Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj

doi:10.15421/nvlvet6821

ISSN 2413–5550 print
ISSN 2518–1327 online

http://nvlvet.com.ua/

УДК 579.222:637.3

Біотехнологія створення вітчизняних бактеріальних препаратів для молочної промисловості України

І.М. Сливка, О.Й. Цісарик
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

У статті висвітлені результати біотехнологічних досліджень конструювання нового бактеріального препарату для виробництва бринзи в промислових умовах.

Проведено скринінг 106 культур молочнокислих бактерій (МКБ) виділених із традиційної бринзи виготовленої у непромислових умовах із овечого молока у Карпатському регіоні України.

При відборі штамів МКБ для конструювання складу бактеріального препарату за технологічними властивостями враховували ступінь і швидкість кислотоутворення та стійкість культур мікроорганізмів до підвищених концентрацій NaCl – 4 і 6,5%.

В результаті проведених досліджень відібрано п'ять штамів МКБ, які були найстійкішими до високих концентрації NaCl (6,5%) та проявляли високу кислотоутворювальну активність. Lactococcus lactis ssp. lactis SB 44 – 98 °T; Enterococcus faecium SB 12 – 86 °T; Lactobacillus plantarum SB 17 – 85 °T; Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides SB 8 – 70 °T; Lactococcus garvieae SB 26 – 67 °T.

Встановлено оптимальне співвідношення МКБ Lac. lactis ssp. lactis – 50%, Lbc. plantarum – 15%, E. faecium –20%, Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides – 10% та Lac. garvieae – 5% у складі бактеріального препарату, що забезпечує найкращі споживчі характеристики готовому продукту.

Виробництво бринзи із підібраним консорціумом мікроорганізмів, який є типовою мікрофлорою для традиційного карпатського сиру бринза, дозволяє отримати безпечний та якісний харчовий продукт, який відповідає вимогам згідно з ДСТУ 7065:2009 і забезпечує збільшення чисельності життєздатних МКБ до 5,2x10^7 КУО/г продукту.

Ключові слова: *бактеріальний препарат, карпатська бринза, молочнокислі бактерії, органолептичні показники, фізико–хімічні показники, мікробіологічні показники, технологічні властивості, кислотоутворювальна активність, солестійкість.*

Препаратов для молочной биотехнология создание отечественных бактериальных промышленности Украины

И.Н.Сливка, О.И. Цисарык
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

В статье освещены результаты биотехнологических исследований конструирования нового бактериального препарата для производства брынзы в промышленных условиях.

Проведен скрининг 106 культур молочнокислых бактерий (МКБ) выделенных из традиционной брынзы изготовленной в непромышленных условиях с овечьего молока в Карпатском регионе Украины.

При отборе штаммов МКБ для конструирования состава бактериального препарата по технологическим свойствам учитывали степень и скорость кислотообразования и устойчивость культур микроорганизмов к повышенным концентрациям NaCl – 4 и 6,5%.

Citation:
Slyvka, I.M., Tsisaryk, O.Y. (2016). Biotechnology of national bacterial preparations for the dairy industry of Ukraine. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 2(68), 103–110.

В результате проведенных исследований отобраны пять штаммов МКБ, которые были устойчивыми к высоким концентрации NaCl (6,5%) и проявляли высокую кислотопродуцирующая активность: Lactococcus lactis ssp. lactis SB 44 – 98 °T; Enterococcus faecium SB 12 – 86 °T; Lactobacillus plantarum SB 17 – 85 °T; Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides SB 8 – 70 °T; Lactococcus garvieae SB 26 – 67 °T.

Установлено оптимальное соотношение МКБ Lac. lactis ssp. lactis – 50%, Lbc. plantarum – 15%, E. faecium – 20%, Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides – 10% и Lac. garvieae – 5% в составе бактериального препарата, которое обеспечивает лучшие потребительские характеристики готовому продукту.

Производство брынзы с подобранным консорциумом микроорганизмов, который является типичной микрофлорой для традиционного карпатского сыра брынза, позволяет получить безопасный и качественный пищевой продукт, который отвечает требованиям по ГОСТ 7065: 2009 и обеспечивает увеличение численности жизнеспособных МКБ до 5,2x10^7 КОЕ/ г продукта.

Ключевые слова: *бактериальный препарат, карпатская брынза, молочнокислые бактерии, органолептические показатели, физико–химические показатели, микробиологические показатели, технологические свойства, кислотопродуцирующая активность, солеустойчивость.*

Biotechnology of national bacterial preparations for the dairy industry of Ukraine

I.M. Slyvka, O.Y. Tsisaryk
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyi, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine

The article presents the results of biotechnological research designing new bacterial preparation for cheese production in industrial conditions.

Conducted a screening 106 cultures of lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditional cheese made in non–industrial conditions with ewe's milk in the Carpathian region of Ukraine.

For the construction of bacterial preparation of the selection strains of LAB into account the technological properties, which include the degree and rate of acid production and resistance microbial cultures to high concentrations of NaCl – 4 and 6.5%.

As a result of the of the research were selected five strains of LAB which are most stability to high concentrations of NaCl (6.5%) and showed high activity of acid production. The composition of bacterial preparation included the following strains of LAB: Lactococcus lactis ssp. lactis SB 44 – 98 °T; Enterococcus faecium SB 12 – 86 °T; Lactobacillus plantarum SB 17 – 85 °T; Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides SB 8 – 70 °T; Lactococcus garvieae SB 26 – 67 °T.

The established optimal ratio of LAB in the composition of bacterial drug that provides the best consumer characteristics of the finished product. This ratio of LAB is as follows: Lactococcus lactis ssp. lactis – 50%, Lactobacillus plantarum – 15%, Enterococcus faecium –20%, Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides – 10% and Lactococcus garvieae – 5%.

The production of cheese with chosen consortium of microorganisms, which is typical for traditional Carpathian microflora a brine cheese, provides a safe and quality food product that meets the requirements according to ISO 7065: 2009 and provides an increase in the number of viable of LAB to 5,2x10^7 CFU / g.

Key words: *bacterial preparation, traditional Carpathian brine cheese, lactic acid bacteria, organoleptic properties, physical and chemical properties, a microbiological indicators, technological properties, activity of acid production, stability of salt.*

Вступ

Однією із основних тенденцій розвитку світового та українського ринку харчових продуктів є виробництво і споживання молока, ферментованих молочних продуктів та сирів. Це безпосередньо пов'язано з тим, що продукція цієї галузі займає важливе місце у харчуванні людини (Smolyar, 2007).

Відтворення природного видового і штамового різноманіття бактерій традиційних національних кисломолочних продуктів і сирів у бактеріальних препаратах для промислового застосування є передумовою не тільки контрольованого здійснення технологічних процесів і отримання продуктів з бажаними властивостями, але й збереження природних мікробіоценозів. Вони формувалися в еконішах упровдовж століть природним добором і пристосовані як до кліматичних умов, так і до технологічних особливостей виробництва традиційних продуктів. Важливо, що мікрофлора таких джерел може бути наділена спеціальними функціональними властивостями, насамперед, пробіотичними, вивчення яких має важливе теоретичне і прикладне значення Karakus M., 2002; Кушнір І.М., 2004; Дідух Н.А., 2008; Giraffa G., 2010; Чагаровський О.П., 2011), на чому базується біотехнологія створення бактеріальних препаратів.

З огляду на це, особливої уваги заслуговує таксономічне положення та цілісна характеристика властивостей молочнокислих бактерій (МКБ), включаючи інформацію про генотип, що є можливим завдяки використанню сучасних молекулярно–генетичних методів (Hammes W.P., 2006; Ботіна С.Г., 2008; Коваленко Н.К., 2009; Giraffa G., 2010; Василюк О.М., 2014). Ідентифікація МКБ за генетичними ознаками дозволяє ефективно проводити відбір перспективних штамів і застосовувати їх у промисловості для виробництва традиційних та інноваційних молочних продуктів (Giraffa et al., 2010).

Крім того, штами, які є перспективними для залучення до складу сучасних бактеріальних препаратів, мають володіти певними технологічними властивостями, а саме, забезпечувати високу врожайність під час нарощування у виробничому середовищі та бути стійкими до особливостей технологічного процесу

(соління, визрівання тощо) (Didux, 2008; Giraffa et al., 2010; Chagarovs`ky`j and Didux, 2011; Vasy`lyuk et al., 2014).

Сучасна молочна промисловість здебільшого використовує імпортні бактеріальні препарати для виробництва ферментованих продуктів і сирів. Принциповою перевагою вітчизняних бактеріальних препаратів є адаптованість штамів молочнокислих бактерій до особливостей технології вітчизняних кисломолочних продуктів та популяції мікроорганізмів характерних для певних географічних регіонів України. Тому недостатня кількість вітчизняних препаратів є великим недоліком української біотехнологічної промисловості (Didux, 2008).

У світі спостерігається тенденція до створення регіональних бактеріальних препаратів із метою збереження певних традиційних технологій виготовлення ферментованих продуктів. Таким продуктом в Україні є карпатський розсольний сир бринза, який має свої особливості, що визначаються еколого–географічними умовами кліматичної зони регіону та особливістю його виробництва. Використання ізольованих штамів МКБ їз карпатської бринзи у складі бактеріального препарату збереже класичну природу традиційних продуктів (Hayologlu et al., 2002; Didux, 2008; Botina, 2008).

Метою роботи було вивчення технологічних властивостей домінуючих видів МКБ виділених із традиційної карпатської бринзи, ідентифікованих за молекулярно–генетичними ознаками, та конструювання на їх основі складу бактеріального препарату для виробництва бринзи у промислових умовах.

Матеріал та методи досліджень

У наукових дослідженнях використано культури МКБ виділені із бринзи, що виготовляється із овечого молока у непромислових умовах Карпатського регіону України.

Культури бактерій ідентифіковано із використанням класичних мікробіологічних і сучасних молекулярно–генетичних методів (RAPD–PCR, RFLP–PCR, секвенування гену 16S рРНК) (Slyvka and Cisary`k, 2013; Slyvka et al., 2014; Slyvka and Cisary`k, 2015).

За основні критерії оцінки придатності культур МКБ як складових майбутнього бактеріального препарату було взято необхідні технологічні параметри, які включали кислотоутворювальну активність ферментації молока, стійкість до високих концентрацій NaCl та температурні оптимуми культивування штамів бактерій.

Кислотоутворювальну активність оцінювали за зниженням pH молока, сквашеного відповідним бактеріальним штамом. Бактерії інкубували в стерильному знежиреному молоці без внесення додаткових компонентів, яке розливали у 5 мл пробірки, засівали 1% інокуляту та інкубували при 30 °С у термостаті протягом 3, 6, 9, 24 год. Титровану кислотність молока визначали за ГОСТ 3624–92 «Молоко і молочні продукти. Титрометричні методи визначення кислотності». Вимірювання активної кислотності проводили за допомогою електронного pH–метра «*Muttler Toledo MP220*».

Здатність культур лактобактерій розвиватись при певних концентраціях NaCl визначали за 4% і 6,5% її концентрації та при різних температурних режимах (+10 °С, +30 °С і +45 °С).

Культивування мікроорганізмів проводили протягом 24 год на спеціальних живильних середовищах (MRS та M17) Культивували кожну культуру окремо протягом 24 год за температури 30 °С. Після закінчення процесу вирощування культуральну рідину нейтралізували до pH (6,5 – 6,6) та відокремлювали біомасу шляхом центрифугування на суперцентрифузі при 15000 об/хв фірми *Thermo Scientific*, після чого змішували із захисним середовищем.

Захисне середовище, яке використовували для біомаси клітин містило сахарозу (10%), цитрат натрію (5%) та сухе знежирене молоко (30%). Співвідношення біомаси клітин до захисного середовища становило 1:2. Суспензії бактеріальних клітин заморожували і сушили методом сублімації протягом (18 ± 2) год. Початкова температура сушіння –25 °С, при закінченні +36 °С.

Отримані одноштамові концентрати *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides*, *Lactococcus garvieae* змішували у співвідношенні 50:20:15:10: 5% відповідно.

Параметри ферментаційного процесу – дозу бактеріального препарату (20 г/1 т молочної основи) встановлено в експериментальних умовах на 1 л молока. Підбір дози проведено у розрахунку кінцевого виходу чисельності МКБ у кількості не менше як $1x10^7$ КУО/г.

Аналіз готового продукту проводили згідно з ДСТУ 7065:2009 (Бринза. Загальні технічні умови).

Чисельність МКБ визначали згідно з ГОСТ 104444.11–89.

Результати та їх обговорення

Відбір культур МКБ для конструювання бактеріального препарату проводили за комплексною оцінкою їх властивостей. Загалом, проведено скринінг 106 культур МКБ. Досліджувані культури МКБ відносилися до таких видів: *Lactococcus lactis ssp. lactis (13 культур), Lactobacillus plantarum (31 культур), Enterococcus faecium (25 культур), Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides (24 культур)* та *Lactococcus garvieae (13 культур).*

У результаті цілеспрямованого відбору для включення у склад бактеріального препарату було відібрано п’ять штамів лактобактерій: *Lactococcus lactis ssp. lactis (SB 44), Lactobacillus plantarum (SB 17), Enterococcus faecium (SB 12), Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides (SB 8)* та *Lactococcus garvieae (SB 26).*

При відборі штамів молочнокислих бактерій за технологічними властивостями важливо враховувати ступінь і швидкість кислотоутворення бактеріальних мікроорганізмів, так як це безпосередньо впливає на смак продукту, його фізичні якості, швидкість отримання готового продукту, його збереження і взаємодію з іншими компонентами бактеріального препарату.

Активна кислотність кисломолочного продукту (pH), особливо сиру прямо пов'язана з вмістом у ньому і формою кальцію. Повільніше утворення кислоти знижує швидкість переходу однієї форми казеїну, що знаходиться в комплексі з двома іонами кальцію, в іншу форму, що утворює комплекс з одним іоном кальцію (dicalcium para–casein в monocalcium para–casein), що призводить до зниження тягучості кінцевого продукту. Якщо pH молочного згустку продовжує падати до значень 5,1 – 5,3, то втрачається більше кальцію, згусток стає менш щільним (Siegumfeldt et al., 2000). Активна кислотність (pH) для свіжого молока становить 6,47 – 6,67. Така кислотність сприятлива для стійкості колоїдної системи молока і розвитку молочної мікрофлори. Кислотоутворювальна здатність слугує критерієм відбору штамів для використання у виробництві ферментованих молочних продуктів та сирів.

Кислотоутворювальну активність штамів щодо зброджування молока вимірювали кількісно. Результати динаміки змін титрованої і активної кислотності молока (pH і °T) при культивуванні в ньому культур МКБ та результати активності росту культур бактерій при різних концентраціях NaCl представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Показники кислотоутворювальної активності та росту МКБ за різних концентрацій NaCl

Вид МКБ	Номер МКБ	Кислотоутворювальна активність МКБ								Ріст МКБ за різних концентрацій NaCl	
		3 год		*6 год*		*9 год*		*24 год*		4%	6,5%
		pH	°T	pH	°T	pH	°T	pH	°T		
Lactobacillus plantarum	*SB 105*	6,28	38,0	6,00	44,5	5,85	50,0	5,15	75,0	–	–
	SB 41	6,46	36,0	6,32	40,0	5,69	55,0	5,12	79,0	–	–
	SB 86	6,29	39,0	5,90	45,0	5,38	66,0	4,90	94,0	–	–
	SB 48	6,90	34,0	6,15	41,0	5,50	56,0	5,01	83,0	–	–
	SB 46	6,59	37,0	6,65	36,0	6,38	38,0	6,24	46,0	+	+
	SB 104	6,70	33,0	6,35	40,0	5,95	46,5	5,45	62,0	+	–
	SB 7	6,26	40,0	5,97	46,0	5,87	52,0	5,01	84,0	–	–
	SB 62	6,35	39,0	6,00	42,0	5,80	52,0	5,41	63,0	+	–
	SB 81	6,40	38,0	6,05	41,0	5,76	53,0	5,30	67,0	+	–
	SB 63	6,90	34,0	6,15	44,0	5,60	58,0	5,05	83,0	–	–
	SB 102	6,22	41,0	5,98	47,5	5,77	53,0	5,13	81,0	–	–
	SB 24	6,38	32,0	6,33	40,0	5,94	46,5	5,42	60,0	+	–
	SB 92	6,30	38,0	6,05	42,0	5,76	54,0	5,30	67,0	+	–
	SB 36	6,11	41,0	5,97	47,5	5,76	54,0	5,14	81,0	–	–
	SB 2	6,70	33,0	6,35	40,0	5,95	46,5	5,49	63,0	+	–
	SB 64	6,21	40,0	5,90	47,5	5,78	55,0	5,11	82,0	–	–
	SB 98	6,69	33,0	6,35	40,0	5,95	46,5	5,45	60,0	+	+
	SB 90	6,46	36,0	6,32	42,0	5,69	55,0	5,26	79,0	+	–
	SB 13	6,29	39,0	5,90	45,0	5,38	65,0	4,90	94,0	–	–
	SB 61	6,67	33,5	6,30	42,0	5,76	49,0	5,30	63,0	+	–
	SB 93	6,60	32,0	6,65	34,0	6,38	38,0	6,24	46,0	+	–
	SB 106	6,70	33,0	6,35	40,0	5,95	46,5	5,45	60,0	+	+
	SB 22	6,26	40,0	5,99	46,0	5,88	55,0	5,02	84,0	+	–
	SB 17	6,60	34,0	6,15	41,0	5,50	56,0	5,10	85,0	+	+
	SB 67	6,34	37,0	6,12	41,0	5,96	49,0	5,28	72,0	–	–
	SB 74	6,66	30,0	6,63	32,0	6,28	37,0	6,02	45,0	+	+
	SB 87	6,46	36,0	6,32	44,0	5,69	55,0	5,12	79,0	–	–
	SB 99	6,29	39,0	5,90	45,0	5,38	55,0	5,50	64,0	–	–
	SB 53	6,28	42,0	5,99	47,0	5,88	53,0	5,00	84,0	+	–
	SB 5	6,34	39,0	6,00	42,0	5,80	52,0	5,41	63,0	+	–
	SB 40	6,42	37,0	6,05	41,0	5,76	54,0	5,30	67,0	+	–
Lactococcus lactis ssp. lactis	*Продовження таблиці*										
	SB 59	6,30	39,0	5,98	42,0	5,30	66,0	4,97	94,0	–	–
	SB 10	6,34	38,0	5,98	46,0	5,30	67,0	4,91	90,0	+	–
	SB 49	6,37	37,0	5,90	42,0	5,31	68,0	4,99	92,0	–	–
	SB 65	6,67	31,0	6,62	32,0	6,27	37,0	6,02	46,0	+	+
	SB 42	6,56	32,0	6,31	36,0	6,18	39,0	5,89	51,0	–	–
	SB 16	6,36	37,0	5,98	42,0	5,30	61,0	4,99	92,0	–	–
	SB 78	6,61	34,0	6,17	42,0	5,67	54,0	4,93	87,0	–	–
	SB 15	6,58	30,0	6,15	41,5	5,87	50,0	5,18	74,0	+	+
	SB 37	6,30	39,0	5,90	42,2	5,40	65,0	4,99	92,0	–	–
	SB 75	6,65	33,0	6,30	42,0	5,86	49,0	5,33	65,0	+	–
	SB 44	6,15	43,0	5,79	48,0	5,18	71,0	4,81	98,0	+	+
	SB 21	6,67	31,0	6,62	32,0	6,27	37,0	6,02	46,0	+	+

	SB 51	6,56	32,0	6,31	36,0	6,18	40,0	5,89	51,0	+	–
Lactococcus garvieae	*SB 76*	6,66	30,0	6,63	32,0	6,28	37,0	6,02	45,0	–	–
	SB 88	6,65	32,0	6,30	41,0	5,86	50,0	5,35	66,0	–	–
	SB 73	6,66	30,0	6,63	32,0	6,28	37,0	6,02	45,0	+	+
	SB 14	6,68	30,0	6,63	32,0	6,30	38,0	6,00	47,0	–	–
	SB 77	6,67	33,5	6,30	42,0	5,86	49,0	5,33	63,0	–	–
	SB 103	6,60	32,0	6,65	34,0	6,38	38,0	6,24	46,0	+	–
	SB 101	6,65	31,0	6,37	40,0	5,86	51,0	5,35	66,0	–	–
	SB 96	6,63	30,0	6,63	31,0	6,28	37,0	6,02	45,0	+	+
	SB 70	6,66	31,0	6,30	43,0	5,86	50,0	5,45	63,0	–	–
	SB 26	6,34	39,0	6,00	42,0	5,80	55,0	5,33	67,0	+	+
	SB 85	6,67	31,0	6,62	32,0	6,29	36,0	6,00	46,0	+	–
	SB 69	6,56	32,0	6,31	36,0	6,18	39,0	5,80	51,0	+	+
	SB 83	6,58	34,0	6,15	42,5	5,87	50	5,18	74,0	–	–
Leuconostoc mesenteroides	*SB 68*	6,58	32,5	6,31	36,0	6,18	40,0	5,89	54,0	+	–
	SB 25	6,64	30,0	6,63	32,0	6,28	37,0	6,02	45,0	–	–
	SB 45	6,67	32,0	6,30	44,0	5,86	50,0	5,35	68,0	+	+
	SB 11	6,71	31,0	6,63	32,0	6,28	37,0	6,02	49,0	+	+
	SB 29	6,68	30,0	6,64	34,0	6,30	39,0	6,00	46,0	+	–
	SB79	6,65	33,0	6,30	42,0	5,88	49,0	5,32	66,0	+	–
	SB 3	6,59	37,0	6,65	36,0	6,38	38,0	6,24	46,0	+	+
	SB 8	6,70	39,0	6,37	41,0	5,76	51,0	5,25	70,0	+	+
	SB 23	6,62	32,5	6,63	34,0	6,38	38,0	6,24	47,0	+	–
	SB 9	6,67	31,0	6,37	42,0	5,86	52,0	5,35	65,0	+	–
	SB 28	6,75	34,0	6,30	42,0	5,83	49,0	5,32	66,0	+	–
	SB 71	6,61	39,2	6,65	37,0	6,38	38,0	6,24	45,0	–	–
	SB 54	6,65	41,0	6,37	40,0	5,88	51,0	5,25	66,0	–	–
	SB 58	6,34	39,0	6,00	42,0	5,82	52,0	5,43	63,0	+	–
	Продовження таблиці										
	SB 50	6,43	38,0	6,05	41,0	5,86	53,0	5,30	67,0	+	–
	SB 19	6,68	33,0	6,35	41,0	5,95	47,5	5,55	64,0	+	–
	SB 66	6,56	33,0	6,63	37,0	6,25	37,0	5,90	49,0	+	–
	SB 32	6,59	36,5	6,27	43,5	5,87	54,0	5,48	65,0	+	–
	SB 27	6,40	32,0	6,33	40,0	5,94	46,0	5,49	62,0	+	–
	SB 84	6,77	32,0	6,62	35,0	6,57	34,0	6,32	32,0	–	–
	SB 100	6,50	32,0	6,37	36,0	6,18	40,0	5,90	51,0	+	–
	SB 34	6,56	33,0	6,63	37,0	6,28	37,0	6,02	45,0	+	–
	SB 56	6,60	32,0	6,34	41,0	5,86	51,0	5,35	66,0	–	–
	SB 97	6,69	34,0	6,67	32,0	6,28	37,0	6,02	45,0	+	–
Enterococcus faecium	*SB 33*	6,50	32,0	6,31	36,0	6,18	40,0	5,89	59,0	+	+
	SB 80	6,68	34,0	6,63	32,0	6,38	36,0	6,02	45,0	+	+
	SB 18	6,69	32,0	6,37	42,0	5,76	50,0	5,35	79,0	+	–
	SB 60	6,61	33,0	6,61	34,0	6,28	38,0	6,02	45,0	+	+
	SB 72	6,78	36,0	6,63	34,0	6,30	39,0	6,00	57,0	+	+
	SB 31	6,57	33,5	6,33	41,0	5,86	48,0	5,33	65,0	+	+
	SB 57	6,62	30,0	6,64	36,0	6,39	37,0	6,24	56,0	+	–
	SB 43	6,67	31,0	6,47	52,0	5,86	50,0	5,28	76,0	–	–
	SB 82	6,66	34,0	6,38	38,0	6,28	41,0	5,99	57,0	+	+
	SB 1	6,36	37,0	5,97	45,5	5,34	62,0	4,99	91,0	+	–
	SB 89	6,61	33,0	6,19	42,0	5,57	55,0	4,92	87,0	+	–
	SB 52	6,72	31,0	6,67	365	6,38	37,0	6,24	56,0	+	+
	SB 39	6,77	35,0	6,49	52,0	5,86	50,0	5,28	76,0	+	–
	SB 30	6,69	34,0	6,48	38,0	6,39	41,0	5,99	59,0	+	+
	SB 20	6,56	34,0	6,38	37,0	6,38	39,5	5,91	56,0	+	+
	SB 4	6,36	37,0	5,98	42,5	5,35	62,0	4,99	93,0	+	–
	SB 55	6,61	34,0	6,18	42,0	5,68	54,5	4,96	88,0	–	–
	SB 95	6,66	37,0	6,35	37,0	6,18	40,0	5,90	51,0	+	+
	SB 47	6,69	35,0	6,63	32,0	6,28	37,0	6,02	45,0	+	+
	SB 12	6,54	39,0	6,30	51,0	5,86	69,0	4,98	86,0	+	+
	SB 38	6,56	32,0	6,63	33,0	6,28	37,0	6,02	45,0	+	+
	SB 35	6,58	31,0	6,63	32,0	6,30	39,0	6,00	48,0	+	+
	SB 91	6,71	36,5	6,30	46,0	5,89	49,0	5,33	66,0	+	–
	SB 6	6,70	34,0	6,65	34,0	6,38	38,0	6,24	49,0	+	+
	SB 94	6,69	32,0	6,37	40,0	5,86	51,0	5,35	66,0	+	–

За здатністю бактерій до утворення молочної кислоти найкращими кислотоутворювачами із виду *Lactococcus lactis subsp. lactis* були культури – *SB 59* і *SB 44* із енергією кислотоутворення 94°Т і 98°Т відповідно. Представники виду *Lactobacillus plantarum* характеризувались помірною кислотоутворювальною здатністю, культури *SB 86* – 94°Т; *SB 48* – 83°Т; *SB 7* – 84°Т; *SB 63* – 83°Т; *SB 36* – 81°Т; *SB 64* – 82°Т; *SB 13* – 94°Т; *SB 22* – 84 °Т; *SB 17* – 85°Т; *SB 53* – 84°Т. Вид *Enterococcus faecium* відзначався також помірнимими показниками активної та титрованої кислотності, *SB 1* – 91°Т; *SB 89* – 87°Т; *SB 4* – 93°Т; *SB 55* – 88°Т; *SB 12* – 86°Т. Менш виражена кислотоутворювальна здатність відмічалась у виду *Lactococcus garvieae* культур *SB 26* – 67°Т та *SB 83* – 74 °Т і виду *Leuconostoc mesenteroides SB 8* – 70°Т та *SB 45* – 68°Т.

Обов'язковою операцією у технології виробництва бринзи є її соління. Стійкість лактобактерій до високих концентрацій NaCl – 5% (для виробництва бринзи з овечого пастеризованого молока) та 7% (для виробництва бринзи з овечого сирого молока) є одним із важливих аспектів у підборі культур для виробництва бринзи. Тому солестійкість лактобактерій є важливим аспектом при відборі культур бактерій для конструювання бактеріального препарату для виробництва бринзи.

Найстійкішими до високих концентрації NaCl (6,5%) виявились культури роду *Enterococcus SB 33, SB 80, SB 60, SB 72, SB 31, SB 82, SB 52, SB 30, SB 20, SB 95, SB 47, SB 12, SB 38, SB 35, SB 6.* Штами видів *Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis ssp. lactis, Leuconostoc mesenteroides* та *Lactococcus garvieae* характеризувались більшою чутливістю до підвищеної концентрації солі і не проявляли свою активність. Однак серед виду *Lactobacillus plantarum* спостерігали ріст п'яти штамів МКБ (*SB 46, SB 98, SB 106, SB 17, SB 74),* виду *Lactococcus lactis ssp. lactis* чотирьох штамів (*SB 65, SB 15, SB 44, SB 21.* Також чотирьох штамів виду *Leuconostoc mesenteroides (SB 45, SB 11, SB 3 SB 8)* та виду *Lactococcus garvieae (SB 73, SB 96,SB 26,SB 69).*

За підсумком технологічних параметрів для конструювання бактеріального препарату було відібрано п'ять культур МКБ: *Lactococcus lactis ssp. lactis SB 44, Lactobacillus plantarum SB 17, Enterococcus faecium SB 12, Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides SB 8* та *Lactococcus garvieae SB 26*, які характеризувались помірною кислотоутворювальною здатністю та стійкістю до підвищеної концентрації NaCl – 6,5%.

Штам *Lactococcus lactis ssp. lactis SB 44* проявляв більшу стійкість до NaCl та обраний як основний кислотоутворювач (98 °Т) у складі бактеріального препарату.

Включення *Enterococcus faecium* обгрунтовано тим, що його штами становлять значну частку від загальної кількості мікроорганізмів, виділених із бринзи. За своєю біологією ентерококи володіють високою здатністю до виживання. Стійкість до високих концентрацій солі та високих температур створює можливості використання їх у різних технологічних процесах. Особливо важливим є те, що *Enterococcus faecium* проявляє геродієтичні властивості (Chagarovs`ky`j and Didux, 2011).

Тому використання ентерококів при виготовленні традиційних національних сирів може бути обгрунтовано їх важливими технологічними і біологічними властивостями. Сьогодні у вітчизняній промисловості не використовують препарати із ентерококами. Тоді як на Заході їх почали включати до мікробіальних композицій для виробництва сирів.

Штам *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides SB 8* залучений до бактеріального препарату, як ароматоутворювальний вид.

Lactococcus garvieae SB 26 відібраний, як типовий штам, оскільки ізольований із усіз зразків бринзи. За технологічними властивостями він характеризувався низькою здатністю до кислотоутворення – 67°Т, але високою стійкістю до NaCl – 6,5%. Включення штамів *Lactococcus garvieae* у склад бактеріального препарату для виробництва бринзи в промислових умовах має на меті збереження типової природної бактеріальної популяції і відповідальності за оригінальні сенсорні властивості традиційного сиру. Штами *Lactococcus garvieae* можна вважати важливою частиною мікробіального складу бринзи, пов'язаного із природною ферментацією (Fortina et al., 2007).

У пошуках оптимального співвідношення культур МКБ у складі бактеріального препарату для виробництва бринзи у промислових умовах було виготовлено дослідні зразки бринзи за традиційною технологією та проведено їх оцінку. Сири оцінювали за 100–бальною шкалою.

Таблиця 2

Оцінка виготовленої бринзи за 100 бальною шкалою

№ зразка бринзи	1	2	3
Співвідношення культур МКБ у бактеріальному препараті	*Lactococcus lactis ssp. lactis; Lactobacillus plantarum; Enterococcus faecium; Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides; Lactococcus garvieae, %.*		
	60:10:15:10:5	50:15:20:10:5	40:25:20:10:5
Оцінка бринзи за 100 бальною шкалою			
Смак і запах − 50 балів	47	49	46
Консистенція − 25 балів	22	23	22
Малюнок − 10 балів	10	10	10
Колір − 5 балів	5	5	5
Зовнішній вигляд − 10 балів	10	10	10
Загальна кількість − 100 балів	94	97	93

Усі сири мали добре виражений кисломолочний запах. Для зразку 1 відрахували 3 бали за надмірнош виражений кислий смак, що є очевидним внаслідок більшої частини бактерій виду *Lac. lactis ssp. lactis* – 60%. Для зразку 3 відрахували 4 бали за невиражений кисломолочний смак, це пов'язано із меншою часткою МКБ виду *Lac. lactis ssp. lactis* – 40%. Відраховано по 3 і 4 бали за злегка крихку та надмірно щільну консистенцію для зразків бринзи 1 і 3 відповідно. Малюнок, колір та зовнішній вигляд у всіх зразках бринзи відповідав максимальній кількості балів. Зразок 2 відзначався найкращими органолептичними показниками і отримав найвищу кількість балів − 97.

Оскільки, співвідношення МКБ *Lactococcus lactis ssp. lactis – 50%*, *Lactobacillus plantarum – 15%*, *Enterococcus faecium –20%*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides – 10%* та *Lactococcus garvieae – 5%* у бактеріальному препараті забезпечує найкращі споживчі характеристики продукту, тому обране як оптимальне.

При проведені аналізу готового продукту до уваги брали органолептичні показники виготовленої бринзи, фізико–хімічні та мікробіологічні. Згідно з ДСТУ 7065:2009 чисельність гранично допустимого рівня МКБ не регламентована. Мікробіологічні показники обмежені вимогами щодо безпечності споживання бринзи. Вони включають дослідження на наявність БГКП, бактерій роду *Salmonella, Staphylococcus aureus* та *Listeria monocytogenes*.

Порівнюючи чисельність клітин МКБ у бринзі, що виготовлена у непромислових умовах, яка становила $4{,}4^{x}10^{5}$ КУО/г (Slyvka et al., 2013), та виготовленою із створеним бактеріальним препаратом, встановлено, що вона на два порядки є більшою і становить $5{,}2^{x}10^{7}$ КУО/г на 20–ту добу дозрівання сиру. На підставі цього стверджуємо, що використання сконструйованого бактеріального препарату має позитивний вплив на якість виготовленого продукту − бринзи, не лише щодо органолептичних, фізико–хімічних та мікробіологічних показників (згідно з ДСТУ 7065:2009), але й щодо кількості життєздатних МКБ.

На зменшення кількості життєздатних клітин МКБ під час виробництва бринзи очевидно мають вплив технологічні чинники − соління сиру та його визрівання. Тому велику увагу приділено солестійкості культур МКБ. Сьогодні науковцями ведеться робота і в напрямку часткового зниження високих концентрацій NaCl в процесі соління і визрівання бринзи, що дозволить уникати впливу на життєдіяльність молочнокислих мікроорганізмів.

Таким чином, у складі бактеріального препарату відтворена природна популяція молочнокислих мікроорганізмів, що беруть участь у процесі виробництва традиційного сиру бринза і роль яких, безпосередньо пов'язана із природною ферментацією молока.

Висновки

За комплексом технологічних властивостей відібрано штами молочнокислих бактерій для конструювання складу бактеріального препарату для виробництва бринзи у промислових умовах.

Використання консорціуму мікроорганізмів *Lactococcus lactis ssp. lactis SB 44, Lactobacillus plantarum SB 17, Enterococcus faecium SB 12, Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides SB 8* та *Lactococcus garvieae SB 26* у співвідношенні 50:15:20:10:5 % відповідно забезпечує найкращі споживні характеристики продукту.

Встановлено, що виготовлена із використанням бактеріального препарату бринза відповідає вимогам ДСТУ 7065:2009 і характеризується високою концентрацією життєздатних МКБ – понад $1x10^{7}$ КУО/г готового продукту.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть скеровані на вивчення функціональних властивостей досліджуваних культур МКБ та їх антибіотикорезистентність.

Бібліографічні посилання

Smolyar, V.I. (2007). Osnovni tendenciyi v xarchuvanni naselennya Ukrayiny`: naukove vy`dannya. Problemy` xarchuvannya: naukovo–prakty`chny`j zhurnal. 4, 5 – 10 (in Ukrainian).

Giraffa, G., Chanishvili N., Widyastuti Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. Res. Microbiol. 161(6), 480–487.

Didux, N.A. (2008). Naukovi osnovy` rozrobky` texnologiyi molochny`x produktiv funkcional`nogo pry`znachennya. Avtoreferat dy`sertaciyi na zdobuttya naukovogo stupenya doktora texnichny`x nauk, Odesa (in Ukrainian).

Chagarovs`ky`j, O.P., Didux, N.A. (2011). Funkcional`ni ky`slomolochni produkty` gerodiyety`chnogo pry`znachennya. Problemy starenija i dolgoletija. 20(2), 214–222 (in Ukrainian).

Vasy`lyuk, O.M., Kovalenko, N.K., Garmasheva, I.L., Oleshhenko, L.T. (2014). Vy`dilennya ta identy`fikaciya bakterij rodu Lactobacillus z fermentovany`x produktiv rizny`x regioniv Ukrayiny`. Mikrobiologichny`j zhurnal. 76(2), 2–9 (in Ukrainian).

Hayologlu, A.A., Guven, M., Fox, P.F. (2002). Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese «Beyaz Peynir»ю. Int. Dairy J. 12, 635–648.

Botina, S.G. (2008). Vidovaja identifikacija i pasportizacija molochnokislyh bakterij metodami molekuljarno–geneticheskogo tipirovanija. Molochnaja promyshlennost'. 3, 52–54 (in Russian).

Kovalenko, N.K., Lashhevskij, V.V. (2003). Primenenie metoda polimeraznoj cepnoj reakcii (PCR) dlja identifikacii molochnokislyh bakterij. Molochna promislovist'.1(4), 24–25 (in Russian).

Slyvka, I.M., Cisary`k, O.J. (2013). Vy`dilennya molochnoky`sly`x bakterij iz ovechogo sy`ru, vy`gotovlenogo v Bukovy`ns`komu regioni ta yix identy`fikaciya. Naukovy`j visny`k LNUVMBT imeni S.Z. Gzhy`cz`kogo. 15, 3(57), 116–121 (in Ukrainian).

Slyvka, I.M., Cisary`k, O.J., Bocer, T. (2014). Zastosuvannya metodu RAPD–PCR dlya identy`fikaciyi molochnoky`sly`x bakterij. Zhurnal «Biologiya tvary`n». 16(4), 143–149 (in Ukrainian).

Slyvka, I.M., Cisary`k, O.J. (2015). Identy`fikaciya molochnoky`sly`x bakterij iz zastosuvannyam kompleksu molekulyarno–genety`chny`x metodiv. Naukovy`j visny`k LNUVMBT imeni S.Z. Gzhy`cz`kogo. 17, 1(61), 213–222 (in Ukrainian).

Siegumfeldt, H., Recliinger, K.B., Jakobsen, M. (2000). Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Appl. Environ. Microbiol. 66(6), 2330–2335.

Fortina, M.G., Ricci, G., Foschino, R., Pacozzi ,C. (2007). Phenotypic typing, technological properties and safetynaspects of Lactococcus garvieae strains from dairy environments. J. of Applied Microbiology. 103, 445–453.

Стаття надійшла до редакції 20.09.2016