

УДК 637.1:579.8+637.352/477.85

Сливка І.М., аспірант, Цісарик О.Й., д. с.-г. н., професор[©]
Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького

ВИДІЛЕННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ІЗ ОВЕЧОГО СИРУ, ВИГОТОВЛЕНОГО В БУКОВИНСЬКОМУ РЕГІОНІ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ

У статті наведено результати мікробіологічних досліджень овечого сиру, виготовленого в гірській та лісостеповій зоні Чернівецької області. Проведено аналіз кількісного та видового складу молочнокислих бактерій бринзи та молодого овечого сиру – буц.

Ключові слова: бринза, буц, молочнокислі бактерії, мікробіологічні показники, бактеріальна композиція.

Молочнокислі бактерії широко розповсюдженні в природі, а деякі види є найважливішими представниками мікробіоценозу організму людини [1]. Молочнокисла мікрофлора довгий час приваблює увагу вчених – біохіміків, мікробіологів, медиків, екологів, маючи потенціальне значення для підтримки гомеостазу системи «людина-навколишнє середовище», збереження здоров'я населення, профілактики і лікування багатьох захворювань різної етіології.

З давніх часів разом з їжею люди використовували велику кількість молочнокислих бактерій, вживаючи різноманітні харчові продукти, такі, як кисле молоко, сир, кумис, кефір, квас та ін., не усвідомлюючи при цьому, що захищають себе певною мірою від шкідливого впливу кишкового загнивання та хвороботворних бактерій.

Сьогодні молочнокислі бактерії родини *Lactobacteriaceae* (*Lactobacterium acidophilum* і *Lactobacterium bulgaricum*) включені в склад більшості заквасок, які використовуються для виробництва таких кисломолочних продуктів, як біокефір, ряжанка, йогурт, дитячі ацидофільні суміші, кисломолочні продукти з використанням біфідобактерій, простокваша та ін. Актуальним підходом для пошуку нових штамів молочнокислих мікроорганізмів, перспективних як заквасок і пробіотиків, є вивчення видового складу мікрофлори кисломолочних продуктів, виділення із них культур бактерій і вивчення їх властивостей.

З метою запобігання втрати біорізноманіття молочнокислих бактерій і втрати традиційної різноманітності сиру, важливою є ідентифікація нової молочнокислої мікрофлори із традиційних кисломолочних продуктів.

Свою увагу ми зосередили на традиційному овечому сирі – бринза, виробництво якого набуло значного поширення у багатьох країнах світу. Бринза вважається національним харчовим продуктом болгар, румунів, молдаван, а також українців [2].

[©] Сливка І.М., Цісарик О.Й., 2013

Традиційно бринза виготовляється із сирого молока у приватних садибах, на малих молочних заводах або на фермах [3-5]. У процесі виготовлення бринзи із сирого молока бактеріальні культури не додаються, тому під час дозрівання природна молочнокисла мікрофлора переважає над іншими групами мікроорганізмів [5]. Тому для виготовлення бринзи у промислових умовах велике значення має склад заквашувального препарату, оскільки обов'язковою технологічною операцією є пастеризація молока, під час якої знищується не тільки патогенна мікрофлора, а й молочнокисла флора сирого молока.

Однією з існуючих технологій виготовлення бринзи у промислових умовах є додавання бактеріальної закваски у молоко, що забезпечує разом з молокозідальним ферментом утворення сирного згустку. Саме мікрофлора заквашувальних культур визначає специфічні фізико-хімічні, органолептичні властивості, забезпечує безпеку споживання та збереження якісних характеристик впродовж зберігання. Завдяки мікрофлорі можна контролювати біохімічні та ферментативні процеси під час визрівання та спрямувати їх у бажаному напрямі [6].

В Україні імпорتنі комерційні закваски набули широкого застосування для виробництва бринзи, але, на жаль, до цього часу немає комерційних заквасок вітчизняного виробництва. Як наслідок, на ринку є присутніми сири різної якості, які не завжди задовольняють очікування споживачів. У доступній нам вітчизняній літературі є лише незначна кількість повідомлень вчених про придатність застосування імпортних культур для виробництва розсолених сирів в Україні. Більше наукових досліджень щодо впливу бактеріальних препаратів на якість розсолених сирів зустрічаються в ряді робіт зарубіжних авторів [7, 8], в яких повідомляється, що для виготовлення сиру були використані поєднання мезо- і термофільних культур (у різних співвідношеннях *Lactococcus* + *Lactococcus* або *Lactococcus* + *Lactobacterium*) [4].

Згідно з ДСТУ 7065:2009 (Бринза. Загальні технічні умови) чисельність гранично допустимого рівня молочнокислих бактерій не передбачена. Мікробіологічні показники обмежені лише вимогами щодо безпечності споживання бринзи. Вони включають дослідження на наявність БГКП, бактерій роду *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* та *Listeria monocytogenes*.

Метою нашої роботи було встановити видовий і кількісний склад молочнокислої мікрофлори ізольованої із бринзи, виготовленої у Буковинському регіоні.

Матеріали та методи досліджень.

Для досліджень було відібрано 7 зразків свіжого овечого сиру (буц) до моменту соління та 1 зразок бринзи (буц після соління) щоб порівняти вплив солі на чисельність молочнокислих бактерій.

Відбір дослідних зразків сиру проводили в умовах фермерського господарства: «Вівчарик» с. Малинівка Новоселицького району Чернівецької області, «Дана» с. Котелеве Новоселицького району Чернівецької області та м. Путила Чернівецької області. Загальну кількість молочнокислих бактерій

визначали стандартним методом висіву десятикратних розведень згідно з ГОСТ 104444.11-89 [9]. Посів на підрахунок МАФАНМ (мезофільні аеробні і факультативно анаеробні мікроорганізми) здійснювали на агаризоване поживне середовище Nutrient Agar за температури інкубування 30°C протягом 72 год в аеробних умовах. Виявлення бактерій роду *Lactococcus* і *Streptococcus* визначали методом посіву на тверде поживне середовище M17, враховуючи оптимальну температуру. Метод виявлення бактерій роду *Lactobacterium* базувався на здатності лактобацил розвиватися на твердому поживному середовищі MRS (de Man, Rogosa and Sharpe).

Відбір зразків для визначення розвитку загальної чисельності молочнокислої мікрофлори сиру та кількості молочнокислих паличок і лактококів проводили одночасно з кожного зразка.

Інкубування лактобактерій здійснювали в анаеробних та мікроаерофільних умовах за температури 38°C, інкубування лактококів при температурі 25°C та 42°C. Підрахунок колоній здійснювали на 3 добу після початку інкубування.

Мікробіологічний аналіз дослідних зразків сиру проводили в лабораторії біотехнології Жешівського університету, Польща.

Місця відбору зразків сиру:

№1 – бринза (солена) овеча, м. Путила Чернівецька обл.;

№2 – буц овечий, м. Путила Чернівецька обл.;

№3 – буц овечий, м. Путила Чернівецька обл.;

№4 – буц овечий, м. Путила Чернівецька обл.;

№5 – буц коров'ячий, м. Путила Чернівецька обл.;

№6 – буц овечий, ФГ «Дана», с. Котелеве Чернівецька обл.;

№7 – буц овечий, ФГ «Дана», с. Котелеве Чернівецька обл.;

№8 – буц овечий, ФГ «Вівчарик», с. Малинівка Чернівецька обл.

Результати та обговорення досліджень.

Лактобактерії росли на щільному живильному середовищі MRS, формуючи білі або сіруваті колонії, діаметром від 1 мм до 5 мм, інколи лінзоподібної або зіркоподібної форми. Поверхня колоній була переважно гладенькою і блискучою (S-форма), проте в окремих випадках спостерігали шорсткі колонії (R- форми).

Для лактококів відзначали характерний ріст на щільному поживному середовищі M17 у вигляді округлих та човникоподібних колоній. На поверхні середовища утворювалися округлі колонії з рівними краями, а човникоподібні колонії дещо вросли в агар.

У препаратах, пофарбованих за Грамом, виявляли прямі чи злегка зігнуті Грам позитивні палички, зазвичай, розташовані поодинокі або ж короткими ланцюжками, без ознак споро- чи капсулоутворення.

Для порівняння чисельності молочнокислої мікрофлори в соленому сирі та сирі, що не містить солі (буц), було відібрано один зразок бринзи (зразок №1), щоб відзначити вплив солі на кількість МКБ.

Аналізуючи дані таблиці 1 і 2 можна визначити таксономічне положення молочнокислих бактерій на рівні роду, оскільки дослідження ферментативних властивостей молочнокислих бактерій не проводились.

Враховуючи культуральні властивості та температурні режими інкубування можемо стверджувати, що ізольовані молочнокислі палички відносилися до родини *Lactobacteriaceae*, роду *Lactobacterium*. А також теоретично вважати ізольованими такі види: *Lbm. acidophilum*, *Lbm. helveticus*, *Lbm. brevis*, *Lbm. casei*, *Lbm. plantarum* та *Lbm. bulgaricus*.

Аналіз ідентифікованих лактококів показує, що вони формують одну родину *Streptococcaceae* та беручи до уваги температурні режими культивування (+25°C і 42°C) два роди *Lactococcus* і *Streptococcus*. Можливі такі види як, *Lac. lactis.*, *Lac. cremolis.*, *Lac. diacetylactis* та *Str. thermophilus*.

Проведені дослідження та аналіз отриманих результатів дають підстави стверджувати, що вміст молочнокислої мікрофлори у відібраному сири (буц) є досить низьким. Якщо порівнювати результати щодо чисельності МКБ у зразку №1 порівняно з іншими можна підтвердити, що сіль згубно впливає на чисельність молочнокислої мікрофлори.

У таблиці 1 представлені дані щодо підрахунку колонієутворювальних одиниць (КУО) молочнокислих паличок у досліджуваних зразках сиру.

Таблиця 1

Чисельність лактобактерій у зразках сиру

№ зразка	Кількість лактобактерій, КУО/г
1	1,3 x 10 ⁵
2	9,5 x 10 ⁵
3	2,9 x 10 ⁵
4	4,1 x 10 ⁵
5	1,8 x 10 ⁵
6	7,5 x 10 ⁵
7	4,1 x 10 ⁵
8	8,5 x 10 ⁵

Отримані результати щодо чисельності лактококів за різних температурних режимів інкубування (+25°C та 42°C) представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Чисельність лактококів у зразках сиру

№ зразка	Кількість лактококів (+25°C), КУО/г	Кількість лактококів (+42°C), КУО/г
1	1,5 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵
2	3,1 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵
3	2,5 x 10 ⁵	6,2 x 10 ⁵
4	7,5 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁵
5	2,6 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵
6	2,5 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵
7	2,8 x 10 ⁵	4,2 x 10 ⁵
8	2,7 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵

У таблиці 3 наведено результати підрахунку кількості МАФАНМ, як показника санітарно-гігієнічного стану харчового продукту. Проте, необхідно враховувати, що цей метод є приблизним, так як неможливо виявити і підрахувати всі мікроорганізми в дослідному матеріалі на одному середовищі і фізіологічні властивості яких є різними. Крім того, режим та умови культивування також можуть не відповідати вимогам всіх мікроорганізмів, що знаходяться в дослідному матеріалі.

Результати дослідження засвідчують, що найменша кількість КУО МАФАНМ зареєстрована у бринзі, що є наслідком впливу солі. Однак і серед зразків буцу встановлено низьку кількість КУО (зразок №6), а найвищою кількістю КУО МАФАНМ характеризувався зразок №6 ($9,3 \times 10^5$).

Таблиця 3

Чисельність МАФАНМ у зразках сиру

№ зразка	Кількість МАФАНМ, КУО/г
1	$6,4 \times 10^5$
2	$8,8 \times 10^5$
3	$9,3 \times 10^5$
4	$8,2 \times 10^5$
5	$7,4 \times 10^5$
6	$6,9 \times 10^5$
7	$8,4 \times 10^5$
8	$9,1 \times 10^5$

Для надання бринзі функціональних властивостей необхідно працювати над підвищенням чисельності живих пробіотичних молочнокислих бактерій, що передбачає два напрями — моделювання композиції бактеріального препарату та створення оптимальних умов для життєдіяльності його мікрофлори.

Висновки. Опираючись на результати проведених нами досліджень, свою подальшу роботу спрямовуємо на пошук солестійких штамів молочнокислих бактерій для включення їх у склад заквашувальної композиції для виготовлення бринзи у промислових умовах. На основі відібраних зразків сиру плануємо провести детальну ідентифікацію молочнокислої мікрофлори методом філогенетичного аналізу секвенованих фрагментів гена 16S рДНК з подальшою селекцією найефективніших штамів.

Література

1. Бондаренко В.М. и др. Пробиотики и механизмы их лечебного действия // Эксперим. клин. гастроентерол. 2004. №3. С. 83 – 87.
2. Бурда Л. Р. Фізико-хімічні показники молока овець української гірськокарпатської породи за різних умов утримання / Л. Р. Бурда, П. В. Стапай // Науково-технічний бюлетень. – 2008. — Вип. 9, № 4. — С. 13–17.
3. Bintsis T. Microbiological quality of white-brined cheeses: a review / T. Bintsis, P. Papademos // Int. J. of Dairy Technol. – 2002. – Vol. 55, № 3. – P. 113-120.
4. Nayaloğlu A.A. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese «Beyaz peynir» / A.A. Nayaloğlu, M. Guven, P.F. Fox // Int. Dairy J. – 2002. – Vol. 12. – P. 635-648.

5. Oner Z. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish White cheese during ripening / Z. Oner, A.G. Karahan, H. Aloglu // LWT – Food Sci. Technol. – 2006. – Vol. 39. – P. 449-454.

6. Soda M. El. Marshall Rhodia International Dairy Science Award Lecture. Adjunct Cultures: Recent Development and Potencial Significance to the Cheese Industry[Text] / Soda M. El., Madkor S.A. // J. of Dairy Science. – 2000. – Vol. 83, №5. – P. 609- 616.

7. Karakuş M. Effect of starter composed of various species of lactic acid bacteria on quality and ripening of Turkish white pickled cheese. / M. Karakuş, I. Alperden // LWT – Food Sci. Technol. – 1995. – Vol. 28. – P. 404-409.

8. Dağdemir E. The effects of some starter cultures on the properties of Turkish White cheese / E. Dağdemir, Ş. Celik, S. Ozdemir // Int. J. Dairy Technol. – 2003. – Vol. 56. – P. 215-218.

9. ГОСТ 10444-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых организмов.

Summary

Slyvka I.M., Tsisarik O.Y.

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z.Gzhytskyj, Lviv, Ukraine

RELEASE OF LACTIC ACID BACTERIA WITH OVINE CHEESE PRODUCED IN BUKOVYNA REGION AND THEIR IDENTIFICATION

In the article microbiological results of ovine cheese sampled in Chernivtsi region are given. The analysis of quantitative and species composition of lactic acid bacteria young ovine cheese and brine cheese – butts are presented.

Key words: *brine cheese, butts, lactic acid bacteria, microbiological parameters, bacterial composition.*

Рецензент – д.т.н., професор Білонога Ю.Л.