

**Відбір штамів мікроорганізмів для сироробства за стійкістю до
інгібіторів у молоці**

*Шульга Н.М., кандидат технічних наук,
Кігель Н.Ф., доктор технічних наук,
Технологічний інститут молока та м'яса УААН*

Проведено скринінг штамів молочнокислих та пропіоновокислих бактерій за чутливістю до дії нітрату калію, залишків перекису водню і активного хлору та відібрано культури, перспективні для виробництва сичужних сирів.

З-поміж всіх галузей молочної промисловості у сироробстві висуваються найвищі вимоги щодо складу та властивостей заготівельного молока, яке повинне не лише характеризуватися необхідними фізико-хімічними і мікробіологічними показниками, але й володіти певними технологічними та біологічними характеристиками. Саме від якості сировини залежить активність заквашувальних культур, що є необхідним елементом одержання сичужних сирів вищого ґатунку. Важливим фактором ризику є вміст у молоці інгібуючих речовин. Діючими нормативними документами на заготівельне молоко як арбітражний метод визначення присутності інгібуючих речовин передбачено визначення наявності антибіотиків. Вміст даних речовин, безумовно, є значущим показником придатності сировини для переробки, однак молоко може містити й інші речовини, які здатні обмежувати розвиток заквашувальних мікроорганізмів [1]. Зокрема, в разі недостатньо ретельного ополіскування обладнання та інвентарю після миття та дезінфекції сильнодіючі речовини можуть у невеликих кількостях потрапляти у молоко. Вони у значній мірі затримують розвиток різних видів молочнокислих бактерій та їхню біохімічну активність. Найвираженішу інгібуючу дію спричиняють препарати, що містять активний хлор, перекис водню та амонійні сполуки [2]. Їх бактеріостатична дія спостерігається навіть за незначних концентрацій у молоці ($10^{-5}\%$). Так, за даними Л.Керерве кислотоутворення лактобактерій роду *Lactococcus* і виду *Streptococcus*

thermophilus знижувалося за вмісту у молоці 10-50 мг/кг активного Cl^- та від 1 до 10мг/кг інших дезінфікуючих сполук. Повне припинення розвитку заквашувальних культур відмічали за кількості >100 мкг/кг активного хлору та від 25 до 100 мг/кг перекису водню, амонійних сполук і амфолітів [3].

Під час виробництва сирів з високими та середніми температурами другого нагрівання однією з умов отримання правильного рисунку у продукті є активне пропіоновокисле бродіння, яке найінтенсивніше відбувається у бродильній камері. Однак переміщення сирів у теплу камеру стає передумовою також розвитку сторонньої мікрофлори, насамперед, маслянокислих бактерій – збудників вади пізнього “здуття” сирів. Унаслідок їх життєдіяльності у продукті нагромаджується масляна кислота, яка надає йому неприємного сального присмаку та запаху, утворюється велика кількість водню, що призводить до появи у сирі рваного, губчатого рисунку, грубої консистенції, деформації форми. Для зниження ризику утворення таких вад у практиці сироробства широко застосовують селітру (нітрати натрію та калію) у кількості 200-300 г на 1 т молочної суміші [4]. У сирах під дією ксантиноксидази молока чи в результаті розвитку бактерій групи кишкових паличок нітрати відновлюються до нітритів, які в свою чергу, гальмують ріст спор маслянокислих бактерій. Однак застосовування цих реагентів також може призвести до побічного ефекту – пригнічення чутливих до різних інгібіторів заквашувальних культур, що негативно позначається на якості готового продукту. Крім того, наявність селітри може вплинути на біохімічні властивості окремих мікроорганізмів закваски. Так, наприклад, внесення у молоко NaNO_3 у кількості більше за 30 мг/л призводило до зникнення антагоністичної активності у лактобацил *Lactobacillus acidophilus* [5]. Особливо це небезпечно в разі застосування бактеріальних препаратів прямого внесення, оскільки їх вносять на початку наповнення сироробної ванни чи сировиготовлювача одночасно з селітрою, і концентрація останньої у молоці є дуже високою. Тому важливо застосовувати заквашувальні культури з мінімальною чутливістю до дії цієї речовини.

Зазвичай, під час добору культур до складу бактеріальних композицій для сироробства основну увагу приділяють таким показникам як протеолітична

та кислотоутворююча активності, здатність до нагромадження смако-ароматичних сполук, газоутворення, ступінь синерезису, соле- та термотривкість, антагоністична дія по відношенню до сторонньої мікрофлори, фагорезистентність [6]. Однак, зважаючи на актуальність проблеми вмісту у сировині інгібуючих речовин, стійкість окремих штамів заквашувальних мікроорганізмів до цих сполук також слід враховувати.

Мета роботи - дослідження штамів молочнокислих та пропіоновокислих бактерій за чутливістю до дії нітрату калію, перекису водню, активного хлору і відбір культур, перспективних для використання у сироробстві за цими показниками.

Матеріали та методи. У роботі було використано штами мезофільних і термофільних молочнокислих та пропіоновокислих бактерій з колекції відділу біотехнології Технологічного інституту молока та м'яса УААН. Рівень інгібування заквашувальних культур визначали в рідкому поживному середовищі та молоці за зниженням приросту активної кислотності та урожайності окремих штамів (кількість інокуляту – 3%) упродовж визначеного терміну культивування при внесенні відповідної речовини порівняно з аналогічним показником без додавання інгібіторів [7]. Вміст діацетилу у молочних згустках установлювали згідно з методом Залашко і Макар'їної у модифікації шляхом дистиляції молочного згустку з водяною парою [8]. Здатність до газоутворення молочнокислих культур визначали за висотою підняття молочного згустку після його нагрівання до температури 95 °C [9].

Результати досліджень. Для проведення досліджень щодо впливу інгібіторів на розвиток заквашувальних культур попередньо було відібрано штами за показниками, важливими у технології твердих і напівтвердих сичужних сирів: з високою протеолітичною активністю, помірним рівнем кислотоутворення, здатністю до продукування смако-ароматичних сполук та газу [10, 11]. Серед них мезофільні лактококи підвидів *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (8 штамів), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (8 штамів), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetilactis* (12 штамів); термофільні стрептококи *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (10 штамів); лактобацили видів

Lactobacillus casei ssp. *casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *rharnosus*, *Lactobacillus plantarum* (7 штамів); *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* (7 штамів), *Lactobacillus acidophilus* (6 штамів) та пропіоновокислі бактерії *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* (4 штами). Було перевірено стійкість зазначених бактерій до залишків активних компонентів миюче-дезинфікуючих розчинів, а саме, перекису водню та хлору у концентрації 10^{-3} % (табл. 1).

1. Вплив інгібуючих речовин на розвиток заквашувальних культур

Мікроорганізми	Кількість досліджених штамів	Рівень інгібування, %	
		Залишки H_2O_2 (10^{-3} %)	Залишки активного Cl^- (10^{-3} %)
<i>L. lactis</i>	8	0-10	5-10
<i>L. cremoris</i>	8	0-10	5-15
<i>L. diacetylactis</i>	12	0-15	10-15
<i>S. thermophilus</i>	10	0-12	0-5
<i>L. casei</i> , <i>L. rharnosus</i> <i>L. plantarum</i>	7	0	0
<i>L. helveticus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	7	0	0
<i>L. acidophilus</i>	6	0	0-5
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	4	15-65	0-50

Залишки H_2O_2 та активного Cl^- в цілому мало впливали на розвиток проаналізованих молочнокислих бактерій, хоча деякі штами, зокрема *L. lactis* ssp. *diacetylactis*, уповільнювали ріст на 10-15% за наявності цих речовин. Пропіоновокислі бактерії демонстрували високу чутливість до залишків миюче-дезинфікуючих засобів у кількості до 10^{-3} %, особливо, перекису водню. Рівень інгібування цією сполукою у зазначеній концентрації окремих штамів цього виду досягав 65%. Серед 4 проаналізованих лише один штам *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* IBM B-7125 характеризувався пригніченням розвитку залишками H_2O_2 та активного Cl^- на рівні 15% та 10%, відповідно.

Також як критерій відбору штамів для сироробства було використано показник стійкості мікроорганізмів до дії KNO_3 у кількостях, що передбачено технологічними інструкціями з виробництва сичужних сирів українського асортименту – від 200 г до 300 г на 1 т молочної суміші (табл. 2).

2. Вплив калієвої селітри на розвиток заквашувальних культур

Мікроорганізми	Кількість досліджених штамів	Рівень інгібування, %	
		KNO_3 , 200 г/ т молока	KNO_3 , 300 г/т молока
<i>L. lactis</i>	8	5-10	5-20
<i>L. cremoris</i>	8	5-25	10-30
<i>L. diacetylactis</i>	12	5-20	10-25
<i>S. thermophilus</i>	10	0-5	5-15
<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> <i>L. plantarum</i>	7	0	0-10
<i>L. helveticus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	7	0-15	5-20
<i>L. acidophilus</i>	6	0	0-10
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermani</i>	4	20-60	30-85

Серед молочнокислих бактерій найчутливішими до дії селітри були мезофільні лактококи, окремі штами *L. lactis* ssp. *cremoris* зазнавали до 25% втрати активності під час культивування у молоці з концентрацією KNO_3 200 г/т, і з підвищенням вмісту селітри рівень інгібування збільшувався до 30%. Також чутливими до дії цієї сполуки були і ароматоутворюючі бактерії *L. diacetylactis*, сповільнюючи швидкість росту на 5-25%. Вплив KNO_3 у зазначених концентраціях на розвиток термофільних стрептококів та лактобацил був менш значним (10-15%), а молочнокислі палички видів *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* та *L. acidophilus* вирізнялися стійкістю до дії даної речовини. Пропіоновокислі бактерії так само, як і внаслідок дії залишків перекису водню та активного хлору, характеризувалися інтолерантністю по відношенню до KNO_3 . Рівень пригнічення їх розвитку у

рідкому поживному середовищі за внесення селітри у кількості 200г/т та 300г/т досягав 20-60% та 30-85%, відповідно. Тобто очевидно, що для виробництва сирів зі застосуванням заквашувальних культур, які містять *P. freudenreichii* ssp. *shermani*, необхідно використовувати сировину високої якості, а застосування селітри небажане.

Під час виробництва сичужних сирів лактококи підвиду *L. diacetilactis* відіграють важливу роль у формуванні органолептичних показників продукту завдяки утворенню широкої гами смако-ароматичних речовин, зокрема, діацетилу, а також за рахунок продукування газу забезпечують певний рисунок у сирній масі. Оскільки внаслідок дії калієвої селітри спостерігали доволі істотну втрату активності даних заквашувальних культур, тому становило науковий інтерес прослідкувати вплив цієї сполуки на здатність 12 штамів *L. diacetilactis* до утворення діацетилу та CO₂ (рис. 1, 2).

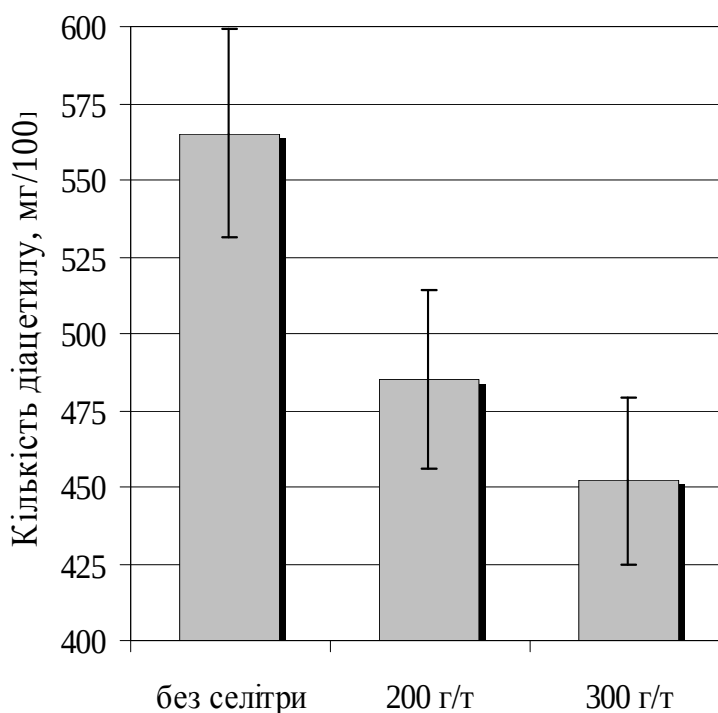


Рис. 1. Вплив калієвої селітри на здатність *L. diacetilactis* до утворення діацетилу

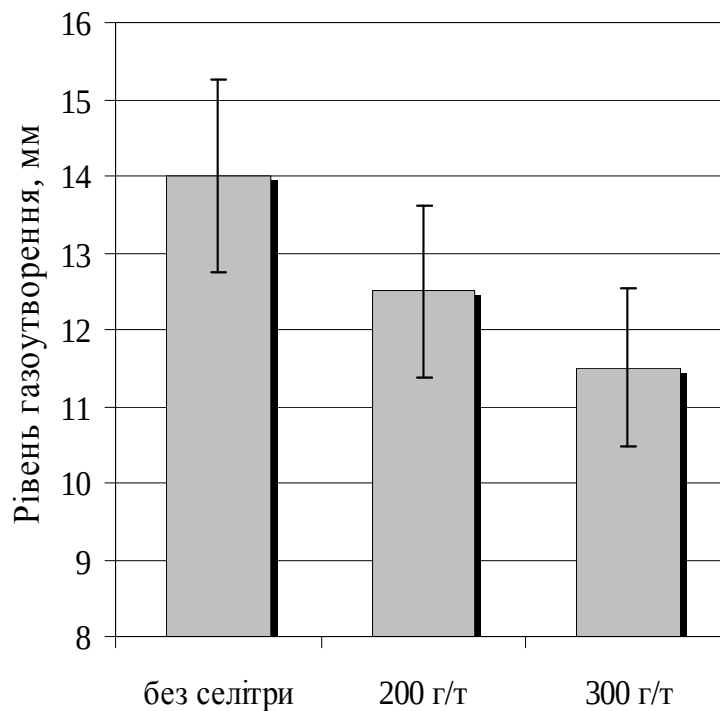


Рис. 2. Вплив калієвої селітри на здатність *L. diacetylactis* до газоутворення

Як свідчать отримані результати, втрати здатності до продукування діацетила молочнокислими бактеріями підвиду *L. diacetylactis* при внесенні KNO_3 у кількості 200 г на тону молока становили від 5% до 27%, а в разі збільшення дози селітри до 300 г/т досліджуваний показник досягав значень 10-31%. Аналогічно змінювалася і здатність даних мікроорганізмів до утворення вуглекислого газу: з підвищенням концентрації калієвої селітри у молоці рівень підняття молочного згустку при нагріванні знижувався. Слід зазначити, що отримані показники дещо вищі за дані щодо інгібування росту *L. diacetylactis*. Це може бути свідченням того, що застосування KNO_3 у зазначених концентраціях позначалося також і на зміні біохімічних властивостей цих окремих штамів.

Отож, очевидно, що для залучення до складу заквашувальних композицій необхідно відбирати культури з найнижчою чутливістю до інгібуючих речовин молока. Нами було встановлено таких 11 штамів *L. lactis* ssp., 2 штами *L. casei* ssp., 1 штама *L. plantarum*, 3 штами *L. acidophilus*.

Висновки. Залишки перекису водню, активного хлору та внесення у молоко нітрату калію у кількості 200-300 г/т спричиняли істотний вплив на

активність та властивості заквашувальних культур. Найчутливішими до дії цих сполук були пропіоновокислі бактерії, рівень інгібування розвитку окремих штамів яких досягав 65-85%. Ароматоутворювальні молочнокислі бактерії виду *L. lactis* ssp. *diacetylactis* в разі наявності інгібуючих речовин зазнавали до 20-25% втрати активності, а застосування селітри призводило до зниження їх здатності продукувати діацетил та утворювати CO₂. Показано, що лактобацили характеризувалися найнижчою вразливістю до KNO₃ та залишків миюче-дезинфікуючих засобів. Таким чином доведено, що показник стійкості заквашувальних культур щодо впливу окремих інгібуючих речовин у молоці є важливим критерієм їх відбору до складу бактеріальних композицій для сироробства.

Бібліографія

1. *Свириденко Г.М.* Обеспечение безопасности и качества отечественных сыров: требования к молоку-сырью // Сыроделие и маслоделие. - 2004. - №6. - С.13-16.
2. *Маневич Б.В.* Научно-практические аспекты использования перекисных дезинфицирующих средств на предприятиях молочной промышленности // Молочное дело. – 2006.- №7. – С.8-9.
3. *Белоусова Н.Н.* Новые исследования в производстве чистых культур молочнокислых бактерий. – М.: ЦНИИТЭИ, 1975. – 53 с.
4. *Сборник* технологических инструкций по производству твердых сычужных сыров. – Углич: ВНИИМС, 1989.
5. *Chumchalová J., Josephsen J., Plocková M.* The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO₃ and lysozyme // International Journal of Food Microbiology. - 1998. - Vol.43, № 1-2. – P. 33-38.
6. *Гудков А.В.* Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 798с.

7. *Salomskiene J.* Microbiological processes in the manufacture of rennet cheese and methods for their control. – Kaunas: KUT, 1997. – 46p.
8. *Инихов Г.С., Брио Н.П.* Методы анализа молока и молочных продуктов. - М.: Пищевая промышленность, 1971. – 275 с.
9. *Лабораторный практикум по технологии молока и молочных продуктов / Соколова З.С., Чекулаева Л.В., Ростроса Н.К., Лакомова Л.И., Тиняков В.Г.* – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1984. – 216 с.
10. *Чередник Н.М., Насирова Г.Ф., Кигель Н.Ф.* Особливості відбору штамів лактобактерій для виробництва сиру // Науковий вісник Національного аграрного університету.- №37. – Київ, НАУ. - 2001. - С.162-166.
11. *Боднарчук О.В., Шульга Н.М., Кигель Н.Ф.* Принципи відбору заквашувальних культур молочнокислих та пропіоновокислих бактерій для виробництва сирів швейцарської групи // Харчова промисловість. – 2004.- Додаток до журналу №3.-С.70-71.

Шульга Н.М., Кигель Н.Ф. Отбор штаммов микроорганизмов для сыроделия по стойкости к ингибиторам в молоке.

Проведен скрининг штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий по чувствительности к действию нитрата калия, остатков перекиси водорода, активного хлора и отобранны культуры, перспективные для использования при производстве сычужных сыров.

Shulga N., Kigel N. Selection of strains for cheese-making on these inhibitor resistance in milk.

The sensibilities of same strains of lactic acid and propionic acid bacteria to potassium nitrate, residues of hydrogen peroxide and active chlorine were investigated. The perspectives for rennet cheeses manufacture starters were selected.