

Н.Ф.Кігель, д.т.н.,
К.В.Копилова, д.с-г.н.,
С.Г.Даниленко., к.т.н.,
О.В.Науменко, к.т.н.

Інститут продовольчих ресурсів НААН

ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОБІОТИ АВТЕНТИЧНИХ ПРОДУКТІВ ІЗ РІЗНИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ

*Проаналізовано органолептичні та мікробіологічні показники 5 зразків автентичних кисломолочних продуктів, отриманих із різних регіонів України. Встановлено, що випробувані зразки характеризувалися специфічною структурою мікробіоти, яка була представлена мікроорганізмами різних таксономічних груп. Встановлено, що у продуктах присутні характерні для ферментованої молочної продукції роди лактобактерій, такі як: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* та вид *Streptococcus thermophilus*. Домінуючою мікрофлорою продуктів були кокові мезофільні та термофільні молочнокислі бактерії. Особливістю мікробіоти продукту з Київської області була наявність у високому титрі біфідобактерій та ацидофільної палички, що свідчить про пробіотичний потенціал продукту. Специфічною рисою кисломолочного продукту з Львівської області була присутність пропіоновокислих бактерій, які збагачували продукт вітаміном B₁₂ та формували неповторну смакоароматичну гаму. На основі науково-експериментальних даних, отриманих у результаті виконання роботи, запропоновано методологічні підходи виявлення та селекції мікроорганізмів різних таксономічних груп, що дозволить підвищити ефективність біотехнологій заквашувальних препаратів для виробництва нової лінійки кисломолочних продуктів і сирів.*

Ключові слова: автентичний продукт, мікробіота, лактобактерії, біфідобактерії, пропіоновокислі бактерії.

N. Kigel, D.Sc. Technics,
K. Kopylova, D.Sc. Agriculture,
S. Danilenko, Ph. D. Technics,
O. Naumenko, Ph. D. Technics,
Food Resources Institute of NAAS

A STUDY OF MICROBIOTA OF AUTHENTIC PRODUCTS FROM DIFFERENT REGIONS OF UKRAINE

*Organoleptic and microbiological parameters of 5 samples of authentic dairy products derived from different regions of Ukraine are analyzed. It is found that samples were characterized by a specific structure microbiota, presented by the microorganisms of different taxonomic groups. It was established that genera *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Streptococcus thermophilus* views are typical of fermented dairy products. The dominant microflora products were kok mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria. Microbiota of product from the Kyiv area featured the presence of high titer bifidobacteria and acidophilus sticks, indicating its potential of probiotic. Unexpectedeya specific feature of fermented milk product from the Lviv area was the presence of propionic acid bacteria enriching product with vitamin B₁₂ and forming unique organoleptic range. On the basis of the scientific and experimental data, obtained as a result of the work methodological approaches for the identification and selection of*

microorganisms of different taxonomic groups were proposed, thus increasing the efficiency of the manufacture of biotechnology preparing to produce a new line of dairy products and cheeses.

Keywords: authentic product, microbiota, lactic acid bacteria, bifidobacteria, propionic acid bacteria.

Н.Ф.Кизель, д.т.н.,
К.В.Копылова, д.с.-г.н.,
С.Г.Даниленко, к.т.н.,
О.В.Науменко, к.т.н.

Институт продовольственных ресурсов НААН

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ АУТЕНТИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ УКРАИНЫ

*Проведен анализ органолептических и микробиологических показателей 5 образцов аутентичных кисломолочных продуктов, полученных из разных регионов Украины. Установлено, что испытанные образцы характеризовались специфической структурой микробиоты, которая была представлена микроорганизмами разных таксономических групп. Установлено, что в продуктах присутствуют характерные для ферментированной молочной продукции роды лактобактерий, такие как: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* и вид *Streptococcus thermophilus*. Доминирующей микрофлорой продуктов были кокковые мезофильные и термофильные молочнокислые бактерии. Особенностью микробиоты продукта из Киевской области было наличие в высоком титре бифидобактерий и ацидофильной палочки, что свидетельствует о пробиотическом потенциале продукта. Специфической чертой кисломолочного продукта из Львовской области было присутствие пропионовокислых бактерий, которые обогащали продукт витамином B12 и формировали неповторимую смакоароматическую гамму. На основе научно-экспериментальных данных, полученных в результате выполнения работы, предложены методологические подходы выявления и селекции микроорганизмов разных таксономических групп, что позволит повысить эффективность биотехнологий заквасочных препаратов для производства новой линейки кисломолочных продуктов и сыров.*

Ключевые слова: аутентичный продукт, микробиота, лактобактерии, бифидобактерии, пропионовокислые бактерии.

Кисломолочна продукція є традиційним складником харчового раціону українців завдяки її високій біологічній і харчовій цінності. Різні кліматичні умови, особливості способу господарювання, звичаїв населення того чи іншого регіону України багатство асортименту автентичних молочних продуктів. Деякі з цих продуктів: ряжанка, сметана, сир кисломолочний, гусянка та ін. знайшли своє промислове впровадження, проте значна частина автентичних продуктів наразі не відома вітчизняному споживачеві. Такі продукти виготовляються з давнини у селах традиційним способом у домашніх умовах, і особливості їх отримання, як правило, не виходять за межі окремого регіону. Вони розрізняються різним складом молочної основи, різною спонтанною мікрофлорою та, власне, способом отримання, що й зумовлює характерні органолептичні ознаки. На жаль, попри свою оригінальність та позитивний вплив на організм людини ці продукти залишаються поза увагою вчених – не відомим залишається склад їх мікрофлори, не підтверджено їх вплив на здоров'я людини та не оцінено їх промисловий потенціал. Просування автентичних продуктів на вітчизняний ринок не тільки розширить асортимент, а й дозволить створити новий сектор унікальних продуктів, що буде відображати уподобання, смаки населення різних регіонів України.

Одним із факторів, що обумовлюють унікальність кисломолочних продуктів, є мікробіота кожного із них, яка забезпечує: продукування молочної кислоти, ароматичних

речовин та вуглекислого газу; протеоліз білків; розщеплення жиру тощо [1]. Водночас вона позитивно впливає на організм людини за рахунок утворення біологічно активних сполук широкого спектру дії та запобігання розвитку як патогенної, так і технічно-шкідливої мікрофлори, що підвищує санітарно епідеміологічні показники готового продукту. Необхідно зауважити, що відмічені вище природні властивості характерні тільки для певних штамів молочнокислих, пропіоновокислих та біфідобактерій, дріжджів тощо [2-3]. Пошук та виділення таких мікроорганізмів ведуть, насамперед, із природних джерел поширення - самоквасних некомерційних молочних продуктів [4]. Поєднання мікроорганізмів різних родів та видів власне і формує унікальний комплекс біотехнологічних властивостей тієї чи іншої заквашувальної культури, що дозволяє отримати оригінальні молочні продукти.

Наразі на ринку України найпоширеніші кисломолочні продукти традиційного асортименту - сметана, кефір, ряжанка, сир кисломолочний. Для кожного типу продукту притаманний свій склад мікроорганізмів. Це можуть бути як монокультури, так і комплекс термофільних стрептококів, ацидофільних паличок, ентерококів, пропіоновокислих, оцтовокислих, біфідобактерій та дріжджів.

Вітчизняна молочна промисловість потребує істотного оновлення в напрямку розширення асортиментного ряду продуктів, у тому числі за рахунок відтворення та впровадження у виробництво автентичних продуктів. А це вимагає глибокого наукового обґрунтування проблеми, кардинальних змін у виборі та оцінці культур мікроорганізмів, створення методології виявлення та селекції високоактивних мікроорганізмів різних таксономічних груп, розробки принципів конструювання заквашувальних препаратів на їхній основі для виробництва автентичних ферментованих молочних продуктів у промислових масштабах.

Метою роботи було дослідження мікробіоти автентичних продуктів, збережених у різних регіонах України.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були зразки автентичних кисломолочних продуктів, їх мікробіота: молочнокислі бактерії, біфідобактерії, пропіоновокислі та оцтовокислі бактерії. Загальну кількість молочнокислих бактерій визначали методом згідно з ГОСТ 10444.11-89, кількість біфідобактерій - згідно з ДСТУ 7355:2013, кількість пропіоновокислих бактерій - згідно з ДСТУ 7354:2013, вміст оцтовокислих бактерій методом згідно з [5]. Водночас аналізували сторонню мікрофлору – БГКП (коліформи) методом згідно з ДСТУ 7357:2013 та наявність дріжджів і плісені методом згідно з ГОСТ 10444.12-88.

Результати дослідження

Проаналізовано органолептичні та мікробіологічні показники 5 зразків автентичних кисломолочних продуктів, отриманих із різних регіонів України. Перелік об'єктів дослідження подано у таблиці 1.

Таблиця 1

Об'єкти дослідження	
№ продукту	Місце походження
1	Полтавська обл.
2	Чернігівська обл.
3	Київська обл.
4	Львівська обл.
5	Житомирська обл.

Встановлено, що вони розрізнялися за консистенцією, смако-ароматичною гамою та складом мікроорганізмів. Загальна характеристика продуктів подана у таблиці 2.

Усі продукти вирізнялися чистим кисломолочним смаком зі специфічними відтінками для кожного з них. *Продукти №1 та №4* були подібними до простокваші, тоді як *продукти №2 та №3* – нагадували класичну ряжанку. Консистенція продуктів за винятком *продукту №2* також повторювала означені аналоги. Цей продукт характеризувався густою сметаноподібною консистенцією зі вкрапленнями сирних крупок, що є характерним для відомої у селян «домашньої ряжанки». *Продукт №5* характеризувався чистим кисломолочним смаком характерним для сиру кисломолочного.

Мікрофлора досліджених продуктів була представлена переважно коками, диплококами та ланцюжками коків різної довжини (табл. 2).

Мікробний пейзаж *продукту №3* був різноманітнішим. Поряд з коковими формами спостерігали наявність паличкоподібних клітин, характерних за морфологією для лактобацил та біфідобатерій.

Цікавим та несподіваним був склад мікрофлори *продукту №4*. Зокрема, поряд з характерними лактококами було встановлено присутність пропіоновокислих бактерій (див. табл. 2).

Мікробіологічні дослідження продуктів проводили у двох напрямках: виявлення заквашувальної та санітарно-показової мікрофлори. Було встановлено, що рівень забруднення коліформами був доволі високим, і ці мікроорганізми були присутні у 0,001 г кисломолочних продуктів та у 0,00001 г сиру кисломолочного (зразок №5). Продукти також містили високу кількість плісені – до сотень тис. КУО/г продукту за винятком *продукту №4*, в якому кількість цих мікроорганізмів була у 1000 разів меншою (табл. 3).

Загальна чисельність мезофільних МКБ у всіх продуктах була майже однаковою – від $7,2 \times 10^7$ до $7,7 \times 10^8$ КУО/см³.

Кількість термофільних МКБ істотно рівнилась у кожному продукті. Так, найбільше цих мікроорганізмів визначено у *продукті №1* ($9,2 \times 10^7$ КУО/см³) та *продукті №5* ($2,3 \times 10^8$ КУО/см³). А у *продуктах №2 та №3* їхня кількість була майже на 2 порядки меншою. Термофільні МКБ у *продукті №4* не перевищували сотень клітин у 1 см³.

Проаналізовані продукти характеризувались високим вмістом ароматоутворювальних бактерій $(2,3-3,5) \times 10^6$ КУО/см³, зокрема у *продуктах №3 та №5* їхня кількість була у 10 разів вищою.

У *продукті №3* поряд з МКБ було виявлено у значній кількості біфідобактерії - $1,5 \times 10^4$ КУО/см³, а у *продукті №4* – пропіоновокислі бактерії - $1,2 \times 10^4$ КУО/см³.

Жоден із обстежених продуктів не містив дріжджів та оцтовокислих бактерій.

Після ряду послідовних маніпуляцій зі застосуванням селективних середовищ було отримано чисті монокультури, які проаналізовано за основними морфологічними, культуральними, фізіологічними та біохімічними ознаками.

На рис. 1 показано морфологію колоній, що характерна для різних видів молочнокислих бактерій. Так, на середовищі Реді *L. lactis ssp. lactis* утворювали білі колонії, тоді як *L. lactis ssp. cremoris* – жовті. На твердому поживному середовищі з натрієм цитриновокислим тризаміщеним цитратзброджувальні ароматоутворювальні молочнокислі мікроорганізми утворювали колонії з зонами просвітлення навколо них. На середовищі Кемплера *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* утворювали сині колонії, тоді як *L. lactis ssp. lactis* – колонії білого кольору. На середовищі ST-агар та Lee-агар *Streptococcus thermophilus* утворювали колонії жовтого кольору.

Необхідно зауважити, що застосування різних селективних середовищ дозволило значно прискорити виділення чистих культур і провести їхню первинну ідентифікацію.

Загальна характеристика продуктів

Номер продукту	Характер згустку	Смак	Мікропрепарат
1	Не в'язкий, не щільний, з відшаруванням сироватки, не однорідний	Чистий кисломолочний	Грампозитивні коки, діаметром 0,6-0,7 мкм, диплококи, переважно у вигляді диплококів та ланцюжків з 2-4 диплококів скупчення коків, діаметром 0,5-0,6 мкм, розташовані переважно у вигляді звивистих ланцюжків різної довжини
2	Сметаноподібний, з вкрапленнями сирних згустків, без відшарування сироватки	Вершковий, кисломолочний	Грампозитивні коки, діаметром 0,6-0,7 мкм, диплококи, переважно у вигляді диплококів та ланцюжків з 2-4 диплококів скупчення коків, діаметром 0,5-0,6 мкм, розташовані переважно у вигляді звивистих ланцюжків різної довжини
3	В'язкий, однорідний, щільний, без відшарування сироватки	Кисломолочний, ряжанковий, з кислінкою	Грампозитивні коки, диплококи, скупчення коків, ланцюжки коків, короткі тоненькі палички ланцюжками, палички, прямі або трохи вигнуті, на кінцях мають більш інтенсивно забарвлені гранули, розміри клітин варіюють від 0,7 до 0,9 мкм ширини та 1,0-2,0 мкм довжини. Розташовуються або поодинокі, або у вигляді невеликих скупчень, зрідка у коротких ланцюжках.
4	В'язкий, однорідний, без відшарування сироватки	Чистий кисломолочний	Грампозитивні коки, диплококи, скупчення коків, ланцюжки коків Грампозитивні дрібні тонкі палички, розташовані поодинокі та у скупченнях
5	Зернистий білковий згусток	Чистий кисломолочний	Грампозитивні коки, диплококи, скупчення коків, ланцюжки коків, палички

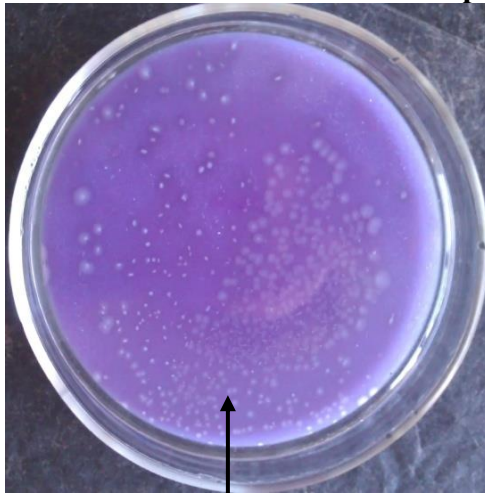
Таблиця 3

Мікробіологічні показники продуктів

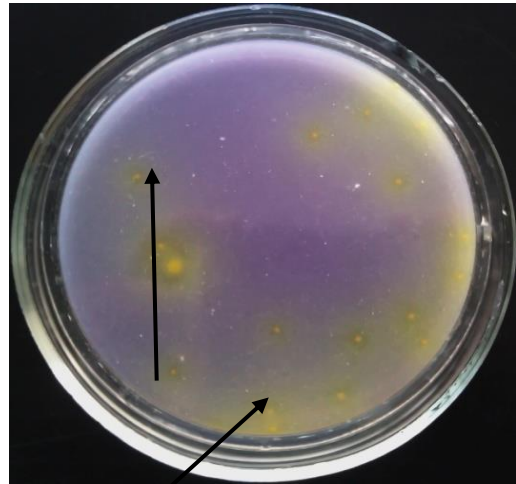
№ п/п	Показник	Темпера- тура росту, °С	№1	№2	№3	№4	№5
			Кількість бактерій, КУО/см ³				
1	БГКП	37	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²	10 ⁵
2	Дріжджі	30	Відсутні				
3	Плісені		5,9x10 ⁵	2,9x10 ⁴	1,5 x 10 ⁵	1,0x10 ²	1,0x 10 ⁴
4	МКБ мезофільні	30	5,4x10 ⁸	6,1x10 ⁸	7,7 x 10 ⁸	6,5x10 ⁸	7,2x10 ⁷
5	МКБ термофільні	43	9,2x10 ⁷	3,0x10 ⁵	2,7 x 10 ⁵	8,0x10 ²	2,3x10 ⁸
7	Ароматоутворювальні мікроорганізми	30	2,6x10 ⁶	3,5x10 ⁶	8,0 x 10 ⁷	2,3x10 ⁶	8,4x10 ⁷
8	Лактобацили	37	0	0	2,0 x 10 ⁶	0	0
9	Біфідобактерії	37	0	0	1,5 x 10 ⁴	0	0
10	Оцтовокислі бактерії	30	Відсутні				
11	Пропіоновокислі бактерії	30	0	0	0	1,2 x10 ⁴	0

Примітка: похибка середнього арифметичного – 3-5%, p < 0,05

Середовище Редді

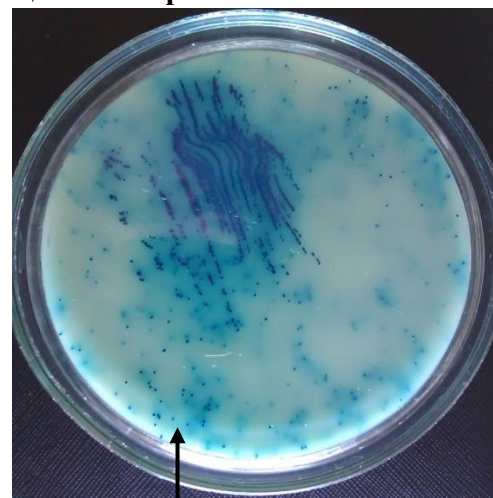
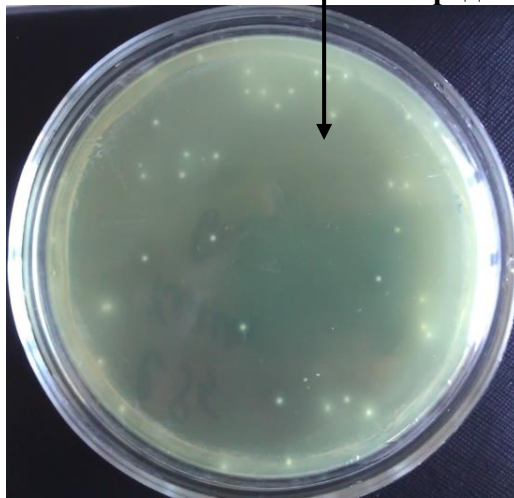


L. lactis ssp. *lactis*



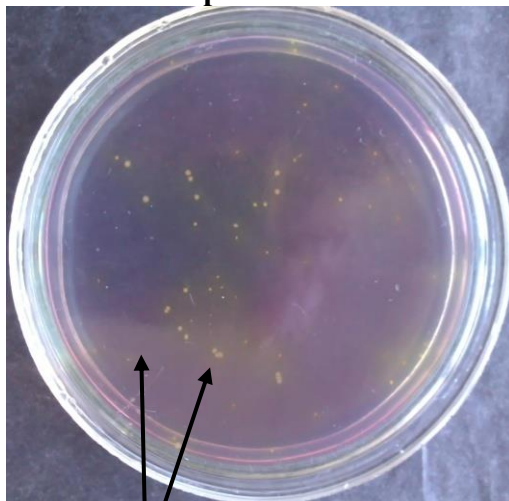
L. lactis ssp. *cremoris*

Середовище Кемплера



L. lactis ssp. *diacetylactis*
Середовище ГА + Са

ST- агар



Streptococcus thermophilus

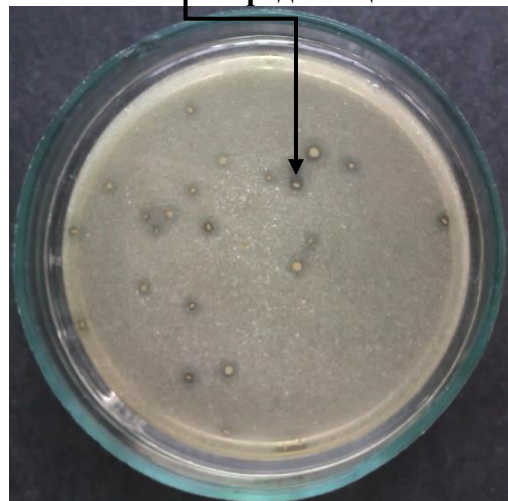


Рис. 1 - Морфологія колоній лактобактерій на селективних середовищах

Остаточну ідентифікацію вилучених культур до виду проводили за відповідними ключами систематики мікроорганізмів згідно з *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [6]. Крім того для уточнення таксономічного статусу виділених штамів було проведено дослідження біохімічного профілю цих культур зі застосуванням тестових систем API 50 CHL та API 20 STREP (bioMérieux, Франція) (рис.2).

Тест-система API 50 CHL V5.1

Тест-система API 20 STREP V7.0

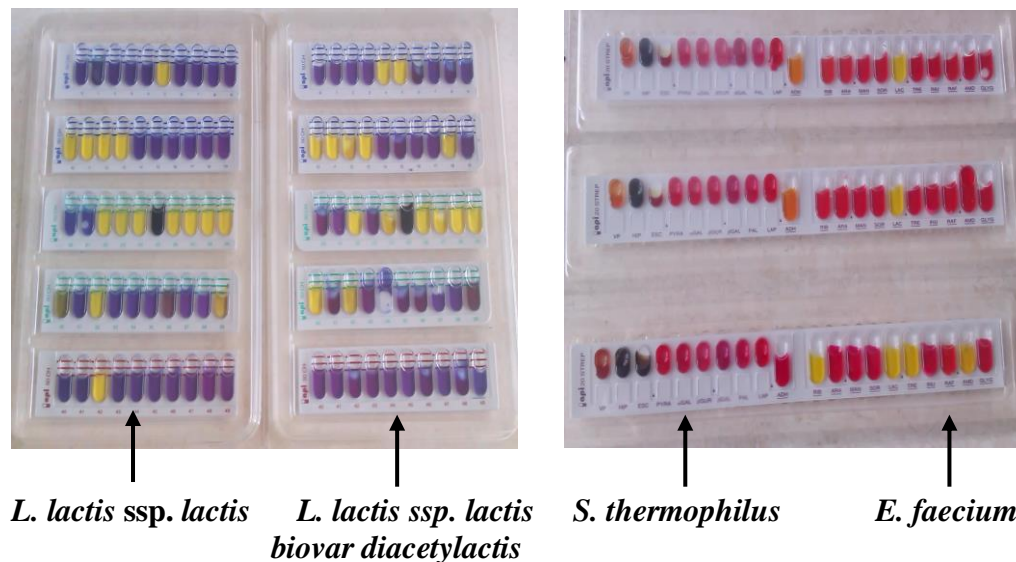


Рис. 2 - Ідентифікація штамів: вивчення біохімічного профілю

За результатами ферментативної активності вираховували аналітичний індекс біохімічного профілю культур, який вводили до комп'ютерної бази даних за допомогою спеціальної програми *ariweb™ V 5.1* та *V 7.0*. Це дозволило визначити таксономічне положення досліджуваних штамів. Результати досліджень подано у таблиці 4.

Таблиця 4

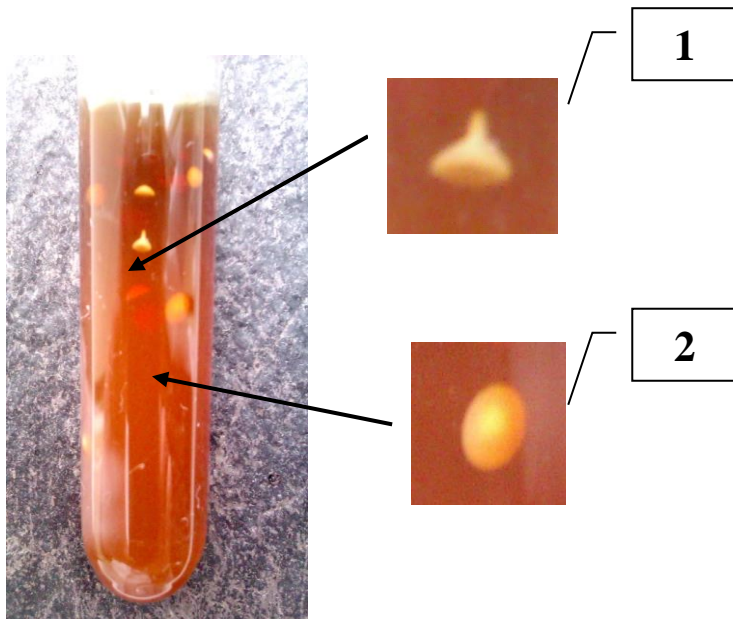
Характерна мікрофлора продуктів

№ n/n	Вид мікроорганізмів	Наявність/відсутність мікроорганізмів				
		№1	№2	№3	№4	№5
1	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	+	+	+	+	+
2	<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	+	+	-	+	+
3	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis</i>	+	+	+	+	+
4	<i>Leuconostoc ssp.</i>	-	+	+	-	+
5	<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+	-	-	+
6	<i>Lactobacillus ssp.</i>	-	-	+	-	-
7	<i>Bifidobacterium ssp.</i>	-	-	+	-	-
8	<i>Propionibacterium ssp.</i>	-	-	-	+	-

Встановлено, що у продуктах присутні характерні для кисломолочних продуктів роди лактобактерій, такі як *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* та вид *S. thermophilus*.

Також було визначено окремі підвиди та біовар мезофільних лактококів виду *Lactococcus lactis*, а саме: *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris* і *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, відповідно. Ідентифікація до виду представників родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* потребувала детальніших та триваліших досліджень.

На рис. 3 та рис. 4 показано характерні морфологічні типи колоній біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій, відповідно. Біфідобактерії у твердому поживному середовищі утворювали типові колонії у вигляді великих “дисків” або “гречаних зерен”. Колонії пропіоновокислих бактерій мали вигляд крупних дисків діаметром (2±1) мм або «гречаних зерен» світло-кремового кольору.



1 - “гречане зерно”; 2 - “диск”

Рис. 3 - Морфологічні типи колоній біфідобактерій

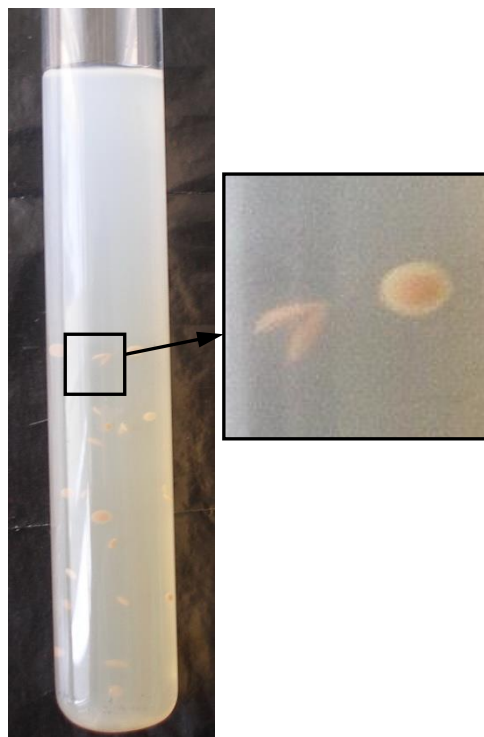


Рис. 4 – Морфологічні типи колоній пропіоновокислих бактерій

Отже на основі науково-експериментальних даних, отриманих у результаті виконання роботи, встановлено методологічні підходи щодо виявлення та селекції мікроорганізмів різних таксономічних груп, що дозволить підвищити ефективність біотехнологій бакпрепаратів для виробництва кисломолочних продуктів і сирів.

Висновки

1. Показано, що мікробіота досліджених автентичних кисломолочних продуктів мала поряд із унікальними властивостями деякі характеристики подібні до традиційних продуктів. Так, продукти з Полтавської та Львівської обл. нагадували *простоквашу*, продукти з Чернігівської та Київської обл. - *ряжанку*, продукт із Житомирської обл. був подібним до *сиру кисломолочного*.

2. Встановлено, що мікробіота продуктів представлена лактобактеріями родів *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* та видом *Streptococcus thermophilus*.

3. Визначено, що мікробіота випробуваних продуктів характеризувалася специфічною структурою і була представлена мікроорганізмами різних таксономічних груп. Домінуючою мікрофлорою *продуктів №1, №2 та №5* були кокові мезофільні та термофільні молочнокислі бактерії. Загальна чисельність мезофільних молочнокислих бактерій у всіх продуктах коливалась у межах від $5,4 \cdot 10^7$ до $7,7 \cdot 10^8$ КУО/см³. Кількість термофільних бактерій варіювала у кожному продукті: найбільша у *продукті №1* - $2,3 \cdot 10^8$ КУО/см³, найменша – у *продуктах №2 та №3* $(2,7-3,0) \cdot 10^5$ КУО/см³.

4. Особливістю мікробіоти *продукту № 3* була наявність у високому титрі біфідобактерій та ацидофільної палички, що свідчить про пробіотичний потенціал цього продукту.

5. Специфічною рисою кисломолочного *продукту № 4* була присутність пропіоновокислих бактерій у кількості - $1,2 \cdot 10^4$ КУО/см³, які збагачували продукт вітаміном В₁₂ та формували неповторну смакоароматичну гаму.

Література

1. Muir D.D. Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yogurt / D.D. Muir, A.Y. Tamime, M. Wszolek // Int. J. Dairy Technol. – 1999. – Vol. 52. – P. 129-134.

2. Zhou J.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains / J.S. Zhou, C.J. Pillidge, P.K. Gopal, H.S. Gill // Int. J. Food Microbiol. – 2005.- Vol. 98. - P. 211–217.

3. Lantinen S. Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Fourth edition / S. Lantinen, A. Ouwehand, S. Salminen, A. Wight // CRC Press New RC Press: New York. – 2012. – P. 2-13.

4. Herrero M. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations / M. Herrero, B. Mayo, B. Gonzalez, J.E. Suarez // J. Appl. Bacteriol. – 1996.- Vol. 81. - P. 565–570.

5. Інструкція щодо організації виробничого мікробіологічного контролю на підприємствах молочної промисловості / Г.О. Єресько, Н.Ф. Кігель, І.О. Романчук [та ін.] ; НААН; Ін-т прод. ресурсів НААН.- К.: ННЦ «ІАЕ», 2014.- 372 с.

6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 3: The Firmicutes [editors: P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman (Eds.)]. – Second Edition.- USA: Springer-Verlag New York, 2009. – Vol. 3.- 1450 p.- ISBN: 978-0-387-95041-9 e – ISBN: 978-0-387-68489-5.- 379 b/w ill., 11 ill. in colour.