

ЗАСТОСУВАННЯ ЛАКТОБАЦИЛ З ВИСОКОЮ АНТАГОНІСТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ У СИРОРОБСТВІ

*У статті наведено дані щодо антагоністичної активності лактобацил по відношенню до технічно шкідливої у сироробстві мікрофлори, простежено взаємозв'язок між рівнем забруднення молока-сировини бактеріями *Escherichia coli* та здатністю заквашувальних культур пригнічувати їхній розвиток.*

*The article considers the data of antagonistic activity of lactobacilli for cheese-making against technically harmful microflora. The relationship between the level of milk contamination with *Escherichia coli* and inhibition ability of starters was examined.*

*Ключові слова: лактобацили, антагоністична активність, мікрофлора, *Escherichia coli*, сичужні сири.*

Постановка проблеми і її зв'язок із найважливішими науковими та практичними завданнями. Збереження якості та попередження втрат харчових продуктів пов'язано з їх безпосереднім захистом від негативного впливу сторонньої мікрофлори та її метаболітів під час виробництва та зберігання. Тому у молокопереробній галузі першочергового значення набувають проблеми біологічної безпеки продуктів. Тверді та напівтверді сичужні сири, вироблені за традиційною технологією, є чудовим поживним середовищем для розвитку технічно шкідливих мікроорганізмів, в тому числі, й небезпечних для здоров'я людини. Потрапляючи у сири, вони не лише продукують токсичні речовини, але й знижують якість продукту внаслідок порушення біотехнологічних процесів виробництва. Оскільки згідно з традиційними технологіями виробництва більшості видів сирів температура пастеризації молочної суміші не повинна перевищувати 74-76°C упродовж 20 с, то залишкова мікрофлора сировини представлена термостійкими бактеріями, спорами анаеробних мікроорганізмів. Крім того, часто незадовільний санітарно-гігієнічний стан виробництва, застосування неякісних допоміжних матеріалів та пакування тощо є причиною вторинної контамінації продукту, що призводить до погіршення його якості. Найбільшу технологічну небезпеку серед сторонньої мікрофлори сирів становлять бактерії групи кишкової палички, які здатні зброджувати лактозу з утворенням CO₂, внаслідок чого головки сиру набувають вади "раннє здуття" [1, 2]. Такий сир відбраковують. Потрапляння ж до продукту інших шкідливих бактерій (стафілококів, сальмонел, протею тощо), не спричиняючи видимих недоліків зовнішнього вигляду, смаку чи аромату сиру, становлять істотну загрозу здоров'ю споживачів та можуть викликати серйозні отруєння.

Ефективним шляхом біологічного захисту сичужних сирів є використання для їх виробництва спеціальних бактеріальних культур. Це досягається за рахунок залучення до складу заквашувальних препаратів штамів

молочнокислих бактерій, активність яких забезпечує не лише бажані для сирів характеристики, але певний рівень показників безпеки. Зокрема, застосування у сироробстві селекціонованих штамів лактобацил має позитивний вплив на якісні характеристики зрілих сирів. Молочнокислі палички володіють вираженою антагоністичною активністю відносно широкого кола аеробних та факультативно-анаеробних грампозитивних і грамнегативних бактерій [1]. Спектр мікроорганізмів пригнічуючої дії продуктів метаболізму лактобацил включає сальмонели, клостридії, стафілококи, стрептококи, лістерії, деякі види грибів. Найвираженіша ця активність є у представників видів *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentii*. За даними багатьох авторів, антагоністична активність молочнокислих бактерій зумовлена [2, 3]:

- конкуренцією за найдоступніші енергетичні джерела: зброджуванням лактози – основного доступного для більшості представників мікрофлори сиру джерела вуглеводного живлення;
- нагромадженням у молоці та сирній масі кислих продуктів, внаслідок чого знижується рН до значень, що інгібують ріст та життєдіяльність кислоточутливих груп мікроорганізмів;
- поглинанням кисню та встановлення низького рівня окисно-відновного потенціалу, що обмежує розвиток та метаболізм аеробних мікроорганізмів;
- утворенням сполук неспецифічної (продукти первинного метаболізму: молочна кислота та інші органічні кислоти, діацетил, H_2O_2 , тощо) та специфічної антимікробної дії (бактеріоцини, антибіотичні сполуки).

Наразі переважна більшість бактеріальних препаратів для виробництва сирів імпортується виробниками таких країн, як Росія (НВО “Углич”, „Барнаульская биофабрика”), Франція (Texel, Superior), Данія (Chr. Hansen), Італія (Sacco, Biochem). Асортимент вітчизняних заквашувальних культур для сичужних сирів є надзвичайно бідним та налічує лише кілька видів бактеріальних препаратів для сирів голландської та швейцарської групи. Крім того, коло промислово-цінних штамів для виготовлення сирів в Україні є обмеженим. Отож, пошук та селекція молочнокислих бактерій з високою антагоністичною активністю для створення сучасних бактеріальних культур, що забезпечували б високі показники безпеки готових продуктів, є одними із пріоритетних напрямів біотехнології сироробного виробництва.

Метою роботи було дослідження антагоністичної активності окремих штамів молочнокислих паличок та їх композицій із мезофільними лактококами, а також встановлення взаємозв'язку між початковим рівнем забруднення молока-сировини бактеріями групи кишкових паличок і рівнем їх пригнічення заквашувальною мікрофлорою під час виробництва сичужних сирів.

Виклад основного матеріалу. До роботи було залучено штамми мезофільних лактококів *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, мезофільних лактобацил *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, термофільних лактобацил *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*. Штами

мезофільних лактококів нарощували у середовищі на основі молока, гідролізованого панкреатином за температури $(30\pm 1)^\circ\text{C}$, лактобактерії – у середовищі MRS за $(39\pm 1)^\circ\text{C}$. Було проаналізовано антагоністичну активність даних штамів щодо 6 тест-культур: бактерій групи кишкових паличок *Escherichia coli* і *Enterobacteria cloacae*, спороутворюючих мікроорганізмів *Bacillus subtilis*, патогенних стафілококів *Staphylococcus aureus* та протею *Proteus rettgeri* і *Proteus morgani*. Дослідження проводили за методом лунок у твердому поживному середовищі [4], антагоністичну активність лактобактерій оцінювали за величиною зон затримки їхнього росту відповідною тест-культурою (табл. 1).

Таблиця 1 - Антагоністична активність штамів молочнокислих бактерій

Мікро-організми	Кількість штамів	Величина зон затримки росту тест-культур, мм					
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteria cloacae</i>	<i>Proteus rettgeri</i>	<i>Proteus morgani</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. lactis</i> ssp.	36	(<8)-10	(<8)-12	<8	<8	(<8)-10	(<8)-10
<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i>	12	(<8)-24	8-20	8-16	18-26	10-16	8-12
<i>L. helveticus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	23	10-26	10-14	8-13	10-26	8-12	10-16

Серед проаналізованих штамів найнижчою антагоністичною активністю володіли мезофільні лактококи. Високу здатність до пригнічення розвитку *Escherichia coli* показали лактобацили *L. casei*, *L. rhamnosus* та *L. acidophilus*, спричиняючи зони затримки росту до 26 мм, а також по відношенню до ентеробактерій. Отримані дані є важливими, оскільки колі-форми відносяться до санітарно-показової мікрофлори, і залучення до заквашувальних композицій бактерій з вираженою антагоністичною дією щодо них дасть змогу поліпшити мікробіологічні показники зрілих сирів. Також ці лактобацили були активними по відношенню до *P. morgani* і *B. subtilis* (до 16 мм). Високу антагоністичну дію щодо золотистого стафілококу було відмічено у окремих штамів мезофільних лактобацил (до 16 мм). Слід зазначити, що активність молочнокислих бактерій по відношенню до сторонньої мікрофлори є у більшій мірі штамовою ознакою, ніж видовою. Так, серед ацидофільних паличок були штами, рівень пригнічення росту якими більшості тест-культур був надзвичайно високим (до 26 мм), тоді як у інших лактобацил цього ж виду - помірним (менше за 8 мм).

Отримані дані свідчать про те, що більшість з проаналізованих термофільних молочнокислих паличок володіють значним потенціалом у плані інгібування небезпечної мікрофлори, а тому їх застосування у сироробстві може істотно поліпшити санітарні показники продуктів. Зазвичай основу

бактеріальних препаратів для виробництва сирів з низькою температурою другого нагрівання, становлять лише мезофільні лактококи, зрідка – мезофільні лактобацили. Було створено заквашувальні композиції, до складу яких поряд з молочнокислими мікроорганізмами видів *L. lactis* ssp. (ЗК №1) було додатково залучено штами лактобацил з високою біологічною активністю, а саме: мезофільних *L. rhamnosus* 3307 у кількості 20% (ЗК №2) та термофільних *L. acidophilus* 2106. Науковий і практичний інтерес становить вивчення антагоністичної дії цих комплексних культур по відношенню до технічно шкідливої мікрофлори. Крім того, було проаналізовано антагоністичну активність заквашувальних композицій з часткою ацидофільної палички 10%, 20%, 30%, 50% (ЗК №№3-6 відповідно) за величиною зон затримки росту основних представників сторонньої мікрофлори – бактерій групи кишкових паличок, споруотворювальних бацил, протею та золотистого стафілококу (табл. 2).

Таблиця 2 - Антагоністична активність заквашувальних композицій

Заквашувальні композиції	Величина зон затримки росту тест-культур, мм				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteria cloacae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>L. acidophilus</i> 2106	26	14	14	18	14
<i>L. rhamnosus</i> 3307	22	11	12	12	14
ЗК №1	8	8	<8	8	<8
ЗК №2	12	8	8	10	10
ЗК №3	14	10	10	12	10
ЗК №4	16	11	10	12	11
ЗК №5	17	11	11	13	11
ЗК №6	20	12	12	15	12

Заквашувальна композиція, основу якої становили лише *L. lactis* ssp., майже не виявляли антагоністичної дії щодо проаналізованих тест-культур (не більше 8 мм), тоді як залучення мезофільних лактобацил дало змогу підвищити рівень пригнічення *E. coli*, *P. vulgaris* та *S. aureus* до 12 мм, 10 мм і 10 мм, відповідно. Додаткове введення *L. acidophilus* 2106 призвело до підсилення антагоністичних властивостей заквасок і зі збільшенням частки ацидофільної палички у складі заквашувальної композиції рівень пригнічення сторонньої мікрофлори збільшувався. Так, у разі введення *L. acidophilus* 2106 у кількості 20% величина зони затримки росту *E. coli* сягала 16 мм, *B. subtilis* – 10 мм, *P. vulgaris* – 12 мм, *S. aureus* – 11 мм. Слід зазначити, що за рівної частки лактобацил (20%) ефективнішим було застосування ацидофільних паличок, аніж мезофільних лактобацил.

Відомо, що серед представників бактерій групи кишкових паличок, найнебезпечніших у сироробстві, більше 65% становлять *E. coli* [5], тому було проведено детальніші дослідження у напрямі вивчення впливу заквашувальних

молочнокислих бактерій на розвиток даної тест-культури. Зокрема, методом спільного культивування у молоці впродовж 24 год. було простежено залежність антагоністичної активності заквашувальних композицій по відношенню до штаму *E. coli* 0111 від їх складу (рис. 1).

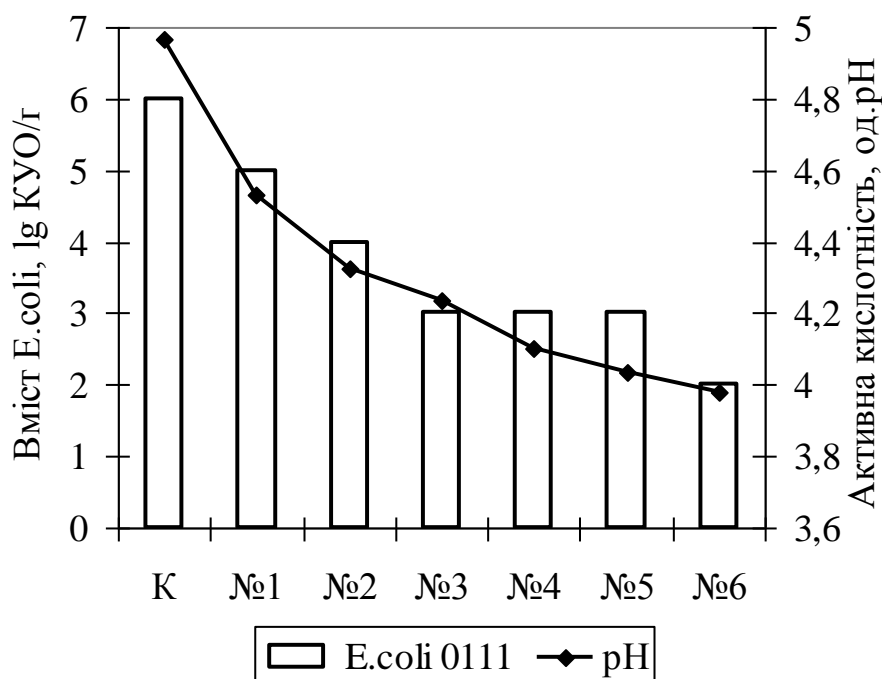


Рисунок 1 - Залежність антагоністичної активності заквашувальних композицій від їх складу

У порівнянні з контролем (К - без внесення закваски), у якому вміст *E. coli* 0111 сягав 10^6 КУО/г, застосування мезофільних лактококів призвело до зниження вмісту цих бактерій на порядок, очевидно, за рахунок зниження активної кислотності середовища до 4,5 од. рН. Залучення мезофільних лактобацил видів дало змогу підвищити рівень пригнічення кишкових паличок у 100 раз порівняно з контролем. У разі використання ацидофільних паличок у кількості 10-30% кінцевий вміст *E. coli* 0111 знизився до 10^3 КУО/г, а за збільшення кількості *L. acidophilus* 2106 до 50% чисельність тест-культури зменшилася ще на порядок, при цьому активна кислотність досягла значення 4,0 од.рН. Слід зазначити, що інгібуючий вплив лактобацил на бактерії групи кишкових паличок обумовлений не лише дією виключно молочної кислоти, оскільки зниження вмісту *E. coli* 0111 від 10^4 до 10^2 КУО/г супроводжувалося зміною активної кислотності у вузькому діапазоні від 4,3 до 4,0 од. рН. Це дає можливість зробити припущення про іншу природу антагоністичної активності заквашувальної композиції (специфічний антагонізм). Вочевидь, застосування лактобацил дає змогу збільшити ступінь інгібування сторонньої мікрофлори, водночас поліпшити показники якості і безпеки сирів, вироблених на їх основі.

За літературними даними антагоністична активність лактобактерій залежить не лише від кількості внесеної закваски, але й від такого фактору, як рівень початкового забруднення сировини сторонньою мікрофлорою [6]. З огляду на це було проведено дослідження впливу початкового вмісту у молоці

бактерій групи кишкової палички на титр антагоністичної активності заквашувальної композиції №4 з часткою *L.acidophilus* 2106 20% під час їх спільного культивування впродовж 24 год. (рис. 2). Застосування більшої кількості даних лактобацил у складі заквашувальної композиції, хоч і збільшує рівень пригнічення патогенних мікроорганізмів, але призводить до істотного зниження рН сирної маси, надаючи продукту надто кислого смаку.

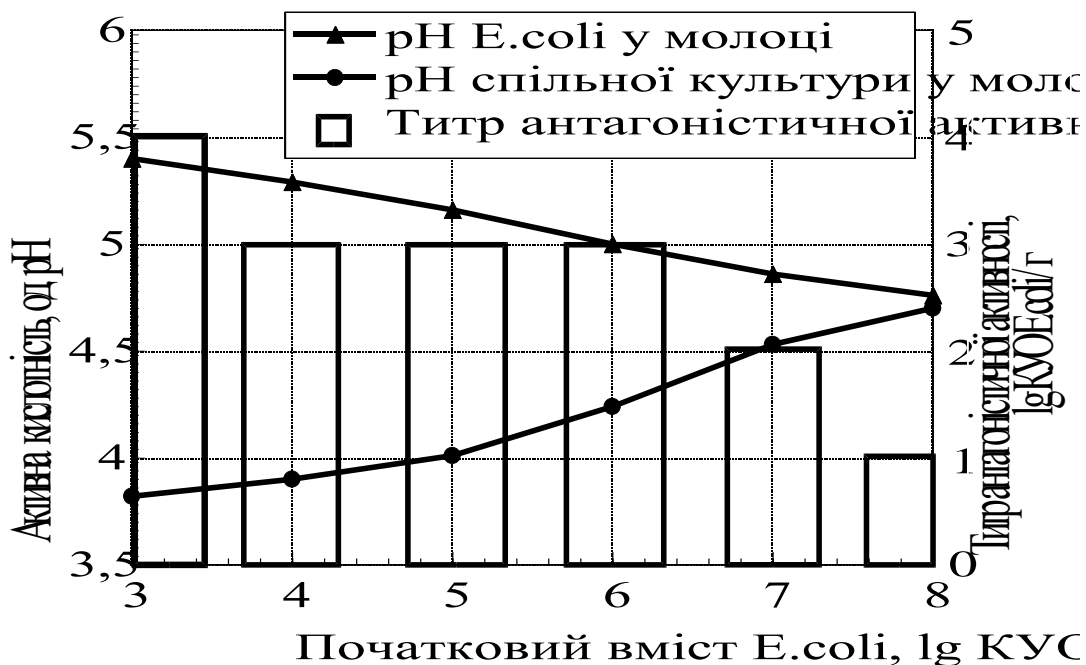


Рисунок 2 - Залежність антагоністичної активності заквашувальної композиції від початкового рівня забруднення молока E. coli 0111

Зі збільшенням початкового вмісту E. coli 0111 у молоці здатність до пригнічення тест-культури заквашувальною композицією знижувалася. Так, за рівня 10^4 КУО кишкових паличок у 1 г молочної сировини титр антагоністичної активності молочнокислих бактерій становив 10^3 , тоді як за вмісту E. coli 0111 10^8 КУО/г даний показник становив лише 10^1 . Отримані результати узгоджуються з даними Сорокіної Н.П. [5], яка стверджувала, що з підвищенням густини популяції кишкових паличок інгібуючий ефект молочнокислих бактерій знижувався, і за рівня забруднення сировини E.coli 10^6 - 10^7 КУО/см³ пригнічення їх розвитку культурами закваски було мінімальним. Згідно з діючими нормативними документами щодо виробництва сирів українського асортименту у твердих і напівтвердих сирах не допускається наявність колі-форм у 0,01г. Виходячи з отриманих даних, для успішного функціонування даної заквашувальної композиції під час виробництва продукту та забезпечення його регламентованих мікробіологічних показників початковий рівень забруднення молочної суміші чи сирної маси E.coli не повинен перевищувати E.coli 10^4 КУО/г.

Висновки. Таким чином, залучення біологічно активних лактобацил до складу заквашувальної композиції на основі мезофільних лактококів дало змогу підвищити антагоністичну дію по відношенню до основних

представників технічно шкідливої мікрофлори у сироробстві. Встановлено, що зі збільшенням кількості застосованих ацидофільних паличок ступень пригнічення патогенних мікроорганізмів видів *E. coli*, *E. cloacae*, *B. Subtilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus* підвищувався, а між початковим рівнем забруднення молочної сировини бактеріями групи кишкових паличок та титром антагоністичної активності молочнокислих мікроорганізмів існує пряма залежність.

Перспективами подальших досліджень у цьому напрямку є розробка технології сучасного бактеріального препарату прямого внесення для сироробства на основі новоствореної заквашувальної композиції та вивчення закономірностей його функціонування під час виробництва твердих і напівтвердих сирів з низькою температурою другого нагрівання.

Література

1. Перфильев Г.Д., Гудков А.В., Шергин Н.А. Производство и применение бактериальных заквасок и препаратов в сыроделии.- М.: ЦНИИТЭИ, 1985. – 36 с.
2. Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 798с.
3. Menéndez S., Centeno J. A., Godínez R., Rodríguez-Otero J. L. Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese // *International Journal of Food Microbiology*. – 2000. – Vol. 59, № 1-2. - P.37-46.
4. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антагонистической активности. –М.: Высшая школа, 1975. -209 с.
5. Сорокина Н.П. Улучшение качества сыров путем разработки и применения бактериального препарата с антагонистическим действием на бактерии группы кишечной палочки.- Автореферат дис.... канд. тех. наук: 05.18.04. – Вологда-Молочное, 1989. – 22с.
6. Chavarri F. J., Nuñez J. A., de Paz M., Nuñez M. Effect of lactic cultures on *Escherichia coli* in ewes' milk stored at low temperatures // *International Journal of Food Microbiology*. - 1991.- Vol.13, №4.–P. 309-314.