

УДК 637.3/579.67

## ПОШУК І ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА СИРУ

*Шугай Мирослава Олександрівна* к.б.н., старший науковий співробітник

*Інститут продовольчих ресурсів НААН України*

*Shugai M.*

*Institute of Food Resources of National Academy  
of Agrarian Sciences of Ukraine*

**Анотація:** з-поміж 247-ми культур МКБ, вилучених з домашніх кисломолочних продуктів, проведено скринінг високоактивних антагоністів до найпоширеніших мікробних забруднювачів сичужних сирів – коліформ, золотистого стафілококу, спорових бактерій. Відібрано 11 штамів лактобацил, які вирізнялися високим рівнем антагоністичної активності до технічно шкідливої та умовно-патогенної мікрофлори. Під дією метаболітів лактобацил на газонах тест-культур утворювались зони затримки росту діаметром до 25 мм. За сукупністю морфо-фізіологічних і біохімічних ознак визначено таксономічне положення штамів: дев'ять віднесено до виду *L. casei*, по одному – до *L. paracasei* та *L. acidophilus*.

Лактобактерії виявили достатній рівень термостійкості та незначну чутливість до солі й селітри, а також мали помірну протеолітичну активність та добрі синергетичні показники молочних згустків (48 ÷ 51) %. Характеристики досліджених штамів МКБ свідчать про перспективність їх використання у біотехнологічних розробках, у тому числі для сиру.

**Ключові слова:** антагонізм, безпеність, *Lactobacillus*, сироваріння, якість.

Одним з перспективних напрямків харчової мікробіології та біотехнології є пошук нових штамів молочнокислих бактерій (МКБ), використання яких дало б змогу гарантовано отримувати продукти, що відповідають сучасним вимогам якості й безпеності та задовольняють смаки споживача.

У харчуванні людини чільне місце посідають молочні ферментовані продукти, у тому числі тверді сири. Під час отримання сиру, зокрема на перших етапах – виробки, пресування, соління – неодмінно відбувається розвиток небажаної мікрофлори, серед якої можуть бути не тільки технічно шкідливі, а й умовно-патогенні мікроорганізми.

Основним джерелом сторонньої мікрофлори у сирах є молочна сировина. Хоча відповідно до технології отримання сичужних сирів, молоко піддають пастеризації (72±2 °С, 15-20 с), така обробка лише частково зменшує рівень загального бактеріального забруднення. Термічну обробку витримують спори аеробних і анаеробних мікроорганізмів та термостійкі бактерії, серед яких виявляють клітини патогенних і умовно-патогенних *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* та ін. [1]. Ще небезпечнішим є післяпастеризаційне забруднення, оскільки в цьому випадку мікроорганізми перебувають в активній формі і здатні швидко нарощувати чисельність, продукуючи метаболіти, що можуть призводити до технологічних проблем, а також знижувати показники якості та безпеності сиру.

Найбільшу технологічну небезпеку для виробництва сиру становлять коліформи. Ферментуючи лактозу з утворенням вуглекислого газу і водню, ці мікроорганізми, у разі надмірного розвитку, призводять до виникнення вади „ранне здуття”, яка спостерігається в перші дні після приготування сиру – під час його пресування або в період витримки у солильному басейні. Сир, забруднений коліформами високого титру, має рваний чи сітчастий рисунок, неприємний присмак і відбраковується.

На відміну від коліформ, перевищення допустимого рівня ( $5 \times 10^2$  КУО/мл) клітин *S. aureus* у сирі не позначається ані на його зовнішньому вигляді, ані на смакових якостях. Однак такий продукт є небезпечним для споживання, оскільки існує ризик розвитку отруєння стафілококовими токсинами, які можуть зберігатися у сирі не втрачаючи активності місяцями і, навіть, роками.

Для зменшення рівня мікробіологічного забруднення молочної сировини та гарантування якості продукту використовують додаткові способи очищення молока: бактофугування, мікрофільтрацію, проводять подвійну пастеризацію, вносять селітру. Кожен з цих підходів має свої переваги і недоліки. Серед останніх – висока вартість обладнання, енергозатратність, утворення шкідливих для здоров'я людини сполук – нітрозамінів.

Перспективним напрямком поліпшення рівня безпечності ферментованих продуктів, у тому числі сиру, є використання біологічного методу – залучення до складу заквашувальних композицій (чи у якості додаткових препаратів) штамів МКБ з високим рівнем антагоністичної активності до небажаної мікрофлори. Антимікробний вплив лактобактерій обумовлений комплексом їх властивостей, що пов'язані з утворенням таких метаболітів як молочна кислота, леткі жирні кислоти, диацетил, перекис водню, лізоцим, бактеріоцини та інші сполуки [2].

**Метою роботи** був пошук культур МКБ з високим потенціалом антагоністичної активності до основних представників технічно шкідливої й умовно-патогенної мікрофлори та перспективних за технологічними характеристиками для виробництва сичужних сирів.

### **Матеріали і методи**

Вилучення монокультур МКБ з асоціацій здійснювали шляхом висівання послідовних 10-кратних розведень проб (домашніх сиру кисломолочного, кисляку) на агаризовані середовища: гідролізоване молоко, MRS (De Man, Rogosa, Sharpe medium) з додаванням 2 % глюкози, а також M-17. Чашки термостатували за температур 30, 37 і 45 °С. МКБ підтримували у відновленому знежиреному молоці, та зберігали за температури холодильника.

Культуральні та фізіолого-біохімічні властивості вилучених штамів визначали за загальноприйнятими тестами [3], ідентифікацію мікроорганізмів проводили згідно з [4, 5]. Рівень антагоністичної активності досліджували методом „дифузії з лунок” [6]. Тест-культури нарощували: ентеробактерії, стафілокок і бацили – у м'ясопептонному бульйоні, дріжджі й плісінь – в рідкому середовищі Сабуро. Лактобактерії культивували: паличкоподібні форми – у рідкому MRS, кокові форми – у гідролізованому молоці. Чашки інкубували за оптимальних для розвитку тест-культур умов. Інтенсивність антагоністичної активності оцінювали за діаметром зон відсутності росту тест-культури навколо лунок з метаболітами МКБ. Граничну кислотність згустків лактобактерій визначали згідно з ГОСТ 3624–92, протеолітичну здатність – на агарі Ейкмана. Синеретичні властивості молочних згустків – після їх центрифугування (1000 об/хв упродовж 15 хв) і розраховували як співвідношення об'ємів супернатанта й вихідної проби, виражене у відсотках. Стійкість лактобацил до солі й нітриту натрію визначали у гідролізованому та відновленому знежиреному молоці за урожайністю клітин МКБ порівняно з контролями – без додавання інгібіторів та без додавання лактобактерій [7]. Стійкість до високих температур – порівнюючи чисельність бактерій, культивованих за оптимальних умов росту та прогрітих за 55 °С упродовж години. Результат виражали у відсотках.

Досліди проводили з трикратним відтворенням. Отримані результати обробляли з використанням *t*-критерія Фішера-Стьюдента і представляли у вигляді середньої арифметичної та її похибки ( $M \pm m$ ).

### **Результати дослідження**

Активність кислотоутворення та органолептичні характеристики є одними з визначальних показників придатності культур МКБ для створення заквашувальних препаратів. Тому первинний відбір ізолятів, вилучених з кисломолочних продуктів, проводили за енергією кислотоутворення – швидкістю ферментування відновленого знежиреного молока. Відбирали штами з високою та помірною кислотоутворюючою активністю, що утворювали не більше як за три доби культивування згустки приємного кисломолочного смаку. Про належність ізолятів до МКБ робили висновок за позитивною реакцією клітин при фарбуванні за Грамом, відсутністю рухливості та здатності до спороутворення, а також за відсутністю ферменту каталази. Отже, було вилучено 247 штамів

МКБ, з яких 105 належали до лактобацил і 142 – до лактококів.

Наступним етапом дослідної роботи стало визначення антагоністичних властивостей МКБ. Як тест-культури використали штами *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Penicillium* spp., *Candida* spp., вилучені під час проведення моніторингу мікробіологічної якості вітчизняних сирів. За ознакою антагоністичної активності кокові форми МКБ значно поступалися представникам роду *Lactobacillus*. Водночас серед лактобацил відмічено наявність штамів з низьким, помірним і високим ступенем антагонізму до використаних тест-культур. До подальшої роботи залучили одинадцять штамів високоактивних лактобацил-антагоністів, метаболіти яких спричиняли утворення зон відсутності росту тест-культур діаметром до 25 мм (див. табл. 1).

Таблиця 1

#### Антагоністична активність штамів *Lactobacillus* sp.

Вид МКБ	Величина зон затримки росту тест-культур, мм					
	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. casei</i> (9 шт)	(23÷25)±0,5	(22÷25)±0,5	(24÷25)±0,5	(22÷24)±0,5	(22÷24)±0,5	(19÷22)±0,5
<i>L. paracasei</i>	24±0,5	23±0,5	25±0,5	23±0,5	24±0,5	20±0,5
<i>L. acidophilus</i>	25±0,5	24±0,5	25±0,5	22±0,5	20±0,5	18±0,5

$P < 0,05$  порівняно з відповідним контролем.

Встановлено таксономічне положення відібраних лактобацил (див. табл. 2). На підставі морфо-фізіологічних та метаболічних характеристик штаму 11 віднесено до виду *L. acidophilus*, штаму 09 – до *L. paracasei*, решту – до *L. casei*. Як видно з таблиці, лактобактерії *L. paracasei* та *L. casei* здатні ферментувати значно більшу кількість вуглеводів, ніж *L. acidophilus*, оскільки вони мають два шляхи метаболізму вуглеводів, при цьому ферментування гексоз відбувається по гліколітичному шляху, а пентоз – по пентозофосфатному.

Таблиця 2

#### Фенотипові та метаболічні характеристики штамів *Lactobacillus* sp.

Характеристики	Штами											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	
1. Реакція за Грамом	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Морфологія клітин	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П
3. Рухливість клітин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. Наявність каталази	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. CO <sub>2</sub> з глюкози	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. NH <sub>4</sub> з аргініну	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. Ріст за: 15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
8. Ріст у молоці за 48 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. Ріст у МПБ (pH 8,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10. Ріст у MRS за наявності NaCl:												
4 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. Ферментування:												
Арабіноза	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ксилоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Продовження таблиці 2												
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Манітол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Манноза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Мелібіоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Рамноза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Рафіноза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Рибоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сорбітол	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Фруктоза	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Целобіоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка. + ферментують вуглевод;- не ферментують вуглевод; П паличкоподібна форма клітин.

Лактобацили виявили порівняно високу стійкість до фізико-хімічних факторів, що мають місце під час виробництва сиру і пригнічують життєдіяльність заквашувальних культур – високої температури, солі та нітритів. А різна чутливість штамів до цих факторів пов'язана на самперед з їх видовими особливостями (див. табл. 3).

Таблиця 3

Технологічні характеристики штамів *Lactobacillus sp.*

Показник	<i>L. casei</i> (9 шт)	<i>L. paracasei</i> 09	<i>L. acidophilus</i> 11
Гранична кислотність у молоці, °Т	200 ÷ 230	220 ± 8	250 ± 10
Синерезис молочного згустку, %	48 ÷ 51	48 ± 2	50 ± 2
Протеолітична активність	+	+	+
Термостійкість за температури 55 °С, 1 год	+	+	+
Розвиток у гідролізованому молоці за наявності NaCl: 3 %	+	+	+
6 %	+/-	-	-
Рівень інгібування KNO <sub>3</sub> , %			
200 г на 1 т молока	0	0	5 ± 0,3
300 г на 1 т молока	8 ÷ 9	8 ± 0,4	11 ± 0,4

$P < 0,05$  порівняно з відповідним контролем

Усі досліджувані лактобацили мали помірну протеолітичну активність, а отже, здатні забезпечити достатній рівень протеолізу під час дозрівання сиру, що важливо для формування смаку й аромату продукту. Водночас помірна протеолітична активність культур закваски дозволяє уникнути зайвих втрат казеїну і гарантує високий вихід сиру. Штами утворювали нев'язкі молочні згустки, що характеризувалися добрими синеретичними властивостями – (48 ÷ 51) %. Дані характеристики дозволять контролювати процес відокремлення сироватки під час формування сирного зерна та мінімізувати втрату сухих речовин з сироваткою.

## Висновки

За результатами скринінгу з-поміж 247 культур МКБ, вилучених з природних джерел, відібрано 11 штамів найактивніших антагоністів до забруднювачів сичужних сирів – коліформ, золотистого стафілококу, спорових бактерій та інших мікроорганізмів. З використанням методу „дифузії з лунок” показано, що на газонах тест-культур під впливом метаболітів лактобактерій утворювались зони затримки росту діаметром від 18 до 25 мм.

За сукупністю морфо-фізіологічних і біохімічних показників дев'ять штамів віднесено до виду *L. casei* та по одному до *L. paracasei* і *L. acidophilus*.

Досліджувані лактобактерії виявили достатній рівень термостійкості та незначну чутливість

до солі й селітри. Помірний рівень протеолізу та добрі реологічні характеристики молочних згустків свідчать, що досліджені штами лактобацил є перспективними для використання у біотехнологічних розробках, у тому числі як заквашувальні та захисні культури для виробництва сиру.

### Список літератури

1. Мордвинова В.А. Подготовка молока к выработке сыра / В. Мордвинова // *Переработка молока*. – 2011. – № 4. – С. 34–36.
2. Erginkaya Z. Importance of microbial antagonisms about food attribution / Erginkaya Z., Ünal E. and Kalkan S. // *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. – 2011. – Vol. 2. – P. 1342–1348.
3. Методы общей бактериологии / Под ред. Герхарда Ф. М.: Мир, 1984. –Т. 3. – 264 с.
4. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Хоулта Дж. М.: Мир, 1980. – 496 с.
5. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.
6. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд. / Н.С. Егоров – М.: Изд МГУ; Наука, 2004. – 258 с.
7. Скородумова А.М. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов / А.М. Скородумова – М.: Пищепромиздат, 1963. – 308 с.

### References

1. Mordvinova V.A. Podgotovka moloka k vyrabotke syra / V. Mordvinova // *Pererabotka moloka*. - 2011. - № 4. - S. 34-36.
2. Erginkaya Z. Importance of microbial antagonisms about food attribution / Erginkaya Z., Ünal E. and Kalkan S. // *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. – 2011. – Vol. 2. – P. 1342–1348.
3. *Metody obshchey bakteriologii* / Pod red. Gerkharda F. M. : Mir, 1984. T. 3. - 264 s.
4. *Kratkiy opredelitel' bakteriy Bergi* / Pod red. Khoult Dzj. M. : Mir, 1980. - 496 s.
5. Bannikova L.A. *Seleksiya molochnokislykh bakteriy i ikh primeneniye v molochnoy promyshlennosti* / L.A. Bannikova. - M. : Pishchevaya promyshlennost', 1975. - 255 s.
6. Yegorov N.S. *Osnovy ucheniya o antibiotiki: Uchebnik. Shestoy izd.* / N.S. Yegorov - M. : Izd MGU; Nauka, 2004. - 258 s.
7. Skorodumova A.M. *Prakticheskoye rukovodstvo po tekhnicheskoy mikrobiologii moloka i molochnykh produktov* / A.M. Skorodumova - M. : Pishchepromizdat, 1963. - 308 s.

## ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СЫРА

**Аннотация:** из самоквасных молочных продуктов выделены 247 культур МКБ, среди которых проведен поиск высокоактивных антагонистов к наиболее распространенным микробным загрязнителям сычужных сыров – колиформам, золотистого стафилококка, спорным бактериям. Отобрано 11 штаммов лактобацилл, обладающих наиболее высоким уровнем антагонизма к технически вредной и условно-патогенной микрофлоре. Под действием метаболитов МКБ на газонах тест-культур образовывались зоны отсутствия роста диаметром до 25 мм. Исходя из морфо-физиологических и биохимических свойств, определено таксономическое положение штаммов: девять отнесено к виду *L. casei*, по одному – к *L. paracasei* и *L. acidophilus*.

Лактобактерии показали достаточный уровень термоустойчивости и незначительную чувствительность к поваренной соли и селитре, а также обладали умеренной протеолитической активностью и образовывали молочные сгустки с хорошими синергическими показателями (48 ÷ 51) %.

Характеристики исследованных штаммов МКБ свидетельствуют об перспективности их использования в биотехнологических разработках, в том числе для сыров.

**Ключевые слова:** антагонизм, безопасность, *Lactobacillus*, сыроделие, качество.

## SEARCH AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA PROSPECTIVE FOR CHEESE MAKING

*Summary:* of 247 LAB extracted from domestic dairy products, the screening of antagonists to the most common microbial rennet cheese contaminants - koliform, *Staphylococcus aureus* and spore-forming bacteria was done. Selected 11 strains of LAB with high level of antagonistic activity to technically harmful and pathogenic microflora. Stunned growth of bacteria zones 25 mm in diameter were formed under the influence of metabolites of *Lactobacillus* on test-cultures lawns.

According to combination of morphological, physiological and biochemical traits defined taxonomic positions of the strains: 9 of them rated as *L. casei*, and another two - as *L. paracasei* and *L. acidophilus*.

*Lactobacilli* found sufficient level of thermal stability and low sensitivity to salt and nitrate, besides that they had moderate proteolytic activity and good (48-51)% syneresis as well.

Description of examined strains of LAB prospectively could be used in biotechnological development, and in cheese making as well.

**Key words:** antagonism, cheese making, *Lactobacillus*, quality, safety.