

**Богдан ГОЛУБ,
Світлана ДАНИЛЕНКО,
Ганна РУДАВСЬКА**

ВПЛИВ ПРОПІОНОВОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ НА ДИНАМІКУ БІФІДОФЛОРИ ПІД ЧАС ФЕРМЕНТАЦІЇ МОЛОКА

На сучасному етапі у світі спостерігається надзвичайно динамічне розширення асортименту еубіотичних харчових продуктів, особливо молочних. Це зумовлено високою харчовою цінністю та сприятливою динамікою споживчого попиту на таку продукцію. Асортимент розвивається насамперед за рахунок застосування нових монокультур мікроорганізмів та їх комбінуванням у складі комплексних заквасок.

© Богдан Голуб, Світлана Даниленко, Ганна Рудавська, 2009

Класичними пробіотиками, як відомо, є бактерії родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. Серед відносно нових видів бактерій, яким притаманний пробіотичний ефект, необхідно відзначити бактерії роду *Propionibacterium*, які все ширше застосовують у виробництві еубіотичних харчових продуктів завдяки досить високій антагоністичній активності щодо міцеліальних грибів, дріжджів і деяким іншим характеристикам. Існує низка робіт відносно наявності пробіотичних властивостей у різних видів *Propionibacterium*, але визнаним пробіотиком на сьогодні є лише один вид – *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* [1–5].

Пропіоновокислі бактерії поділяють на дві групи – молочні, або класичні, та бактерії шкірного покриву. Саме представники першої групи досліджуються на предмет використання як аліментарні пробіотики. Найважливішими з них, крім зазначеного вище виду, є *Propionibacterium acidipropionici*, *P. thoenii* та *P. jensenii*. Останні два види генетично дуже близькі, однак мають низку фенотипічних відмінностей, насамперед щодо збродувальної активності. *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* здавна використовується у складі закваски для виробництва сичужних сирів з високою температурою нагрівання сирного тіста, де накопичення продуктів обміну пропіоновокислих бактерій зумовлює появу специфічного запаху, смаку та рисунку сирів. Пропіоновокислим бактеріям притаманний бродильний тип метаболізму з утворенням значної кількості пропіонової та оцтової кислот (співвідношення може коливатися в межах 2:1–5:1) і вуглекислого газу. Ці бактерії здебільшого відносять до мікроаерофілів (причому бактерії шкірного покриву значно витриваліші до дії високих концентрацій кисню), вони характеризуються повільним розвитком, оптимальна температура для них – 30–37 °C [6].

Увага до класичних пропіоновокислих бактерій як до потенційних пробіотиків зумовлюється їхніми властивостями продукувати антибіотичні (пропіоніцини) та біфідогенні речовини різної природи.

Доведено антибіотичну активність пропіоніцинів щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів. Нині вважається, що це протеазоактивуючі поліпептиди, дуже подібні за своєю будовою до пептидів, виділених із *Lactobacillus lactis*. Їхній ген міститься у плазмідах і характеризується горизонтальним шляхом передачі. Антибіотична активність притаманна *Propionibacterium jensenii* SM11 і різним штамам *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* щодо дріжджів, які викликають псування молочних продуктів при холодильному зберіганні [7; 8].

Біфідогенна активність пропіоновокислих бактерій зумовлюється продукуванням 1,4-гідрокси-2-нафтоїної кислоти, 2-аміно-3-карбоксі-

1,4-нафтохінону та дещо менше коротколанцюговими жирними кислотами, котрі водночас є інгібіторами грамнегативних факультативних і облигатних анаеробів. Основними продуцентами біфідогенних факторів є бактерії *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* та *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Також виявлено синтез біфідогенних факторів *P. acidipropionici* в аеробних умовах [9; 10].

У практиці виробництва кисломолочних пробіотичних напоїв пропіоновокислі бактерії використовуються тільки у складі полікультурних заквасок різних штамів *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* і *Bifidobacterium*. Прикладом такої вітчизняної продукції є асортиментна низка кисломолочних напоїв "Симбітер", де у складі багатштамової симбіотичної закваски використовуються понад десятка штамів бактерій родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Streptococcus* [11; 12]. Особливістю цього продукту є окреме культивування симбіозу оцтовокислих, пропіоновокислих і біфідобактерій та симбіозу молочнокислих бактерій з наступним їх змішуванням і виготовленням полікультурної закваски. Подібні закордонні зразки також представлені заквасками, до складу яких входять бактерії щонайменше трьох родів – *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*.

Досліджено способи стимулювання біфідофлори пропіоновокислими бактеріями при ферментації молока без участі інших молочнокислих бактерій. Для цього проведено порівняльний аналіз впливу культивованих спільно пропіоновокислих бактерій на пробіотичні штами біфідобактерій, вирощуваних на мікробіологічних середовищах та в коров'ячому молоці при виготовленні кисломолочного напою типу простокваша.

Як основу закваски використано монокультури для виробництва кисломолочних продуктів *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (BB-12) фірми *Chr. Hansen* (Данія) і *Bifidobacterium longum* VKPM-1514 (каталожний номер 4201) виробництва Технологічного інституту молока та м'яса Української академії аграрних наук (ТІММ УААН), які рекомендовано для виготовлення функціональних молочних продуктів. Використаний штам відноситься до групи класичних пропіоновокислих бактерій – *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (каталожний номер 5103, далі по тексту *Pr-5103*), ізольований у ТІММ УААН із твердих сичужних сирів.

Культивування бактерій проведено згідно з методичними вказівками "Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах" і чинними стандартами [13–15]. До поживного середовища у співвідношенні 1:1 внесено 3 % інокуляту з пропіоновокислих бактерій і біфідобактерій. Після їх нарощування у рідких середовищах – відповідно у гідролізатно-молочному й лактатному – визначено при-

ріст чисельності методом граничних десятикратних розведень і наступного висіву 1 см³ розведень 10⁵, 10⁶, 10⁷ і 10⁸ (для пропіоновокислих бактерій розведення взяті на порядок нижчі) на відповідні тверді середовища. Після інкубації (72 год для біфідобактерій та 96 год для пропіоновокислих) визначено загальну чисельність бактерій у дослідних зразках. Розрахунок кількості та приросту мікроорганізмів проведено за відповідними формулами [15]. Значення приросту кількості КУО – різниця між десятковими логарифмами кількості КУО, інкубованих без 16-годинного попереднього нарощування та з попереднім нарощуванням у рідкому середовищі.

Аналіз росту бактерій під час дослідного виготовлення кисломолочного напою проведено аналогічно, але посіви на тверді середовища здійснено не після 16-годинного нарощування на рідких середовищах, а після утворення молочного згустка. Рецептатура кисломолочного напою аналогічна простокваші 3.2-процентної жирності – 79 % молока 3.2-процентної жирності, 6 % вершків 30-процентної жирності, 10 % закваски біфідобактерій та 5 % – пропіоновокислих бактерій [16]. Молоко та вершки виробництва ВАТ "Галактон" попередньо простерилізовано.

У табл. 1 і 2 наведено середні результати інкубації біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій. За контроль узято результати вирощування біфідобактерій у відсутності пропіоновокислих бактерій. Аналітична повторюваність досліду трикратна.

Таблиця 1

Кількість і приріст бактерій при вирощуванні на мікробіологічних середовищах, 10⁵ · КУО/см³

Дослідні культури	Без нарощування		Після нарощування		Приріст, разів	
	<i>Pr</i> *	<i>B</i> *	<i>Pr</i> *	<i>B</i> *	<i>Pr</i> *	<i>B</i> *
<i>BB-12</i>	–	709.12	–	894.23	–	1.26
<i>Pr-5102, BB-12</i>	11.0	118.21	90.91	1209.43	8.265	10.23
<i>VKPM-1514</i>	–	672.76	–	1909.41	–	2.84
<i>Pr-5102, VKPM-1514</i>	9.0	52.73	54.55	2027.32	6.061	38.45
<i>BB-12, VKPM-1514</i>	–	172.79	–	2645.11	–	15.31
<i>Pr-5103, BB-12, VKPM-1514</i>	6.41	57.27	18.18	1145.12	2.836	20.00

Примітка. **Pr* – пропіоновокислі бактерії; *B* – біфідобактерії.

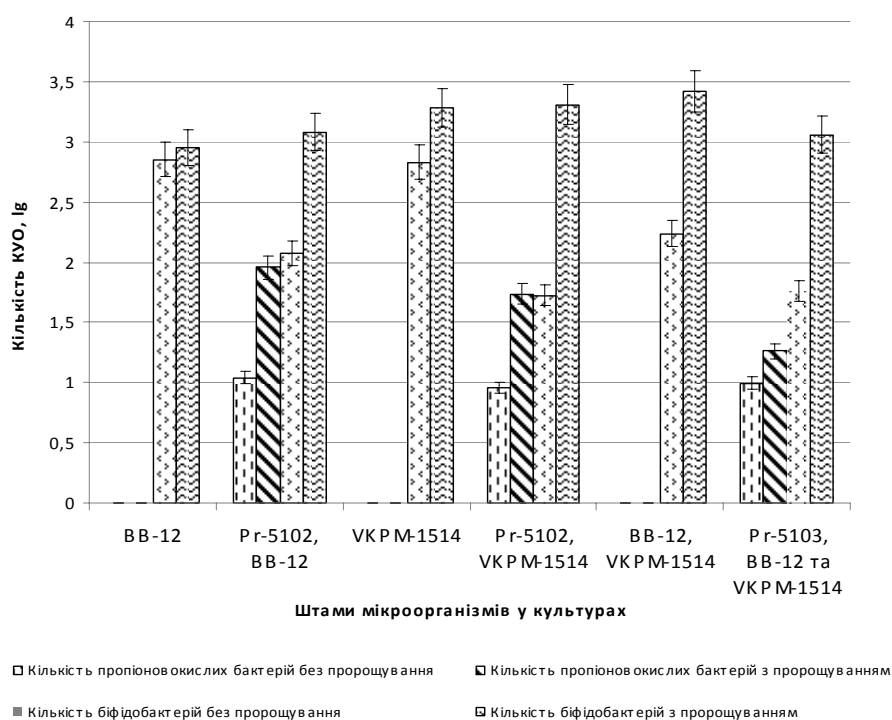


Рис. 1. Зміна кількості бактерій при вирощуванні на мікробіологічних середовищах

Ферментація на мікробіологічних середовищах показала наявність стимулювального ефекту пропіонових бактерій на розвиток біфідобактерій. Найбільший вплив виявлено при вирощуванні монокультур. У випадку культивування суміші біфідобактерій та пропіонових бактерій ймовірно вираженішим є взаємне стимулювання. При цьому в усіх варіантах виявлено закономірно вищий приріст кількості біфідобактерій порівняно з пропіоновими. Це можна пояснити менш інтенсивним розвитком останніх. Така властивість є несприятливою у виробництві ферментованих полікультур харчових продуктів, що підтверджено в досліді з ферментації молока. У виробничих умовах це потребує використання закваски пропіонових бактерій з вищим початковим значенням КУО. Із рис. 1 видно, що достовірний приріст кількості біфідобактерій відзначено в усіх варіантах, проте штам *VKPM-1514* зумовив найвищий приріст у присутності пропіонових бактерій. Однак подібна тенденція не збереглася при ферментації молока впродовж дослідного виробництва кисломолочного напою (рис. 2).

Таблиця 2

Кількість і приріст бактерій при виготовленні кисломолочного напою, $10^5 \cdot \text{КУО}/\text{см}^3$

Дослідні культури	До заквашування	Після утворення згустка	Приріст, разів
-------------------	-----------------	-------------------------	----------------

	<i>Pr</i> *	<i>B</i> *	<i>Pr</i> *	<i>B</i> *	<i>Pr</i> *	<i>B</i> *
<i>BB-12</i>	–	389.01	–	2145.88	–	5.52
<i>Pr-5102, BB-12</i>	7.12	408.21	15.99	3358.97	2.246	8.23
<i>VKPM-1514</i>	–	893.23	–	3455.19	–	3.87
<i>Pr-5102, VKPM-1514</i>	5.09	781.01	11.71	4198.13	2.301	5.38
<i>BB-12, VKPM-1514</i>	–	432.07	–	5243.91	–	12.14
<i>Pr-5103, BB-12, VKPM-1514</i>	9.87	490.33	25.16	7329.08	2.549	14.95

Примітка. **Pr* – пропіоновокислі бактерії; *B* – біфідобактерії.

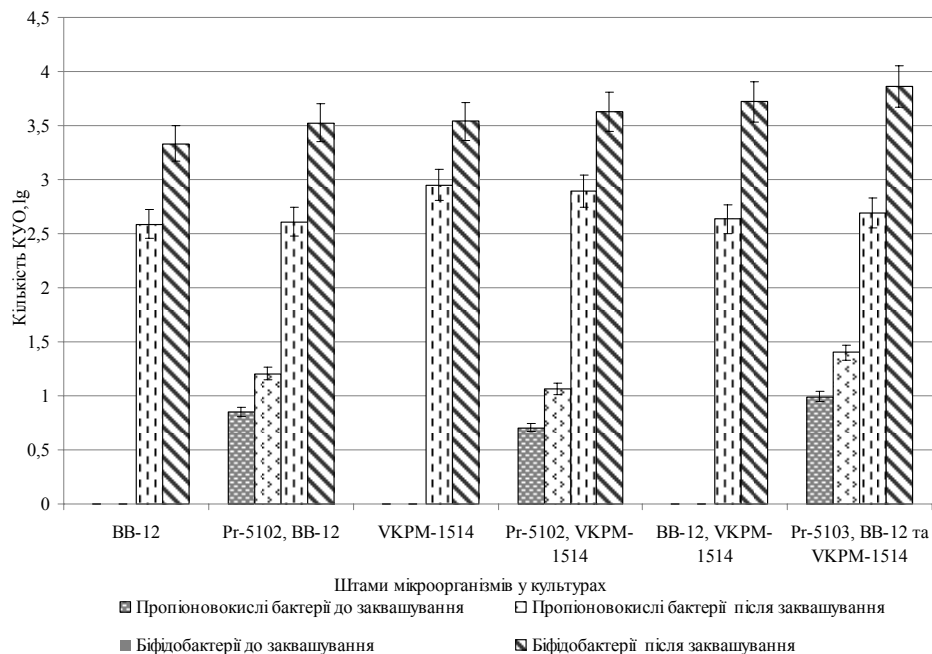


Рис. 2. Зміна кількості бактерій при виготовленні кисломолочного продукту

У всіх зразках приріст біфідобактерій був за межами похибки. Необхідно відзначити приблизно однакову кінцеву кількість біфідобактерій після заквашування (моментом закінчення ферментації та відбору зразків є утворення згустка). Водночас спостерігалася стійка тенденція утворення більшої кількості КУО біфідобактеріями в біштамовій культурі. Найвищий приріст КУО відмічено у штамі *BB-12*, що пояснюється його направленою селекцією для виробництва молочних продуктів і вищою лактозоброджувальною активністю. Ймовірно характерними властивостями цього штаму зумовлено значний приріст КУО біштамової культури. Пропіоновокислі бактерії посилюли ріст штаму *BB-12* на 49 %, а штаму *VKPM-1514* – на 39 %. Біштамова культура біфідобактерій у присутності пропіоновокислих бактерій посилюла ріст лише на 23 %. Використання пропіоновокислих бактерій

дало змогу також скоротити час утворення згустка: з 8.3 до 7.0 год для штаму *BB-12* і з 7.5 до 6.5 год – для штаму *VKPM-1514*.

Приріст пропіоновокислих бактерій був помірним – у 2.2–2.5 рази, що пояснюється незначним терміном інкубації. Оскільки біфідобактерії активніше зброджують лактозу й досить швидко накопичують необхідну для утворення згустка кількість молочної кислоти, подальший розвиток пропіоновокислих бактерій гальмується.

Отже, узагальнюючи отримані результати, необхідно відзначити доведений позитивний вплив пропіоновокислих бактерій на біфідобактерію при спільному культивуванні. Використання такої бікомпонентної закваски уможливило отримання біфідопродукту з більшою кількістю КУО біфідобактерій на момент утворення згустка. Найпозитивніший вплив виявлено щодо монокультури *Bifidobacterium animalis ssp. lactis (BB-12)*. При використанні бікомпонентної біфідокультури позитивний вплив на кількість КУО менше виражений. Відомо, що кількість КУО корисної мікрофлори є одним із головних показників якості кисломолочних напоїв – тому що безпосередньо визначає їхню профілактичну цінність.

Використання штамів пропіоновокислих бактерій у виробництві біфідопродуктів є одним із засобів управління якістю останніх, оскільки введення бактерій *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* уможливило посилення найважливішої характеристики функції якості кисломолочних напоїв спеціального дієтичного споживання – пробіотичної активності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Charalampopoulos D.* Prebiotics and Probiotics Science and Technology / Dimitris Charalampopoulos, Robert A. Rastall. — s. 1. — Springer, 2009. — 1248 p.
2. *Huang Y.* The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model / Y. Huang, L. Kotula, MC. Adams // Food Chemical Toxicology. — 2003. — N 41 (12). — P. 1781—1787.
3. *Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly* / AC. Ouwehand, H. Lagstrom, T. Suomalainen et al. // Annals of Nutrition and Metabism. — 2002. — N 46 (3—4). — P. 159—162.
4. *Probiotic Dairy Products*; ed. Adnan Tamime. — s. 1. — Blackwell Publishing, 2005. — 218 p.
5. *Some factors affecting the adherence of probiotic Propionibacterium acidipropionici CRL 1198 to intestinal epithelial cells* / G. Zarate, V. Morata de Ambrosini, Perez Chaia et al. // Canadian Journal of Microbiology. — 2002. — N 48. — P. 449—457.

6. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Vol. 3 : Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes / ed. Martin Dworkin, Stanley Falkow et al. — Singapore: Springer, 2006. — 1146 p.
7. *High production system of the antibacterial peptide PLG-1* / N. Gollop, D. Toubia, G. B. Shushan et al. // *Biotechnology Progress*. — 2003. — N 19. — P. 436—439.
8. *Schwenninger S. M.* A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts / S. M. Schwenninger, L. Meile // *Systematic and Applied Microbiology*. — 2004. — N 27. — С. 229—237.
9. *Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by Propionibacterium freudenreichii ET-3* / K. Isawa, K. Hojo, N. Yoda et al. // *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. — 2002. — N 66. — P. 679—681.
10. *Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains* / Tomoaki Kouya, Katsuhiro Misawa, Masahito Horiuchi et al. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. — Vol. 103 (5). — 2007. — P. 464—471.
11. Пат. 67660 Україна, МПК 2006 A23C 9/127 C12N 1/20. Спосіб одержання пробіотика "Симбітер-М"/ Янковський Д. С., Димент Г. З., Потребчук О. П., Товкачевська Л. Д. ; заявник і патентовласник ТОВ-фірма "О. Д. Пролісок". — № 2003119885 ; заявл. 04.11.2003 ; опубл. 15.06.2006, Бюл. № 3.
12. Пат. 10367 Україна, МПК 2006 A23C 9/127 C12N 1/20. Спосіб одержання бактеріальної закваски "Симбітер" і спосіб виробництва бактеріального концентрату з її використанням для кисломолочних продуктів / Янковський Д. С., Димент Г. З., Бондаренко В. М. та ін. ; заявник і патентовласник ТОВ-фірма "О. Д. Пролісок". — № 94010088 ; заявл. 16.12.93 ; опубл. 31.08.98, Бюл. № 4.
13. МВК 10.10.2.2.—119—2005. Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах. Метод. вказівки. — К. : Держ. сан.-епід. служба України ; МОЗ України, 2005.
14. *Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування. Ч. 1 : Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень (ISO 6887-1:1999, IDT) : ДСТУ ISO 6887-1:2003.* — [Чинний від 1.10.2004]. — К. : Держспоживстандарт України, 2005. — 10 с. (Національний стандарт України).
15. *Молоко і молочні продукти. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підраховування колоній за температури 30 °С (IDF 100В:1991) ДСТУ IDF 100В:2003.* — [Чинний від 1.01.2005]. — К. : Держспоживстандарт України, 2005. — 10 с. (Національний стандарт України).
16. *Степанова Л. И.* Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры. Т. 1. Цельномолочная продукция / Л. И. Степанова. — СПб. : Гиорд, 1999. — 360 с.