

Дніпродзержинський державний технічний університет

## МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВИНИ ТА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ – КОЗЯЧОГО СИЧУЖНОГО СИРУ СУЛУГУНІ

**Вступ.** Нажаль в останні 10 років в Україні знижується поголів'я корів. При цьому продуктивність стада зростає недостатньо швидко, тому в результаті скорочується валове виробництво молока в країні. Така тенденція спостерігається не лише в Україні, але і у всьому світі, при цьому вжиток молочної продукції, навпаки, збільшується. Тому для молочної промисловості визначена певна мета – зупинити падіння виробництва молока. Один із шляхів вирішення проблеми – технологічний, за допомогою вдосконаленого устаткування, новітніх технологій з метою забезпечення широким асортиментом якісної та корисної молочної продукції [1].

Останнім часом пильну увагу вчені починають приділяти козячому молоку як сировині для виробництва кисломолочних продуктів дитячого харчування. Важливу роль у харчуванні дітей відіграють кисломолочні продукти, виготовлені шляхом ферментації молока молочнокислими бактеріями. З кисломолочних продуктів найбільш широке використання одержав розсільний сир (сулугуні – Грузія), який не тільки стимулює секрецію травних соків, але й підсилює виділення жовчі. Традиційно сулугуні роблять із овечого молока або буйволиного молока [2].

У технології виробництва такого сиру існує багато окремих технологічних моментів, які впливають на якість та корисність продукту, тому на сьогодні дуже важливим є вдосконалення рецептури приготування сичужних сирів з метою надання лікувальних властивостей, направлених на профілактику сучасних захворювань – дисбактеріоз кишечника та алергійних проявів [3].

Метою роботи є мікробіологічне дослідження сировини та отриманого продукту – сичужного сиру сулугуні щодо доцільності використання у харчуванні дітей і дорослих.

**Постановка задачі.** Для підтвердження дієтологічних властивостей отриманого продукту за власною покращеною технологією, а саме збагачення сичужного сиру сулугуні пробіотиками, сформульовано та досліджено наступні задачі:

- визначення індексу бактерій групи кишечних паличок після введення комплексу молочнокислих бактерій в сировину;
- встановлення загального мікробного обсіменіння в зразках з підвищеною чисельністю молочнокислих бактерій;
- фарбування за Грамом з метою визначення чистоти культур;
- визначення оксидазної та редуцтазної активності;
- дослідження впливу молочнокислих бактерій на зниження титру *E.coli* „В”;
- визначення загальної засіяності готового продукту після введення пробіотиків [4].

**Результати роботи. Матеріали та методи дослідження.** Для надання сичужному сиру Сулугуні лікувально-профілактичних властивостей використано закваски торгівельної марки VIVO державного підприємства бактеріальних заквасок Технологічного інституту молока та м'яса (ТІММ, м. Київ): Біфівіт, Симбілакт, Стрептосан та фармпрепарати Лактобактерин-Біофарма та Біфідумбактерин-Біофарма, які складаються з комплексу біфідо-, лакто-, пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій.

За розробленою власною методикою приготування сичужного сиру сулугуні бактеріальні закваски вносили в пастеризоване, охолоджене до 35-37°C молоко у розчи-

неному вигляді із розрахунку 1г сухої закваски на 1 л молока. Через декілька хвилин вносили сичужний фермент. Процес ферментації молока займав близько трьох годин.

*Визначення загального мікробного числа.* Загальне мікробне забруднення (ЗМЗ) визначається кількістю сапрофітних мікроорганізмів, що знаходяться в 1 см<sup>3</sup> дослідженого зразка. При бактеріологічному дослідженні обраних зразків роблять посіви розведених проб. Десятикратні розведення готують наступним чином: беруть кілька пробірок, що містять по 9 см<sup>3</sup> стерильної водопровідної води. Досліджуваний зразок об'ємом 1см<sup>3</sup> після ретельного перемішування вносять стерильною піпеткою в першу пробірку. Далі з кожної пробірки після перемішування переносять в наступні пробірки по 1см<sup>3</sup> попереднього розведення. Посів проводять шляхом виконання паралельних засівів. Відразу ж після внесення аліквоти підготовленого розведеного зразка в кожену чашку вливають 10-12 см<sup>3</sup> розплавленого і остудженого до 45-46°C поживного агару після фламбування країв посуду. Чашки із застиглим середовищем поміщають у термостат кришками вниз і вирощують при температурі 37°C протягом 24 год.

*Проба на редуктазу.* Визначення наявності ферменту в досліджуваному зразку проводять за стандартною методикою із застосуванням фарбника (метиленовий блакитний). У пробірку (18-20 мл) наливають по 1 мл робочого розчину метиленового блакитного і по 20 мл досліджуваного молока, попередньо нагрітого до 38-40°C. Наповнені пробірки закривають гумовими пробками, змішують шляхом повільного триразового перевертання. Пробірки поміщають у редуктазник, водяну баню або термостат. Температура води в редуктазнику або в бані після занурення пробірок з молоком повинна підтримуватися протягом усього часу в межах 38-40°C. Момент занурення пробірок в баню вважають початком аналізу. Спостереження за зміною забарвлення ведуть через 20 хв., 2 год., 5 год. після початку аналізу.

*Визначення індексу БГКП.* Число лактозопозитивних кишкових паличок визначається титраційним методом. Аліквоту дослідженого матеріалу для посіву обирають з таким розрахунком, щоб у мінімальних обсягах або у найбільш високому розведенні отримати один або кілька негативних результатів. Кожен обсяг проби або її розведення засівається паралельно в дві чашки Петрі з лактозопептонним середовищем. Посіви інкубують в термостаті при температурі 37°C протягом 24 годин. Повна відсутність зміни кольору середовища або помутніння без утворення газу дозволяє підтвердити негативну реакцію. З посівів, де зазначено помутніння й газоутворення, проводиться висів на поверхню підтверджуючого щільного фуксинсульфітного середовища Ендо, розділеного на 3-4 сектори з таким розрахунком, щоб отримати ізольовані колонії. Посіви на середовищі Ендо інкубують при температурі 37°C протягом 16-18 годин. При наявності в середовищі інтенсивного помутніння та газоутворення з наступним пересівом на елективне середовище дають позитивну відповідь. Час проведення дослідження – 42 години. Колонії, які виростили на елективному середовищі Ендо, мікроскопіюють за Грамом, а потім засівають на напіврідке середовище з лактозою (Гіса) уколом, посіви інкубують при температурі 37°C 5-6 годин.

*Фарбування за Грамом.* Мазок на предметному склі фіксують трикратним проведнням через полум'я пальника. На препарат накладають смужку фільтрувального паперу і на нього наливають карболовий розчин генціану віолету, витримуючи 1 хв. Потім знімають використану смужку, наливають розчин Люголя (йодований розчин) на предметне скло, витримуючи 1 хв. По закінченні часу експозиції розчин Люголя змивають дистильованою водою, а потім етиловим спиртом, поки не перестане відходити фарба. По закінченні процедури скло ретельно промивають водою та фарбують фуксином Циля, розведеним у співвідношенні 1:10 дистильованою водою (час експозиції 1-2 хв.). По закінченні часу фарбування мазок промивають і підсушують. Підготовлений мазок підлягає мікроскопіюванню. Грампозитивні (Грамм (+)) мікроорганізми дають мі-

цне з'єднання з указаними фарбниками і йодом. При цьому вони не знебарвлюються при дії на них спиртом, унаслідок чого при додатковому забарвленні фуксином Грам (+) мікроорганізми не змінюють прийнятий фіолетовий колір. Грамнегативні (Грам (-)) мікроорганізми утворюють з основними фарбниками і йодом з'єднання, що легко руйнується під дією спирту. В результаті мікроби знебарвлюються, а потім зафарбовуються фуксином, набуваючи червоного кольору.

*Визначення оксидазної активності.* Використовують готові індикаторні системи промислового виготовлення, диски оксидази чи папірці, попередньо виготовлені за таким прописом: 30 мг альфа-нафтолу розчиняють в 2,5 см<sup>3</sup> 96%-вого етилового спирту, додають 7,5 см<sup>3</sup> дистильованої води з 50 мг фенілєндіамінової сполуки. В отриманому розчині змочують фільтрувальні папірці, висушують і зберігають у темному місці в чорному папері не більше 6 місяців. Надійний результат оксидазного тесту може бути отриманий лише при використанні добової культури, вирощеної на неселективному поживному агарі.

Виходячи з літературного огляду, у якості сировини обрано козяче молоко, яке за своїми фізико-хімічними властивостями і смаком вигідно відрізняється від коров'ячого і від молока інших видів тварин.

Проведено дослідження якісного складу сулугуні за мікробіологічними показниками: визначення обсіменіння зразків бактеріальних заквасок, визначення загального мікробного числа сировини, заквашених зразків молока та продукту двома методами (одношаровим та двошаровим), виділення чистої культури *E.coli* „B” зі стічної води (СВ), визначення кількості патогенної мікрофлори (колі-титр) в сировині, фарбування за Грамом, визначення оксидазної активності, проба на редуктазу молока.

У результаті проробленої роботи отримано згустки, що вигідно відрізнялися від згустків звичайного сиру сулугуні, виготовленого за допомогою лише сичужного порошку (пепсину), за зовнішнім виглядом, запахом, смаковими особливостями. Поверхня згустків глянцева, без відстою сироватки; консистенція однорідна, злегка колеться; смак чистий, ніжний кисломолочний, злегка солодкуватий, без сторонніх присмаків; запах чистий, кисломолочний, без сторонніх запахів; колір білий, рівномірний по всій масі. Сулугуні, приготовлений за довершеною методикою, володіє низкою переваг – підвищеною антагоністичною активністю до збудників кишкових інфекцій та гнилісних бактерій при його вживанні. Продукт нормалізує обмін речовин, процес перетравлювання, роботу серцево-судинної системи, нервової та ендокринної систем, очищує кишечник від хвороботворної та гнилісної мікрофлори, володіє антисклеротичною дією, сповільняє процеси старіння організму. Встановлено ефективність використання бактеріальних заквасок торгівельної марки Vivo у порівнянні з фармацевтичними мікробними препаратами Лактобактерин-Біофарма, Біфідумбактерин-Біофарма та чистою сироваткою, тобто без внесення додаткових культур, після виробництва козиного розсільного сиру – сулугуні. Зразки наведено на рис.1.

*Проба на редуктазу.* Козине молоко не дало реакції впродовж зазначеного часу, а отже проба на редуктазу молока виявилася негативною.

*Визначення ЗМЧ.* Виходячи з отриманих даних, двошаровий метод визначення ЗМЧ виявився кращим, ніж одношаровий. Загальне мікробне число в зразках сулугуні значно більше, ніж в зразках заквашеного молока, тому що при виробництві сичужних сирів на прикладі сулугуні в згусток переходить більша частина корисних бактерій, а молочна сироватка залишається багата тільки на вітамінний склад.

Експериментально доведено, що в отриманих зразках сироватки після технології виробництва сулугуні (з додаванням комплексу молочнокислих бактерій Біфівіт, Симбілакт, Стрептосан та фармацевтичних мікробних препаратів Лактобактерин-Біофарма, Біфідумбактерин-Біофарма внаслідок концентрування казеїну молока вміст молочнокислих



Рисунок 1 – Наглядний вигляд використаних зразків згустку та отриманої молочної сироватки

в сироватці дуже низький, що свідчить про 80%-вий перехід комплексу молочнокислих бактерій до згустку. Внаслідок цього запропоновано і підтверджено дослідями доцільність повторного введення вказаного комплексу молочнокислих бактерій до представлених зразків молочної сироватки, якщо є необхідність приготування нового продукту – сиреру. За допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel* побудовано графічну залежність, на якій відображено порівняльну характеристику вмісту ЗМЧ в молочної сироватці після виробництва сулугуні, а також молочної сироватки вже як готового продукту, збагаченого симбіозом молочнокислих бактерій. Цю залежність представлено на рис.2.

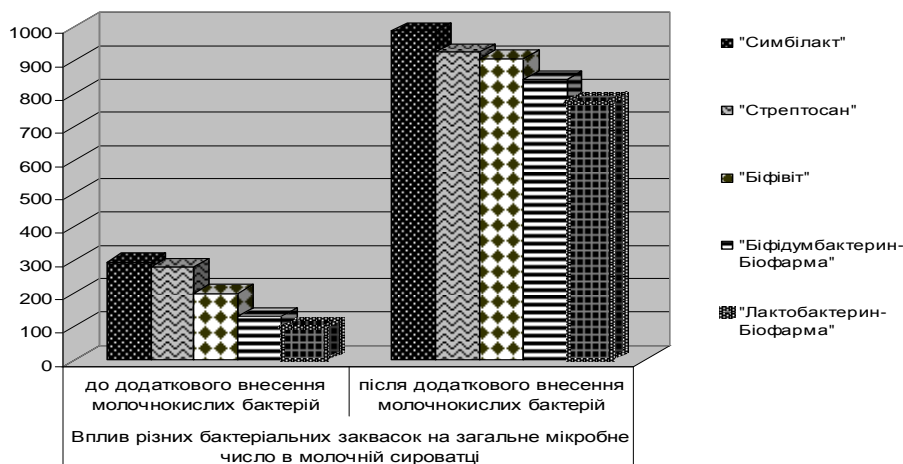


Рисунок 2 – Порівняльна характеристика різних видів бактеріальних заквасок до і після виробництва козиного сичужного сиру – сулугуні

*Визначення впливу молочнокислих бактерій на зниження титру *E.coli* „В”.* На МПБ бактерії дають рясний ріст при значному помутнінні середовища, осад невеликий, сіруватого кольору, що легко руйнується. Утворюють пристінкове кільце, плівка на поверхні бульйону зазвичай відсутня. Після підрощення бактерій на МПБ з глюкозою роблять пересів на елективне середовище Ендо штрихом та підраховують вирослі колонії. На середовищі Ендо бактерії утворюють плоскі червоні колонії середньої величини.

*Фарбування за Грамом.* Встановлено, що закваска Симбілакт та фармпрепарат Лактобактерин-Біофарма складаються з бактерій роду *Lactobacillus* та *Propionibacterium*. По морфології ці бактерії мають форму паличок, розташованих поодинокі, попарно, ланцюжками, грампозитивні, тобто за Грамом фарбуються в синій колір. Закваска

Стрептосан представлена бактеріями роду *Streptococcus*. Це грампозитивні бактерії, мають клітини кулястої форми, розташовуються короткими і довгими ланцюжками. За Грамом фарбуються в синій колір. Закваска Біфівіт та фармпрепарат Біфідумбактерин-Біофарма складаються з бактерій роду *Bifidobacterium*. Також встановлено наявність бактерій групи кишкової палички в зразках стічної води (СВ). Бактерії *Escherichia coli* представлені маленькими рухомими паличками, які розташовуються поодинокі, грам-негативні, за Грамом фарбуються у червоний колір.

**Визначення загальної засіяності.** Проведеними дослідженнями доведено ефективність використання бактеріальних заквасок різного типу сировини та від різних виробників для підвищення лікувально-профілактичної дії продукту. Бродильним методом та шляхом пересіву на селективні середовища Ендо та Гіса було встановлено, що всі бактеріальні закваски торгівельної марки VIVO пригнічують ріст *E.coli* „B” на відміну від фармацевтичних мікробних препаратів торгівельної марки Біофарма-Лактобактерин [5].

**Тест на оксидазну активність.** Результатом проведеного тесту є позитивна реакція Ерліха (зафіксовано зміну кольору зразка з малинового забарвлення на фіолетове), що свідчить про наявність ферменту оксидази. Виходячи з даних дослідження, з'ясовано, що фармацевтичні препарати Лактобактерин-Біофарма та Біфідумбактерин-Біофарма недостатньо активно впливають на зменшення титру *E.coli* «B» в досліджених зразках молока в порівнянні з заквасками Біфівіт, Симбілакт, Стрептосан. В останніх спостерігається майже 100%-ве пригнічення росту бактерій групи кишкової палички.

**Висновки.** 1. Проведеними дослідженнями доведено ефективність використання бактеріальних заквасок різного типу відносно покращення якісних характеристик сировини та готового продукту з використанням пробіотиків від різних виробників задля підвищення лікувально-профілактичної дії готового продукту.

2. Виходячи з результатів дослідів щодо визначення оксидазної активності, з'ясовано, що фармацевтичні препарати Лактобактерин-Біофарма та Біфідумбактерин-Біофарма недостатньо ефективно впливають на зменшення титру *E.coli* „B” в досліджених зразках молока в порівнянні з заквасками Біфівіт, Симбілакт, Стрептосан. В останніх спостерігається майже 100%-ве подавлення росту бактерій групи кишкової палички.

3. На основі результатів досліджень розроблено рекомендації щодо застосування пробіотиків торгівельної марки VIVO в рецептурах приготування сирів з підвищеними лікувально-профілактичними властивостями.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Досягнення молодих вчених у вирішенні актуальних проблем м'ясної та молочної галузей, присвяченої 50-річчю Технологічного інституту молока та м'яса, 20 жовтня 2010 року. – К., ТІММ, 2009. – 187с.
2. І.В.Сирохман. Товарознавство харчових продуктів функціонального призначення. [Електронний ресурс]: навч. посіб. / І.В.Сирохман, В.М.Завгородня. – К.: Центр учбової літератури, 2009. – 68 с., [http://ebooktime.net/book\\_74.html](http://ebooktime.net/book_74.html).
3. Свириденко Ю.Я. Экологические и экономические аспекты переработки молочной сыворотки / Ю.Я.Свириденко, Э.Ф.Кравченко, О.А.Яковлева // Сыроделие и маслоделие. –2006. – 404 с.
4. Экспертиза молока и молочных продуктов. Качество и безопасность: уч.-справ. пос. / Дунченко Н.И., Храмцов А.Г., Макеева И.А. [и др.]. – Сибирское университетское изд-во, 2007. – 477с.
5. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа: ГОСТ 18963-73. – [Чинний від 1974-07-01]. – К.-М.: Стандартиформ, 2008. – 21с.

Надійшла до редколегії 02.06.2014.