

Е.М. Коровицкая¹, Н.Н. Фурик¹, к.т.н., Н.К. Жабанос¹, к.т.н.,
С.Л. Василенко², к.б.н.

¹Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КУЛЬТУР-АНТАГОНИСТОВ НА РАЗВИТИЕ ТЕХНИЧЕСКИ-ВРЕДНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И ПОСЛЕДУЮЩЕГО ХРАНЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

E. Korovatskaya, N. Furik, N. Zhabanos, S. Vasylenko
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

STUDY OF THE INFLUENCE OF ANTAGONIST CULTURES ON THE DEVELOPMENT OF TECHNICALLY HARMFUL MICROORGANISMS DURING THE PRODUCTION AND SUBSEQUENT STORAGE OF FERMENTED DAIRY PRODUCTS

e-mail: ekorovatskaya@mail.ru, furik_nn@tut.by, nzhabanos@tut.by, vasylenko@tut.by

В статье приведены результаты исследований по изучению влияния культур-антагонистов: лактобацилл и пропионовокислых бактерий, на развитие технически-вредных микроорганизмов в процессе изготовления и последующего хранения ферментированных молочных продуктов (сметаны и творога). Установлено, что исследованные штаммы молочнокислых и пропионовокислых бактерий проявляли антагонистические свойства к технически вредным микроорганизмам в молочном сырье в процессе изготовления и хранения сметаны и творога. Показано, что антагонистическая активность является штаммоспецифичной характеристикой, зависит от начальной дозы внесения культуры-антагониста и может проявляться на разных стадиях технологического процесса.

Ключевые слова: антагонистическая активность; защитные культуры; молочнокислые микроорганизмы; лактобациллы; пропионовокислые бактерии; *Lactococcus cremoris*; сметана; творог; технически-вредные микроорганизмы; *E. coli*; *Candida albicans*; *Fusarium oxysporum*; *Aspergillus niger*.

In the article there are the results of studies of the antagonistic cultures: lactobacilli and propionic acid bacteria. We studied the their influence on the development of technically harmful microorganisms during the production and subsequent storage of fermented dairy products (sour cream and cottage cheese). It was established that the investigated lactic acid bacteria and propionic acid bacteria strains had exhibited antagonistic activity to technically harmful microorganisms in dairy raw materials, during the production and storage of sour cream and cottage cheese. It has been shown that antagonistic activity is a strain-specific characteristic and depends on the antagonist culture inoculation dose and can manifest itself at different stages of the technological process.

Key words: antagonistic activity; protective cultures; lactic acid microorganisms; lactobacilli; propionic acid bacteria; *Lactococcus cremoris*; sour-cream; cottage cheese; technically harmful microorganisms; *E. coli*; *Candida albicans*; *Fusarium oxysporum*; *Aspergillus niger*.

Введение. Молочнокислые бактерии синтезируют разнообразные биологически активные вещества: органические кислоты, этанол, углекислоту, ферменты, вещества с антибиотической активностью [1–4], что позволяет им проявлять выраженный антагонизм в отношении различных микроорганизмов, в том числе и патогенных. Такие штаммы можно использовать при изготовлении ферментированных молочных продуктов в качестве защитных культур. Защитные культуры представляют собой альтернативные биологические средства защиты кисломолочных продуктов и сыров от развития нежелательной микрофлоры [5]. Таким образом, цель исследования – оценка влияния культур-антагонистов на развитие

технически-вредных микроорганизмов в процессе изготовления и последующего хранения ферментированных молочных продуктов (сметаны и творога).

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись культуры молочнокислых и пропионовокислых бактерий из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и бактериофагов с подтвержденной антагонистической активностью к технически-вредным микроорганизмам [6, 7]: *Lactococcus lactis subsp. lactis* 487 М-А, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 2717 М-А, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* 2187 М-А, *Lactobacillus fermentum* 2650 ТЛ-О, *Lactobacillus gasseri* 2648 ТЛ-О, *Lactobacillus sakei* 2800 МЛ-О, *Lactobacillus plantarum* 2645 МЛ-О, *Lactobacillus helveticus* 1191 ТЛ-АФ, *Propionibacterium freudenreichii* 2017 МНО-К, сухие закваски лактококков для сметаны СМ-Мв и творога ТВ-М, закваска сухая концентрированная поливидовая «Оптим протект-5» (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Propionibacterium freudenreichii*).

В исследованиях использованы культуры технически-вредных микроорганизмов (дрожжи *Candida albicans*, кишечная палочка *E. coli* Y5-3R16, плесневые грибы *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus niger*).

В лабораторных условиях изготовлены образцы сметаны и творога с добавлением культур, обладающих антагонистической активностью. Контаминация сырья технически-вредными микроорганизмами составляла $1 \cdot 10^2$ КОЕ/см³.

Микробиологический контроль полученных образцов сметаны на содержание технически-вредных микроорганизмов проводили на стадиях: 1 – образование сгустка (через 10 ч культивирования при 30°C), 2 – готовый продукт (через 20 ч хранения при $4 \pm 2^\circ\text{C}$), 3 – через 7 суток хранения при $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Микробиологический контроль содержания технически-вредных микроорганизмов в образцах творога проводили на трех стадиях: 1 – после образования сгустка; 2 – после обработки сгустка (45°C, 1 ч) и отделения сыворотки (готовый творог), 3 – через 7 суток хранения готового творога при $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Количество технически-вредных тест-культур определяли чашечным методом путем высева из соответствующих разведений на селективные среды.

Закваски сухие концентрированные лактококков для сметаны и для творога вносили в сырье в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований влияния культур, обладающих антагонистической активностью, на содержание дрожжей *Candida albicans*, кишечной палочки *E. coli* Y5-3R16 и плесневого гриба *Fusarium oxysporum* в образцах сметаны представлены на рисунках 1, 2 и 3 соответственно.

В образце сметаны, содержащем *Propionibacterium freudenreichii* 2017 МНО-К, количество дрожжей после образования сгустка составило $2,9 \cdot 10^2$ КОЕ/г (в 4,8 раз меньше, чем в контрольном образце) и продолжило снижаться в готовом продукте до $2,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г (в 3,1 раза меньше чем в контрольном образце). Через 7 суток хранения, несмотря на зафиксированное увеличение содержания дрожжей до $6,5 \cdot 10^4$ КОЕ/г, их количество определено в 6,6 раз меньше, чем в контрольном образце.

В образцах, содержащих культуры *Lactobacillus sakei* 2800 МЛ-О и *Lactobacillus fermentum* 2650 ТЛ-О выявлено дрожжей в 4 раза меньше, чем в контрольном образце после ферментации сливок, в 10,5 и 3,4 раза, соответственно, при получении готового продукта, в 3,1 и 3,6 раза после 7 суток хранения готового продукта (рисунок 1).

Исследования штамма *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 2717 М-А в качестве культуры-антагониста показали его высокую антагонистическую активность. Добавление этой культуры в количестве $5 \cdot 10^5$ КОЕ/см³ достоверно снижало количество клеток *Candida albicans*: в 46,7, 62,0 и 107,5 раз по сравнению с контрольным образцом на всех стадиях эксперимента. Внесение меньших дозировок

данного лактококка ($1 \cdot 10^5$ КОЕ/см³ или $5 \cdot 10^4$ КОЕ/см³) оказались менее эффективны по отношению к *Candida albicans* (рисунок 1).

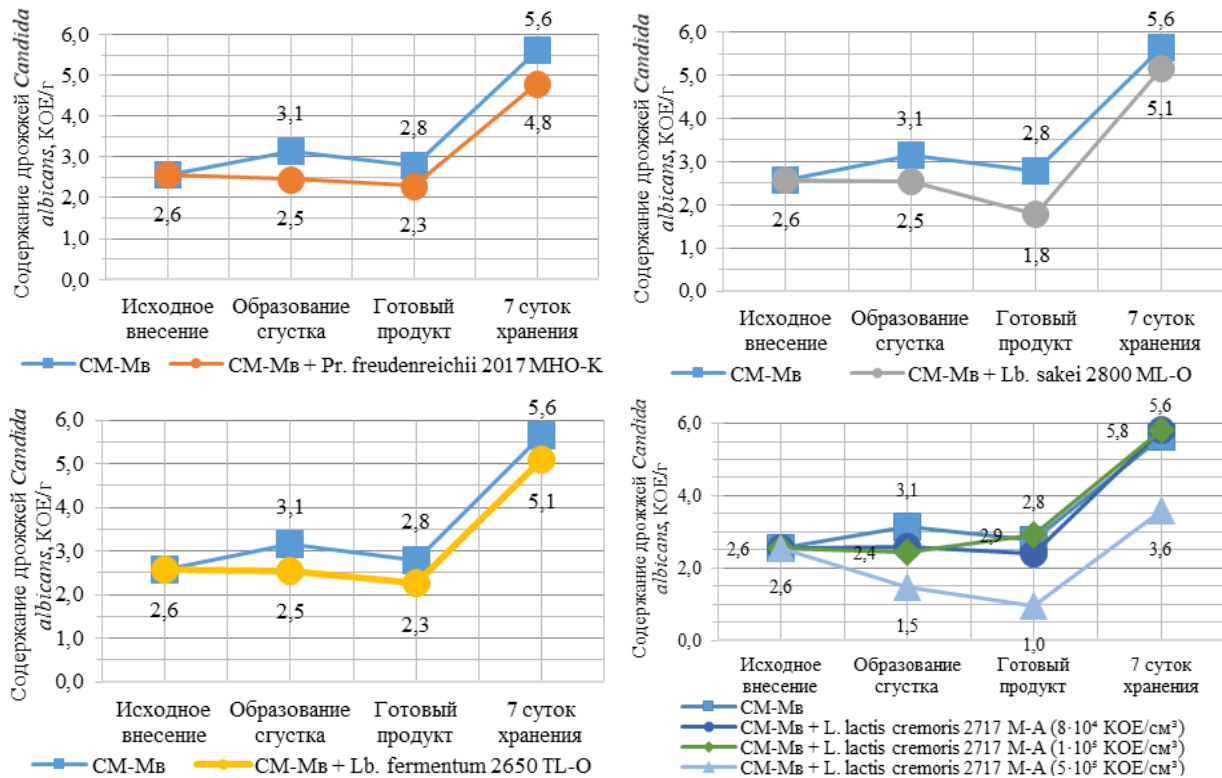


Рисунок 1 – Содержание дрожжей *Candida albicans* в образцах сметаны с добавлением культур-антагонистов
Источник данных: собственная разработка.

При изучении влияния культур-антагонистов на развитие в сметане кишечной палочки установлено, что в образцах, содержащих культуры *Lactococcus lactis subsp. lactis* 487 M-A, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* 2187 M-A, *Lactobacillus fermentum* 2650 TL-O, *Lactobacillus gasseri* 2648 TL-O, *Lactobacillus sakei* 2800 ML-O в соответствии с пороговой чувствительностью метода определения *E. coli* содержание кишечной палочки снизилось до менее 10 КОЕ/г и оставалось таковым на всех исследованных стадиях технологического процесса производства и хранения сметаны (рисунок 2).

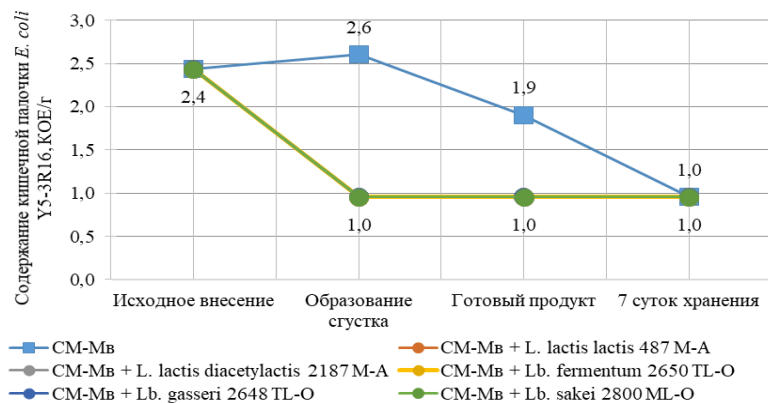


Рисунок 2 – Содержание кишечной палочки *E. coli* Y5-3R16 в образцах сметаны с добавлением культур-антагонистов
Источник данных: собственная разработка.

В контрольном варианте, ферментированном только закваской лактококков также отмечено подавление развития кишечной палочки, однако снижение количества колониеобразующих единиц *E. coli* имело иной характер. При исследованиях контрольного образца регистрировали незначительное увеличение количества клеток *E. coli* Y5-3R16 в течение 10 ч сквашивания, с последующим отмиранием в процессе хранения в течение 7 суток до менее 10 КОЕ/г (рисунок 2).

При исследованиях образцов с внесением в качестве культуры-антагониста закваски сухой концентрированной поливидовой «Оптима протект - 5» отмечено снижение содержания плесневых грибов до $6,0 \cdot 10^1$ КОЕ/г (рисунок 3) после образования сгустка. Однако после хранения количество *Fusarium oxysporum* имело тенденцию к увеличению и составило $6,5 \cdot 10^1$ КОЕ/г (в готовом продукте) и $2,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г (через 7 суток хранения) что в 1,8 и 12,5 раз меньше по сравнению с выявленным в контрольном образце.

В образце сметаны с добавлением культуры *Propionobacterium freudenreichii* 2017 МНО-К (в количестве $1 \cdot 10^5$ КОЕ/см³) количество плесневых грибов снижалось до $9,5 \cdot 10^1$ КОЕ/г (на стадии образования сгустка) и $1,0 \cdot 10^1$ КОЕ/г (в готовом продукте) и незначительно увеличилось (рисунок 3) после хранения в течении 7 суток (до $1,8 \cdot 10^1$ КОЕ/г, что в 138,9 раз меньше, чем в контрольном образце).

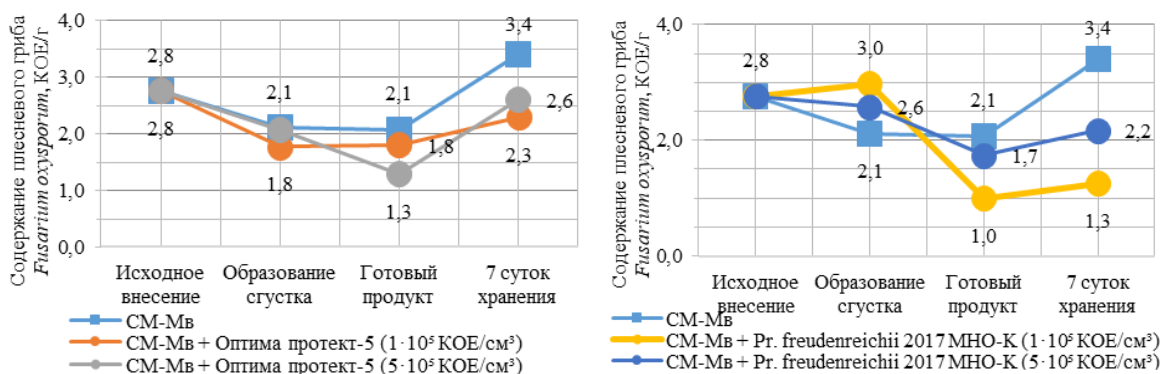


Рисунок 3 – Содержание плесени *Fusarium oxysporum* в образцах сметаны с добавлением культур-антагонистов
Источник данных: собственная разработка.

Для оценки влияния культур – антагонистов на развитие технически-вредной микрофлоры использовали результаты, полученные на основных стадиях технологического процесса его производства: получение сгустка, после обработки сгустка и отделения сыворотки, а также после хранения готового продукта в течение 7 суток в условиях холодильника. Результаты микробиологических исследований на содержание технически-вредных микроорганизмов в экспериментальных образцах при получении творога представлены на рисунках 4, 5, 6.

Установлено, что на разных стадиях моделирования процесса производства и хранения творога в лабораторных условиях при использовании в качестве культур-антагонистов штаммов *Lactobacillus sakei* 2800 ML-O и *Lactobacillus plantarum* 2645 ML-O содержание кишечной палочки снизилось до менее 10 КОЕ/г и оставалось таковым на всех исследованных стадиях и не отличалось от контрольного образца (рисунок 4).

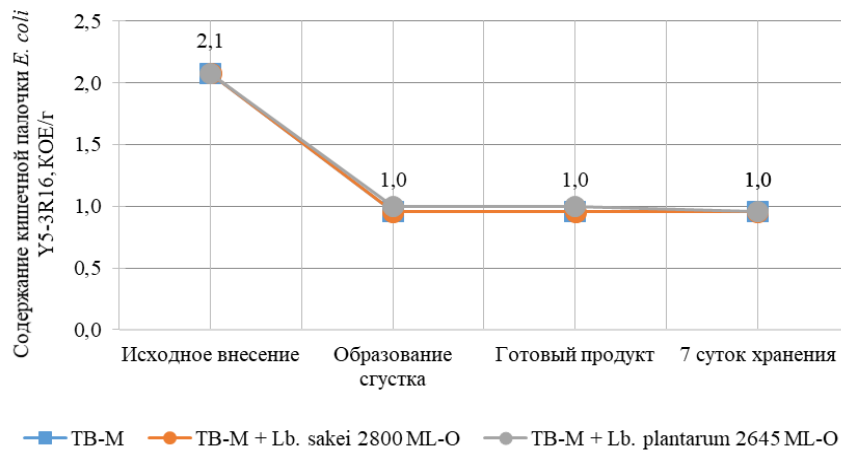


Рисунок 4 – Содержание кишечной палочки *E. coli* Y5-3R16 в экспериментальных образцах творога с добавлением культур-антагонистов
Источник данных: собственная разработка.

Изучение изменения количества дрожжей *Candida albicans* при моделировании процесса производства и хранения творога при использовании культур-антагонистов, показало, что в исследованных образцах с добавлением штаммов *Lactobacillus fermentum* 2650 TL-O и *Lactobacillus sakei* 2800 ML-O количество клеток дрожжей снизилось до менее $0,8 \cdot 10^1$ КОЕ/г и $1 \cdot 10^1$ КОЕ/г на стадии образования сгустка и оставалось таковым после обработки сгустка и получения готового продукта, однако на стадии хранения продукта в течении 7 суток наблюдали тенденцию к увеличению до $7,6 \cdot 10^3$ КОЕ/г и $2,7 \cdot 10^3$ КОЕ/г, что в 16 и 4 раза меньше чем в контрольном образце (рисунок 5).

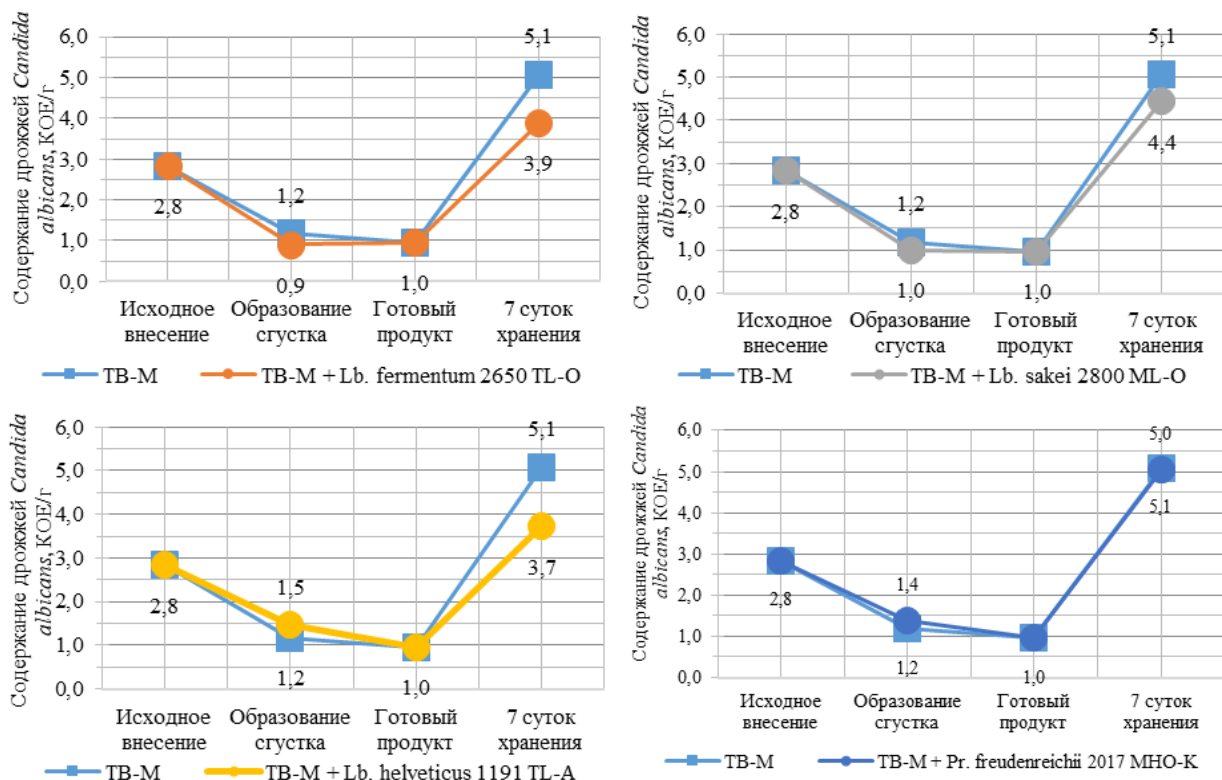


Рисунок 5 – Содержание дрожжей *Candida albicans* в экспериментальных образцах творога с добавлением культур-антагонистов
Источник данных: собственная разработка.

Изучение влияния культуры *Lactobacillus helveticus* 1191 TL-AF на разных стадиях технологического процесса показало, что на стадии образования сгустка количество дрожжей составляло $2,9 \cdot 10^1$ КОЕ/г (в 1,9 раза больше чем в контрольном образце), в готовом продукте – снизилось до менее 10 КОЕ/г. После 7 суток хранения отмечен рост количества дрожжей в данном образце до $5,2 \cdot 10^3$ КОЕ/г, что в 23 раза меньше чем в контрольном образце (рисунок 5).

При изучении влияния на развитие дрожжей культуры *Propionobacterium freudenreichii* 2017 МНО-К в исследованных образцах выявлено незначительное отклонение содержания дрожжей от такового в контрольном образце на всех исследованных стадиях (рисунок 5).

Оценка влияния культур-антагонистов на *Aspergillus niger* в процессе изготовления творога показала, что в образцах, содержащих *Lactobacillus plantarum* 1190 ML-AF и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2717 М-А количество плесневых грибов снизилось до $4,4 \cdot 10^1$ КОЕ/г и $7,2 \cdot 10^1$ КОЕ/г (рисунок 6) на стадии образования сгустка и продолжило снижаться до 10 КОЕ/г на последующих стадиях при моделировании технологического процесса изготовления и хранения творога.

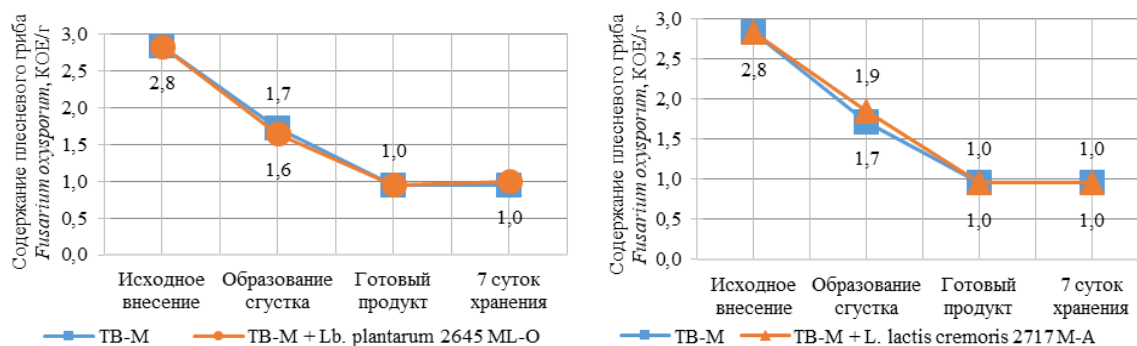


Рисунок 6 – Содержание плесневого гриба *Aspergillus niger* в экспериментальных образцах творога с добавлением культур-антагонистов
Источник данных: собственная разработка.

Заключение. В результате проведенного исследования установлено, что штаммы молочнокислых и пропионовокислых бактерий: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 487 М-А, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2717 М-А, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 2187 М-А, *Lactobacillus fermentum* 2650 TL-O, *Lactobacillus gasseri* 2648 TL-O, *Lactobacillus sakei* 2800 ML-O, *Lactobacillus plantarum* 2645 ML-O, *Lactobacillus helveticus* 1191 TL-AF, *Propionobacterium freudenreichii* 2017 МНО-К проявляют свои антагонистические свойства к технически вредным микроорганизмам и в различной степени подавляют их развитие в молочном сырье в условиях, приближенных к этапам технологических процессов изготовления и хранения сметаны и творога. Антагонистическая активность заквасочных культур является штаммоспецифичной характеристикой, а также зависит от начальной дозы внесения культуры-антагониста и может проявляться на разных стадиях технологического процесса.

Список использованных источников:

1. Семенов А. В. Антагонизм как результат межмикробных отношений / А. В. Семёнов // Бюллетень научного центра УрО РАН, 2013. – С. 8.
1. Semenov A. V. Antagonizm kak rezul'tat mezhmikrobnyh odnoshenij [Antagonism as a result of intermicrobial relationships] / A. V. Semjonov // B'ulleten' nauchnogo centra UrO RAN, 2013. – S. 8.

2. Чернышов А. Ю. Антагонистическое действие пробиотических лактобактерий в отношении патогенных стрептококков различных серологических групп / А. Ю. Чернышов // Автореф. канд. мед. наук. – СПб, 2008. – 19 с.
2. Chernyshov A. Ju. Antagonisticheskoe dejstvie probioticheskikh laktobakterijj v otnoshenii patogennyh streptokokkov razlichnyh serologicheskikh grupp [Antagonistic effect of probiotic lactobacilli against pathogenic streptococci of various serological groups] / A. Ju. Chernyshov // Avtoref. kand. med. nauk. – SPb, 2008. – 19 s.
3. Ганина В. И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии / В. И. Ганина. – М. : МГУПБ, 2001. – 169 с.
3. Ganina V. I. Probiotiki. Naznachenie, svojstva i osnovy biotehnologii [Purpose, properties and basics of biotechnology] / V. I. Ganina. – M. : MGUPB, 2001. – 169 s.
4. Ускова М. А. Изучение свойств пробиотических молочнокислых бактерий как биологически активных компонентов пищи / М. А. Ускова // Автореф. канд. биол. наук. – М, 2010. – 18 с.
4. Uskova M. A. Izuchenie svojstv probioticheskikh molochnokislyh bakterij kak biologicheski aktivnyh komponentov pishhi [Studying the properties of probiotic lactic acid bacteria as biologically active food components] / M. A. Uskova // Avtoref. kand. biol. nauk. – M, 2010. – 18 s.
5. Белкова М. Д. Повелитель времени – принцип, по которому работают защитные культуры AiBi® / М. Д. Белкова // Молочная промышленность. – 2015. – № 6. – С. 34-35.
5. Belkova M. D. Povelitel' vremeni – princip, po kotoromu rabotajut zashhitnye kul'tury [Lord of Time - the principle by which protective crops work] AiBi® / M. D. Belkova // Molochnaja promyshlennost'. – 2015. – № 6. – S. 34-35.
6. Володько М. М. Отбор культур рода Lactobacillus из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий для использования в производстве мясных изделий / Володько М. М., Марченко Н. М., Фурик Н. Н., Савельева Т. А., Жабанос Н. К. / Инновационные технологии в пищевой промышленности: материалы XIII Международной научн.-практ. конф., Минск, 1–2 октября 2014 г. / РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»; редкол.: В. Г. Гусаков [и др.] – Минск : ИВЦ Минфина, 2014. – С. 42-44
6. Volod'ko M. M. Otbor kul'tur roda Lactobacillus iz Centralizovannoj otraslevoj kollekcii promyshlennyh shtammov molochnokislyh bakterij dlja ispol'zovanija v proizvodstve mjasnyh izdelij [Selection of cultures of the genus Lactobacillus from the Centralized Industry Collection of Industrial Strains of Lactic Acid Bacteria for use in the production of meat products] / Volod'ko M. M., Marchenko N. M., Furik N. N., Savel'eva T. A., Zhabanos N. K. / Innovacionnye tehnologii v pishhevoj promyshlennosti: materialy XIII Mezhdunarodnoj nauchn.-prakt. konf., Minsk, 1–2 oktjabrja 2014 g. / RUP «Nauchno-prakticheskij centr Nacional'noj akademii nauk Belarusi po prodovol'stviju»; redkol.: V. G. Gusakov [i dr.] – Minsk : IVC Minfina, 2014. – S. 42-44
7. Шолох О. А. Поливидовые бактериальные закваски для хлебобулочных изделий / Шолох О. А., Фурик Н. Н., Жабанос Н. К. Техника и технология пищевых производств : тез. докл. X Международной научн.-техн. конференции, 23–24 апреля 2015 г., Могилев / УО «Могилевский государственный университет продовольствия»; редкол.: А. В. Акулич (отв. ред.) [и др.]. – Могилев : МГУП, 2015. – С. 110.
7. Sholoh O. A. Polividovye bakterial'nye zakvaski dlja hlebobulochnyh izdelij [Polyspecies bacterial starter cultures for bakery products] / Sholoh O. A., Furik N. N., Zhabanos N. K. Tehnika i tehnologija pishhevyh proizvodstv : tez. dokl. X Mezhdunarodnoj nauchn.-tehn. konferencii, 23–24 aprelja 2015 g., Mogilev / UO «Mogilevskij gosudarstvennyj universitet prodovol'stvija»; redkol.: A. V. Akulich (otv. red.) [i dr.]. – Mogilev : MGUP, 2015. – S. 110.