

**СКРИНІНГ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ШТАМІВ, ВИЛУЧЕНИХ ІЗ М'ЯСНИХ ВИРОБІВ**

*Досліджено склад мікрофлори вітчизняних м'ясних виробів. Вилучено ізоляти різних представників домінуючої мікрофлори, а саме Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus та Staphylococcus, що вказує на особливості процесу виготовлення в залежності від виду та регіону походження продукту. Проведено скринінг біохімічно-активних штамів мікроорганізмів, перспективних для використання у виробництві ферментованих м'ясних продуктів. Ідентифіковано до роду 148 штамів за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями із 238 вилучених ізолятів. Серед отриманих ізолятів - 24 % віднесено до роду Lactobacillus, 19 % – до Streptococcus, 13 % – до Staphylococcus, 8 % – до Micrococcus, 3% – до Enterococcus і у 32 % ізолятів не вдалося визначити рід. Для можливості їх подальшого використання як заквашувальних культур постає необхідність детальнішого вивчення їх біологічних та технологічних властивостей.*

*Ключові слова: мікрофлора ферментованих м'ясних продуктів, мікрококи, молочнокислі бактерії, селекція, стафілококи.*

*Исследовано состав микрофлоры отечественных мясных изделий. Выделено изоляты разных представителей доминирующей микрофлоры, а именно Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus и Staphylococcus, что указывает на особенности процесса изготовления в зависимости от вида и региона происхождения продукта. Проведен скрининг биохимически активных штаммов микроорганизмов, перспективных для использования в производстве ферментированных мясных продуктов. Идентифицировано до рода 148 штаммов по морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим свойствам из 238 выделенных изолятов. Среди выделенных изолятов - 24 % отнесено к роду Lactobacillus, 19 % – к Streptococcus, 13 % – к Staphylococcus, 8 % – к Micrococcus, 3% – к Enterococcus и у 32 % изолятов не удалось определить род. Для дальнейшего их использования в качестве заквасочных культур необходимо более детальное изучение их биологических и технологических свойств.*

*Ключевые слова: микрофлора ферментированных мясных продуктов, микрококки, молочнокислые бактерии, селекция, стафилококки.*

*Studied the composition of the microflora of domestic meat products. Different representatives of the dominant microflora, namely Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus and Staphylococcus, which indicates features of the manufacturing process depending on the type and region of origin of the product were selected.*

*Biochemically active strains of microorganisms which were promising for use in the manufacture of fermented meat products have been screened. It was determined identification to the genus level 148 strains by morphological, cultural and physiological-biochemical properties of 238 isolates obtained. Among them, 24% of isolates assigned to the genus Lactobacillus, 19 % – to Streptococcus, 13% - to Staphylococcus, 8% - to Micrococcus, 3% - to Enterococcus and 32% of the isolates were unable to determine the genus. For further use as starter cultures requires more detailed study of their biological and technological properties.*

*Key words: lactic acid bacteria, microflora of fermented meat products, micrococci, selection, staphylococci.*

На сьогодні об'єктом активних досліджень постає мікрофлора ферментованих ковбас [1-3]. Більшість спеціалістів вважають, що мікрофлора м'ясних виробів майже однакова за своїм видовим складом, проте підкреслюють домінування тих або інших видів мікроорганізмів, що пов'язано з особливостями технологічного процесу виготовлення продуктів. У зв'язку з цим актуальним є напрям вивчення можливості застосування різноманітних груп бактерій у виробництві ковбас, дослідження взаємодії зі спонтанною мікрофлорою та впливу на перебіг фізико-хімічних та біохімічних процесів в залежності від властивостей м'ясної сировини та складу фаршу.

Пошук технологічно перспективної мікрофлори здійснюють із різних природних джерел (свіжої м'ясної сировини, фаршу, м'ясних, молочних, кисломолочних продуктів, овочів, фруктів та розсолів), проводять селекцію у бажаному напрямі, застосовуючи як традиційні, так і сучасні генетичні методи. Сьогодні для визначення мікроорганізмів застосовують фенотипову, хемотаксономічну, ієрархічну, філогенетичну, генотипову систематики. Ці системи є результатом застосування не тільки різних методів, а й, перш за все, різних методологічних підходів. Найуживанішою схемою ідентифікації мікроорганізмів є систематика бактерій, що зібрана у Визначнику бактерій Бергі [4].

Для того, щоб створити ефективні заквашувальні композиції пошук мікроорганізмів ведуть за певними ознаками. Однак, слід зазначити, що чітко означених правил для вибору культур не існує, і кожен автор для цього пропонує свій власний алгоритм. Загальним є те, що культури мають бути непатогенними, нетоксикогенними. Позитивною рисою вважають нездатність культур утворювати небезпечні аміни (гістамін, тирамін, кадаверін, путресцин) та сірководень [5].

На думку інших дослідників заквашувальні культури, особливо ті, що застосовуються у виробництві ферментованих м'ясних виробів, повинні працювати у широкому діапазоні температур, значного вмісту NaCl та кислотності, мати високу нітриредуквальну, протеолітичну, ліполітичну та ароматоутворювальну активності [6-8]. Окрім цих вимог Н. J. Buckenhüskes [9] вважає за доцільне брати до уваги властивості сировини, бажані ознаки готового продукту та особливості технології, за якою його будуть виробляти.

**Метою даної роботи** є виділення з різних природних джерел з широким спектром біологічної активності, дослідження їх властивостей та оцінка перспектив їх застосування як складників бактеріальних препаратів для виробництва ферментованих м'ясних продуктів високої якості.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були зразки сиров'ялених ковбас та балику, ізоляти мікроорганізмів.

Чисті культури мікроорганізмів одержували за загальними мікробіологічними методами на відповідних селективних середовищах. Для одержання ізольованих колоній кокової форми накопичувальну культуру висівали на агаризовані селективні середовища – м'ясопептонний агар (МПА) та МПА з 5% NaCl (МПА-С). Для одержання паличкоподібних форм – використовували такі поживні середовища: на основі гідролізованого протеазою знежиреного молока (ГА), середовище de Man, Rogosa and Sharpe (MPC), середовище з дріжджовим екстрактом та глюкозою (ПК) [4, 10, 11].

Контроль чистоти культур визначали методом світлової мікроскопії відповідно до ДСТУ 7357:2013 [12].

Селекційні дослідження мікрофлори виконано за рекомендаціями Л.І. Банікової, "Сборника инструкций по селекции МКБ", "Методических рекомендаций по выделению и идентификации бактерий рода *Staphylococcus*", "Диастаф" – экспресс-метода диагностики стафилококков" та посібника Ф. Герхарда [10, 11, 13-15].

Видову приналежність виділених штамів визначали за Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009 p. [4].

### Результати досліджень.

Для мікробіологічного обстеження було взято продукцію виробників різних регіонів України, виготовлену за традиційними технологіями, що не передбачають використання бактеріальних препаратів: сиров'ялені та сирокочені ковбаси “Дарницька” (КД), “Любительська” (КЛ), “Житомирська” (КЖ), “Українська” (КУ), “Ювілейна” (КЮ), “Курортна” (КК), “Київська” (ККи) та балик сиров'ялений зі свинини (БС).

Вилучення мікроорганізмів із комерційних м'ясних виробів здійснювали у кілька послідовних етапів. Спочатку одержували накопичувальні культури, висіваючи зразки ковбас у селективні поживні середовища та культивуючи їх за температури 30°C.

У такий спосіб було отримано 96 накопичувальних культур, що розрізнялись за морфологією клітин мікроорганізмів. Для одержання ізольованих колоній накопичувальну культуру висівали на відповідні тверді селективні середовища. Потім отримані ізоляти переносили в рідкі селективні середовища (МПБ, МРС, ПК, відновлене знежирене молоко) і культивували за температури 30 °С упродовж 48 год. Ступінь чистоти культур оцінювали мікроскопією за морфологічною однорідністю. Для кожної накопичувальної культури виконували 2-3 разову процедуру очищення.

Колонії мікроорганізмів, виділені із досліджених м'ясних продуктів, були подібними за морфологією. У товщі агаризованого середовища (ГА, МПА, МПА-С, МРС) колонії мали форму “човників” довжиною 1 мм, “гречаного зерна” або дисків.

За поверхневого росту спостерігали різні за кольором та розміром колонії, здебільшого дрібні (до 1 мм у діаметрі), білуваті (зрідка кремового, жовтого чи блідо-рожевого забарвлення), круглі, опуклі, гладкі, блискучі найчастіше з рівним краєм колонії діаметром 1-2 мм та до 5 мм.

У рідких середовищах одержали різноманітні групи бактерій. Так, у середовищі МПБ більшість ізолятів мали форму коків від 0,5 до 2,5 мкм в діаметрі, зустрічались тетракоки. Під час розвитку у рідкому середовищі МРС, ПК, відновленому знежиреному молоці паличкоподібні ізоляти мали форму окремих ниткоподібних, тоненьких, вигнутих паличок різної довжини (0,7-1,1 мкм) та товщини (0,1-0,6 мкм), які інколи утворювали ланцюжки. У разі неоднорідності ізоляту виконували додаткові операції з очищення культур.

Із досліджених продуктів було отримано 238 ізолятів мікроорганізмів, які за морфологічною будовою клітин умовно розподілили на 4 групи: I – коки, тетракоки, II – коки, ланцюжки коків, III – палички, IV – суміш коків та паличок (табл. 1).

Таблиця 1

### Характеристика ізолятів, вилучених з різних м'ясних продуктів

| Вид продукту | Кількість ізолятів | виділених | Розподіл ізолятів за морфологією клітин |    |     |    |
|--------------|--------------------|-----------|---|----|-----|----|
|              |                    |           | I                                       | II | III | IV |
| КД           | 27                 |           | 7                                       | 14 | 0   | 6  |
| КЛ           | 39                 |           | 6                                       | 4  | 13  | 16 |
| КЖ           | 43                 |           | 2                                       | 4  | 21  | 16 |
| КУ           | 18                 |           | 2                                       | 0  | 5   | 11 |
| КЮ           | 33                 |           | 6                                       | 14 | 6   | 9  |
| КК           | 13                 |           | 4                                       | 6  | 0   | 3  |
| ККи          | 16                 |           | 0                                       | 1  | 9   | 6  |
| БС           | 47                 |           | 21                                      | 21 | 0   | 5  |
| Всі продукти | 238                |           | 48                                      | 64 | 54  | 72 |

Більшість ізолятів кокової форми (17,8 %) одержали з балику сиров'яленого свинячого (БС). Решту – із ковбас “Дарницької” (КД) – 8,9%, “Курортної” (КК) та “Любительської” (КЛ) - по 4,2 %, з “Житомирської” (КЖ) – 2,5 %, та “Української” (КУ) – 0,8 % (табл. 1).

Ізоляти паличкоподібних форм було отримано з ковбас “Київської” (ККи) – 3,8 %, з “Житомирської” (КЖ) – 8,9 %, “Любительської” (КЛ) – 5,5 %, з “Української” (КУ) - 2,1% та з “Ювілейної” (КЮ) – 2,5 %.

Отже, таке різноманіття виділених ізолятів вказує на особливості технологічного процесу виготовлення цих ферментованих продуктів, виготовлених у різних регіонах України.

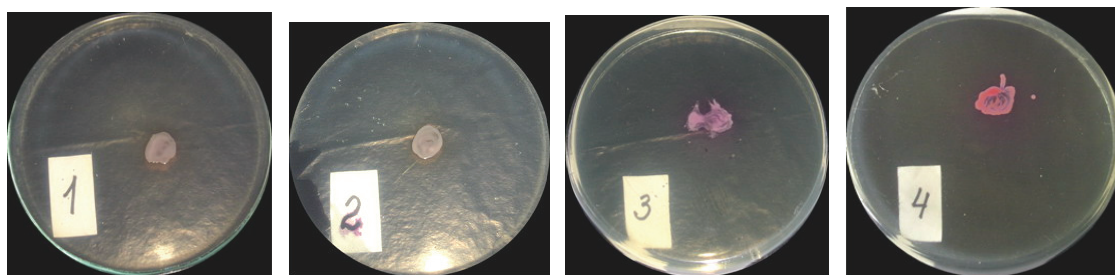
Слід зазначити, що частина отриманих паличкоподібних ізолятів (30,5 % від загальної кількості вилучених ізолятів) утворювали з коками стійкі сполучення, які не вдалося розподілити на складники (див. табл. 1). У кожному продукті таких сполучень було від 1,3 до 6,8 % від усіх відокремлених колоній. Спороутворювальні мікроорганізми становили 3,4 % із вилучених паличкоподібних ізолятів. Стійкі сполучення коків з паличками та спороутворювальні ізоляти було вилучено з наступних досліджень.

Мікробіологічний аналіз ізолятів I-III груп показав їхню морфологічну однорідність (таблиця 1). Ідентифікацію культур проводили за комплексом культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак відповідно до ключів, наведених у визначнику Бергі [4].

Рід виділених коків I групи встановлювали за рядом діагностичних тестів на агарі з фуразолідомом, з фенолфталеїнфосфатом натрію, за здатністю гідролізу гліцерину у присутності еритроміцину, а також за експрес-методом “Діастаф”.

Показано, що 38 % ізолятів I групи належність до мікрококів, оскільки вони не є чутливими до фуразолідону [4].

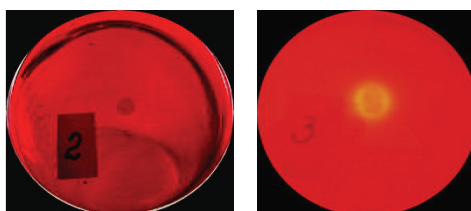
Ще одним критерієм розмежування мікрококів від стафілококів є визначення їхньої фосфатазної активності [14], яку було встановлено за якісною реакцією на середовищі з фенолфталеїнофосфатом натрію (рис. 1). Колір колоній стафілококів після обробки парами аміаку набував рожевого забарвлення (варіант 3, 4), тоді як пігмент мікрококів залишався без змін (вар. 1, 2). За цим тестом позитивною реакцією володіли 50% вилучених ізолятів, що вказувало на належність до роду *Staphylococcus*.



**Рис. 1. Фосфатазна активність виділених кокових ізолятів I групи.**

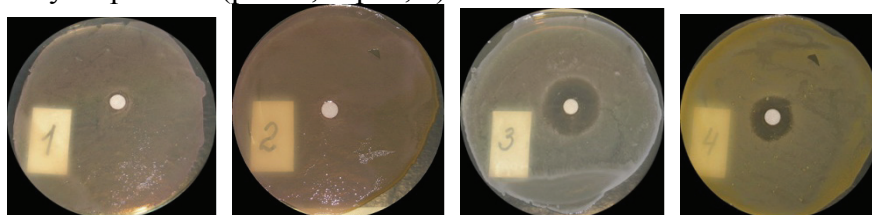
Варіанти 1, 2 – рід *Micrococcus*, 3, 4 - *Staphylococcus*.

Якісним показником, що також підтверджує наявність штамів роду *Staphylococcus* є здатність до гідролізу гліцерину в присутності еритроміцину [14]. Стафілококи змінюють забарвлення поживного середовища з червоного на жовтий колір (варіант 3, рис. 2). Відсутність зміни кольору свідчить, що штами належать до роду *Micrococcus* (вар. 2, рис. 2). За цим тестом 62 % вилучених ізолятів мали позитивну реакцію.



**Рис. 2. Визначення роду коків I групи за допомогою тесту з еритроміцином.**  
Варіанти 2 – рід *Micrococcus*, 3 – *Staphylococcus*.

Зі застосуванням експрес-методу “Діастаф” було також визначено родову належність ізолятів I групи і доведено їхню чистоту, що підтвердило наші попередні тести (рис. 3, табл. 2). На рис. 3 у варіантах 3, 4 зафіксовано зони затримки росту (від 17 до 34 мм) навколо диску (d = 6 мм) з антибіотиком АЛ-87. Ці світлі зони свідчать про бактерицидну дію антибіотика щодо стафілококів [15]. Штами роду *Micrococcus* були стійкими до цього антибіотика і зон не утворювали (рис. 3, вар. 1, 2).



**Рис. 3. Визначення роду коків I групи за експрес-методом діагностики стафілококів “Діастаф”.**  
Варіанти 1, 2 – рід *Micrococcus*; 3, 4- *Staphylococcus*.

Таблиця 2

**Діагностичний тест розділення виділених кокових форм**

| Вид продукту | Кількість штамів | Зона затримки росту з дисками “Діастаф”, мм |           |
|--------------|------------------|---|-----------|
|              |                  | Менше 14                                    | Більше 14 |
| КД           | 7                | 3   | 4         |
| КЛ           | 6                | 2   | 4         |
| КЖ           | 2                | 2   | 0         |
| КУ           | 2                | 1   | 1         |
| КЮ           | 4                | 4   | 2         |
| КК           | 4                | 0   | 4         |
| БС           | 21               | 6   | 15        |
| ККи          | 0                | 0   | 0         |
| Всі продукти | 48               | 18  | 30        |

У результаті проведених досліджень було встановлено, що більша частина культур I групи належала до роду *Staphylococcus* – 62,5 %, тоді як до роду *Micrococcus* – 37,5 %.

Встановлення роду молочнокислих бактерій II і III груп (див. табл. 1) здійснювали не тільки за культурально-морфологічними, а й фізіолого-біохімічними властивостями.

Ізоляти II та III груп досліджували за наступними властивостями: визначення типу ферментування, газоутворення, ароматоутворення, кислотоутворення, стійкість до високих концентрацій солі, жовчі, лужного середовища, утворення аміаку з аргініну, розвиток на лакмусовому молоці, каталазну активність (табл. 3) [10, 11, 13].



Усі вилучені молочнокислі коки та палички були грампозитивними та каталазонегативними. Мікроорганізми II групи зброджували глюкозу за гомоферментативним типом бродіння, оскільки вони утворювали лише молочну кислоту. Для паличкоподібних ізолятів III-ї групи властиві як гомоферментативні – 80,6 %, так і гетероферментативні – 19,4 % культури. Продукування ацетоїну було виявлено у 48 % дослідних штамів II та III груп за реакцією Фогес-Проскауера, яка заснована на окисленні ацетоїну до діацетилу у лужних умовах [16].

Із 100 дослідних молочнокислих ізолятів у присутності 40 % жовчі гинули лише 72 % культур. Стійкими ці мікроорганізми були і до лугу: 45 % культур зберігали активність за рН 9,2, а за рН 9,6 розвивались лише 24 %. Активний розвиток у лакмусовому молоці спостерігали у 37 % ізолятів; 29 % - утворювали аміак із аргініну.

За наведеними показниками 86 % ізолятів II групи було віднесено до роду *Streptococcus*, решта - до типових ентерококів. Усі паличкоподібні ізоляти III-ї групи за сукупністю властивостей відповідали характеристикам роду *Lactobacillus*.

Ізоляти IV групи являли собою стійку суміш коків та паличок після повторних процедур очищення. З цієї групи не вдалося одержати чисті культури і визначити їх рід.

Як свідчать наведені вище дані, мікрофлора ферментованих м'ясних продуктів переважно представлена родами *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* та *Staphylococcus*, що узгоджується з відомими літературними даними [17-19]. Більшу частину від загальної кількості мікрофлори в українських ковбасах “Любительська”, “Житомирська”, “Київська”, “Ювілейна” склали молочнокислі бактерії - від 36 % до 41 %. Домінування кокової мікрофлори, зокрема мікрококів та стафілококів, спостерігали у ковбасах “Дарницька”, “Курортна”, в балику сиров'яленому зі свинини. Їхня частка від загальної кількості мікроорганізмів складала від 33 % до 41 %. У ковбасі “Українська” співвідношення між молочнокислими бактеріями та мікрококами і стафілококами становило близько 1:1.

У результаті ідентифікації за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями 148 вилучених штамів віднесено 24 % вилучених ізолятів до роду *Lactobacillus*, 19 % – до *Streptococcus*, 13 % – до *Staphylococcus*, 8% - до *Micrococcus*, 3% - до *Enterococcus* і у 32 % ізолятів не вдалося визначити рід.

### **Висновки**

1. Досліджено склад мікрофлори вітчизняних м'ясних виробів. Встановлено, що найпоширенішими її представниками є роди *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* та *Staphylococcus*. Таке різноманіття виділених ізолятів вказує на особливості технологічного процесу виготовлення цих ферментованих продуктів.

2. Проведено ідентифікацію за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями до роду 148 штамів із 238 вилучених ізолятів. Серед них 24 % віднесено до роду *Lactobacillus*, 19 % – до *Streptococcus*, 13 % – до *Staphylococcus*, 8 % – до *Micrococcus*, 3% – до *Enterococcus* і у 32 % ізолятів не вдалося визначити рід. Для можливості їх подальшого використання як заквашувальних культур постає необхідність детальнішого вивчення їх біологічних та технологічних властивостей.

### **Література**

1. Rebecchi A., Crivori S., Sarra P.G., Cocconcelli P.S. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation // J. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol. 84, № 6. – P. 1043-1049.
2. Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami // Int. J. Food Microbiol. – 1994. – Vol. 23, № 3. – P. 179-196.
3. Santos E.M., Gonzales-Fernandez C., Jaime I., Rovira J. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of “chorizo” // Int. J. Food Microbiol. – 1998. – Vol. 39, № 1-2. – P. 123-128.

4. De Vos P. Bergey's manual of systematic bacteriology / De Vos P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K-H. Schleifer, W. D. Whitman. - Second edition. Springer: New York, 2009. – Vol. 3. – 1422 p.
5. Gardini F., Martuscelli M., Crudele M. A., Paparella A., Suzzi G. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content // Meat Science. – 2002. – Vol. 61, № 3. – P. 275-283.
6. García-Varona M., Santos E. M., Jaime I., Rovira J. Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo // Int. J. Food Microbiol. – 2000. – Vol. 54, № 3. – P. 189-195.
7. Mauriello G., Casaburi A., Blaiotta G., Villani F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy // Meat Science. – 2004. – Vol. 67, № 1. – P. 149-158.
8. Johansson G., Berdagué Jean-L., Larsson M., Tran N., Borch. E. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures // Meat Science. – 1994. – Vol. 38, № 2. – P. 203-218.
9. Buckenhüskes H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities // FEMS Microbiology Reviews. – 1993. – Vol. 12, № 1-3. – P. 253-271.
10. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищ. промышленность, 1975. – 225 с.
11. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф.Герхарда. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – т. 1. – 536 с.
12. ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання – Введ. 2014-01-01. – Київ: Мінекономрозвитку України, 2014. - 31 с.
13. Сборник инструкций по селекции молочнокислых бактерий и бифидобактерий и подбору заквасок для кисломолочных продуктов //Разработан ЦЛМ ВНИИМП при участии Сибирского филиала ВНИМИ и УкрНИИмясомолпрома и утв. 4.12.1985. – 101 с.
14. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Staphylococcus* / М.: Главное эпидемиологическое управление Министерство здравоохранения РСФСР. – 1990. – 21 с.
15. “Диастаф” – экспресс-метод диагностики стафилококков / Информационное письмо: Республ. центр науч. медиц. информ, по проблеме “Вирусология, микробиология и инфекционные болезни”. – К. – Вып. 6. - 1995. – 1995.
16. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Московского университета. – 1976. – 307 с.
17. Drosinos E.H., Mataragas M., Xiraphi N., Moschonas G., Gaitis F., Metaxopoulos J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage // Meat Science. – 2005. – Vol. 69, № 2. – P. 307-317.
18. Scannell A. G.-M., Kenneally P.M., Arendt E.K. Contribution of starter cultures to the proteolytic process of a fermented non-dried whole muscle ham product // Int. J. Food Microbiol. – 2004. – Vol. 93, № 2. – P. 219-230.
19. Coppola R., Iorizzo M., Saotta R., Sorrentino E., Grazia L. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage // Food Microbiol. – 1997. – Vol. 14, №1. – P. 47-53.