lactis, L. lactis ssp.cremoris, L.. lactis ssp. diacetilactis. Штами охарактеризовано за такими важливими технологічними показниками як кислотоутворююча активність, стійкість до NaCl, здатність рости у присутності антибіотиків, фагорезистентність, загальна протеолітична активність. На основі отриманих результатів відібрано два протеолітично-активні штами, фізіологічні властивості яких задовільняють технологічні вимоги, що дозволяє використати їх для проведення модельних дослідів по протеолізу білків казеїнового комплексу.

Продукти протеолізу білків казеїнового комплексу у значній мірі визначають харчову і біологічну цінність молочних продуктів. Особливу увагу процес протеолізу викликає у дослідників у зв'язку з відкриттям у складі білків казеїнового комплексу амінокислотних послідовностей, які у вигляді окремих пептидів володіють високою фізіологічною активністю [1].

Протеоліз білків казеїнового комплексу при виготовленні молочних продуктів у значній мірі зумовлений ферментами молочнокислих бактерій. В першу чергу це стосується лактококів, які входять до складу багатьох промислових заквасок. Для вивчення процесу протеолізу білків казеїнового комплексу необхідно відібрати штами з високою активністю їх протеолітичних систем. Крім цього, застосування їх у виробництві зумовлено відповідністю їх фізіологічних властивостей низки технологічних вимог, а саме: кислотоутворююча здатність, стійкість до NaCl та антибіотиків, фагорезистентність.

Метою нашої роботи є пошук протеолітично-активних штамів з високими технологічними властивостями.

Для дослідження було використано 27 штамів трьох підвидів виду *Lactococcus lactis*, які умовно позначаються для підвиду *L.lactis* ssp.*lactis: ll5, ll6, ll7, ll8, ll9, ll10, ll11, ll12;* для підвиду *L.lactis* ssp. *cremoris: lc1, lc2, lc3, lc4, lc5, lc6, lc8, lc9, lc10;* для підвиду *L.lactis* ssp.*diacetilactis: ld1, ld2, ld3, ld4, ld5, ld6, ld7, ld8, ld9, ld10*. Штами виділені з молочних продуктів країн СНД та Балтії і культивуються на кафедрі харчової біотехнології і хімії Тернопільського державного технічного університету імені ІванаПулюя.

При періодичних пасажуваннях в якості середовища використовували стерилізоване знежирене молоко. Термостатували до згортання при 30°С і зберігали між пересівами при температурі+4С [2]. Пересіви здійснювали через кожних 20 днів [2].

Енергію кислотоутворення визначали шляхом дослідження титрованої кислотності культури (у градусах Тернера /°Т/) у знежиреному молоці. Граничну кислотність визначали через 7 діб при 30°С [3]. Активну кислотність визначали за допомогою pH-метра pH-150.

Стійкість лактококів до NaCl визначали на знежиреному стерилізованому молоці, вивчаючи вплив на розвиток лактококів наступних концентрацій NaCl: 2%, 4%, 6.5%. Посівний матеріал вносили у кількості 3%. В

якості контролю було молоко, яке не містило NaCl. Через 24 години визначали у колбах титровану кислотність. Стійкість культур до NaCl оцінювали за відсотками титрованої кислотності у дослідних зразках порівняно з контролем.

Здатність росту лактококів у присутності антибіотиків визначали на знежиреному стерилізованому молоці, вивчаючи вплив на розвиток лактококів наступних антибіотиків: тетрацикліну у концентрації 0,1 МЕ/мл, пеніциліну - 0,1 МЕ/мл, стрептоміцину - 50 МЕ/мл. Посівний матеріал вносили у кількості 3%. Контролем було молоко, що не містило антибіотиків. Титровану кислотність визначали через 48 годин. Стійкість культури до антибіотиків оцінювали за відсотками титрованої кислотності порівняно з контролем.

Фагостійкість визначали методом агарових шарів за Адамсом [4]. У чашки Петрі заливали по 20 мл розплавленого і охолодженого до 45°С 1,5% середовища (агар з гідролізованим молоком). З метою забезпечення адсорбції фагів на поверхню бактеріальних клітин в 0,7% розплавлене середовище додають солі кальцію та магнію (по 1 мл на 100 мл середовища 0,01 М розчин $CaCl_2$ і 0,1 М розчин $MgSO_4$). У пробірку з 4 мл розплавленого і охолодженого 0,7% середовища з солями вноситься 0,3 мл 18-годинної витримки бактеріальної культури і нашаровується на поверхню 1,5%-агаризованого середовища у чашки Петрі. Ретельно перемішується і залишається на горизонтальній поверхні для застигання. У комірки спеціального реплікатора вноситься суспензія фагів. За допомогою реплікатора фаги вносяться на поверхню газону культур. Якщо культура чутлива до фагів, то у місцях внесення крапель фагів у суцільному газоні лактококів утворюються зони лізису. Для експерименту було використано колекцію фагів відділу мікробіології НВО "Белмясомолпром".

Для визначення протеолітичної активності лактококів використовували метод Гула у модифікації М.В.Залашко [5], в основі якого відбувається реакція взаємодії фенольного реактиву Фоліна з тирозином і триптофаном. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 650 нм. Контролем був фільтрат молока (тієї ж партії), оброблений за вищевказаним методом. Покази оптичної густини перераховували на вміст тирозину і триптофану в мг% за калібрувальним графіком, побудованим з використанням розчинів тирозину + триптофану відомої концентрації.

У першій серії дослідів нами вивчалися кислотоутворюючі властивості досліджуваних штамів. При цьому визначали титровану і активну кислотність культуральних середовищ через 6, 24, 48, 168 годин культивування штамів у стерилізованому знежиреному молоці при 30°С. Результати наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Кислотоутворюючі властивості 27 штамів лактококів.

Штам	Т культурного середовища через				pH культурного середовища			
	6 год	24 год	48 год	168 год	6 год	24 год	48 год	168 год
Ll5	32	66	81	98	5.89	5.12	4.88	4.50
Ll6	28	56	77	89	6.18	5.32	4.78	4.80
Ll7	40	97	106	109	5.26	4.56	4.56	4.44
Ll8	30	55	68	93.5	5.94	5.33	4.98	4.74

Штам	Т культурного середовища через				pH культурного середовища			
	6 год	24 год	48 год	168 год	6 год	24 год	48 год	168 год
Ll9	32	66	80	94	5.90	5.11	4.89	4.58
Ll10	33	67	85	108	5.87	5.08	4.80	4/49
Ll11	34	70	88	107	5.78	4.90	4.71	4.47
Ll12	56	106	111	120	5.13	4.32	4.3	4.24
Lc1	32	67	85	97	5.87	4.97	4.85	4.48
Lc2	26	63	83	94.5	6.15	5.14	4.9	4.54
Lc3	27	56	89	101:5	6.13	5.26	4.81	4.45
Lc4	31	61	90	98	5.95	5.16	4.65	4.53
Lc5	32	60	85	96	5.86	5.18	4.84	4.57
Lc6	32.5	75	94	101	5.87	4.87	4.58	4.45
Lc8	28	50	78	88	6.11	5.42	4.77	4.68
Lc9	30	67.5	91	97	5.96	4,98	4,6	4,5
Lc10	31	57	76	90	5.95	5,27	4,79	4,63
Ld1	32	58	75	93	5.86	5,22	4,82	4,59
Ld2	33	56.5	77	95	5.84	5,27	4,78	4,56
Ld3	32	62	70	96	5.87	5,14	4,9	4,56
Ld4	33	59	75	91	5.85	5,2	4,82	4,6
Ld5	31	56	74	94.5	5.91	5,26	4,84	4,58
Ld6	32	62	77	98.5	5.87	5,14	4,78	4,55
Ld7	34	66	76	95.5	5.79	5,11	4,79	4,57
Ld8	36	73	86	95.5	5.60	4,82	4,6	4,43
Ld9	33	63	81	117	5.85	5,17	4,7	4,54
Ld10	35	67	80	103	5.63	5,1	4,75	4,56

З результатів по визначенню граничної кислотоутворюючої здатності (168 годин) видно, що найсильнішими кислотоутворювачами є штами ll12,ll7, ll10, ll11, lc3, lc6, lc4, lc1, lc9, ld8, ld9, ld6. Штами ll12, ll7, ld8 володіють найбільшою швидкістю кислотоутворення.

У молочній промисловості при виробництві сиру у якості харчового додатку застосовується кухонна сіль. Тому нами досліджувався вплив різних концентрацій NaCl на розвиток штамів у знежиреному молоці. Промислові штами повинні володіти стійкістю до 4% концентрації солі. Штами, ріст яких гальмується 2% NaCl не придатні для приготування заквасок [6]. Результати розвитку досліджуваних штамів у присутності різних концентрацій NaCl подані у табл. 2 .

Таблиця 2

Вплив NaCl на розвиток 27 штамів лактококів

Штам	%- титрованої кислотності від контролю при концентрації NaCl:		
	2%	4%	6,50%
Ll5	93.6	76.4	49.1
Ll6	69.4	46.9	46.9
Ll7	85.0	29.0	24.0
Ll8	73.6	41.8	41.8
Ll9	93.9	36.4	34.8
Ll10	98.5	84.3	35.8
Ll11	98.6	91.4	35.7

Штам	%- титрованої кислотності від контролю при концентрації NaCl:		
	2%	4%	6,50%
Ll12	93.4	62.3	24.5.
Lc1	60.6	38.5	37.7
Lc2	87.7	42.4	39.6
Lc3	41.1	40.2	40.2
Lc4	65.5	41.3	41.3
Lc5	96.6	92.0	50.8
Lc6	90.8	36.9	36.9
Lc8	85.7	48.9	42.8
Lc9	90.3	35.5	33.3
Lc10	100.0	72.0	42.0
Ld1	96.4	87.3	41.8
Ld2	93.8	79.6	44.2
Ld3	91.9	76.6	37.1
Ld4	88.8	71.7	43.4
Ld5	89.0	78.2	43.6
Ld6	95.4	85.5	39.7
Ld7	87.0	70.2	33.6
Ld8	100.0	85.7	85.7
Ld9	93.3	76.6	49.2
Ld10	94.6	76.8	46.4

Як показав аналіз, розвиток усіх досліджуваних штамів у присутності 2% NaCl не пригнічується. Однак, в значній мірі сповільнюється розвиток штамів lc3, lc1, lc4. При використанні 4% концентрації NaCl значно пригнічувався розвиток штамів lc9, lc6, lc1, lc3, lc4, lc2, ll7, ll9, ll8, ll6. Штами підвиду *L.lactis* ssp.*diacetilactis* виявилися більш стійкими до концентрації солі 4% порівняно з іншими підвидами лактококів. Штам lc5 помітно відрізняється стійкістю до 4%NaCl від інших штамів свого підвиду. Концентрація NaCl 6,5% пригнічує розвиток всіх досліджуваних штамів. В загальному, за стійкістю до NaCl перспективними є штами ll11, ll10, ll4, ll12, ll5, ld1, ld6, ld8, ld2, ld9, ld10, lc5, lc10, lc8.

Для вивчення стійкості лактококів до антибіотиків були використані наступні антибіотики: тетрациклін, пеницилін, стрептоміцин. Результати наведені у табл. 3.

Таблиця 3

Вплив антибіотиків на розвиток 27 штамів лактококів

Штам	%-титрованої кислотності від контролю при застосуванні:		
	тетрациклін 0.1МЕ/мл	пеницилін 0.1МЕ/мл	стрептоміцин 50МЕ/мл
Ll5	98.6	85.4	34.6
Ll6	92.9	83.7	37.7
Ll7	97.9	77.3	76.1
Ll8	100.0	91.8	44.1
Ll9	91.9	70.8	40.5
Ll10	99.4	98.9	64.2
Ll11	89.9	95.9	58.8
Ll12	98.3	68.5	49.2

Штам	%-титрованої кислотності від контролю при застосуванні:		
	тетрациклін 0.1МЕ/мл	пеницилін 0.1МЕ/мл	стрептоміцин 50МЕ/мл
Lc1	100.0	73.2	43.7
Lc2	98.8	55.3	32.5
Lc3	95.3	69.4	39.0
Lc4	98.3	62.5	38.5
Lc5	98.8	83.5	38.8
Lc6	98.9	68.0	32.6
Lc8	94.0	48.8	46.1
Lc9	96.8	70.1	32.0
Lc10	92.1	70.9	53.9
Ld1	93.2	76.0	37.6
Ld2	97.9	62.2	40.8
Ld3	100.0	64.3	48.7
Ld4	97.3	50.0	33.3
Ld5	88.8	94.6	67.5
Ld6	100.0	65.3	69.6
Ld7	92.1	60.7	71.2
Ld8	98.8	85.9	39.6
Ld9	95.0	62.5	42.2
Ld10	97.6	59.8	62.0

Більш стійкими до тетрацикліну (при допустимій дозі 0,1 МЕ/мл [7]) виявилися штами ll5, ll7, , ll8, ll_{10}, ll_{12}, lc1, lc2, lc4, lc5, lc6, ld1, ld3, ld4, ld6, ld8, ld10, ld2. Вивчено вплив пеницилiну у дозі 0,1 МЕ/мл, яка за даними авторів [6] суттєво знижує кількість живих клітин. Більш стійкими до дії пеницилiну виявилися штами: ll_{10}, ll_{11}, ll8, lc5, lc1, lc10, ld5, ld8. До дії стрептоміцину у дозі 50 МЕ/мл стійкими виявилися штами ll_{10}, ll_{11}, ll7, lc1, lc8, lc 10, ld6, ld7,

Всі штами підвиду *L.lactis* ssp.*lactis*, за винятком ll_{12} виявилися стійкими до дії всіх використаних фагів. Результати подані у табл. 4.

Таблиця 4

Штами лактококів, які чутливі до дії бактеріофагів (з 27 штамів)

Штам	Кількість фагів, які лізують штам	%-від загальної кількості використаних фагів
Ll12	2	1.33
Ld3	7	4.67
Ld2	1	0.67
Ld5	2	1.33
Ld6	21	14
Ld8	2	1.33
Ld9	7	4.67
Ld10	31	20.67

Два фаги з 150 слабо лізували клітини штаму ll_{12}. Всі штами підвиду *L.lactis* ssp.*cremoris* виявилися стійкими до всіх фагів, які використовувалися. Найчутливішими до дії фагів виявилися штами підвиду *L.lactis* ssp.

diacetilactis . Виняток складають штами ld1, ld4, ld7, які виявилися стійкими до всіх використаних фагів.

Оцінка протеолітичної активності досліджуваних штамів методом Гула у модифікації Залашко при культивуванні їх у стерилізованому знежиреному молоці при 30°С протягом 72 год. показала, що найвищою протеолітичною активністю серед усіх штамів трьох підвидів лактококів володіють 2 штами підвиду *L.lactis* ssp.*lactis* - *ll*$_{12}$ *і ll*$_{7}$. Результати наведені у табл. 5.

Таблиця 5

Протеолітична активність 27 штамів лактококів

Штам	Протеолітична активність, мг% тирозину+триптофану через:		
	24 год.	72 год.	168 год.
Ll5	-0.25	0.27	0.5
Ll6	-0.05	0.04	0.18
Ll7	6.3	7.6	10.3
Ll8	0.4	1.0	1.9
Ll9	0.5	1.5	2.75
Ll10	0.6	0.7	1.8
Ll11	0.58	1.0	-
Ll12	6.8	8.7	10.2
Ld1	2.25	0.4	2.75
Ld2	0.25	2.05	2.73
Ld3	1.95	0.7	2.1
Ld4	-0.2	1.35	0.85
Ld5	0.15	1.75	2.55
Ld6	0	-0.3	2.25
Ld7	-0.1	1.75	2.9
Ld8	-0.3	1.7.	2.6.
Ld9	2.3	1.4	2.1
Ld10	2.25	1.6	1.9
Lc1	1.05	0.4	0.4
Lc2	0.82	0.8	1.57
Lc3	0.1	1.3	0.97
Lc4	1.5	2.6	3.48
Lc5	1.1	1.3	1.95
Lc6	1.05	1.0	1.41
Lc8	0.2	0.81	1.6
Lc9	0.81	-0.1	1.48
Lc10	1.15	0.98	3.59

Проведений аналіз фізіологічних властивостей лактококів показав, що 7 штамів задовільняють технологічні вимоги виробництва молочних продуктів. Із них лише два проявили високу протеолітичну активність і можуть бути використані для вивчення процесів протеолізу білків казеїнового комплексу.

Summury. We investigated the physiological properties of 27 industrial strains lactococcus subspecies: Lactococcus lactis ssp.lactis, L. lactis ssp.cremoris, L.. lactis ssp. diacetilactis. These strains were tested on acid-production properties, persistently to NaCl, to antibiotics, phage-resistance, general proteolitic activity.We choiced two strains with high proteolitic activity and valueable industrious properties. They may be to make use for experiment of proteolysis of casein's complex proteins.

Література

1. Brantl V., Teschemacher H., Henschen A. & Lottspeich F. (1981) Novel opioid peptides derived from casein (b-casomorphins). *Hoppe-Seylor's Z.Physiol.Chem.* v.360, p.1211-1216.
2. Королева Н.С. Основы микробиологии и гигиены молока и молочных продуктов. М.: Легкая и пищевая промышленость, Москва, 1984.- 168 с.
3. Банникова Л.А. Микробиологические основы молочного производства.-М.:: Агропромиздат, 1987.- 400с.
4. Габрилович И.М. Практическое пособие по бактериофагии.-Минск: Вышейшая школа, 1968.-180с.
5. Залашко М.В., Образцова Н.В., Савинко Е.И. Исследование протеолитической активности молочнокислых бактерий. //Физиология и биохимия микроорганизмов.- Минск: Наука и техника, 1970.-С.121-128.
6. Trolles I.A., Stinson I.V. Moisture requirement for growth and metabolite production by micro lactis acid bacteria //*Appl. and Environ. Microbiol.*- 1982. v.42. n.4.
7. Горбатова К.К. Технология молока и молочньіх продуктов.-М.-Легкая и пищевая промышленность, 1984.-311с.

Автори висловлюють щиру вдячність ст.н.с. відділу мікробіології НВО "Белмясомолпром" Т.А.Парнюк за суттєву технічну і методичну допомогу у проведенні аналізу фагорезистентності штамів лактококів.