



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ПОЛУЧЕНИЕ ХОЛОДОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЗАКВАСОК ПРОБИОТИКА “НАРИНЕ”

Գ.Գ. ՕԳԱՆԵՍՅԱՆ, Ա.Ա. ԲԱՐՏԵԳՅԱՆ, Շ.Շ. ՕԳԱՆԵՍՅԱՆ,
Ա.Վ. ՄԱՐՄՅԱՆ, Գ.Գ. ԳՐԻԳՐՅԱՆ

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
hhov@sci.am

Одним из эффективных способов продления срока хранения кисломолочных продуктов является использование холодочувствительных заквасок. Показано, что среди устойчивых к рифампицину мутантов штамма *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602, используемого в качестве закваски диетического кисломолочного продукта “Нарине”, с частотой 1,2 % удается отобрать холодочувствительные мутанты (CSM), не размножающиеся при минимальной температуре роста. Многие из отобранных мутантов сохраняли характерную для родительского штамма скорость ферментации молока, накопления биомассы, а также титруемую кислотность, вязкость, вкус и консистенцию сквашенного продукта. Один из мутантов CSM-12 по технологическим и органолептическим характеристикам кисломолочного продукта даже превосходил родительский штамм.

Закваска – “Нарине” – рифампицинустойчивые мутанты – холодочувствительные закваски – накопление биомассы – скорость сквашивания – титруемая кислотность

Կաթնամթերքի պահպանման ժամկետը երկարացնելու առավել արդյունավետ միջոցներից է ցրտազգայուն մերանների օգտագործումը: Ցույց է տրվել, որ Նարինե է դիետիկ կաթնամթերքի մերան հանդիսացող *Lactobacillus acidophilus* ԻՆՄԻԱ-9602 շտամի ռիֆամպիցինի հանդեպ կայուն մուտանտներից 1,2%-ը չի բազմանում աճի մինիմալ ջերմաստիճանում: Ընտրված ցրտազգայուն (CSM) մուտանտների զգալի մեծամասնությունը կաթի ֆերմենտացիայի արագությամբ, կենսազանգվածի կուտակմամբ, ինչպես նաև թթվայնությամբ, մածուցիկությամբ, համով և կոնսիստենցիայով չեն զիջում ծնողական շտամին: Նրանցից *L. acidophilus* CSM-12 մերանը տեխնոլոգիական և կաթնամթերքի օրգանոլեպտիկ հատկանիշներով նույնիսկ գերազանցում է ծնողական շտամին:

Պրոբիոտիկ կաթնամթերք – Նարինե – ռիֆամպիցին կայուն մուտանտներ – ցրտազգայուն մերան – կենսազանգվածի կուտակում – մերան արագություն – տիտրվող թթվայնություն

The use of cold-sensitive starter cultures is an effective way to increase the shelf life of milk products. It has been revealed that from rifampicin-resistant mutants of *Lactobacillus acidophilus* INMIA 9602, which serves as starter for fermentation of probiotic dairy food “Narine”, 1.2 % aren't propagate under minimal temperature. Numerous of rif cold sensitive CSM mutants retained properties of parental strain rate of milk fermentation, biomass accumulation, as well as titratable acidity, viscosity, flavor and texture of fermented milk. One of the mutants CSM-12 possesses even better technological and organoleptic characteristics.

The starter of dietary sure-milk product “Narine” – rifampicin-resistant mutants – cold sensitive mutants – biomass accumulation – milk fermentation – titratable acidity

Срок хранения молочных продуктов во многом определяется способностью заквасочных культур проявлять метаболическую активность в период стабилизации (созревания) и хранения при низких температурах. Повышение чувствительности заквасочных культур к низким температурам может способствовать сохранению качества кисломолочных продуктов в более длительное время.

Предельные температуры роста микроорганизмов в основном определяются термочувствительностью одного или нескольких белков. Повышение холодоустойчивости одновременно нескольких белков при помощи мутаций очень трудоемкий процесс. В таких случаях идут путем получения ступенчатых мутаций, что требует много времени и материальных затрат. С другой стороны, мутационные изменения термочувствительности ключевых белков, участвующих в таких глобальных процессах клетки какими являются редупликация ДНК, транскрипция РНК, биосинтез белков или деление клетки, могут привести к термочувствительному фенотипу клетки. Известно также, что мутации компонентов белок синтезирующего аппарата (РНК полимеразы, рибосом, аминацил т-РНК синтетаз и т-РНК) нередко обладают плейотропным действием, выражающемся в одновременном изменении целого ряда свойств (признаков) клетки [1, 2, 5, 8, 9, 10, 12, 17]. Наиболее выраженным плейотропным эффектом обладают мутации, приводящие к рифампицин и/или стрептомицин устойчивости, затрагивающие биосинтез РНК и белков. Ранее нами было показано, что среди устойчивых к рифампицину мутантов молочнокислых бактерий с достаточно высокой вероятностью можно отобрать штаммы, обладающие плейотропным фенотипом, проявляющимся в изменении морфологии колоний, удельной скорости роста, скорости сквашивания молока, титруемой кислотности и органолептических свойств сквашенного продукта [5, 6, 7].

Целью настоящей работы является отбор холодоустойчивых мутантов у штамма *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602 с использованием мутаций, придающих устойчивость к рифампицину.

Материал и методика. Закваску кисломолочного диетического продукта "Нарине" штамм *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602, имеющий оптимальную (T_{opt}) 37-42°C, минимальную (T_{min}) 21°C и максимальную (T_{max}) 48°C температуры роста, получили из Республиканского центра депонирования микроорганизмов (РЦДМ), г. Абовян, Армения.

Питательные среды LАРТ_g бульон, LАРТ_g агар [16] и обезжиренное молоко.

Спонтанные, устойчивые к рифампицину мутанты, получали высевом около 10^9 клеток *L. acidophilus* 9602 на LАРТ_g агар при 100 мкг/мл рифампицина.

Чувствительность культур к температуре определяли с помощью игольчатого репликатора с 50-ю гнездами, куда заливали по 0,3 мл физиологического раствора и с помощью стерильной иглы инокулировали колонии, чашки-реплики ставили на разные температуры и после роста отбирали не выросшие при перmissive температурах мутанты. Для определения накопления биомассы мутантов ночные культуры в соотношении 1/1000 инокулировали в LАРТ_g бульоне, инкубировали при разных температурах и на следующий день определяли оптические плотности (ОП) на фотокolorиметре КФК-2МП при длине волны 590 нм.

Для определения скорости свертывания молока из ночных культур по 0,2 мл переносили в пробирки, содержащие 1,8 мл стерильного обезжиренного молока, ставили в термостат на 37°C и регистрировали время образования сгустков [4]. Кислотность ферментированного молока определяли титриметрическим методом, выражая в градусах Тернера (°Т) [4, 15].

Все эксперименты проводили в 3-5 повторностях. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием теста Стьюдента, принимая значение критерия $p < 0,05$ достаточным для достоверной разницы в результатах.

Результаты и обсуждение. На основании ранее полученных данных по определению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) рифампицина, которая составляла < 20 мкг/мл [5], отбор устойчивых к рифампицину мутантов проводили на среде LAPT_g, содержащей 100 мкг/мл рифампицина высевом (3-5) × 10⁹ клеток штамма ИНМИА 9602. Частота встречаемости устойчивых к рифампицину (*Rif^r*) колоний составляла ~10⁻⁸. Среди проверенных 500 *Rif* мутантов при T_{min} (21°C) *L. acidophilus* ИНМИА-9602 удалось отобрать шесть штаммов, утративших способность расти при минимальной перmissive температуре, названные CSM (cold sensitive mutant).

Результаты определения МИК рифампицина и роста при предельных перmissive температурах у холодочувствительных CSM мутантов в LAPT_g бульоне приведены в табл.1.

Табл. 1. Устойчивость к рифампицину и температурный профиль CSM культур

Штаммы	МИК рифампицина, мкг/мл	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Предельные и оптимальные температуры роста, °C		
			T _{min}	T _{opt}	T _{max}
9602	> 20	0.38±0.2	21	37 - 42	48
CSM12	> 1600	0.48±0.4	27	37 - 42	48
CSM131	> 1600	0.28±0.3	24	37 - 42	48
CSM231	> 1600	0.31±0.3	30	37 - 42	48
CSM332	> 1600	0.25±0.4	24	37 - 42	45
CSM373	> 800	0.38±0.2	24	37 - 42	45
CSM413	> 800	0.43±0.25	30	37 - 45	48

Как видно из табл. 1, по устойчивости к рифампицину мутанты превосходят родительский штамм от 40 до 80 раз. Так, у четырех мутантов МИК рифампицина была выше 1600 мкг/мл, а у оставшихся двух – выше 800 мкг/мл. В присутствии указанных концентраций антибиотика мутанты сохраняли способность к свертыванию молока. Определение минимальной температуры роста выявило, что за счет *rif^r* мутаций минимальные температуры роста у CSM мутантов повысились от 3 до 9 градусов. При этом оптимальная температура роста у мутантов не изменилась, оставаясь в пределах 37-42°C. Влияние *rif^r* мутаций отразилось также на удельной скорости роста (μ). Наивысшей удельной скоростью роста обладал мутант CSM-12, а наименьшей CSM-332, остальные существенно не отличались от родительского штамма. У двух мутантов, CSM-332 и CSM-373 T_{max} снизилась до 45°C.

В связи с тем, что основным показателем качества пробиотического продукта является количество жизнеспособных микроорганизмов [14], у CSM мутантов была изучена способность к накоплению биомассы при указанных в табл. 1 критических для каждого температурах роста. Накопление биомассы CSM мутантов определяли по оптической плотности, после 18 ч роста в LAPT_g бульоне при оптимальной и субэкстремальных температурах (рис.1).

Как видно из рис. 1, при T_{opt} наибольшее накопление биомассы наблюдается у мутантов CSM 12 и CSM 413, остальные мутанты по этому признаку мало отличались от родительского штамма. Эти два мутанта, по сравнению с остальными, при температурах 37-42°C в среде LAPT_g, обладали более высокой удельной скоростью роста. При субэкстремальных температурах уровень накопления биомассы мутантов (кроме CSM 12 и CSM 413) незначительно отличался от родительского штамма.

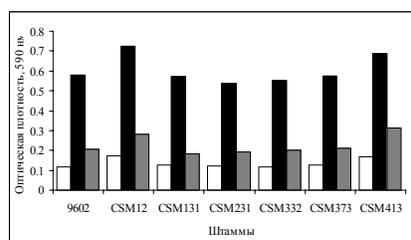


Рис. 1. Накопление биомассы в среде LAPTg при минимальных (светлые столбцы), оптимальных (темные столбцы) и максимальных (серые столбцы) температурах.

Показано, что в процессе ферментации молока температура является одним из основных факторов, влияющих на скорость свертывания, текстуру и органолептические качества конечного кисломолочного продукта [3, 13]. В связи с этим была изучена температурная зависимость ферментации молока мутантными культурами. Ферментации проводились в диапазоне температур от 21°C до 48°C.

Как видно из табл. 2, все мутанты в изученном диапазоне температур с разной скоростью свертывали молоко. При этом свертывание молока при предельных температурах протекало значительно медленнее, чем при оптимальной (табл. 2).

Табл. 2. Скорость свертывания молока CSM мутантами при различных температурах

Штаммы	Температурный профиль ферментации молока, °C								
	21	24	27	30	37	42	45	48	
9602	+	+	++	++	+++	+++	++	++	
CSM12	-	-	-	++	++++	+++	+++	++	
CSM131	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	
CSM231	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	
CSM332	-	++	++	++	+++	+++	++	-	
CSM373	-	-	-	++	+++	+++	++	-	
CSM413	-	-	-	++	++++	+++	+++	++	

- не сквашивает; + сквашивает за 24 часа; ++ сквашивает за 12 часов;
+++ сквашивает за 6-8 часов; ++++ сквашивает за <6 часов.

Были изучены технологический профиль мутантных культур и органолептические свойства ферментированных ими кисломолочных продуктов при оптимальной температуре (табл.3).

Табл. 3. Скорость сквашивания молока CSM заквасками и качество кисломолочных продуктов

Мутант	Скорость свертывания молока, час	Титруемая кислотность, °T	Вязкость, мПа·с	Вкус	Консистенция
9602	5.25±0.4	80±12	146	кислый	тягучая
CSM12	4.25±0.25	70±18	181	слабокислый	слабо тягучая
CSM131	6.75±0.4	85±10	111	невывраженный	тягучая
CSM231	5.5±0.5	82±13	128	кислый	тягучая
CSM332	7.75±0.25	95±8	108	невывраженный	тягучая
CSM373	5.5±0.25	80±21	139	кислый	тягучая
CSM413	5.0±0.3	75±17	176	слабокислый	слабо тягучая

В ряде случаев мутации, определяющие устойчивость к рифампицину, оказывали положительное влияние на скорость ферментации молока. Так, мутант CSM12 на 1 ч быстрее сквашивал молоко, чем контрольная культура, а титруемая кислотность была ниже на 14°Т. Эти показатели были также несколько выше у мутанта CSM413. Мутанты GSM231 и CSM373 ведут себя почти также как исходный штамм. Остальные мутанты (CSM131 и CSM413) имели более низкие скорости сквашивания молока и титруемую кислотность сквашенного продукта.

Таким образом, удалось показать, что среди Rif^r мутантов с частотой около 1,2% можно отобрать холодоустойчивые закваски, не уступающие родительскому штамму по скорости роста, ферментации молока и качеству ферментированного кисломолочного продукта. Обнаруженные отклонения в лучшую или худшую сторону можно объяснить плеiotропным проявлением *rif^r* мутаций [4,5,6]. Один из мутантов, CSM12 по всем технологическим и органолептическим характеристикам превосходил родительский штамм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abad J.P., Amils R.* Location of the streptomycin ribosomal binding site explains its pleiotropic effects on protein biosynthesis. *J.Mol.Biol.*, 235, 1251-1260, 1994.
2. *Dennis P.* Transcription and translation in a pleiotropic streptomycin-resistant mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 137, 1, 197-203, 1979.
3. *Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N., & Corrieu, G.* Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yoghurt. *Journal of Dairy Science*, 82, 673–781, 1999.
4. *Dairy processing handbook / Ed.G. Bylund.* Tetra Pak Processing Systems AB, S221 86 Lund, Sweden, 436, 1995.
5. *Hovhannisyann H.G., Barseghyan A.A., Grigoryan N.G., Topchyan A.V.* Genetic improvement of technological characteristics of starters for fermented milk products. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46, 4, 395–399, 2010.
6. *Huys G., D'Haene K., Swing J.* Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34, 402-406, 2002.
7. *Hummel A.S., Hertel C., Holzapfel W.H., and Franz C.M. A.P.* Antibiotic Resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3, 730-739, 2007.
8. *Ingham C. J., Furneaux P.A.* Mutations in the β subunit of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase that confer both rifampicin resistance and hypersensitivity to NusG. *Microbiology*, 146, 3041–3049, 2000.
9. *Jin D., J. Gross C.A.* Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171, 9, 5229-5231, 1989.
10. *Kogoma T.* *Escherichia coli* RNA polymerase mutants that enhance or diminish the SOS response constitutively in the absence of RNase HI activity. *J. Bacteriol.*, 176, 5, 1521-1523, 1994.
11. *Lucey, J. A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T., & Walstra, P.* Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-delta-lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*, 7, 389–397, 1997.
12. *Maughan H., Galeano B., Nicholson W.L.* Novel *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on *Bacillus subtilis*: Global effects on growth, competence, sporulation, and germination *J. Bacteriol.*, 186, 8, 2481–2486, 2004.
13. *Radke-Mitchell, L., & Sandine, W. E.* Influence of temperature on association growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 69, 2558–2568, 1986.

14. *Shafiee G., Mortazavian A.M., Mohammadifar M.A., Koushki M.R., Mohammadi A., Mohammadi R.* Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 12, 1265-1274, 2010.
15. *Tamime A.Y., Robinson R.K.* Yoghurt: science and technology. Woodhead Publishing Ltd., 345 p., 2011.
16. *Huys G., D'Haene K., Swing J.* Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34, 402-406, 2002.
17. *Vanigelgem F., Zamfir M., Adriany T., De Vuyst L.* Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *J. of Appl. Microbiol.*, 97, 1257-1273, 2004.
18. *Zengel J. M., Young R., Dennis P. P., Nomura M.* Role of ribosomal protein S12 in peptide chain elongation: Analysis of pleiotropic, streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 129, 3, 1320-1329, 1977.

Поступила 12.10.2012