**Назва реферату**: Конкуруюча мікрофлора як фактор підвищення стійкості пастеризованого молока
**Розділ**: Біологія

**Конкуруюча мікрофлора як фактор підвищення стійкості пастеризованого молока**

Oдним з основних завдань молочної промисловості на даному етапі є випуск високоякісної продукції зі збільшеним терміном зберігання. Найпоширенішим і вживаним суцільномолочним продуктом є питне молоко, що входить у щоденний раціон харчування всіх категорій людей. Внаслідок цього питання, пов'язані з дослідженням факторів, що впливають на якість і стійкість цього продукту, і розробка рекомендацій зі збільшення строку зберігання пастеризованого молока досить важливі й актуальні.

Одним з "бар'єрів", виділених проф. Л. Ляйстнером [1], що може бути використаний у розробці технології стійкого пастеризованого молока, є конкуруюча мікрофлора.

Аналіз наявних у літературі даних показує, що молочнокислі й біфідобактерії проявляють антагоністичну дію відносно різних мікроорганізмів. Це може бути викликане як нагромадженням молочної кислоти, так і утворенням значної кількості специфічних продуктів метаболізму, що володіють антибактеріальною дією. До них відносять речовини пептидної природи (нізин), карбонільні сполуки (диацетил), перекис водню, високомолекулярні сполуки - бактеріоцини, одні з яких впливають на энергозалежні системи й ингібують транспортні процеси, змінюють проникність клітинної мембрани для іонів калію, магнію, кобальту, знижують рівень АТФ, знижують трансмембранний електрохімічний потенціал, викликають зникнення специфічних мембранних білків, інші - викликають деградацію ДНК, порушення синтезу РНК, інгібування синтезу білка, а наслідком цих змін є загибель чутливих бактеріальних клітин. У молоці антагонізм молочнокислих бактерій стосовно кислоточутливих протеолітичних мікроорганізмів може бути обумовлений підвищенням активної кислотності. Крім того, взаємодії в мікробних співтовариствах можуть здійснюватися не тільки через метаболіти, виділювані в навколишнє середовище мікроорганізмами, але й через конкурентні трофічні зв'язки, тобто два види не можуть тривалий час співіснувати в одному середовищі, якщо вони залежать від того самого їхнього лімітуючого ресурсу. [2].

Численними дослідженнями встановлена здатність молочнокислих і біфідобактерійей пригнічувати сторонню мікрофлору у ферментованих молочних продуктах. Досліджено, головним чином, антагоністичну активність цих мікроорганізмів стосовно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Антагоністичні властивості мікроорганізмів у цей час широко використовують для виробництва молочних продуктів лікувально-профілактичного напрямку.

НУПТ разом з Інститутом мікробіології й вірусології НАНУ [3] запропонований спосіб продовження терміну пастеризованого молока до вживання шляхом використання молочнокислих мікроорганізмів виду L.plantarum.

В Англії запатентований молочний продукт [5], до складу якого входить комбінація пробіотичних бактерій L. plantarum і пробіотичних олигосахаридів у кількості достатній для попередження розмноження бактерій, що викликають псування харчових продуктів. Кількість пробіотичних бактерій L. plantarum в 1000 кг харчового продукту становить > 1012 клітин.

За рубежем [2, 6] для запобігання росту психротрофів, збільшення терміну зберігання й прискорення згортання при виробленні сиру широко використовують закваски на молочнокислих бактеріях, які вносять у сире молоко перед зберіганням при температурі 4-7°З у кількості 0,1 .0,5% (з розрахунку 107-109 клітин в 1 мол). Ріст психротрофних мікроорганізмів придушує широкий спектр молочнокислих бактерій, таких як болгарської, ацидофільна палички, термофільний стрептокок, молочнокислий стрептокок, вершковий стрептокок і ін.

Метою нашої роботи є розробка технології пастеризованого молока зі збільшеним терміном зберігання.

Нами запропонований ряд напрямків продовження терміну зберігання пастеризованого молока до 7 доби.

Перший спосіб передбачає більш твердий режим теплової обробки, розлив молока при температурі не нижче 65 °С и більш низьку температуру зберігання. На підставі цього розроблена технологія питного пастеризованого молока "Українське" зі строком зберігання 7 діб (ТУ У 25927934-008-98).

Наступним запропонованим і обґрунтованим нами напрямком збільшення стійкості пастеризованого молока є використання нізину - продукту метаболізму молочнокислих стрептококів. При цьому можлива пастеризація молока при 76±2°С и витримці 15-20 з або при 88±2°С з тією же витримкою.

Третій напрямок - застосування подвійної пастеризації, що сприяє зниженню залишкової й вторинної мікрофлори й підвищує стійкість молока в процесі зберігання.

А також для збільшення терміну зберігання пастеризованого молока можливе використання конкуруючої мікрофлори, що надає не тільки бактерицидної або бактеріостатичної дії на мікрофлору молока, але й володіє пробіотичними властивостями. На підставі цього розроблена технологія питного пастеризованого молока " Біо-Молоко" з терміном зберігання 7 діб (ТУ У 25027034 - 025 - 2001).

У даній статті викладені результати досліджень впливу конкуруючої мікрофлори на стійкість пастеризованого молока.

При виборі представників конкуруючої мікрофлори ми виходили з наступних:

- штами-антагоністи повинні мати антибіотичні властивості відносно залишкової мікрофлори й мікрофлори вторинного осеменіння;

- вони не повинні в процесі зберігання молока підвищувати його кислотність;

- ці мікроорганізми повинні мати пробіотичні властивості, і концентрація живих клітин в 1 см3 молока повинна бути не нижче 106.

Виходячи з літературних джерел [2, 7, 8, 9] і вимог до мікроорганізмів-антагоністів для досліджень як конкуруюча мікрофлора нами були обрані культури ацидофільної палички й біфідобактерійей.

Досліджено штами 3113, 3114, 3115 L. acidophilus, отримані в Технологічному інституті молока м'яса УААН, штам 317/402, що використовується для виробництва кисломолочного напою «Наринэ», а також закваска La-5, що представляє собою ліофілізовану культуру L. acidophilus (штам, аналогічний тому, що знаходиться в шлунковій системі людини) для безпосереднього внесення, виробляється фірмою Хр.Хансен. З біфідобактерійей досліджені види В. longum штам яз, В. bifidum штам 1, В. adolescentis штам з52 і ліофілізована закваска для безпосереднього внесення фірми Хр.Хансен Вв-12, що складається з біфідобактерій.

Дані штами мають антибіотичну активність стосовно патогенних, умовно-патогенних і сапрофітних мікроорганізмів. Крім того, ацидофільна паличка й біфідобактерії належать до пробіотичних культур. Це домінуючі представники нормальної мікрофлори кишечника, вони синтезують ряд вітамінів, беруть участь у гідролізі жовчних солей і холестерину, благотворно впливають на травлення й моторику шлунково-кишкового тракту. Тому використання цих видів мікроорганізмів як конкуруюча мікрофлора дасть можливість вирішити відразу два завдання - збільшити стійкість пастеризованого молока й одержати продукт із пробіотичними властивостями.

На першому етапі ми досліджували антагоністичну активність перерахованих культур стосовно залишкової мікрофлори й мікрофлори вторинного осеменіння пастеризованого молока.

Залишкова мікрофлора була виділена нами з посівів пастеризованого в стаціонарних умовах молока. Вона представлена, головним чином, спороутворюючими - Вас. subtilis.

Для виділення мікрофлори вторинного осеменіння були використані зразки пастеризованого молока декількох молочних підприємств України. Мікрофлора вторинного осеменіння більше різноманітна в порівнянні із залишковою й залежить від заводу-виробника. Нами були виділені кишкові палички з посівів на середовище Ендо й психротрофні мікроорганізми з посівів на ПА й витримкою при температурі 6±2°С напротязі 10 діб.

Таким чином, як тест-культури нами використані Вас. subtilis, бактерії роду Pseudomonas і Е. coli.

Дослідження антибіотичної активності штамів і заквасок стосовно виділених тест-культур, проводили методом спільного культивування й методом лунок [7]. Визначення концентрації найбільш імовірного числа молочнокислих мікроорганізмів проводили посівом у стерильне молоко з наступним термостатуванням і складанням числової характеристики по пробірках, у яких молоко згорнулося. НВЧ молочнокислих мікроорганізмів визначали по таблиці.

Визначення біфідобактерійей проводили посівом на тіогліколеве середовище, з наступним термостатуванням і підрахунком колоній або безпосереднім підрахунком у камері Горяєва.

Після підрахунку колоній на твердому живильному середовищі визначали ступінь інгібування, що характеризує антагоністичну активність:

**І = ( К-С)-Ш/К**

де І- ступінь інгібування, %;

К- число колоній тест-культури, що виросли в монокультурі, од/мл;

С- число колоній тест-культури, що виросли при спільному культивуванні, од/мл.

Чисті культури L. acidophillus вносили в концентрації - 104, 105, 106 клітин в 1 мол молока. У процесі культивування їхня концентрація збільшувалася в середньому на 2 порядки.

Отримані результати представлені на діаграмах 1,2,3.

Наведені на діаграмі результати показують, що досліджені штами значно відрізняються антибіотичною активністю. Найбільш активними у відношенні всіх досліджених тест-культур при спільному культивуванні виявилися мікроорганізми роду L. acidophillus штами 3114 і 317/402.

Штами L.acіdophilus 3114 і 317/402 при концентрації 10 пригнічували близько 70% кишкової палички, близько 60% В. subtilts. Зі зменшенням концентрації ацидофільної палички ступінь інгібування зменшується, і при концентрації 106 клітин в 1 мол становить відповідно близько 60% і 50%. Відносно мікроорганізмів роду Pseudomonas штам 3114 L. acidophilus проявляв низьку антибіотичну активність - порядку 13%, вище вона відзначена в штаму 317/402. У закваски DVS La-5 антагоністична активність у відношенні всіх досліджених тест-культур була трохи нижче, ніж у штаму 317/402.

Антагоністичну активність закваски Вв-12 методом спільного культивування визначали тільки стосовно кишкової палички. Ступінь інгібування становить 46,7%.

Антагоністичну активність В. longum, В. adolescentis, B. bifidum стосовно Вас. subtilis проводили методом лунок. Судячи з розміру зони гноблення, найбільш активними виявилися В. longum і В. adolescentis.

Однак умови взаємодії мікроорганізмів при спільному культивуванні відрізняються від умов у пастеризованому молоці. При спільному культивуванні штами-антагоністи перебувають у сприятливих умовах, концентрація їх збільшується на 2 порядки, відповідно збільшується доля продуктів метаболізму, які мають бактерицидну або бактеріостатичну дію на мікрофлору молока. А в пастеризованому молоці ті ж мікроорганізми перебувають в умовах, що обмежують їхній розвиток низькою температурою зберігання продукту. У цьому випадку можна розраховувати тільки на ті метаболіти, які вносять у молоко з культурою. У той же час для залишкової мікрофлори умови розвитку в молоці при температурі 4±2°С більш сприятливі, тому що багато хто із цих мікроорганізмів є психротрофами.

Для дослідження впливу найбільш активних штамів-антагоністів на мікрофлору молока до пастеризованого молока промислового виробництва були додані культури з розрахунку їхнього вмісту в продукті не менш 106 клітин у мл. Контролем слугувало пастеризоване молоко. Крім того, для встановлення впливу досліджуваних штамів на кислотність молока в процесі зберігання при температурі 4±2°С той же зразок пастеризованого молока стерилізували й у нього вносили культури антагоністів у тій же кількості.

Таким чином, у контрольному варіанті зміна титруємої й активної кислотності могло бути викликане розвитком тільки мікрофлори молока, у молоці зі штамами-антагоністами - мікрофлорою молока й внесеною мікрофлорою, а в стерильному молоці з культурами - тільки ацидофільною паличкою й біфідобактеріями.

Про динаміку розвитку мікроорганізмів у процесі зберігання пастеризованого молока судили по титруємій і активній кислотності й числу МАіФАМ.

Результати досліджень представлені в таблиці.

|  |  |
| --- | --- |
| Зразок  | Час зберігання, діб  |
| Вихідний  | 1  | 4  | 7  | 10  | 12  |
| оТ  | рН  | оТ  | рН  | оТ  | рН  | оТ  | рН  | оТ  | рН  | оТ  | рН  |
| Пастеризоване молоко  | 17,0  | 6,70  | 17,0  | 6,70  | 17,0  | 6,70  | 19,0  | 6,59  | 23,0  | 6,37  | 26  | 6,20  |
| Стерилізоване молоко  | 17,0  | 6,70  | 17,0  | 6,70  | 17,0  | 6,70  | 17,0  | 6,70  | 17,0  | 6,70  | 17,0  | 6,70  |
| Пастеризоване молоко+штамм 3114  | 18,2  | 6,62  | 18,2  | 6,62  | 18,5  | 6,61  | 21,0  | 6,47  | 24,0  | 6,32  | 28,0  | 6,08  |
| Стерилізоване молоко+штамм 3114  | 18,2  | 6,62  | 18,2  | 6,62  | 18,5  | 6,61  | 19,0  | 6,58  | 19,5  | 6,55  | 22,0  | 6,42  |
| Пастеризоване молоко+штамм 317/402  | 18,0  | 6,65  | 18,0  | 6,65  | 18,5  | 6,60  | 21,0  | 6,46  | 24,5  | 6,29  | 27,5  | 6,10  |
| Стерилізоване молоко+штамм 317/402  | 18,0  | 6,65  | 18,0  | 6,65  | 18,5  | 6,60  | 19,0  | 6,58  | 20,0  | 6,53  | 21,5  | 6,44  |
| Пастеризоване молоко+закваска La-5  | 17,5  | 6,67  | 17,5  | 6,67  | 18,0  | 6,65  | 20,0  | 6,53  | 23,0  | 6,37  | 27,0  | 6,13  |
| Стерилізоване молоко+закваска La-5  | 17,5  | 6,67  | 17,5  | 6,67  | 18,0  | 6,65  | 18,5  | 6,61  | 19,0  | 6,58  | 20,0  | 6,53  |

У контрольному варіанті пастеризованого молока протягом 5 діб зберігання показники титруємої й активної кислотності залишалися на одному рівні. На 7 добу кислотність підвищилася на 2Т, на 10-у - досягла 23Т, і молоко по цьому показнику перестало відповідати вимогам ДСТУ 2661-94 "Молоко коров'яче питне". У стерилізованому молоці, збагаченому штамами ацидофільної палички й біфідобактерійей, рівень титруємої й активної кислотності змінювався відразу після внесення. У процесі зберігання спостерігалося незначне збільшення титруємої кислотності й зменшення активної кислотності. Це свідчить про те, що й при температурі молока 4±2°С штами-антагоністи розвиваються й зброджують лактозу. Найбільшої кислотоутврюючею здатністю характеризуються штами 3114 і 317/402, у яких відразу після внесення кислотність підвищилася на 1 Т и при подальшій витримці протягом 12 днів - на 4°Т. Штам L acidophilus закваски La-5 і біфідобактерійей є слабкими кислотоутворювачами. Незважаючи на відсутність у молоці стимуляторів росту й низькі температури зберігання спостерігалося підвищення кислотності за 12 днів на 2,5 - ЗТ.

У пастеризованому молоці, збагаченому культурами, відбувається збільшення титруємої кислотності більшою мірою, чим у контрольному варіанті. Така закономірність встановлена для молока, збагаченого ацидофільною паличкою й біфідобактеріями. Порівнюючи показники титруємої й активної кислотності в стерилізованому й пастеризованому молоці, збагаченому культурами, з контрольним зразком, можна зробити висновок про те, що їхні зміни відбуваються за рахунок розвитку внесених лактобацилл і біфідобактерій, кількість яких у молоці значно перевищує мікрофлору пастеризованого молока. На 7-й день всі зразки по показнику титруємої кислотності відповідають вимогам НТД, на 10-й день - кислотність перевищила припустимий рівень.

Аналізуючи результати експериментів, наведені в таблицях, можна зробити висновок про те, що в пастеризованому молоці досліджені культури в концентрації 106 гальмують розвиток мікрофлори молока. Це підтверджується посівами зразків молока на пептонний агар. Результати мікробіологічного контролю досвідчених і контрольного зразка представлені в таблиці 3.

Наведені в таблиці 3 дані свідчать про те, що штами ацидофільної палички й біфідобактерії, що володіють антибіотичною активністю, затримують ріст мікроорганізмів у пастеризованому молоці. Так, у контрольному варіанті за 7 діб зберігання при температурі 4±2°С число МАіФАМ склало

1,2-105 КОЕ/мл (початкове -4,1-104), а за тей ж час у дослідних зразках з ацидофільною паличкою воно коливалося від 67,5 до 78,3% стосовно контролю, а в зразках з біфідобактерійами ступінь затримки росту були ще вище - від 35 до 43,3%.

Таким чином, отримані нами результати по дослідженню впливу конкуруючої мікрофлори на стійкість пастеризованого молока при зберіганні показали, що, підбираючи штами мікроорганізмів з високою антагоністичною активністю стосовно мікрофлори пастеризованого молока й незначною кислотоутворюючою здатністю, можна збільшити стійкість пастеризованого молока до 7 діб. При використанні як конкуруючу мікрофлору пробіотичних мікроорганізмів можна одержати біо-продукт із функціональними властивостями.

Литература:

1 .Люк Э., Ягер М. Консерванты в пищевой промышленности. Свойства и применение. - Санкт-Петербург: ГИ-ОРД, 2000. - 255 с.

2. Перфильев Г.Д. Влияние антибактериальных свойств молочнокислых бактерий на качество молочных продуктов: Обзорная информация. - М.: ЦНИИТЭИ минмясомолпром. - 1985. -45 с.

3. Коваленко Н.К. Cпociб подовження терміну придатності до споживання пастеризованого молока /Н.К. Коваленко, О.В. Кравцова, Т.А. Скорченко //Молочна промисловють. - 2005. -№5. - С. 20-23

4. Коваленко Н.К. Технологія пастеризованого молока, збагаченого різними штамами пробіотичних культур виду L. plantarum / Н.К. Коваленко, Т.М. Лясковський, О.В. Кравцова, Т.А. Скорченко // Молочна промисловість. - 2004. - №4. - С. 35-36

5.PAT 2369777 Великобритания МПК7 А 61 К 35/ 74, А 61 Р 31 / 04. А Lactobacillus plantarum bacterium for use in food products and combined preparations which inhibit the growth of food poisoning bacteria / St. Ivel Ltd, Griggs Cristopher William, Fooka Laura Janine, Gibson Glenn Robinson. - № 99110289 /13; заявлено 05.10.2000; опубл. 12.06.2002

6. Griffiths M.W. Some insight into the mechanism of inhibition of phychrotrophic bacterial growth in raw milk by lactic acid bacteria / M.W. Griffiths, I.M. Banks,

L McEntyre, A. Limond // J. Soc. Dairy Technol. - 1991. - №1. - P. 24-29

7. Банникова Л.А., Королева H.C., Ceменихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства: Справочник. - М.: Агропромиздат, 1987.-400 с.

8. Потемська О. Антагонютична активність як критерій вибору культур молочнокислих та біфідобактерій / О. Потемська, В. Ушакова, О. Рожанська,

Т. Кшель // Харчова i переробна промисловють. -2001. -№1. -С. 17-19

9.Капрельянц Л.В. Мультиштаммовая композиция молочнокислых бактерий для пробиотических продуктов питания/Л.В. Капрельянц, Я.Б. Паулина, Т.А. Величко, Е.А. Килименчук//HayKOBi пращ ОНАХТ - №23. - С. 97-100