

УДК 637.146.2

Боднарчук О.В., к.т.н., Шульга Н.М., к.т.н., Гудима В.В., Кігель Н.Ф., д.т.н. ©
Технологічний інститут молока та м'яса УААН, м. Київ

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЗАКВАШУВАЛЬНОЇ МІКРОФЛОРИ КЕФІРУ

*Досліджено антагоністичну активність грибової кефірної закваски та заквашувальної композиції для виробництва кефіру щодо патогенної та умовно-патогенної мікрофлори. Показано особливості спільного культивування у молоці заквашувальної мікрофлори кефіру та тест-культур бактерій групи кишкової палички, *Staphylococcus aureus* і *Bacillus subtilis*.*

Ключові слова: *грибкова кефірна закваска, заквашувальна композиція, кефір, молочнокислі бактерії, дріжджі, антагоністична активність, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*.*

Кефір – продукт молочнокислого та спиртового бродіння, що виробляють сквашуванням молока симбіотичною кефірною грибовою закваскою. У результаті ферментування у цьому кисломолочному напої накопичується значна кількість молочної кислоти, етанолу, вуглекислого газу, а також смако-ароматичних сполук. Завдяки їм формуються специфічні ознаки продукту та посилюються функціональні властивості, а утворення деякими мікроорганізмами бактеріоцинів, специфічних біологічно активних полісахаридів зумовлює пригнічення росту патогенної мікрофлори та дає змогу віднести кефір до комплексних пробіотиків [1].

За свідченнями численних дослідників [2-3] антагоністичні взаємовідносини обумовлені високим ступенем конкурентності мікрофлори, що залежить від енергії кислотоутворення, стійкості до кінцевих продуктів бродіння (молочної, оцтової та інших кислот), потреб у поживних речовинах, низького рівня окисно-відновного потенціалу (неспецифічний антагонізм) та спричинені дією специфічних факторів (утворення перекису водню, метаболітів антибіотикоподібної природи, бактеріоцинів). Зокрема відомо, що потенціал антагоністичної активності мікробної асоціації кефірного грибка зростає за рахунок вироблення нейтральних ліпідів, амінокислот, коротколанцюгових жирних кислот ферментів, лізоциму, які руйнують стінки бактеріальних клітин.

Прагнення до інтеграції у світову спільноту ставлять перед молокопереробними підприємствами важливу задачу – адаптуватися до умов на міжнародному ринку. І якість та безпечність продукції при цьому є основним інструментом у боротьбі за ринки збуту. Зважаючи на значний рівень бактеріального забруднення молочної сировини зростає ймовірність присутності потенційно небезпечних мікроорганізмів у готовому продукті в разі недотримання технологічних режимів і санітарних правил під час його виробництва. Ці перестороги потребують ретельної перевірки.

Незважаючи на те, що кислотність є важливим чинником регулювання росту та виживання сторонньої мікрофлори, ферментовані молочні продукти з високою кислотністю все ж таки є причиною спалахів харчових отруень. Є свідчення, що кислоторезистентні штами бактерій групи кишкової палички, спороутворювальних бактерій та стафілококів можуть виживати і впродовж довготривалого зберігання продукту [4].

У Технологічному інституті молока та м'яса розроблено заквашувальну композицію для виробництва кефіру. Біотехнологія цієї культури передбачає використання як основи природного симбіозу грибової кефірної закваски у кількості 25% з додатковим залученням виділених виключно з кефірних грибків лактобактерій видів *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* та лактозонегативних дріжджів *Saccharomyces unisporus*. Їхнє застосування дає змогу одержати продукт з характерними для кефіру ознаками.

Оскільки відомо, що молочнокислі бактерії та дріжджі пригнічують життєдіяльність патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів і здатні до їхнього конкурентного витіснення, науковий та практичний інтерес становило вивчення антагоністичних властивостей кефірних заквасок.

Метою роботи було дослідити антагоністичну активність грибової кефірної закваски та новоствореної бактеріальної композиції для виробництва кефіру щодо основних небезпечних контамінантів.

Об'єктами досліджень були грибовка кефірна закваска (ГКЗ), заквашувальна композиція (ЗК), дріжджі виду *Saccharomyces unisporus*, 15 штамів тест-культур видів *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri*.

Матеріали та методи досліджень. Антагоністичну активність заквасок щодо тест-культур визначали методом «лунок» за величиною зон затримки росту [5], а також за приростом чисельності відповідної тест-культури порівняно з її початковим вмістом під час спільного культивування у молоці упродовж 5 діб за кількості інокуляту 1%.

Добові тест-культури змивали з поверхні м'ясо-пептонного агару (МПА) фізіологічним розчином та доводили густину бактеріальної суспензії за стандартом мутності Мак-Ферлана до 10^8 КУО/см³.

Для одержання грибової кефірної закваски у пастеризоване знежирене молоко вносили кефірні грибки за співвідношення «грибки : молоко» 1:30 та здійснювали культивування за температури (20±2) °С упродовж 16-20 годин до утворення згустку.

Кількість життєздатних клітин бактерій визначали стандартними методами: молочнокислої мікрофлори – згідно з ГОСТ 10444.11-89, дріжджів – згідно з ГОСТ 10444.12-88, *Staphylococcus aureus* – згідно з ГОСТ 10444.2-94. Чисельність мікроорганізмів роду *Escherichia* sp. аналізували методом висіву серійних розведень на селективне хромогенне середовище (Coliform-agar), *Bacillus subtilis* – на середовище МПА.

Рівень активної кислотності визначали потенціометрично.

Повторюваність дослідів триразова.

Результати досліджень. Результати з визначення антагоністичної активності ГКЗ, заквашувальної композиції ЗК та дріжджів виду *Saccharomyces unisporus*, що входять до складу заквашувальної композиції, показали їхню високу здатність до пригнічення росту патогенної та умовно-патогенної мікрофлори (табл. 1).

Таблиця 1.

Антагоністична активність грибової кефірної закваски, заквашувальної композиції для виробництва кефіру та дріжджів

Тест-культура	Кількість штамів тест-культур	Величина зон затримки росту тест-культур, мм		
		ГКЗ	ЗК	<i>Saccharomyces unisporus</i> 5502
<i>Escherichia coli</i>	3	14±4	15±2	19±10
<i>Escherichia blattae</i>	1	21±3	15±1	25±2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	18±2	15±1	29±4
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	15±3	16±4	14±5
<i>Staphylococcus epidermis</i>	1	19±2	13±3	29±2
<i>Bacillus subtilis</i>	2	32±3	30±2	32±4
<i>Proteus sp.</i>	3	14±4	12±1	12±3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	8±1	8±1	12±1

Встановлено, що більшість із проаналізованих патогенних і умовно-патогенних бактерій були чутливими до дії заквашувальних культур. Так, величина зон затримки росту спороутворювальних мікроорганізмів *B. subtilis* становила від 28 мм до 36 мм, бактерій групи кишкової палички *E. blattae* – від 14 мм до 27 мм, стрептококів виду *S. epidermis* – від 10 мм до 31 мм. Як свідчать експериментальні дані, ГКЗ та дріжджі активніше пригнічували усі тест-культури, особливо мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*, у порівнянні зі ЗК. Очевидно, це обумовлено дією лактобацил та інших складових мікробіоти грибової закваски, які у процесі метаболізму утворюють органічні кислоти, у тому числі молочну кислоту та ряд коротколанцюгових жирних кислот. Помірніша антагоністична активність ЗК пов'язана з тим, що до її складу залучено лише чверть об'єму мікробного симбіозу кефірних грибків.

Водночас кефірні закваски та дріжджі характеризувалися відносно низьким рівнем інгібування псевдомонад (7-13 мм) та протею (10-18 мм).

Наявність зон пригнічення небезпечних контамінантів мікрофлорою кефірних заквасок на твердих середовищах недостатньо висвітлює характер їх взаємовідносин у виробничих умовах. Слід враховувати, що у рідкому середовищі – молоці, кількість життєздатних клітин мікроорганізмів та виділених ними антимікробних речовин знижується. Тому оцінка росту всіх груп мікроорганізмів заквашувальної мікрофлори та виживання шкідливої у ході технологічного процесу виробництва кефіру є доречною і привертає увагу, насамперед, з питань безпеки та якості виробленого продукту.

За спільного росту тест-культур та досліджуваних культур у молоці встановлено, що мікрофлора кефірних заквасок згубно діє на контамінантні бактерії (рис. 1).

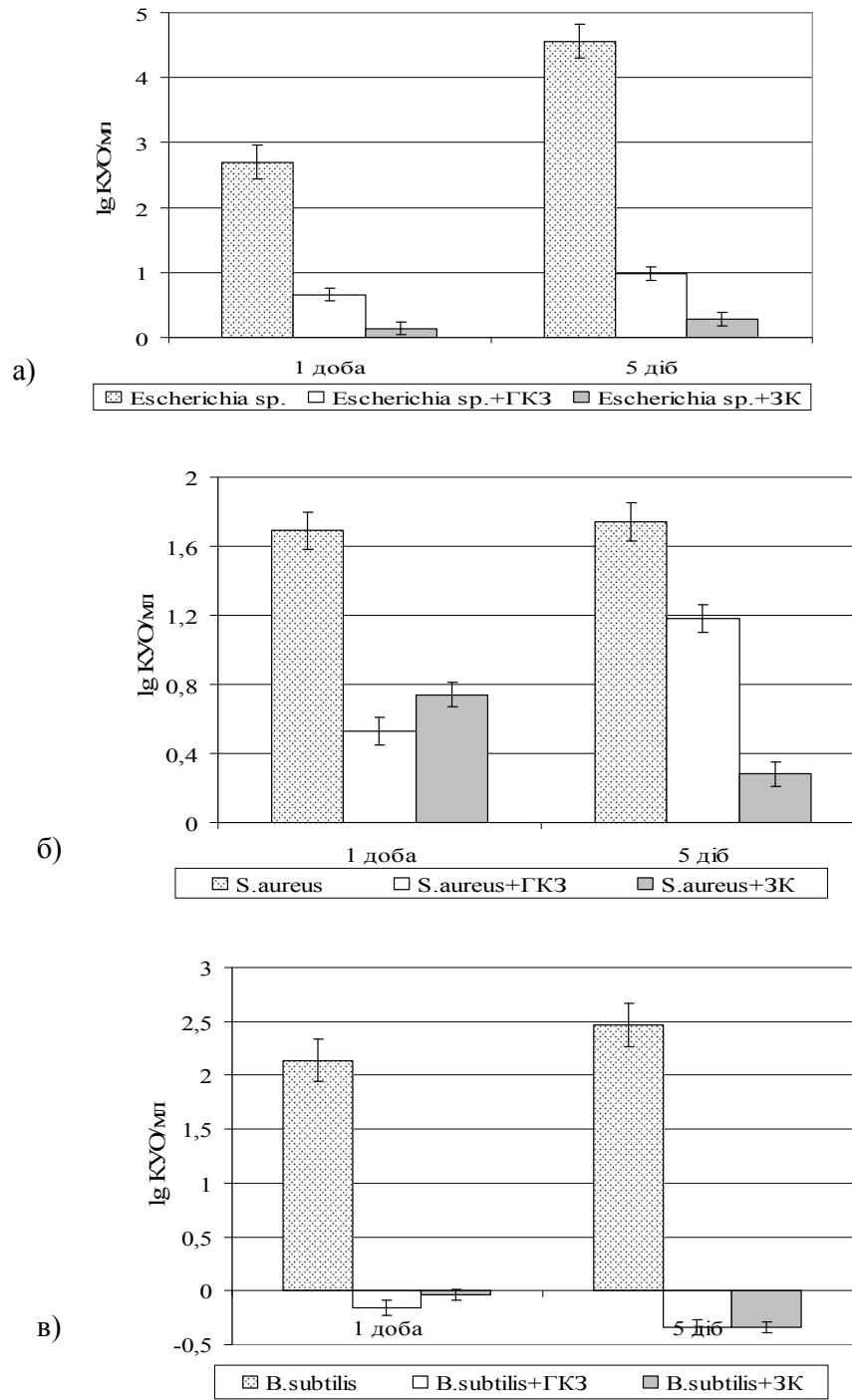


Рис. 1. Індекс антагоністичної активності ГКЗ та ЗК щодо тест-культур під час спільного культивування з упродовж 5 діб:
 а) - *Escherichia sp.*, б) - *S. aureus*, в) - *B. subtilis*

Про це свідчить істотне зниження чисельності всіх тест-культур у продуктах, вироблених як зі застосуванням симбіотичної грибової закваски, так і новоствореної заквашувальної культури. Зокрема, найвразливішими були клітини *B. subtilis*. Під час спільного культивування з ГКЗ та ЗК чисельність спороутворювальних бацил знижувалася від 0,16 lg КУО/см³ на 1 добу до 0,35 lg КУО/см³ після 5 діб зберігання кефіру порівняно з початковим вмістом (4,34 lg КУО/см³), тоді як у разі інокулювання молока лише бактеріями *B. subtilis* кількість останніх наприкінці зберігання досягала 6,48 lg КУО/см³.

У разі спільного нарощування у молоці заквашувальної мікрофлори та бактерій роду *Escherichia* sp. також спостерігали значну затримку росту кишкової палички на відміну від їхнього росту у чистій культурі. Однак упродовж п'ятиденного зберігання досліджуваних зразків було відмічено приріст чисельності вказаної тест-культури на 0,28-0,98 lg КУО/см³. У свіжовироблених кефірах помічено тенденцію до уповільнення росту бактерій групи кишкової палички з підвищенням кислотності. Варто акцентувати увагу, що рівень активної кислотності у всіх молочних згустках досягав від 3,92 од. рН до 4,02 од.рН. Проте, навіть за умови такої низької кислотності середовища досліджувані штами роду *Escherichia* були здатні до виживання. Це свідчить про високу небезпеку цих контамінантів у молочній промисловості, адже посилене їхнє розмноження може не лише зумовити вади кисломолочних напоїв: надмірне газоутворення, що супроводжується утворенням зброженого згустку, нечистий смак та запах продукту, але й стати причиною харчових отруєнь.

Аналогічну тенденцію спостерігали і в разі спільного культивування ГКЗ та ЗК з *S. aureus*. Рівень пригнічення золотистого стафілококу під впливом заквашувальної мікрофлори становив від 56% до 68%. Упродовж 5 діб зберігання зразку, виробленого з використанням ЗК, чисельність *S. aureus* знижувалася ще на 28%. Разом з тим активна кислотність середовища упродовж зазначеного періоду змінювалася незначно (від 4,29 од.рН до 4,17 од.рН). Очевидно, антагоністичні властивості ЗК обумовлені не лише за рахунок накопичення молочної кислоти, але й інших біологічно активних речовин.

Слід зазначити, що у молоці мікрофлора ЗК інтенсивніше гальмувала розвиток усіх тест-культур, знижуючи чисельність останніх на 1,5-2,0 порядки. Пригнічення їхнього росту можна пояснити не лише несприятливим впливом кислої реакції продукту, зниженням температури впродовж зберігання, але й антагоністичною дією заквашувальної мікрофлори. Проте результати досліджень показують, що *Escherichia* sp. і *S. aureus* можуть виживати і розмножуватися під час виробництва продукту, їхній уміст може зростати у 2,0-2,2 рази наприкінці зберігання. Крім того, небезпечною є також забруднення цими мікроорганізмами продукту на всіх технологічних етапах виробництва. Також основні зусилля необхідно спрямовувати на поліпшення якості вихідної сировини.

Контамінування молока сторонньою мікрофлорою позначалося на розвитку заквашувальних культур. У всіх дослідних варіантах у порівнянні з

контролями (кефіри, виготовлені лише на кефірних заквасках без інфікування патогенними та умовно-патогенними бактеріями) відмічено зниження чисельності всіх складових мікроорганізмів заквасок (табл. 2). Так, уміст мезофільних лактобактерій ГКЗ та ЗК через 1 добу спільного культивування з тест-культурами знижувався від 8,5% до 11,5%, ароматоутворювальних молочнокислих мікроорганізмів – від 4,5% до 18,0%, дріжджів – від 4,0% до 13,5%. Упродовж 5 діб зберігання подібна тенденція зберігалася. Ймовірним поясненням такої динаміки розвитку заквашувальної мікрофлори може бути конкурування за поживні речовини, а також часткове гальмування під дією продуктів метаболізму сторонньої мікрофлори. Слід відмітити, що з-поміж проаналізованих варіантів спороутворювальні бацили *B. subtilis* найменше впливали на розвиток усіх складових заквашувальної мікрофлори. У разі застосування ЗК уповільнення розвитку молочнокислих бактерій було менш вираженим порівняно з ГКЗ, очевидно, завдяки додатковому залученню до складу нової бактеріальної композиції дріжджів *Saccharomyces unisporus*, які збагачують середовище рядом незамінних продуктів свого метаболізму і є факторами росту для лактобактерій.

Таблиця 2.

Розвиток мікрофлори кефірної грибової закваски та заквашувальної композиції за спільного культивування з тест-культурами

Об'єкти досліджень	Чисельність, lg КУО/см ³					
	ММКБ		АМКБ		дріжджів	
	1 доба	5 діб	1 доба	5 діб	1 доба	5 діб
ГКЗ	8,90±0,25	8,45±0,21	7,35±0,18	6,90±0,22	5,77±0,31	5,95±0,26
<i>Escherichia</i> sp.+ ГКЗ	7,86±0,23	7,62±0,18	7,11±0,17	6,46±0,15	5,00±0,11	4,38±0,10
<i>S. aureus</i> +ГКЗ	8,16±0,24	7,20±0,16	6,00±0,27	6,78±0,17	5,65±0,20	4,15±0,13
<i>B.subtilis</i> +ГКЗ	8,15±0,21	6,90±0,17	6,60±1,21	6,49±0,18	5,04±0,15	4,90±0,15
ЗК	8,95±0,17	8,75±0,21	8,85±0,21	8,41±0,20	4,78±0,21	4,88±0,17
<i>Escherichia</i> sp.+ ЗК	8,04±0,26	7,90±0,22	8,50±0,18	8,34±0,23	4,70±0,22	4,15±0,21
<i>S. aureus</i> +ЗК	8,26±0,14	8,23±0,15	8,08±0,22	8,00±0,20	4,78±0,21	4,26±0,25
<i>B.subtilis</i> +ЗК	8,80±0,19	8,72±0,12	8,43±0,09	8,39±0,21	4,35±0,16	4,30±0,24

Примітка. МКБ – мезофільні молочнокислі бактерії,

АМКБ – ароматоутворювальні молочнокислі бактерії

Таким чином, новостворена заквашувальна композиція володіє високим антагоністичним потенціалом щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій.

Висновки. Встановлено, що мікрофлора ГКЗ та ЗК для виробництва кефіру володіє антагоністичною активністю щодо бактерій родини *Enterobacteriaceae*, золотистого стафілококу *S. aureus* та спороутворювальних бацил *B. subtilis*, спричиняючи зони затримки росту на твердому середовищі від 12 мм до 36 мм. У результаті досліджень особливостей спільного культивування заквашувальної мікрофлори кефіру та означених тест-культур показано здатність новоствореної композиції пригнічувати розвиток патогенних та умовно-патогенних бактерій на 1,5-2,0 порядки упродовж 5 діб

зберігання продукту. Доведено, що контамінування молока сторонньою мікрофлорою призводить до уповільнення розвитку молочнокислих мікроорганізмів на 8,5-11,5%. Отримані результати мають велике значення для наукового обґрунтування мікробіологічних ризиків на шляху наближення національних стандартів щодо безпечності молочних продуктів до вимог ЄС.

Література

1. Farnworth E.R. Kefir – a complex probiotic // Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods. – 2004. – Vol. 2. – P. 1–17.
2. Karagozlu N., Karagozlu C., Ergonul B. Survival characteristics of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during kefir fermentation // Czech. J. Food Sci. – 2007. – Vol. 25, № 4. – P. 202-207.
3. Gulmez M., Guven A. Survival Characteristics of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in ayran and modified kefir as pre- and post fermentation contaminant // Vet. Med. Czech. – 2003. – Vol. 48, № 5. – P. 126-132.
4. Ulusoy B.H., Colac H., Hampicyan H., Erkan M. E. An *in vitro* study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens // Turk Microbi Cem Derg. – 2007. – Vol. 37, № 2. – P. 103-107.
5. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антагонистической активности. – М.: Высшая школа, 1975. – 209 с.

Summary

Bodnarchuk O., Shulga N., Gudyma V., Kigel N.
ANTAGONISTIC ACTIVITY OF KEFIR STARTERS

Antagonistic activity of grain kefir starter and starter composition for kefir manufacture against same pathogens was investigated. Specificity of simultaneous cultivation of kefir starters and test-cultures of coli-forms bacteria, Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis was shown in milk.

Стаття надійшла до редакції 9.04.2010