

# ПОШУК І ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

О. В. Науменко

Інститут продовольчих ресурсів НААН України, Київ

E-mail: [naumenkoo@list.ru](mailto:naumenkoo@list.ru)

Отримано 27.03.2014

Метою роботи був пошук біологічно активних штамів лактобактерій, перспективних у виробництві функціональних молочних продуктів.

Об'єктом дослідження були молочнокислі бактерії, ізольовані з вмісту кишечника здорових людей та з некомерційних молочних продуктів. Застосовано сучасні методологічні підходи й відібрано штами *молочнокислих бактерій Lactobacillus casei* 302, *Lactobacillus acidophilus* 35 і *Streptococcus thermophilus* 21 з високим рівнем біологічної активності. Встановлено високий біологічний потенціал відібраних культур лактобактерій, що здатен забезпечити стабільність перебігу технологічного процесу виробництва та необхідні характеристики бактеріальних препаратів і ферментованих ними продуктів. У досліджах *in vitro* показано, що селекціонованим штамам притаманні важливі промислові властивості, а саме: здатність знижувати рівень холестеролу та лактози під час розвитку в молоці, стійкість до вірулентних бактеріофагів та агресивних сполук шлунково-кишкового тракту, висока антагоністична й адгезивна активність.

**Ключові слова:** *Lactobacillus casei*, селекція, адгезія, холестерол.

В останні роки невпинно зростає популярність функціональних молочних продуктів, оскільки стала відомою важлива роль, яку вони відіграють у дієтичному і лікувальному харчуванні. Багато в чому біологічна цінність функціональних продуктів зумовлена властивостями заквашувальних культур, що входять до їхнього складу [1]. Тому вкрай важливо розширити коло пробіотичних мікроорганізмів і залучити їх до нашого раціону. Пошук і спрямований відбір культур-пробіотиків є актуальним завданням, що потребує проведення всебічних досліджень цих мікроорганізмів [2]. Для промислового застосування пробіотичні штами селекціонують за низкою біологічних властивостей та проявом їхньої функціональної активності, зокрема у досліджах *in vitro*.

Метою роботи був пошук біологічно активних штамів лактобактерій, перспективних у виробництві функціональних продуктів.

## Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були виділені нові культури молочнокислих бактерій. Ідентифікацію та селекційні дослідження штамів проводили згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009 р.). У досліджах використовували 17-годинні чисті культури,

вирощені дворазово у відповідному рідкому середовищі: МРС із 1% глюкози та 1% лактози — для бактерій роду *Lactobacillus*, гідролізованому бульйоні (ГБ) — *Streptococcus thermophilus*. Молокозсідальну активність, межу кислотоутворення та інші технологічні показники визначали відповідно до [3]. Закономірності росту чистих культур вивчали, застосовуючи періодичне культивування у 10%-му стерильному знежиреному молоці. Чисельність мікроорганізмів визначали за кількістю колонієутворювальних одиниць (КУО) на агаризованому живильному середовищі, використовуючи метод граничних десятикратних розведень. Розрахунок параметрів росту культур здійснювали на підставі кривих росту мікроорганізмів в координатах  $lg$  КУО — тривалість культивування. Відношення культур до бактеріофагів визначали методом подвійного агару з додаванням 10 мМ  $CaCl_2$  [4]. У досліджах використовували літично активні видоспецифічні бактеріофаги, виділені на підприємствах України, з колекції молочних фагів Інституту продовольчих ресурсів. *Антагоністичну активність* молочнокислих бактерій щодо тест-культур патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів визначали методом спільного культивування упродовж 24 год, при цьому вираховували титр

антагоністичної активності як найбільше розведення бактеріальної суміші, з якого висівається тест-культура. Гідрофобність клітин вивчали методом, який ґрунтується на здатності бактерій розподілятися у біфазній системі «суспензія бактерій:*n*-гексадекан». Гідрофобність виражали у відсотках і визначали за відношенням оптичної густини бактеріальної суспензії після взаємодії з *n*-гексадеканом до її вихідного значення. Електрокінетичні дослідження поверхневих структур клітин проводили на установці для мікроелектрофорезу. Після нарощування у середовищах МРС і ГБ 17 год клітини осаджували центрифугуванням за 3 000 об/хв 15 хв та двічі промивали стерильною дистильованою водою (рН 6,6). Вимірювали швидкість електрофоретичної рухливості 30 клітин в електричному полі (10 В/см; 6,7 мА). *Здатність до адгезії лактобактерій* досліджували у модельній системі з гранулами скла. Для цього скляні колонки діаметром 15 мм заповнювали хімічно чистими скляними гранулами діаметром близько 1 мм (5 г) і додавали 5 см<sup>3</sup> бактеріальної суспензії, оптична густина якої становила 0,8 од (довжина хвилі  $\lambda = 540$  нм). Контролем слугувала колонка із суспензією бактерій без скляних гранул для підрахунку клітин, які закріпилися на її стінках. Через 30 хв суспензію зливали у мірний посуд, колонку двічі промивали фізіологічним розчином для вилучення незакріплених клітин. Контрольний та дослідний об'єми суспензій доводили до 10 см<sup>3</sup> фізрозчином і вимірювали оптичну густину суспензії. Адгезивну здатність бактерій визначали за часткою закріплених клітин від вихідної кількості. Крім того, досліджували адгезію бактерій до клітинної лінії аденокарциноми гортані людини НЕР-2, яку було люб'язно надано доктором мед. наук В. І. Задорожною (Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України). Мікроорганізми готували, як наведено вище, а густину суспензії доводили за оптичним стандартом мутності з розрахунку 10<sup>9</sup> клітин/1 см<sup>3</sup>. У стерильну чашку Петрі вносили покривне скельце з відмитою клітинною культурою (вирощеною на скельцях у чашках Петрі в інкубаторі з 5%-м вмістом СО<sub>2</sub>) і бактеріальною суспензією (10 см<sup>3</sup>). Інкубували впродовж 1 год за кімнатної температури. Після цього скельця промивали 8 разів у фізрозчині для вилучення незакріплених бактерій, висушували, фіксували та фарбували метиленовим синім. В оптичному мікроскопі підраховували кількість лактобактерій, що закріпилися

на клітинах культури НЕР-2. Для досягнення достовірності результатів переглядали не менше 100 клітин НЕР-2. Ступінь адгезивності виражали за індексом адгезивності (ІА) — середньою кількістю бактерій, що закріпилися на одній клітині НЕР-2. Кислоторезистентність лактобактерій оцінювали за кількістю життєздатних клітин під час експозиції в середовищі, підкисленому соляною кислотою до рН 2,0; 2,5; 3,5. Стійкість до жовчі (Oxgall, Sigma, США) — за різницею в часі, через який оптична густина культури (за  $\lambda = 540$  нм) у середовищі з 0,3% жовчі (дослід) та без неї (контроль) досягла величини 0,3. Холестеразну активність бактерій досліджували у молоці зі вмістом жиру 3,2% та в середовищах МРС або ГБ (залежно від роду бактерій), в яких джерелами холестеролу були, відповідно, молочний жир та водорозчинна суміш ліпідів, збагачена холестеролом (Aldrich Co.LTD, Sigma). Холестеразну активність культур визначали як різницю між величинами залишкового холестеролу в культуральній рідині та стерильному середовищі. Аналіз мікропрепаратів здійснювали за допомогою мікроскопа Motic (Fischer Bioblock) із вмонтованою відеокамерою TopView зі збільшенням у 1 000 разів. Усі дослідні проводили у трьох повторях. Для оброблення експериментальних даних застосовували пакет програмного продукту STATISTICA<sup>®</sup> 5.XX for Windows (StatSoft Inc., USA) з урахуванням рекомендацій, наведених у [5]. У таблицях подано середні арифметичні та їх стандартні похибки. Результати вважали достовірними за  $P \leq 0,05$ . Обробку даних здійснювали за допомогою програми Excel.

### Результати та обговорення

Пошук та виділення активних штамів лактобактерій проводили із природних джерел розповсюдження: зразків вмісту кишечника здорових людей та некомерційних молочних продуктів. Відібраний матеріал висівали в рідкі середовища — МРС із 1% глюкози й 1% лактози, рН 5,9, та відновлене знежирене молоко і культивували за температури 37 °С. Із накопичувальних культур, застосовуючи традиційну техніку виділення мікроорганізмів у чисту культуру, виділяли окремі колонії. Ці колонії з характерною для молочнокислих бактерій морфологією переносили в рідкі середовища і культивували за температури 37 °С. Ступінь чистоти вирощених культур оцінювали на підставі морфологічної однорідності під час мікроскопіч-

ного аналізу. Цю процедуру проводили для кожної накопичувальної культури 2–3 рази. У результаті проведеної селекційної роботи було вилучено 322 ізоляти в чистій культурі. Одержані ізоляти умовно розподілили на 4 групи за морфологічною будовою клітин та джерелом виділення (табл. 1).

Як свідчать наведені в таблиці дані, з кишечника було виділено 125 ізолятів, а з молочних продуктів — 197. Більшість із них мали паличкоподібну форму різних розмірів — 74,53% від загальної кількості. Кількість паличок, виділених із кишечника та молочних продуктів, була майже на одному рівні — 38,82% і 35,71%, відповідно. Кокові мікроорганізми виділили лише з молочних продуктів.

Первинний скринінг ізолятів проводили за показниками, що характеризують техно-

логічну придатність культур, а саме: молокозсідальною активністю (МЗА) та межею кислотоутворення (МКУ). Окрім того, одночасно вивчали такі важливі властивості культур, як стійкість до жовчі (ЖС) та кислоторезистентність (КР). Застосування цих показників зумовлено напрямом селекції — відбір біологічно активних мікроорганізмів. У табл. 2 показано розподіл виділених ізолятів за обраними для кожної групи критеріями селекції.

Активніше заквашували молоко культури, що їх було виділено з молочних продуктів, — так звані «молочні» штами з 2-ї та 4-ї груп: значення показника МЗА коливалось у межах 5–10 год. Частка таких культур становила 46,9% від загальної кількості виділених ізолятів. Із числа «кишкових» за походженням культур 1-ї та 3-ї груп лише

Таблиця 1. Характеристика виділених культур

Група	Морфологія клітин	Розміри клітин, мкм	Джерело виділення	Кількість ізолятів
I	Товсті палички різної довжини, окремі або в ланцюжках	0,6-0,9 — 1,4-6,0	Кишечник людини	73
II	Товсті палички різної довжини, окремі або в ланцюжках	0,7-0,9 — 1,5-7,0	Молочні продукти	115
III	Тонкі палички, іноді в ланцюжках	0,5-0,6 — 1,0-4,4	Кишечник людини	52
IV	Коки, диплококи, ланцюги	0,6-0,8	Молочні продукти	82

Таблиця 2. Розподіл виділених ізолятів за селекційними критеріями

Показник	Діапазон	Група							
		I		II		III		IV	
		кількість ізолятів							
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
МЗА, год	5–10	21	6,5	84	26,1	0	0	67	20,8
	10–20	38	11,8	29	9,0	7	2,1	15	4,7
	20–30	14	4,3	2	0,6	45	13,9	0	0
МКУ, °Т	80–150	0	0	0	0	37	11,5	78	24,2
	150–250	12	3,7	39	12,1	15	4,7	4	1,2
	250–350	61	18,9	76	23,6	0	0	0	0
ЖС, Δ год	1–2	16	4,9	0	0	11	3,4	0	0
	2–4	31	9,6	22	6,8	39	12,1	15	4,7
	Більше 4	26	8,1	93	28,9	2	0,6	67	20,8
КР, %	10–25	18	5,6	73	22,7	7	2,8	51	15,8
	25–50	43	13,4	36	11,2	29	9,0	27	8,4
	50–90	12	3,7	6	1,7	16	4,9	4	1,2

Примітка: загальна кількість виділених ізолятів  $n = 322$  (100%).

21 ізолят 1-ї групи характеризувався високою молокозсідальною активністю.

Відомо, що молочнокислі палички здатні до суперпродукування молочної кислоти, і це часто призводить до виникнення вад ферментованих молочних продуктів. З огляду на це доцільно вести пошук штамів, які мають помірну кислотоутворювальну здатність. Виходячи із цього частка паличок «молочного» походження (ізоляти 2-ї групи) зі значеннями МКУ не більше 250 °Т становила 12,1%. Частка «кишкових» ізолятів (1-ї та 3-ї груп), для яких МКУ ≤ 250, була більшою в 1,6 раза і нараховувала 64 ізоляти.

Більшість жовчостійких ізолятів також мали кишкове походження. Заслугує на увагу той факт, що 8,4% ізолятів 1-ї та 3-ї груп мали високу стійкість до жовчі (затримка росту не більше 2 год) і 21,7% — середню (до 4 год). На «молочні» ізоляти 4-ї групи жовч впливала найбільше і серед них взагалі не було культур з високою резистентністю.

Для біологічно активних штамів молочнокислих бактерій кислотостійкість має вирішальне значення: по-перше, для успішного транзиту через травний канал, особливо через шлунок з його високою концентрацією HCl, а по-друге — для забезпечення їх гарантованої кількості у готових функціональних продуктах та впродовж зберігання. Аналіз виділених ізолятів за показником кислоторезистентності показав, що стійких штамів «кишкового» походження було у 2,8 раза більше порівняно з «молочними». Поряд із цим кількість ізолятів, що за витримки впродовж 2 год у середовищі з активною

кислотністю на рівні рН 2,5 зберігали до 50% живих клітин (середній рівень), була приблизно однаковою незалежно від джерела виділення (табл. 2).

Отже, виділені ізоляти мають біологічну активність. Однак «кишкові» штами характеризувалися більшою стійкістю до жовчі й кислоти і нижчими показниками молокозсідальної активності та межі кислотоутворення порівняно з «молочними». Це зумовлено більшою пристосованістю молочних культур до розвитку в молоці — природному для них середовищі [6].

У результаті скринінгу за 4 показниками було відібрано як перспективні 8 штамів, 5 з яких були «кишкового» походження і 3 — «молочного». Відібрані чисті культури бактерій було проаналізовано та класифіковано за видом. Подальше дослідження властивостей виділених культур здійснювали за критеріями *in vitro*, що дають змогу ґрунтовніше вивчити функціональний потенціал штамів, а саме: антагоністичною та адгезивною активністю, а також здатністю знижувати вміст холестеролу.

Антагоністичну активність виділених культур досліджували методом спільного вирощування з тест-культурами патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів. Було встановлено, що в чистій культурі кількість тест-культур становила  $10^8$  КУО/см<sup>3</sup>, а під час спільного росту з лактобактеріями — знижувалась у тисячі та мільйони разів (табл. 3).

Вивчення антагоністичної активності виділених культур показало, що лактобацили

Таблиця 3. Титр антагоністичної активності різних штамів, Іг КУО/см<sup>3</sup> (спільне культивування)

Лактобактерії	Тест-культури			
	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Pr. vulgaris</i>	<i>Bac. subtilis</i>
<i>S. thermophilus</i> 21	4	4	3	4
<i>S. thermophilus</i> 37	5	5	3	5
<i>L. acidophilus</i> 35	2	1	Менше 1	1
<i>L. acidophilus</i> 310	2	3	2	3
<i>L. casei</i> 205	2	2	Менше 1	3
<i>L. casei</i> 218	2	3	1	3
<i>L. casei</i> 302	Менше 1	1	Менше 1	1
<i>L. casei</i> 330	1	2	Менше 1	3
<i>L. casei</i> Yacult (Японія)	2	4	3	3
Контроль 1, рН 3,8	5	6	6	6
Контроль 2, чиста тест-культура	8	8	8	8

Примітка: похибка середнього арифметичного — 3–5%; для всіх значень  $P < 0,05$  (порівняно з контролем 1 і контролем 2).



активніше пригнічували розвиток тест-культур порівняно з термофільними стрептококами. Найчутливішими до їхньої дії були протей та кишкові палички — титр антагоністичної активності коливався від 1 до  $2 \lg \text{ КУО/см}^3$ . Штам *L. casei* 302 мав найвищий титр антагоністичної активності —  $\geq 1 \lg \text{ КУО/см}^3$ . Штами *S. thermophilus* 21 і 37 характеризувалися дещо меншою антимікробною активністю, про що свідчить нижче значення антагоністичного титру — від 3 до  $5 \lg \text{ КУО/см}^3$  (табл. 3).

Одним із механізмів антимікробної дії лактобактерій є здатність накопичувати в процесі життєдіяльності значну кількість органічних кислот, передусім молочної. Тому в дослідях як контроль 1 використовували відповідні стерильні середовища з доведеною кислотністю до 3,8 од рН. Окрім того, прояв антагоністичної активності досліджуваними лактобактеріями порівнювали з дією штаму *L. casei*, який нами було виділено з пробіотичного напою Yacult (контроль 2). Як впливає з даних табл. 3, лактобактерії справляли більший інгібуючий вплив на всі тест-культури порівняно з контролем 1 (рН 3,8). Отже, можна припустити, що їхня пригнічувальна дія пов'язана з продукуванням не лише кислот, а й, можливо, певних антимікробних речовин.

Спектр дії використаного як додатковий контроль 2 штаму *L. casei* (з Yacult) істотно не відрізнявся від дії досліджуваних культур. Виділені нами молочнокислі бактерії *L. casei* за рівнем антагоністичної активності не поступалися цій пробіотичній культурі або навіть перевершували її.

Адгезію молочнокислих бактерій вивчали у модельних системах *in vitro*, які імітували неспецифічну взаємодію з гідрофобною

(*n*-гексадекан) і гідрофільною (скляні гранули) поверхнями та специфічну — з клітинною культурою НЕР-2.

Аналіз гідрофобності поверхні клітин молочнокислих бактерій показав, що ця властивість перебуває в залежності від умов вирощування культур і є штамоспецифічною ознакою (табл. 4).

Найвище значення цього показника спостерігали в «кишкового» штаму *L. casei* 302 — 14,8 %, тимчасом як у «молочного» штаму *L. acidophilus* 310 у середовищі МРС ступінь гідрофобності був меншим у середньому в 2,5 раза ( $P < 0,05$ ).

Під час розвитку в середовищі МРС поверхня клітин характеризувалася меншим в 1,1–1,9 раза ступенем гідрофобності порівняно з ростом у ГБ. Очевидно, наявність додаткових вуглеводів у середовищі МРС стимулювала утворення гідрофільних сполук на поверхні клітин молочнокислих бактерій, тоді як у ГБ цього не відбувалось.

Дослідження електрофоретичної рухливості клітин в електричному полі показало, що сумарний потенціал популяції клітин лактобактерій мав від'ємний заряд. У «кишкових» штамів значення  $\zeta$ -потенціалу було у 2,0–2,1 раза нижчим порівняно з культурами «молочного» походження. Найменший  $\zeta$ -потенціал визначено для штаму *L. casei* 302 — (–11,8) мВ (табл. 4). Деякі автори пов'язують цю ознаку з високими адгезивними властивостями бактерій [7].

Зміни поверхневих властивостей молочнокислих бактерій у процесі розвитку в різних середовищах позначалися на їхній здатності прикріплюватись до скляних гранул (табл. 5).

Таблиця 4. Гідрофобні та електрокінетичні властивості клітинних поверхонь лактобактерій

Лактобактерії	Гідрофобність, %		$\zeta$ -потенціал, мВ
	МРС	ГБ	
<i>S. thermophilus</i> 21	$9,17 \pm 0,31$	$12,29 \pm 0,57$	$5,52 \pm 0,23$
<i>S. thermophilus</i> 37	$8,64 \pm 0,79$	$9,28 \pm 0,44$	$2,53 \pm 0,12$
<i>L. acidophilus</i> 35	$7,04 \pm 0,23$	$13,17 \pm 0,29$	$7,21 \pm 0,15$
<i>L. acidophilus</i> 310	$5,96 \pm 0,54$	$9,26 \pm 0,26$	$6,26 \pm 0,13$
<i>L. casei</i> 205	$9,51 \pm 0,35$	нд*	$5,12 \pm 0,14$
<i>L. casei</i> 218	$12,21 \pm 0,64$	нд*	$7,35 \pm 0,21$
<i>L. casei</i> 302	$14,75 \pm 0,61$	нд*	$11,76 \pm 0,30$
<i>L. casei</i> 330	$9,74 \pm 0,29$	нд*	$5,09 \pm 0,24$

Примітка: тут і далі \* нд — не досліджували.

Таблиця 5. Адгезія молочнокислих бактерій у різних модельних системах

Лактобактерії	Скляні гранули, %		HEp-2, IA
	МРС	ГБ	
<i>S. thermophilus</i> 21	11,13 ± 0,45	50,49 ± 2,21	0,99 ± 0,14
<i>S. thermophilus</i> 37	8,63 ± 0,26	22,65 ± 0,48	0,34 ± 0,11
<i>L. acidophilus</i> 35	37,01 ± 1,57	45,84 ± 1,71	0,36 ± 0,18
<i>L. acidophilus</i> 310	16,89 ± 1,64	21,05 ± 1,81	0,21 ± 0,10
<i>L. casei</i> 205	16,63 ± 1,56	нд*	0,22 ± 0,10
<i>L. casei</i> 218	19,17 ± 0,41	нд*	0,20 ± 0,13
<i>L. casei</i> 302	33,90 ± 0,88	нд*	1,43 ± 0,24
<i>L. casei</i> 330	30,49 ± 1,26	нд*	0,43 ± 0,20

Як впливає з даних табл. 5, кількість закріплених бактерій, вирощених у ГБ, в 1,2–4,5 раза більша, ніж у МРС. Так, адгезивність штаму *S. thermophilus* 21 у ГБ була в 4,5 раза вища, ніж у МРС. Вплив ростового середовища на адгезивні властивості штамів ацидофільної палички був мінімальний. Загалом кількість адгезованих до скляних гранул клітин залежала від штаму й варіювала від 8,6 до 50,5%.

На моделі клітинної лінії HEp-2 показано, що найкращою адгезивною здатністю характеризувався штам *L. casei* 302 — значення індексу адгезивності (IA) було на порядок вищим порівняно з іншими штамми. На рисунку наведено мікрофотограму, що ілюструє адгезію *L. casei* 302 до клітинної лінії HEp-2.

Отже, виділені штами виявляли *in vitro* високу здатність до адгезії, а штам *L. casei* 302 — навіть більшу, ніж культури, що були ефективними в лікуванні верхніх дихальних шляхів дітей [8].

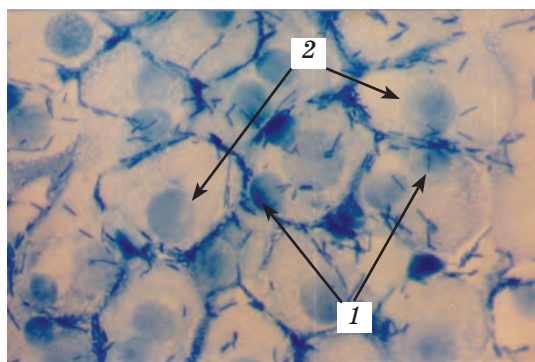


Рис. Адгезія молочнокислих бактерій до клітинної лінії аденокарциноми гортані людини HEp-2:  
1 — *L. casei* 302; 2 — HEp-2  
(світловий мікроскоп, збільшення 10×100)

Дослідження холестеразної активності показало, що штами істотно різнилися за цим показником і зв'язували від 7,7% до 64,0% холестеролу середовища (табл. 6).

Найактивніше знижували вміст холестеролу штами, що належали до виду *L. casei*. Після 20 год росту в молоці кількість холестеролу зменшувалась на 79,4÷108,7 мкг/см<sup>3</sup>. Практично на такому самому рівні впливав на вміст холестеролу штам *S. thermophilus* 21 — кількість вилученого холестеролу в молоці становила 60,1 мкг/см<sup>3</sup>. Вплив ацидофільних паличок за культивування в молоці був істотно слабшим — цей показник знижувався на 42,8÷43,9 мкг/см<sup>3</sup>.

Слід також зазначити, що штам *L. casei* (з продукту Yakult), використаний нами для порівняння властивостей досліджуваних культур із відомим пробіотиком, не мав істотних переваг за умов описаного експерименту.

Одержані результати стосовно високої холестеразної активності *L. casei* узгоджуються з даними літератури. У досліджах Brashears штами *L. casei* вилучали 60 мкг холестеролу з 1 см<sup>3</sup> МРС-бульйону [9]. Відібрані нами штами виявляли холестеразну активність на такому самому високому рівні, а *L. casei* 302 вилучав із середовища у 2,01 раза більше холестеролу.

Штами молочнокислих бактерій, що залучаються до складу заквашувальних культур, мають добре розвиватись у молоці, під час заквашування утворювати кисломолочні згустки з однорідною, щільною консистенцією, з приємним смаком та ароматом.

Встановлено, що активніше розвивались у молоці штами термофільного стрептокока й ацидофільної палички — збільшували кількість клітин у 55–110 разів від початкової кількості. Інтенсивність нагромадження

Таблиця 6. Зниження вмісту холестеролу лактобактеріями *in vitro*

Лактобактерії	У МРС, мкг/см <sup>3</sup>		У молоці, мкг/см <sup>3</sup>	
	$M \pm m$	%	$M \pm m$	%
Контроль	170 ± 0,24	100	500 ± 0,11	100
<i>S. thermophilus</i> 21	63,3 ± 0,12*	12,7	60,1 ± 0,21*	35,4
<i>S. thermophilus</i> 37	60,1 ± 0,22*	12,0	35,1 ± 0,15*	20,6
<i>L. acidophilus</i> 35	47,1 ± 0,16*	9,4	43,9 ± 0,18*	25,8
<i>L. acidophilus</i> 310	38,4 ± 0,17*	7,7	42,8 ± 0,13*	25,2
<i>L. casei</i> 205	101,5 ± 0,11*	20,3	79,4 ± 0,12*	46,7
<i>L. casei</i> 218	104,4 ± 0,18*	20,9	86,5 ± 0,11*	50,9
<i>L. casei</i> 302	120,6 ± 0,15*	24,1	108,7 ± 0,22*	64,0
<i>L. casei</i> 330	105,9 ± 0,11*	21,2	99,8 ± 0,23*	58,7
<i>L. casei</i> Yacult (Японія)	77,0 ± 0,13*	15,4	65,4 ± 0,14*	38,5

Примітка:\* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

клітин *L. casei* була істотно нижчою — вони збільшували цю кількість лише у 5÷20 разів залежно від штаму (табл. 7).

Відмінності між штамами в межах видів стосовно характеру росту в молоці було виявлено на підставі аналізу параметрів росту, а саме: питомої швидкості росту ( $\mu$ , год<sup>-1</sup>), тривалості лаг-фази ( $T_1$ ), константи швидкості поділу (число поділу клітини за 1 год) ( $v$ , год<sup>-1</sup>) і терміну регенерації, що характеризує час, необхідний для одного циклу поділів клітини ( $g$ , год).

Із числа *S. thermophilus* було відібрано штаму 21, а з *L. acidophilus* — 35, як найактивніші. Ці культури починали рости після невеликої фази затримки росту — показник  $T_1$  найменший серед усіх дослі-

джуваних культур для *S. thermophilus* 21: 0,22 год і для *L. acidophilus* 35 — 1,76 год. Активний ріст у періодичній культурі тривав 6 год для *S. thermophilus* 21 і 8 год — *L. acidophilus* 35 із питомою швидкістю у лог-фазі 0,97 і 0,76 год<sup>-1</sup> відповідно. Штаму термофільного стрептокока відтворювався швидше порівняно з ацидофільною паличкою, термін регенерації був коротший у 2,1 раза. Чисельність у стаціонарній фазі для обох штаму була приблизно однаковою і становила  $8,50 \pm 0,5$  лг КУО/см<sup>3</sup>.

Культури виду *L. casei*, унаслідок свого «кишкового» походження, потребували більшого адаптаційного періоду перед активним ростом — від 2,94 до 3,20 год (табл. 7). Після фази затримки росту вони росли

Таблиця 7. Показники росту лактобактерій у молоці

Штаму	МЗА, год	Чисельність бактерій, лг КУО/см <sup>3</sup>	$\mu_{\max}$ , год <sup>-1</sup>	$T_1$ , год	$v$ , год <sup>-1</sup>	$g$ , год
<i>S. thermophilus</i>						
21	5,0	8,50	0,97	0,22	1,08	0,94
37	6,0	8,31	0,91	0,30	0,85	1,18
<i>L. acidophilus</i>						
35	5,0	8,47	0,76	1,76	0,51	2,00
310	5,5	8,20	0,90	1,95	0,56	1,80
<i>L. casei</i>						
205	21,0	7,90	0,26	3,08	0,15	6,67
218	24,0	7,00	0,11	3,20	0,10	11,11
302	16,5	8,25	0,42	2,94	0,20	5,00
330	19,5	8,00	0,37	3,00	0,17	5,88

з помірною швидкістю  $\mu_{\max}$  (0,11–0,42) год<sup>-1</sup> тривалий час — від 7 до 10 год залежно від штаму. Штам *L. casei* 302 вирізнявся найкоротшим терміном регенерації клітин — в 1,2–2,2 раза меншим порівняно з іншими штамми цього виду та найвищою продуктивністю —  $8,25 \pm 0,5$  lg КУО/см<sup>3</sup>. Активність зсідання молока цим штамом була також в 1,2–1,5 раза вищою порівняно з ними. Отже, темп росту в молоці цього штаму свідчить про ефективність проведеної селекції в напрямі адаптації до молока.

Ці дані мають важливе значення для розроблення складу живильного середовища з метою нагромадження біомаси дослідних культур у процесі виробництва бактеріальних препаратів.

Відомо, що чутливість заквашувальних культур до інфікування фагом створює низку ускладнень під час виробництва різноманітної кисломолочної продукції та сирів і призводить до суттєвих економічних втрат [10]. Тому було досліджено таку важливу для молочної галузі властивість заквашувальних культур, як здатність протистояти шкідливому впливові фагів. Встановлено, що селекціоновані штамми були фагорезистентними щодо промислових видоспецифічних вірулентних бактеріофагів із колекції відділу біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН України.

Культури мали гомогенну популяцію клітин зі стабільними характеристиками (коефіцієнти варіації 2–3%) і за сукупністю біологічних властивостей їх визнано перспективними об'єктами у подальших біотехнологічних розробках.

Таким чином у результаті цілеспрямованої селекції за критеріями, що характе-

ризують вияв функціональної активності *in vivo*, із природних джерел було виділено 3 промислово важливі штамми: *L. casei* 302, *L. acidophilus* 35 і *S. thermophilus* 21. Встановлено високий біологічний потенціал відібраних культур лактобактерій, здатний забезпечити стабільність перебігу технологічного процесу виробництва та необхідні характеристики бактеріальних препаратів і ферментованих ними продуктів; у дослідках *in vitro* показано, що відібрані штамми характеризуються здатністю знижувати рівень холестеролу та лактози за ферментації молока і є фагорезистентними. Крім того, вони є стійкими до впливу жовчі та кислоти, антагоністично активні щодо патогенних і умовно патогенних бактерій, мають адгезивні властивості. На підставі проведених досліджень складено технологічні паспорти на штамми, проведено їх депонування в Національній колекції промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України. Штам *L. casei* 302 захищено патентом України № 12788.

Роботу виконано відповідно до Науково-технічних програм НААН України в межах виконання службового завдання за темами: 31.01 «Провести відбір та селекцію штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями, перспективних для використання у виробництві молочних продуктів спеціального призначення»; 69.06 «Удосконалити біотехнології отримання бактеріальних препаратів для виробництва ферментованих продуктів з використанням мікроорганізмів різних таксономічних груп».

Висловлюю вдячність доктору технічних наук Н. Ф. Кігель за цінні поради та допомогу у проведенні досліджень.

## REFERENCES

1. Lantinen S., Ouwehand A., Salminen S., Wight A. Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Fourth edition. CRC Press New RC Press: New York. 2012. P. 2–13.
2. Poltav's'ka O. A., Kovalenko N. K., Uspen's'kii I. G. Screening of strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria for probiotic properties. *Mikrobiologiya i biotekhnologiya*. 2011, N 1, P. 6–16. (In Ukrainian).
3. Gudkov A. V. Cheesemaking: technological, biological and physical and chemical aspects. Moscow: Deli print. 2004. 250 p. (In Russian).
4. Marcy M., Moineau S., Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*. 2012, 2 (3), 149–155.
5. Lapach S. N., Chubenko A. V., Babich P. N. Statistical methods in biomedical studies using Excel. Kyiv: Morion. 2001. 408 p. (In Russian).
6. Eresko G. O., Kigel N. F., Zhogan G. V. Acid resistance of industrial strains of lactic acid bacteria. *Visnyk ahrarnoi nauk*. 2003, N 5, P. 66–68. (In Ukrainian).
7. Bos R., van der Mei H., Busser H. Physicochemistry of microbial adhesive interactions — its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* 1999, 23(2), 179–230.
8. Marushko U. V., Kigel' N. F., Rozhanskaya A. M., Zholobak N. M. Study microbial coenosis tonsils of healthy and sickly children. *Mikrobiol. zh.* 1999, 61(2), 74–78. (In Ukrainian).



9. *Brashears M., Gilliland S., Buck L.* Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *L. Casei*. *J. Dairy Sci.* 1998, 81(8), 2103–2110.

10. *Garneau J., Moineau S.* Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories.* 2011, 10(2), 1–10.

## ПОИСК И СВОЙСТВА ЛАКТОБАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

*О. В. Науменко*

Институт продовольственных ресурсов  
НААН Украины, Киев

*E-mail: naumenkoo@list.ru*

Целью работы был поиск биологически активных штаммов лактобактерий, перспективных в производстве функциональных молочных продуктов. Объектом исследования были молочнокислые бактерии, изолированные из кишечника здоровых людей и некоммерческих молочных продуктов. Применены современные методологические подходы и отобраны штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* 302, *Lactobacillus acidophilus* 35 и *Streptococcus thermophilus* 21 с высоким уровнем биологической активности. Установлен высокий биологический потенциал отобранных культур лактобактерий, способный обеспечить стабильность протекания технологического процесса производства и необходимые характеристики бактериальных препаратов и ферментированных ими продуктов. В опытах *in vitro* показано, что селекционированные штаммы характеризовались важными промышленными свойствами, а именно: способностью снижать уровень холестерина и лактозы при развитии в молоке, устойчивостью к вирулентным бактериофагам и агрессивным соединениям желудочно-кишечного тракта, высокой антагонистической и адгезивной активностью.

**Ключевые слова:** *Lactobacillus casei*, селекция, адгезия, холестерин.

## SEARCH AND PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA PROSPECTIVE FOR BIOTECHNOLOGY

*O. V. Naumenko*

Institute of Food Resources of the National  
Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: naumenkoo@list.ru*

Search of biologically active *Lactobacillus* strains prospective for functional milk food production was the aim of the research. The study involved the lactic acid bacteria isolated from biological material of healthy human and non-dairy lactic products. Using modern methodological approaches, the strains of lactic acid bacteria such as *Lactobacillus casei* 302, *Lactobacillus acidophilus* 35 and *Streptococcus thermophilus* 21 having high level of biological activity were selected. High biological potential of selected cultures of lactic acid bacteria, which could provide stability for the technological process of production and essential characteristics of bacterial preparations and fermented their products, was set. *In vitro* the experiments demonstrated that selected strains had valuable production properties, namely the ability to reduce level of cholesterol and lactose during development in milk, were resistant to virulent bacteriophages and aggressive compounds of the gastrointestinal tract, and high adhesive and antagonistic activities as well.

**Key words:** *Lactobacillus casei*, selection, adhesive activities, cholesterol.