

**АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЯК КРИТЕРІЙ ВІДБОРУ
МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ У БІОТЕХНОЛОГІЇ
МОЛОЧНИХ ФЕРМЕНТОВАНИХ ПРОДУКТІВ**

У статті обґрунтовано важливість проведення відбору молочнокислих бактерій (МКБ) до складу заквашувальних і захисних препаратів для виробництва молочних ферментованих продуктів за показниками антагоністичної активності. При цьому слід відбирати культури, що характеризуються високим ступенем антагонізму до небажаної мікрофлори і водночас сумісні (або виявляють незначний антагонізм) до інших молочнокислих бактерій.

*Зроблено висновок про значний біологічний потенціал бактерій роду *Lactobacillus* як природного засобу підвищення мікробіологічної безпечності та якості молочних ферментованих продуктів. Дані експериментальних досліджень дали змогу виокремити штами лактобацил, перспективних для використання у біотехнології молочних ферментованих продуктів.*

*Ключові слова: антагоністична активність, безпечність, біотехнологія, *Lactobacillus*, стороння мікрофлора.*

В статье обоснована важность проведения отбора молочнокислых бактерий для заквасок и защитных препаратов, предназначенных для производства молочных ферментированных продуктов, за показателями антагонистической активности. Перспективными являются культуры, обладающие высокой антагонистической активностью к нежелательной микрофлоре и в то же время не антагонистичны (или проявляющие умеренный антагонизм) по отношению к другим молочнокислым бактериям.

*Сделан вывод о значительном биологическом потенциале бактерий рода *Lactobacillus* как природном способе повышения микробиологической безопасности и качества молочных ферментированных продуктов. Данные экспериментальных исследований позволили определить штаммы лактобацил, перспективных для использования в биотехнологии молочных ферментированных продуктов.*

*Ключевые слова: антагонистическая активность, безопасность, биотехнология, *Lactobacillus*, посторонняя микрофлора.*

Importance of selection of lactic acid bacteria for starter and protective cultures for the production of fermented dairy products on the basis of antagonistic activity was shown in this article. Prospective cultures should be characterized by a high degree of antagonism to contaminating microorganisms and insignificant antagonism to other strains and species of lactic acid bacteria.

*It was concluded that genus *Lactobacillus* bacteria have significant biological potential as a natural mean to improve microbiological safety and quality of fermented dairy products. The experimental date obtained made it possible to determine the group of strains lactobacilli promising for use in biotechnology fermented dairy products.*

*Key words: antagonistic activity, biotechnology, harmful microorganisms, *Lactobacillus*, safety.*

Молочнокислі бактерії використовуються людиною з давніх-давен. Лише історія сироваріння налічує понад 7 тисячоліть. За тих часів людина використовувала лактобактерії у повсякденному житті стихійно – ферментування молока відбувалося внаслідок потрапляння у нього з довкілля мікрофлори, значну частку якої становили МКБ. Завдяки

роботам Луї Пастера прийшло розуміння природи бродіння і важливої ролі у ньому мікроорганізмів.

Важливою особливістю молочнокислих бактерій, завдяки якій вони і отримали таку назву, є здатність утворювати з лактози молочну кислоту. Саме внаслідок накопичення молочної кислоти – головного продукту молочнокислого бродіння, відбуваються зміни структури казеїнів, що призводять до зсідання молока і утворення згустку (у сироварінні значну роль в утворенні згустку відіграє сичужний фермент). Було помічено, що молочна кислота, як і деякі інші органічні кислоти, виявляє бактерицидну чи бактеріостатичну дію на певні види мікроорганізмів. Згодом виявлено інші продукти метаболізму молочнокислих бактерій, здатні пригнічувати розвиток сторонньої мікрофлори: перекис водню, диацетил, етанол, леткі жирні кислоти, вуглекислий газ, лізоцим, специфічні субстанції білкові природи – бактеріоцини [1,2]. Останні різняться рівнем і спектром активності, механізмом дії.

Усі ці фактори, що зумовлюють антагоністичні властивості мікроорганізмів, виникли в процесі еволюції як пристосування до конкуренції з іншими мікроорганізмами за освоєння екологічних ніш і забезпечують виживання видів у природних екосистемах [3].

Розрізняють антагонізм до неспоріднених і споріднених видів. Якщо ж йдеться про штучні екосистеми, якими можна вважати виробництво сиру й інших молочних ферментованих продуктів, то з точки зору біотехнології доцільно виокремлювати антагонізм молочнокислих бактерій до патогенної й умовно-патогенної мікрофлори та антагонізм до споріднених видів.

Серед технічно шкідливої й умовно патогенної мікрофлори молочних ферментованих продуктів найпоширенішими забрудниками є мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*, аеробні та анаеробні види спорових бактерій, дріжджі, плісені, патогенні стафілококи [4, 5]. Мікроорганізми цих груп потрапляють у молоко під час доїння, з повітря, при контакті молока з молокопроводами і технологічним обладнанням, а деякі – як наприклад, стафілококи та коліформи – можуть мати ще й маститне походження. У разі значного мікробіологічного забруднення молока-сировини, прийняті режими пастеризації не гарантують необхідний рівень бактеріальної чистоти молока. Активізувавшись, залишкова мікрофлора, або ж мікрофлора, що потрапила до ферментерів під час вторинної контамінації, здатна швидко нарощувати свою чисельність. При цьому зростає ризик виникнення вад продукту і знижується його безпечність. Так, виробництво натуральних сирів пов'язане з небезпекою розвитку вад «раннього» і «пізнього» здуття, прокованих відповідно коліформами та здатними до зброджування лактатів клостридіями. Значну небезпеку для виробництва практично всіх молочних ферментованих продуктів представляють патогенні стафілококи та їх токсини [6]. Підступність стафілококового забруднення полягає в тому, що контамінований патогенними стафілококами продукт органолептично неможливо відрізнити від безпечного.

Санітарно-мікробіологічні показники якості молочних ферментованих продуктів можна поліпшити, залучивши до складу заквасок чи як захисні культури біологічно активні МКБ. Зважаючи на це, пошук нових штамів лактобактерій з високою антагоністичною активністю до сторонньої мікрофлори, а також дослідження особливостей їх міжмікробної взаємодії є актуальним завданням.

Метою роботи було здійснити пошук та відбір молочнокислих бактерій з високим антагоністичним потенціалом до технічно шкідливої та умовно патогенної мікрофлори виробництва молочних ферментованих продуктів. Дослідити антагоністичну активність відібраних лактобактерій до штамів тих видів МКБ, які використовуються у виробництві молочних продуктів.

Матеріали та методи. Пошук біологічно активних штамів лактобактерій проводили серед вилучених із самоквасних молочних продуктів МКБ, що задовольняли технологічні вимоги за показниками енергії кислотоутворення – 105-ти культур лактобацил і 142-х культур лактококів. Антагоністичну активність МКБ досліджували методом „дифузії з лунок” [7]. У дослід брали тест-культури, нарощені в середовищах: м'ясопептонному бульйоні (ентеробактерії, стафілокок і бацили) та в рідкому середовищі Сабуро (дріжджі й

плісінь). Нарощування МКБ здійснювали в рідкому середовищі MRS з додаванням 2 % за об'ємом глюкози (паличкоподібні форми) та в гідролізованому панкреатині молоці (кокові форми). Чашки інкубували за умов, оптимальних для розвитку тест-культур упродовж 24 годин. Інтенсивність антагоністичної активності оцінювали за діаметром зон відсутності росту тест-культур навколо лунок з метаболітами МКБ. Контролями слугували лунки (К₁) зі стерильними середовищами, у яких культивували тестовані штами. Крім цього, для виявлення антагоністичного впливу інших, ніж молочна кислота факторів, до контрольних лунок (К₂) вносили стерильний розчин молочної кислоти (рН 3,7).

Для визначення чутливості МКБ до штамів-антагоністів використали культури «Колекції виробничих та перспективних для переробки молока і м'яса штамів мікроорганізмів» Інституту продовольчих ресурсів НААН, а саме: мезофільні МКБ (*L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* та *L. lactis* ssp. *diacetylactis*), термофільні стрептоки (*S. thermophilus*), стрептобактерії (*L. casei* ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*, *L. plantarum*) та *L. bulgaricus*. Оцінювання ступеня чутливості колекційних штамів МКБ до лактобацил-антагоністів проводили за критеріями: нечутливими вважали тест-культури, на газонах яких діаметр прозорої зони (зони лізису клітин) не перевищував 10 мм, малочутливими – 11÷13 мм, чутливими – 14 мм і більше. Чутливість того чи іншого виду (групи) МКБ до лактобацил-антагоністів виражали у відсотках від кількості поєднань, узятих до досліду тест-культур, зі штамми антагоністами.

Культури МКБ підтримували у відновленому знежиреному молоці, зберігали за температури холодильника.

Досліди проводили з трикратним відтворенням. Отримані результати обробляли з використанням *t*-критерія Фішера-Стьюдента і представляли у вигляді середньої арифметичної та її похибки ($M \pm m$).

Результати досліджень та їх обговорення. Для виявлення культур МКБ з високим антагоністичним потенціалом до умовно-патогенної та технічно шкідливої мікрофлори скористались штамми сторонньої мікрофлори, вилученими під час проведення моніторингу якості вітчизняних сирів [4] та ідентифікованими як *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Penicillium* spp. і *Candida* spp. Таким чином, на першому етапі до досліджень було залучено по одному представнику мікробіологічних забрудників різних груп сторонньої мікрофлори.

За результатами роботи зроблено висновок про значно вищий антагоністичний потенціал лактобацил порівняно з лактококами. Водночас серед лактобацил відмічено наявність штамів з низьким, помірним і високим ступенем антагонізму до використаних тест-культур. Важливо відмітити, що ані серед кокових, ані серед паличкоподібних форм не виявлено штамів, здатних пригнічувати розвиток тест-культур плісені та дріжджів. Цей факт може свідчити про незначне поширення в природних популяціях МКБ з протидріжджовими та фунгіцидними властивостями.

До подальших досліджень було відібрано 11 штамів найактивніших антагоністів роду *Lactobacillus*: штам 09 – виду *L. paracasei*, штам 11 – *L. acidophilus*, решта – до *L. casei*. Ширше досліджено антагоністичну активність вказаних лактобактерій – кількість тест-культур збільшили, залучивши штами *E. aerogenes*, *P. vulgaris* та *B. subtilis* (Рис. 1, 2).

Ентеробактерії виду *E. aerogenes* досить часто зустрічаються серед колі-форм, їх розвиток супроводжується інтенсивним газоутворенням, що може створювати проблеми під час виробництва сиру [8]. Представники роду *Proteus* здатні спричиняти різноманітні запальні захворювання людини [9], а значна кількість протея у продуктах негативно позначається на органолептичних показниках – можуть виникати темні плями на сирних головках, продукт набуває нечистого гнилісного присмаку [10]. Включення до тест-культур штаму *B. subtilis* (сінної палички) обумовлено частим виявленням спор цих мікроорганізмів у молоці та молочних продуктах [11]. І хоча зустріваність патогенних для людини штамів серед представників *B. subtilis* порівняно невисока [12], проте, даний вид бацил характеризується значною протеолітичною активністю, результатом якої є утворення специфічних сполук, що негативно впливають на якість продуктів.

Результати досліджень представлено в таблиці 1 та на рисунку 1, з яких видно, що всі одинадцять штамів лактобацил виявили високий рівень антагонізму до залучених тест-культур. Інтенсивність антагоністичної активності залежала від тест-культури та природних особливостей того чи іншого штаму лактобацил.

Таблиця 1

Антагоністична активність штамів *Lactobacillus* sp.

Вид МКБ	Величина зон затримки росту тест-культур, мм					
	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. casei</i> (9 шт)	(23÷25)±0,5	(22÷25)±0,5	(24÷25)±0,5	(22÷24)±0,5	(22÷24)±0,5	(19÷22)±0,5
<i>L. paracasei</i>	24±0,5	23±0,5	25±0,5	23±0,5	24±0,5	20±0,5
<i>L. acidophilus</i>	25±0,5	24±0,5	25±0,5	22±0,5	20±0,5	18±0,5

P<0,05 порівняно з відповідними контролями

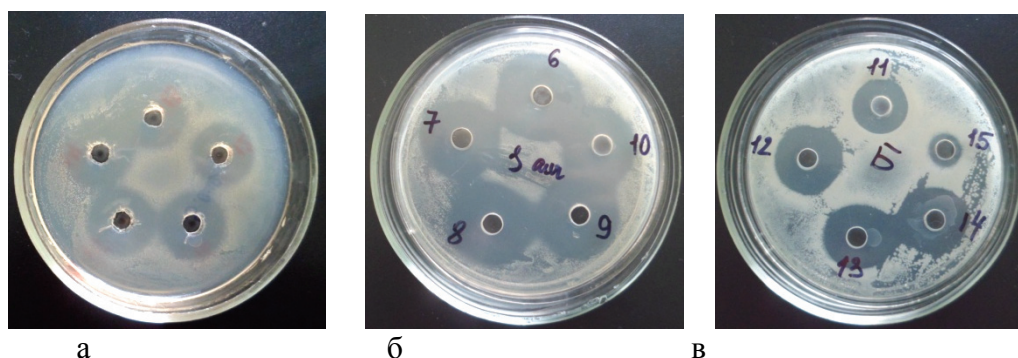


Рис. 1. Антагоністична активність лактобактерій до сторонньої мікрофлори:
а – *E. coli*, б – *S. aureus*, в – *B. cereus*.

У природних умовах антагонізм як явище виявляється у пригніченні розвитку популяцій інших мікроорганізмів, які займають спільну екологічну нішу. При цьому вектор антагоністичної дії спрямовується не лише на представників генетично віддалених таксонів, а й споріднених видів.

До складу заквашувальних препаратів для сичужних сирів та кисломолочних продуктів традиційно залучають штами мезофільних лактококів, термофільних стрептококів, болгарської палички, іноді стрептобактерій. Ці види МКБ були використані як тест-культури для визначення чутливості до лактобацил-антагоністів. Результати дослідів представлено на рисунку 2.

На сам перед слід відмітити різну реакцію тест-культур на метаболіти антагоністів, при цьому відмінності спостерігалися не лише в межах виду, а й на штамовому рівні: одна й та сама тест-культура виявляла різну реакцію на антагоніста. В одних випадках зони були відсутні, в інших – їх діаметр сягав 17, 18, і навіть 20 мм, що співвимірно з чутливістю до лактобацил-антагоністів деяких штамів технічно шкідливої мікрофлори (табл. 1). Як видно з рисунку, найбільш чутливими до антагоністів виявились термофільні стрептококи. Кількість нечутливих, малочутливих і чутливих поєднань становила 31,8 %, 33,5 % і 34,7 %, відповідно. Окремі штами термофільних стрептококів, як наприклад, 2115 і 2148 виявились достатньо стійкими до метаболітів лактобацил, про що свідчило формування зон незначного діаметру – до 10 мм, або ж їх відсутність. Натомість штаму 2113 був найчутливішим – діаметр відсутності зон його росту становив 12÷20 мм.

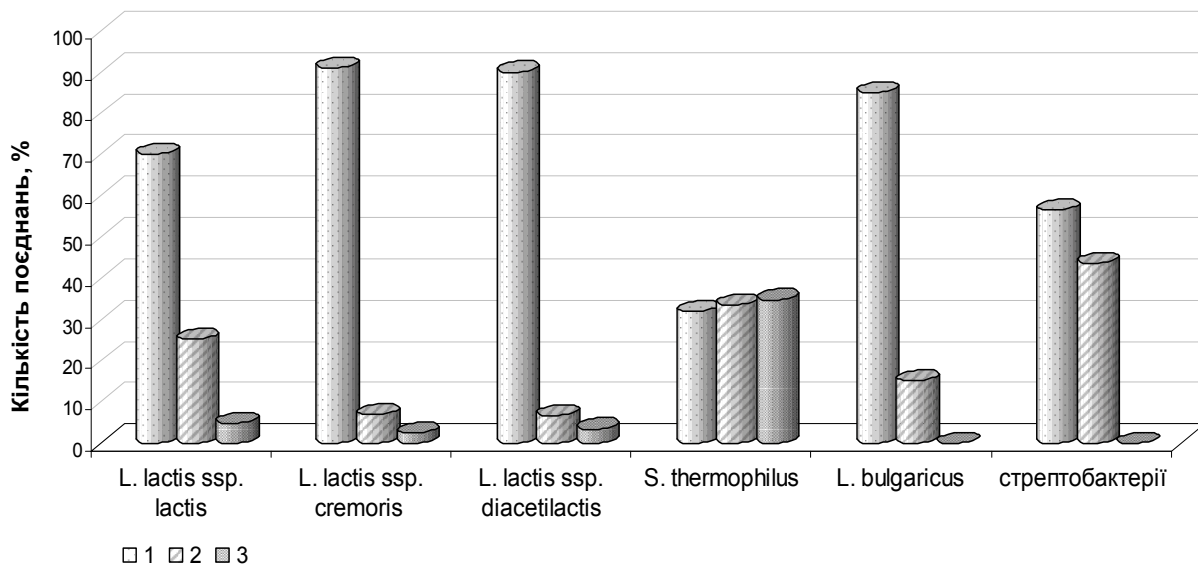


Рис. 2. Чутливість молочнокислих бактерій до лактобацил:
 1 – нечутливі штами (зони відсутності росту тест-культур 0÷10 мм);
 2 – малочутливі штами (зони відсутності росту тест-культур 11÷13 мм);
 3 – чутливі штами (зони відсутності росту тест-культур 14 ≤ мм);

На відміну від термофільних стрептококів, мезофільні лактококи виявили незначну чутливість до лактобацил-антагоністів, проте відсоток поєднань штамів із середнім рівнем чутливості був вищим серед *L. lactis ssp. lactis* порівняно з *L. lactis ssp. cremoris* та *L. lactis ssp. diacetylactis*. Цікаво, що в жодному з поєднань, узятих до дослідження штамів болгарської палички та стрептобактерій з лактобацилами-антагоністами, не зафіксовано утворення зон відсутності росту клітин понад 13 мм – ці культури були або нечутливими, або малочутливими до досліджуваних лактобацил.

Важливими є спостереження щодо впливу на тест-культури МКБ з точки зору інтенсивності антагоністичної активності того чи іншого штаму лактобацил. Встановлено, що більшість штамів-антагоністів виявляли помірний ступінь антагонізму до тест-культур МКБ. Лише під впливом метаболітів двох штамів *L. casei* на більшості газонів чутливих культур формувались зони затримки росту значного діаметру. Високий рівень антагонізму цих лактобацил до представників інших видів МКБ дещо обмежує їх використання при сумісному культивуванні.

Висновки. Під час конструювання заквашувальних і захисних бактеріальних композицій для виробництва молочних ферментованих продуктів важливим критерієм відбору лактобактерій є їх здатність пригнічувати розвиток небажаної мікрофлори. Проте дослідження антагоністичної активності потенційних «культур-кандидатів» до заквашувальних/захисних препаратів не повинні обмежуватися колом технічно шкідливих та умовно-патогенних мікроорганізмів, а також обов'язково включати визначення типу взаємовідносин з іншими мікроорганізмами – складниками бактеріального препарату.

Результати досліджень свідчать про значний біологічний потенціал бактерій роду *Lactobacillus* як природного засобу підвищення мікробіологічної безпечності та якості молочних ферментованих продуктів. Отримані дані про міжвидову та міжштамову взаємодію лактобацил з представниками технічно-шкідливої та умовно-патогенної мікрофлори, а також культурами молочнокислих бактерій, дали змогу виокремити групу штамів лактобацил, перспективних для використання у біотехнологічних розробках для молочних ферментованих продуктів.

Література

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюл. сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50–58.
2. Aween M.M., Hassan Z., Muhialdin B.J., Noor H.M. and El-Jamel Y.A. Evaluation on antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey // American Journal of Applied Sciences. – 2012. – 9(6). – P. 807–817.
3. Квасников Е.И. Место и значение молочнокислых бактерий в биосфере. Эскиз // Микробиол. Журн. – 1992. – Т. 54. – № 5. – С. 3–10.
4. Шугай М.О., Чорна Н.А., Кігель Н.Ф. Мікробіологічна якість вітчизняних сирів та відповідність вимогам нормативних документів // Науковий Вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького – 2013. – Том 15. – № 3 (57). – С. 138–142.
5. Присяжна А.М., Черевич Н.В., Вінніков Л.І. Санітарно-мікро-біологічний аналіз молочних продуктів, що реалізуються у торгівельній мережі м. Бобринець // Вісник проблем біології і медицини – 2014. – Вип. 4. – Т. 3 (115). – С. 309–314.
6. Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A., Decastelli L., Mioni R., Scuota S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Salinetti A.P., La Salandra G., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia N.C., Celano G.V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy // Int. J. Food Microbiol. 2005. – Vol. 15. – № 98 (1). – P. 73–79.
7. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд. / М.: Изд МГУ; Наука. – 2004. – 258 с.
8. Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / Под ред. Гудкова С.А. – М.: ДеЛи принт. – 2003. – 800 с.
9. Цыганенко А.Я., Мишина М.М., Оветчин П.В. Этиологическая роль и биологические свойства современного протей // Сучасні проблеми дерматології, косметології та управління охороною здоров'я: Зб. наук.-практ. конф. – Харків, 2004. – С. 23–24.
10. Deetae P., Bonnarme P., Spinnler H.E. and Helinck S. The growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter* sp. during ripening in a cheese model medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009 – № 82. – 169–177.
11. TeGiffel M.C., Beumer R.R., Leijendekkers S., Rombouts F.M. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. Food Microbiol. 1996. – № 13. – P. 1096–1100.
12. Logan N.A. *Bacillus* and relatives in foodborne illness // Journal of Applied Microbiology. – 2011. – № 112. – P. 417–429.