

ВЫЯВЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО ИСТОЧНИКА ДЛЯ ИЗОЛИРОВАНИЯ УКСУСНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Боиштян А.В.¹, канд. техн. наук,
Кирсанова А.И.¹, доктор биол. наук,
Рубцов С.Л.¹, доктор техн. наук,
Киселица Н.², доктор биол. наук

¹ Технический Университет Молдовы, Кишинёв, Республика Молдова

² Институт Микробиологии и Биотехнологии, Кишинёв, Республика Молдова

Ключевые слова: бактерии *Acetobacter*, чистые культуры, уксусная кислота, уксус, ферментация

Аннотация

Представлены результаты исследований по изолированию уксуснокислых бактерий с гроздьев винограда, виноматериалов и органического уксуса и выявление максимального источника активных и жизнеспособных уксуснокислых бактерий для дальнейшего использования в производстве. В результате было выявлено 2 наиболее подходящих источника для изолирования чистых культур уксуснокислых бактерий – сброженное до уксуса винное сусло и вино с повышенной кислотностью, в них бактерии находятся в наибольшем количестве и в активной форме. Гроздь винограда тоже достаточно хороший источник уксуснокислых бактерий, но из-за разнообразной микрофлоры, процесс изолирования является длительным и трудоёмким. Изолированные бактерии *Acetobacter aceti* дали хорошие результаты – подтвердили принадлежность к данной группе при тестировании: Gr+, положительный тест на каталазу, положительный тест с КОН, при ферментации в течение 14 дней титруемая кислотность была более 5%.

Введение

В последнее десятилетие возрос интерес к проблеме питания и производству качественных продуктов, в том числе и органического уксуса, для производства которого необходимы активные уксуснокислые бактерии [1]. Уксуснокислые бактерии являются строго аэробными микроорганизмами, грамотрицательными, каталаза положительными и оксидаза негативными, эллипсоидные или палочковидные клетки, которые могут встречаться по одиночке, парами или цепочками. Они также являются мезофильными микроорганизмами, и их оптимальная температура роста составляет от 25 до 30 °С. Оптимальный pH для их роста составляет 5,0–6,5, но они также могут расти при более низких значениях pH [2]. Уксуснокислые бактерии, очень широко распространённые в природе. Они способны окислять этанол в качестве субстрата с образованием уксусной кислоты в нейтральной и кислой среде в аэробных условиях. Вышеупомянутые характеристики позволяют использовать их в производстве ферментированных продуктов либо с пользой (шоколадные изделия, кофе, уксус и специальное пиво), либо с вредом (порча пива, вина, сидра и молочнокислых продуктов), а также в производстве коммерчески важных химических веществ. *Acetobacter* и *Gluconobacter* – два основных рода уксуснокислых бактерий, используемые для ферментации и получения уксусной кислоты [3, 4].

Целью исследования являлось выделение этих бактерий из местных сортов винограда и продуктов их переработки, изучение источников живых и сильных микроорганизмов и идентификация чистых культур уксуснокислых бактерий.

Материалы и методы

Для исследования было взято местное сырьё: ягоды винограда сорта Nova (Кэлэрашский район год урожая 2019) и продукты его переработки (белое вино 2019 года, окисленное белое вино 2018 года, сброженное до уксуса винное сусло, лаборатор-

IDENTIFICATION OF THE OPTIMAL SOURCE FOR ISOLATION OF ACETIC BACTERIA

Boistean A.V.¹, Chirsanova A.I.¹,
Rubtov S.L.¹, Chiselita N.²

¹ Technical University of Moldova

² Institute of Microbiology and Biotechnology

Key words: bacteria *Acetobacter*, pure cultures, acetic acid, vinegar, fermentation

Abstract

The article presents the results of studies on the isolation of acetic acid bacteria from bunches of grapes, wine materials and organic vinegar, and the identification of the maximum source of active and viable acetic acid bacteria for further use in production. As a result, 2 most suitable sources for isolating pure cultures of acetic acid bacteria were identified – wine must fermented to vinegar and wine with high acidity, in which the bacteria are in the greatest amount and in active form. Bunches of grapes are also a fairly good source of acetic acid bacteria, but due to the diverse microflora, the isolation process is lengthy and laborious. Isolated bacteria *Acetobacter aceti* gave good results – they confirmed their belonging to this group when tested: Gr+, positive test for catalase, positive test with KOH, during fermentation for 14 days the TA was more than 5%.

ного производства) и промышленный уксус (нефильтрованный и непастеризованный) [5]. Изолирование чистых культур уксуснокислых бактерий проводили с использованием общепринятых методов [6] на трёх плотных дифференциально-диагностических средах: GYC (глюкоза 10 г, дрожжевой экстракт 1,0 г, карбонат кальция 2,0 г, агар 1,5 г, pH = 6,8) [7], RAE (глюкоза – 40 г, пептон – 10 г, дрожжевой экстракт – 10 г, лимонная кислота – 0,15 г, Na₂HPO₄ × 2 H₂O – 0,38 г, pH = 3,8, ледяная уксусная кислота – 0,5 мл и абсолютный спирт – 1 мл добавлялись в чашку Петри) [8] и HOYER'S ((NH₄)₂SO₄ – 1 г, K₂HPO₄ – 0,1 г, KH₂PO₄ – 0,9 г, MgSO₄ – 0,25 г, C₂H₅OH – 30 мл, Fe Cl31% – 0,5 г, агар – 15 г) [9]. Среда были изготовлены и сертифицированы в Институте Микробиологии и Биотехнологии Академии Наук Молдовы. Культивирование, хранение и изучение бактерий осуществлялись в лабораториях Факультета Пищевых Технологий в термостате при температуре 27 ± 1 °С в течение 3–5 дней. Идентификацию изолятов осуществляли по морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим признакам, учитывая характерные для ацетобактерий свойства [10].

Результаты и обсуждение

На всех исследуемых материалах в большем или меньшем количестве обитают уксуснокислые бактерии. Первоочередной задачей было выделить эти бактерии, определить их видовую принадлежность, а также выделить потенциальный источник живых и сильных уксуснокислых бактерий. Первый посев провели глубинным методом, так как при таком методе колонии вырастают не сплошным газоном, а изолированно, что дало возможность детально изучить культуральные свойства выросших колоний. Было проведено три параллельных инокулирования с целью минимизировать погрешности и иметь средние результаты по каждой из трёх сред.

Результаты посева представлены в **таблице 1**, можно отметить, что колонии микроорганизмов выросли выборочно.

Результаты роста микроорганизмов

Таблица 1

Объекты исследования	Питательная среда для микроорганизмов		
	GYC	RAE	Hoyer's
Виноград белый сорта Nova	+	-	+
Белое вино сорта Nova 2019 года	+	-	-
Окисленное белое вино сорта Nova 2018 года	+	+	+
Уксус винный бутилированный, промышленный	-	+	-
Сброженное до уксуса винное сусло	+	+	-

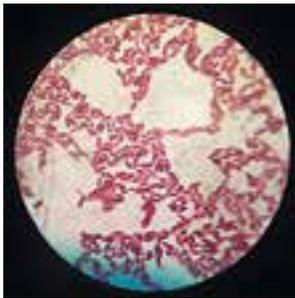
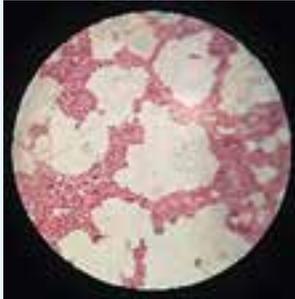
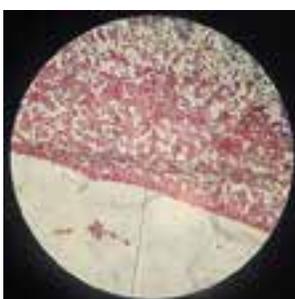
+ наличие роста; - отсутствие роста.

После изучения количественного и качественного состава микроорганизмов можно сделать предварительный вывод, что по степени обсеменённости микроорганизмами гроздь винограда стоят на первом месте, так как микроорганизмы, выделенные с данного материала, проросли на двух питательных средах из трёх, причём на каждой из чашек Петри выросло по несколько видов колоний сразу, что свидетельствует о большом разнообразии микроорганизмов, находящихся на поверхности ягод

и контактных объектах (воздух, почва, вегетация). Среди этого разнообразия выделяются и уксуснокислые бактерии, но ввиду большого числа микроорганизмов изолирование является длительным и трудоёмким. Белое вино 2019 года, также не является достаточно массивным источником уксуснокислых бактерий. Их количество незначительно, так как колонии выросли лишь на одной питательной среде из трёх и то в достаточно небольшом количестве. Окисленное белое вино 2018 года является более подходящим источником уксуснокислых бактерий, их количество доминирует над всеми остальными. Различного вида колонии выросли на всех трёх питательных средах, 2 вида из которых, согласно морфологической и культуральной характеристике клеток, можно отнести к уксуснокислым бактериям. Из промышленного уксуса на основе белого вина удалось выделить небольшое количество микроорганизмов, которые проросли лишь на одной из питательных сред, хотя производитель отмечает, что продукт является непастеризованным, нефильтрованным и содержит культуру ацетобактерий. Можно предположить, что при завершении процесса брожения уксуснокислые бактерии теряют свою активность и погибают или, возможно, был добавлен какой-либо консервант. Колонии микроорганизмов из ферментированного уксуса лабораторного производства проросли на двух питательных средах из трёх, что является хорошим результатом. Согласно морфологическим и культураль-

Таблица 2

Морфологические и культуральные признаки микроорганизмов, выросших при изолировании

№	Питательная среда	Культуральные признаки колоний	Изображение	Морфологические признаки	Микроскопическое изображение
1	2	3	4	5	6
1	Hoyer's	Рельеф – плоский Цвет – белоснежный Край – волнистый Форма – неправильная структура волокна Блеск – матовая Размер – Ø 5–8 мм Прозрачность – непрозрачная		Беспоровые палочки с овальным краем, среднего размера	
2	GYC	Профиль – плоский Цвет – бежевый с желтоватым оттенком Край – ровный-гладкий Форма – неправильная, сплошная Блеск – присутствует Размер – 2–7 мм Прозрачность – прозрачная		Грамм-округлые микроорганизмы среднего размера	
3	RAE	Профиль – плоский Цвет – белесый Край – волнистый Форма – круглая, неправильная Блеск – присутствует Размер – 1–3 мм Прозрачность – полупрозрачная		Микроорганизмы, мелкого размера, встречаются и овальные формы	

ным признакам данные микроорганизмы можно причислить к уксуснокислым бактериям рода *Acetobacter*. Факт, что на каждой из чашек Петри выросло только по одному виду колоний, даёт возможность дальнейшего пересева и изолирования.

Дальнейшие исследования были направлены на изолирование чистой культуры из выделенных микроорганизмов и их тестированию.

Исходя из данных, представленных в **таблице 2**, можно сделать вывод, что колонии со среды Hoyer's (виноград и окисленное вино) схожи между собой, а именно характерный белый цвет, матовость, непрозрачность. Изучив морфологию клеток под микроскопом, можно отметить, что клетки принадлежат к одному и тому же типу – крупные, цилиндрической формы. Данные клетки не схожи по характеристикам с уксуснокислыми бактериями и поэтому в дальнейших анализах не выделяются и не изучаются.

При исследовании колоний со среды GYC (сброженное до уксуса винное сусло) можно заметить характерные прозрачные ореолы, образованные вокруг колоний. Этот признак свойственен уксуснокислым бактериям, так как некоторые из них во время своей жизнедеятельности потребляют кальций, а данный элемент является одним из ингредиентов питательной среды GYC. При изучении клеток под микроскопом можно сделать вывод, что согласно морфологическим и культуральным характеристикам (палочки мелких и средних размеров) данные клетки являются уксуснокислыми бактериями рода *Acetobacter*, вида *Acetobacter aceti* и *Acetobacter rancens*.

Колоний на среде RAE (окисленное вино 2018) выросло немного, но по культуральным признакам схожи с уксуснокислыми бактериями – полупрозрачность, присутствие блеска. То, что данные микроорганизмы являются уксуснокислыми бактериями, доказывает также и микроскопическое изображение, продолговатые клетки очень мелкого размера.

При изучении колоний на среде RAE (сброженное до уксуса винное сусло), можно заметить, что на среде выросло два типа колоний, то есть произошло частичное изолирование. Причиной этому может служить большая концентрация других микроорганизмов, участвующих в процессе брожения в исходном продукте. При микроскопическом изучении были выделены мелкие палочки и крупные овальные клетки, что доказывает, что на среде культивировано два типа микроорганизмов – уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter* и дрожжи рода *Saccharomyces*. Колонии уксуснокислых бактерий отличаются характерным блеском, по цвету светлее колоний дрожжей. Так как есть возможность отделить их друг от друга, то изолированные уксуснокислые бактерии используют в последующих исследованиях и практическом применении.

Конечным этапом исследовательской работы была идентификация уксуснокислых бактерий при помощи качественных реакций: на каталазу, на КОН, окрашивание по Грамму, что даёт нам информацию о физиологии и морфологии клеток, а именно о строении клеточной стенки. А также изолированные бактерии были подвержены тесту на способность окисления спиртов до

уксусной кислоты и её накоплению. Тесты проводились для установления видовой принадлежности к роду уксуснокислых бактерий. Результаты тестов приведены в **таблице 3**.

Бактерии из сброженного до уксуса винного сула со среды RAE и GYC полностью отвечают требованиям, предъявляемым при идентификации уксуснокислых бактерий, а именно:

- ▶ положительный тест на каталазу;
- ▶ положительный тест при взаимодействии с КОН;
- ▶ тест на накопление уксусной кислоты;
- ▶ окраска по Грамму является отрицательной.

Взяв за основу результаты тестов, можно смело утверждать, что полученные бактерии являются уксуснокислыми рода *Acetobacter*. Изолированные бактерии с окисленного вина на среду RAE отвечают лишь одному требованию, согласно данным тестам, – являются Gr- отрицательными. Тест на каталазу не дал результатов, также, как и тест при взаимодействии с КОН.

Изучение способности изолированных бактерий окислять этиловый спирт до уксусной кислоты проводилось на трёх субстратах из белого вина в течение 14 дней. Для оценки степени окисления за основу был взят показатель титруемой кислотности. Данные показывают, что все бактерии имеют высокую способность к окислению в СН₃СООН, так показатели варьируются от 5,2 до 5,7%. Этому свидетельствует также анализ органолептических показателей: наличие «вуали» на поверхности, комплексный аромат, цвет. В дальнейшем бактерии были подвержены тестированию методом ПЦР (real-time PCR), которая на уровне ДНК подтвердила принадлежность изолируемых нами бактерий к роду *Acetobacter* [11].

Выводы

Основной задачей данной исследовательской работы было выделение чистой культуры уксуснокислых бактерий из местных винодельческих продуктов. В результате проведённых опытов можно отметить, что выделить уксуснокислые бактерии из гроздьев винограда достаточно трудно ввиду большого количества других микроорганизмов на его поверхности. Белое вино 2019 года является слабым источником уксуснокислых бактерий, и к там уже преобладают дрожжи. Малое количество уксуснокислых бактерий было выделено и из уксуса промышленного производства, даже при том, что производитель отмечает, что уксус нефильтранный, непастеризованный и без консервантов. В результате сравнительных экспериментов было выявлено, что сильными источниками уксуснокислых бактерий являются белое вино 2018 года с повышенной кислотностью и винное сусло сброженное до уксуса в лаборатории в процессе ферментации. Удалось выделить достаточное количество уксуснокислых бактерий, которые в дальнейшем на стадии идентификации подверглись тестам (на каталазу, с КОН, окраска по Грамму, тест на способность окислять этиловый спирт до уксусной кислоты). Согласно результатам, пробы со сброженного до уксуса винного сула со среды RAE и GYC полностью отвечают требованиям, предъявляемым при идентификации уксусно-

Таблица 3

Качественные реакции уксуснокислых бактерий

№	Источник бактерий	Тест на каталазу	Окраска по Грамму	Тест на КОН	Тест на накопление уксусной кислоты (14 дней), Кислотность %, г\100 мл
1	Окисленное вино 2018 на среде RAE	–	–	–	5,7 ± 0,6
2	Сброженное до уксуса винное сусло на среде RAE	+	–	++	5,2 ± 0,5
3	Сброженное до уксуса винное сусло на среде GYC	+	–	+	5,4 ± 0,9

«+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат

кислых бактерий, а именно положительный тест на каталазу, отрицательная окраска по Грамму, положительный при взаимодействии с КОН. Для бактерий с окисленного вина 2018 года на среду RAE из трёх тестов дал нужный результат только один – окрашивание по Грамму. В заключении можно сказать, что были выделены уксуснокислые бактерии, которые принадлежали к видам *Acetobacter aceti* и *Acetobacter gancens*. Эти микроорганизмы, выделенные из отечественного сырья по их морфологическим, культуральным, физиологическим свойствам являются активными, жизнеспособными, могут быть использованы в промышленном производстве винного уксуса. Следующая работа – по сертификации и апробированию данных уксуснокислых бактерий для производства винного уксуса в РМ и представление культур на хранение в Национальную Коллекцию непатогенных бактерий.

📧 КОНТАКТЫ:

Боиштян Алина Вячеславовна
✉ alina.boistean@toap.utm.md
Кирсанова Аурика Ивановна
✉ aurica.chirsanova@toap.utm.md
Рубцов Сильвия Леонидовна
✉ silvia.rubtov@tpa.utm.md
Киселица Наталья
✉ chiselita.natalia@gmail.com

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	REFERENCES:
1. Панасюк, А.Л. Новое направление в производстве пищевого уксуса / А.Л. Панасюк, Е.И. Кузьмина, А.Л. Борисова // Пищевая промышленность. – 2017. – № 7. – С. 58–60.	Panasyuk, A.L. A new direction in food vinegar production / A.L. Panasyuk, E.I. Kuzmina, A.L. Borisova // Food industry. – 2017. – № 7. – P. 58–60.
2. Sengun, I.Y. Importance of acetic acid bacteria in food industry / I.Y. Sengun, S. Karabiyikli // Food control. – 2011. – V. 22. – № 5. – P. 647–656. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008 .	
3. Cousin, F.J. Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions / F.J. Cousin, R. Le Guellec, M. Schlusshuber, M. Dalmaso, J.-M. Laplace, M. Cretenet // Microorganisms. – 2017. – V. 5. – № 3. – P. 39. https://doi.org/10.3390/microorganisms5030039 .	
4. Генюш, И.В. Выделение и характеристика бактерий – продуцентов уксусной кислоты / И.В. Генюш, В.Ю. Кузьмицкая, Н.А. Белясова // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. – 2015. – № 4. – С. 89–93.	Henius, I.V. Isolation and characterization of bacteria producing acetic acid / I.V. Henius, V. Yu. Kuzmitskaya, N.A. Belyasova // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series. – 2015. – № 4. – P. 89–93.
5. Batt, C.A. Encyclopedia of Food Microbiology / C.A. Batt, R. Robinson // Academic Press. – 2014. – 3248 p. ISBN978-0-12-384733-1.	
6. Ohmori, S. Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Acid Fermentation at High Temperature / S. Ohmori, H. Masai, K. Arima, T. Beppu // Agricultural and Biological Chemistry. – 1980. – V. 44. – № 12. – P. 2901–2906. DOI: 10.1080/00021369.1980.10864432.	
7. Sharafi, S.M. Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods / S.M. Sharafi, I. Rasooli, K. Beheshti-Maal // Iranian Journal of Microbiology. – 2010. – V. 2. – № 1. – P. 38–45.	
8. Mamlouk, D. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation / D. Mamlouk, M. Gullo // Indian Journal of Microbiology. – 2013. – V. 53. – № 4. – P. 377–384. https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z .	
9. Trček, J. The highly tolerant acetic acid bacterium <i>Gluconacetobacter europaeus</i> adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression / J. Trček, K. Jernejc, K. Matsushita // Extremophiles. – 2007. – V. 11. – № 4. – P. 627–635. https://doi.org/10.1007/s00792-007-0077-y .	
10. Joao Nuno Serodio de Melo. Dissertation – Microbiology of Vinegar: from Isolation, Phenetic Characterization and Detection of Acetic Acid Bacteria to Microbial Profiling of an Industrial Production. 2016 [Electronic resource: https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/microbio/dissertacao/846778572211566 (Access date 23.09.2020)].	
11. Boistean, A. The methodological aspects of using real-time pcr in acetobacter detection / A. Boistean, A. Chirsanova, D. Zgardan, I. Mitina, B. Gaina // Journal of Engineering Science. – 2020. – V. XXVII. – № 3. – P. 232–238. http://doi.org/10.5281/zenodo.3949726 .	