УДК 637.33

INVESTIGATION OF WAYS FOR PREVENTION OF "LATE BLOWING" IN HARD CHEESES

N. Shulga, N. Gapchenko
Institute of Post-Diploma Training of the National University of Food Technologies

Key words:
Butyric acid fermentation
Propionic acid bacteria
Lactic acid bacteria
Lysozyme
Potassium nitrate
Hard cheese

Article history:
Received 17.05.2019
Received in revised form 28.05.2019
Accepted 14.06.2019

Corresponding author:
N. Shulga
E-mail:
shulga.palmira@gmail.com

ABSTRACT

The paper states the searching of effective methods for prevention of the "late blowing" defect in hard cheeses due to the growth of butyric acid bacteria *Clostridium tyrobutyricum* that is an actual problem. It is substantiated that a promising way of clostridia inactivation is the preliminary introduction of the natural enzyme of lysozyme derived from egg protein into the pasteurized milk, which causes lysis of these bacteria cell walls in contrast to the traditional method, by treatment with potassium nitrate.

The purpose of the study was the investigation of effectiveness of potassium nitrate and the enzyme preparation of lysozyme usage in order to prevent the butyric fermentation in hard cheeses.

To solve the problem, a comprehensive analysis of bactericidal action of antibacterial agents has been carried out using standard and modified research methods.

The methodology of laboratory studies was based on the assessment of the effect of potassium nitrate with concentration of 200 mg/kg and 300 mg/kg of milk and the enzyme preparation of lysozyme with activity of $9 \cdot 10^6$ units/cm^3 at a dose of 100 mg/kg as the main technically important starter bacteria in cheesemaking. The presented data include analysis of the inhibition level of different species of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria under the influence of tested bactericidal compounds as well as their ability to produce aromatics and gas formation. It has been shown that the loss of activity of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* was 2.0—2.8 times lower due to enzyme using compared to the action of nitrate. The effectiveness of the clostridium inhibition by lysozyme with dosage 100 mg/dm^3 of growth medium has been investigated. The application of technology of milk processing by lysozyme after adding starter under industrial conditions guaranteed microbiological safety at the initial stages of cheese production, preventing the development of butyric acid fermentation, and all mature cheeses were characterized by high organoleptic characteristics.

DOI: 10.24263/2225-2924-2019-25-3-23

ДОСЛІДЖЕННЯ СПОСОБІВ ЗАПОБІГАННЯ ВАДІ «ПІЗНЄ СПУЧУВАННЯ» У ТВЕРДИХ СИРАХ

Н. М. Шульга, Н. О. Гапченко
Інститут післядипломної освіти Національного університету харчових технологій

У статті визначено, що пошук ефективних способів запобігання ваді «пізнє спучування» у твердих сирах, яка зумовлена розвитком маслянокислих бактерій виду Clostridium tyrobutyricum, є актуальною проблемою. Обґрунтовано, що на відміну від традиційного засобу інактивації клостридій у сирній масі шляхом обробки нітратом калію, перспективним способом їх знешкодження є попереднє внесення у пастеризоване молоко природного ферменту лізоциму, отриманого з яєчного білка, який спричиняє лізис клітинних стінок вказаних бактерій.

Досліджено ефективність застосування нітрату калію та ферментного препарату лізоциму для запобігання маслянокислому бродінню у твердих сирах. Проведено всебічний аналіз бактерицидної дії антибактеріальних препаратів з використанням стандартних і модифікованих методів досліджень.

Методологія лабораторних досліджень ґрунтувалася на оцінці впливу на основну заквашувальну мікрофлору твердих сирів нітрату калію у кількостях 200 мг/кг та 300 мг/кг молока та ферментного препарату лізоциму з активністю $9 \cdot 10^6$ од/см^3 за дози внесення 100 мг/кг. Представлені дані охоплюють аналіз рівня інгібування молочнокислих бактерій різних видів і пропіоновокислих бактерій під дією вказаних бактерицидних сполук, а також їх здатність до продукування смако-ароматичних сполук і газоутворення. Показано, що при використанні ферментного препарату втрата активності заквашувальних культур виду Propionibacterium freudenreichii ssp. shermani була у 2,0—2,8 раза нижча, ніж під дією селітри. Досліджено ефективність пригнічення збудників маслянокислого бродіння лізоцимом у концентрації 100 мг/дм^3 ростового середовища. Застосування технології обробки молока лізоцимом у промислових умовах після заквашування молочної суміші гарантувало мікробіологічну безпеку вже на початкових стадіях виробництва сиру, запобігаючи розвитку маслянокислому бродінню, а всі зрілі сири характеризувалися високими органолептичними показниками.

Ключові слова: *маслянокисле бродіння, пропіоновокислі бактерії, молочнокислі бактерії, лізоцим, нітрат калію, тверді сири.*

Постановка проблеми. Виробництво твердих сичужних сирів вирізняється серед іншої молочної продукції залежністю від мікробіологічних показників сировини та особливими технологічними режимами обробки. Наявність у молочній суміші великої кількості сторонньої мікрофлори може призвести до утворення ряду вад у готовому продукті. Окрім цього, більшість

сирів після виготовлення визрівають упродовж тривалого часу, і, на жаль, за умов дозрівання в них можуть розмножуватися не лише заквашувальні мікроорганізми, а й технічно шкідливі.

Однією з найнебезпечніших вад твердих сирів є так зване «пізнє спучування», що полягає у збільшенні об'єму сирних головок та утворенні тріщин усередині сирної маси внаслідок інтенсивного газоутворення у другій половині визрівання. Процес супроводжується виділенням неприємного прогірклого запаху масляної кислоти, сири набувають масткої консистенції, а колір змінюється на білувато-сірій [1]. Збудником вади є маслянокислі бактерії виду *Clostridium tyrobutyricum,* що зброджують лактати з утворенням масляної та оцтової кислот, а також великої кількості вуглекислого газу і водню. Бактерії цього виду класифікують як спороутворювальні строгі анаероби, тобто вони розвиваються лише в умовах, де неможливий доступ повітря (всередині головки сиру, при герметичному пакуванні продукту). Джерелом забруднення є корми, погано сквашена силосна маса, звідки вегетативні клітини та спори потрапляють через травну систему тварин у молоко, особливо в осінньо-зимовий період [2].

Маслянокислі бактерії є найбільш небезпечними збудниками недоліків твердих сирів, оскільки[3]:

- забруднення молока маслянокислими бактеріями проходить поза межами молочного заводу, і сироробі обмежені в можливості запобігти цьому;
- режими пастеризації молока під час виробництва сиру (72—76°С упродовж 20 с) не інактивують бактеріальних спор;
- маслянокислі бактерії, які зброджують лактати, забезпечені поживними речовинами протягом усього періоду дозрівання сирів;
- сир, вражений вадою «пізнє спучування», не може бути використаний для вторинної переробки (наприклад, як сировина для плавленого сиру), що завдає значних матеріальних збитків виробникам.

Саме тому пошук ефективних методів знешкодження маслянокислих бактерій під час виробництва твердих сирів і запобігання дефекту «пізнє спучування» залишається актуальною проблемою.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На сучасному етапі вченими постійно проводяться дослідження з розробки дієвих заходів боротьби з вадою «пізнє спучування» в сироробстві. Найбільш вразливі сири швейцарської групи, для яких характерна висока температура визрівання, помірний рівень активної кислотності та незначний вміст кухонної солі. Однак сири з низькою температурою другого нагрівання та формуванням сирних головок з пласта, а також з підвищеним рівнем молочнокислого процесу також можуть зазнавати враження маслянокислим бродінням. Ступінь вираження цієї вади сирів залежить від початкового рівня забруднення молока *Clostridium tyrobutyricum*, вміст яких у сировині може досягати $(2—4)\cdot 10^3$КУО/дм^3. Є відомості, що у зрілих сирах російської групи віком 45 діб за визрівання за температури 10—12°С при забрудненні вхідної сировини спорами цього виду маслянокислих бактерій виявляли до $5 \cdot 10^6$ КУО/г вегетативних клітин [3; 4].

Відомі технологічні, хімічні та біологічні методи, які дають змогу запобігти псуванню сирів клостридіями з одночасним збереженням їх якості, однак

жоден з них не є досконалим. Достатньо ефективним технологічним способом, що знижує небезпеку маслянокислого бродіння, є бактофугування молока. Однак ця технологічна операція передбачає використання дорогого устаткування і вимагає значних енерговитрат. Також перспективні біологічні методи, засновані на використанні антагоністичних властивостей бактерій, що беруть участь в дозріванні, але вони непридатні для вироблення сирів з високою температурою другого нагрівання внаслідок чутливості заквашувальних культур до дії специфічних сполук метаболізму.

Основним традиційним засобом інактивації лактатзброджувальних спорових форм у сироробстві, передбаченим чинними технологічними інструкціями, є застосування калієвої чи натрієвої селітри, яку вносять у молочну суміш після заквашування чи у сирне зерно. Інгібуючу дію на активність цієї сторонньої мікрофлори спричиняють нітрити — первинні продукти відновлення нітратів. Недоліком цього способу є негативний вплив вказаних солей на заквашувальну мікрофлору, завдяки якій формується смако-ароматична композиція сирів під час визрівання. Відомо про підвищену чутливість, зокрема, пропіоновокислих бактерій до дії селітри [5]. Ці мікроорганізми, розвиваючись під час визрівання сиру за спеціальних режимів підвищеної вологості та температури, ініціюють пропіоновокисле бродіння. В результаті зрілий продукт набуває специфічного присмаку, головки сиру на розрізі мають крупні вічки правильної форми.

Альтернативою внесення селітри може бути використання лізоциму — ферменту класу мурамідаз, виділеного з яєчного білка. Механізм дії лізоциму ґрунтується на пригніченні росту вегетативних клітин *Clostridium tyrobutyricum* шляхом часткового чи повного лізису мембрани клітинної стінки бактерій [6]. Останнім часом впровадженню такого біотехнологічного методу для поліпшення мікробіологічних показників молока приділяється багато уваги як вітчизняними науковцями, так і практиками-виробниками сиру [7]. На вітчизняних молокопереробних підприємствах широке впровадження лізоциму у сироробстві обмежене, в тому числі внаслідок недостатньої інформації щодо впливу цього інгредієнта на перебіг молочнокислого процесу та формування показників якості зрілих сирів.

Метою статті є дослідження ефективності застосування нітрату калію та ферментного препарату лізоциму для запобігання ваді «пізного спучування» у твердих сичужних сирах.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на базі лабораторій Інституту післядипломної освіти НУХТ з використанням штамів мезофільних і термофільних молочнокислих, пропіоновокислих та маслянокислих бактерій з колекції Інституту продовольчих ресурсів НААН. У процесі дослідження застосовували рідкий ферментний препарат Delvo®Zyme L виробництва компанії DSM з активністю лізоциму $9 \cdot 10^6$ од/см^3 (вміст сухої речовини 22%). Рівень інгібування лактобактерій визначали в рідкому поживному середовищі MRS, пропіоновокислих — у рідкому лактатному середовищі на підставі аналізу урожайності окремих штамів (кількість інокуляту — 3%) упродовж визначеного терміну інкубування при внесенні відповідної речовини за показником оптичної густини. Кількість утвореного ароматоутворюючими

культурами діацетилу у молоці аналізували за методом Залашко у модифікації, а накопичення вуглекислого газу пропіоновокислими бактеріями у лактатному середовищі — методом перегонки [8]. Вплив лізоциму на ріст маслянокислих бактерій визначали шляхом культивування штаму *Clostridium tyrobutyricum* у рідкому середовищі Ласса з подальшим підрахунком чисельності вказаних бактерій [9]. Виробки твердих сирів та їх органолептичну оцінку здійснювали в промислових умовах ТОВ «Світловодський маслосирзавод».

Результати і обговорення. Для проведення досліджень застосовували такі дози бактерицидних засобів: KNO_3 вносили у кількостях, що передбачені технологічними інструкціями з виробництва твердих сичужних сирів українського асортименту — від 200 мг до 300 мг на кг молочної суміші, ферментний препарат лізоцим — у дозі 100 мг на кг молока. До роботи було залучено промислово цінні штами як молочнокислих бактерій родів *Lactococcus* і *Lactobacillus*, так і пропіоновикислих бактерій, що входять до складу заквасок для виробництва твердих сирів. Рівень інгібування заквашувальних культур оцінювали порівняно з показниками росту в аналогічних умовах без внесення селітри чи лізоциму за таких умов росту: мезофільних лактококів — упродовж 12 год за температури 30°С, термофільних стрептококів та лактобацил — упродовж 8 год за температури 40°С, пропіоновокислих бактерій — упродовж 48 год за температури 24°С. Результати досліджень представлено у табл. 1.

Таблиця 1. **Вплив нітрату калію та лізоциму на розвиток заквашувальних культур**

Мікроорганізми	Кількість досліджених штамів	Рівень інгібування, %		
		KNO_3, 200 мг/дм^3	KNO_3, 300 мг/дм^3	лізоцим, 100 мг/дм^3
Lactococcus lactis ssp. lactis	8	5—10	5—20	5—10
Lactococcus lactis ssp. cremoris	8	5—25	10—30	5—20
Lactococcus lactis ssp. diacetilactis	12	5—20	10—25	5—15
Streptococcus thermophilus	10	0—5	5—15	5—10
Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum	7	0	0—10	0—5
Lactobacillus helveticus, Lactobacillus bulgaricus	7	0—15	5—20	0—10
Propionibacterium freudenreichii ssp. shermani	4	20—60	30—85	10—30

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 середовищі з концентрацією KNO_3 200 мг/дм^3, і з підвищенням вмісту селітри рівень інгібування збільшувався до 30%. Також чутливими до дії цієї сполуки були й ароматоутворюючі бактерії *Lactococcus lactis ssp. diacetilactis*, які сповільнювали швидкість росту на 5—25%. Вплив KNO_3 у зазначених концентраціях на розвиток термофільних стрептококів і лактобацил був менш значним (10—15%), а молочнокислі палички видів *L. casei* та *L. plantarum* вирізнялися стійкістю до дії цієї речовини. Схожі результати було отримано при визначенні впливу лізоциму у концентрації 100 мг/дм^3 на ростові характеристики лактобактерій. Під дією

цього ферментного препарату активність мезофільних молочнокислих культур знижувалася максимум на 20%, лактобацили також демонстрували чутливість до лізоциму. Пропіоновокислі бактерії характеризувалися інтолерантністю стосовно KNO_3, рівень пригнічення їх розвитку в рідкому поживному середовищі за внесення селітри у кількості 200 мг/дм^3 та 300 мг/дм^3 досягав 20—60% та 30—85% відповідно. Натомість при застосуванні лізоциму дані культури зберігали достатньо високий рівень активності: лише один з чотирьох досліджуваних штамів *P. freudenreichii* ssp. *shermani* уповільнював розвиток на 30%, рівень інгібування інших штамів цим ферментом був у межах 10—20%.

Варто зазначити, що вплив досліджуваних бактерицидних препаратів на молочнокислі бактерії у промислових умовах можна нівелювати, збільшивши дозу закваски. Щодо пропіоновокислих бактерій, то їх підвищена чутливість до калієвої селітри є критичною та істотно впливає на якість готового продукту, не даючи змоги отримати сир з притаманним смаком і вираженим рисунком. Тобто очевидно, що для виробництва сирів, технологія яких передбачає пропіоновокисле бродіння, внесення селітри небажане, альтернативою цьому традиційному способу захисту сирів може бути застосування ферментного препарату лізоциму.

На користь цього висновку свідчать і дані проведених досліджень з порівняння впливу KNO_3 та лізоциму на здатність чотирьох штамів пропіоновокислих бактерій до газоутворення у рідкому лактатному середовищі (рис. 1).

Упродовж 48 год культивування за температури 24°С у контрольному середовищі без додавання бактерицидних речовин *Propionibacterium* накопичували понад 420 мг/дм^3 вуглекислого газу. Внесення калієвої селітри у кількості 200 мг/дм^3 та 300 мг/дм^3 знижувало цей показник у середньому в 1,9 та 2,3 раза відповідно. При використанні 100 мг/дм^3 лізоциму інтенсивність утворення CO_2 пропіоновокислими бактеріями залишалася достатньо високою, досягаючи 370 мг/дм^3. Отримані результати підтверджують негативний вплив селітри на цей вид заквашувальної мікрофлори та перевагу застосування ферменту лізоциму у виробництві твердих сирів типу «Мааздам».

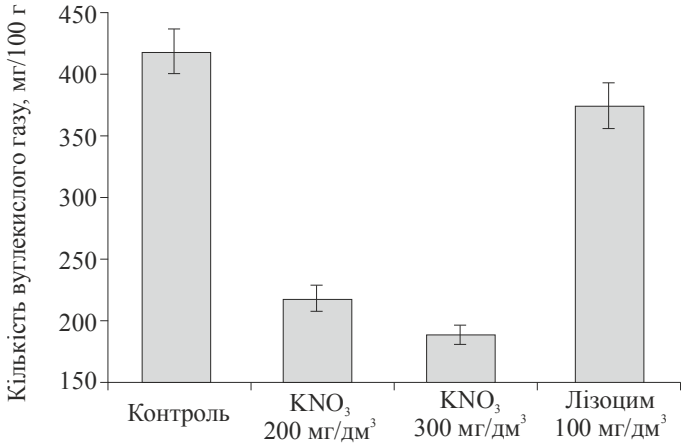

Рис. 1. Вплив нітрату калію та лізоциму на здатність *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* до газоутворення

У формуванні органолептичних показників твердих сирів голландської групи важливу роль відіграють лактококи виду *Lactococcus lactis ssp. diacetilactis* завдяки утворенню широкої гами смако-ароматичних речовин, зокрема діацетилу. Оскільки внаслідок дії досліджуваних бактерицидних засобів спостерігали доволі істотну втрату активності заквашувальних культур, то важливо було прослідкувати вплив цих сполук на здатність 12 штамів підвиду *L. diacetilactis* до утворення діацетилу (рис. 2).

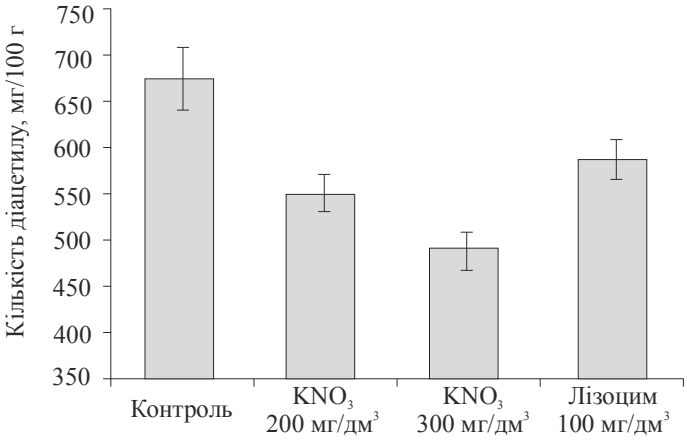

Рис. 2. Вплив нітрату калію та лізоциму на здатність *Lactococcus lactis ssp. diacetilactis* до утворення діацетилу

Як свідчать отримані результати, втрати здатності до продукування діацетилу ароматоутворюючими молочнокислими бактеріями при внесенні KNO_3 у кількості 200 мг на дм^3 молока становили від 5% до 27%, а в разі збільшення дози селітри до 300 мг/дм^3 досліджуваний показник досягав значень 10—30%. Слід зазначити, що отримані показники дещо вищі за дані щодо пригнічення ростових характеристик цих культур. Це може бути свідченням того, що застосування KNO_3 у зазначених концентраціях позначалося також і на зміні біохімічних властивостей окремих штамів. В разі застосування 100 мг/дм^3 лізоциму кількість виділеного діацетилу знижувалася на 9—16% порівняно з контролем.

Ефективність дії лізоциму на збудників вади «пізнє спучування» бактерій виду *Clostridium tyrobutyricum* було досліджено лабораторним шляхом під час експозиції у рідкому середовищі Ласса за анаеробних умов упродовж 14 год за температури 37°С (рис. 3).

Початковий рівень інокуляції маслянокислими бактеріями становив $1 \cdot 10^4$КУО/см^3. В разі внесення у середовище ферменту у кількості 100 мг/дм^3 чисельність клостридій упродовж визначеного терміну культивування знижувалася більше ніж на 2,5 порядки, досягаючи 30 КУО/см^3, причому знешкодження вегетативних клітин спостерігали вже через 2 год після обробки. Без додавання лізоциму у модельному середовищі за 14 год експозиції маслянокислі бактерії демонстрували ріст, збільшивши чисельність у 1,5 раза. Тож отриманий рівень інгібування *Clostridium tyrobutyricum* достатній для забез-

печення показників сиропридатності молочної сировини згідно з чинними вітчизняними вимогами.

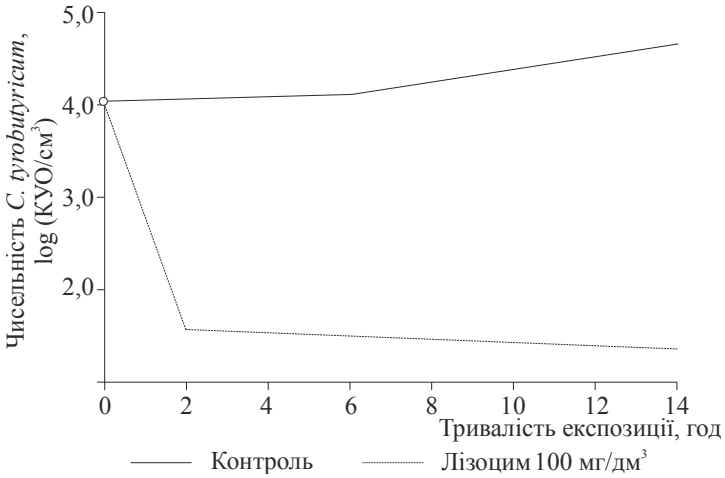

Рис. 3. Вплив лізоциму на ріст *Clostridium tyrobutyricum*

Порівняння способів захисту твердих сирів від маслянокислого бродіння у промислових умовах було проведено шляхом органолептичної оцінки двох партій сирів «Сметанковий» віком 60 діб, що були вироблені у період підвищеного забруднення сировини споровими лактатзброджувальними бактеріями. Першу партію виготовляли за традиційною технологією з додаванням KNO_3 у кількості 300 г на 1 т молока у сирне зерно перед його другим нагріванням, другу партію — шляхом внесення 100 г/т лізоциму у молочну суміш після заквашування. Інші технологічні режими та інгредієнти були ідентичними. Визрівання обох варіантів запакованих у бар'єрну плівку сирів здійснювали у камері з температурою 11°С за відносної вологості повітря 85%. Зрілий сир, під час виробництва якого використовували нітрат калію, характеризувався нижчими балами за смак та аромат порівняно з продуктом, виготовленим з додаванням лізоциму. Крім того, застосування обробки молока ферментним препаратом дало змогу мінімізувати відбракування сирів з вадою «пізнє спучування». Варто відзначити, що за традиційним методом запобігання розвитку клостридій селітрою бактерицидна дія цього інгредієнта проявлялася лише під час визрівання сирів, тоді як активність лізоциму гарантувала мікробіологічну безпеку сировини вже на початкових стадіях технологічного процесу.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці та впровадженні у виробництво нових видів молочних продуктів, технологія яких передбачає попередню обробку сировини ферментними препаратами лізоциму.

Висновки

1. Проведено порівняння рівня інгібування основних заквашувальних культур для сироробства (мезофільних лактококів, термофільних стрептококів, лактобацил і пропіоновокислих бактерій) під впливом нітрату калію у

кількостях 200 мг/дм^3 та 300 мг/дм^3 та лізоциму у кількості 100 мг/дм^3. Показано, що при використанні ферментного препарату втрата активності штамів *Propionibacterium* була у 2,0—2,8 раза нижча, ніж під дією селітри.

2. Встановлено, що застосування лізоциму менш згубно діє на здатність пропіоновокислих бактерій до газоутворення, ніж певні дози калієвої селітри.

3. Простежено вплив нітрату калію та лізоциму на рівень продукування діацетилу ароматоутворюючими молочнокислими бактеріями у молоці.

4. Досліджено ефективність дії лізоциму на бактерії виду *Clostridium tyrobutyricum* у лабораторних умовах, а промисловими тестами доведено перевагу застосування цього ферментного препарату для запобігання ваді «пізнє спучування» у твердих сирах.

Література

1. Практические рекомендации сыроделам: 197 вопросов и ответов / под ред. П. Л. Г. МакСунни. Санкт-Петербург: Профессия, 2010. 373 с.

2. Panelli S., Brambati E., Bonacina C., Feligini M. Detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk to prevent late blowing in cheese by automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Journal of Food Science*. 2013. Vol. 78, No. 10. P. 1569—1574.

3. Гудков А. В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / под ред. С. А. Гудкова. Москва: ДеЛи принт, 2003. 800 с.

4. Lopez-Enriques L., Rodrigues-Lazaro D., Hernandes M. Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 73, No. 11. P. 3747—3751.

5. Thierry A., Deutsch S.-M., Falentin H., Dalmasso M. New insight into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011. Vol. 149, No. 1. P. 19—27.

6. Brasca M., Morandi S., Silvetti T., Rosi V., Cattaneo S. Different analytical approaches in assessing antibacterial activity and the purity of commercial lysozyme preparations for dairy application. *Molecules*. 2013. Vol. 18. P. 6008—6020.

7. Машкін М. І., Могутова В. Ф., Литвин Т. О. Розробка біотехнології питного пастеризованого молока покращеними функціональними властивостями. *Збірник наукових праць Вінницького національного аграрного університету*. Вінниця, 2013. Вип. 3(73). С.185—191.

8. Инихов Г. С., Брио Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов. Москва: Пищевая промышленность. 1971. 275 с.

9. Інструкція щодо організації виробничого мікробіологічного контролю на підприємствах молочної промисловості / за ред. Г. О. Єресько. Київ: ННЦ «ІАЕ», 2014. 372 с.