

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ ЗАКВАСОК ДЛЯ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Т.Л. Шуляк, Н.Ф. Коротченко, А.В. Веренич

Исследована протеолитическая активность и устойчивость к антибиотикам различных заквасок и бакконцентратов для ферментированных молочных продуктов. Установлено, что наибольшей протеолитической активностью обладают закваски болгарской и ацидофильной палочек. Достаточно высокую протеолитическую активность имеют кефирные закваски. Наиболее устойчивыми к антибиотикам (пенициллину, стрептомицину, хлорамфениколу) в молоке являются кефирная производственная закваска и закваска ацидофильной палочки (вязкий штамм). Отобраны закваски с наибольшей протеолитической активностью и устойчивостью к антибиотикам для создания функциональных продуктов противоаллергической направленности.

Введение

Одним из прогрессирующих в последние годы заболеваний, связанных с питанием, является пищевая аллергия, то есть непереносимость некоторых пищевых веществ, обусловленная специфическим влиянием их на иммунную систему организма человека [1].

Часто причиной аллергических реакций является коровье молоко. Его аллергенные свойства во многом определяются особенностями белкового состава. В белках коровьего молока преобладают казеины, оказывающие наибольшее аллергизирующее действие. В отличие от молока кисломолочные (ферментированные) продукты обладают антибактериальными свойствами и нормализуют микрофлору кишечника, которая нарушается при пищевой аллергии. Наличие в них молочной кислоты способствует лучшему усвоению кальция, снижающего аллергическую «настроенность» организма. Кроме того, в ферментированных молочных продуктах под действием микроорганизмов заквасок происходит протеолиз казеина с образованием низкомолекулярных азотистых веществ, что уменьшает его аллергенные свойства [2]. Поэтому для создания молочных продуктов функционального назначения противоаллергической направленности целесообразно использовать заквасочные культуры с наибольшей протеолитической активностью.

Одним из основных требований, предъявляемых к заквасочным культурам в молочной промышленности, является их устойчивость к антибиотикам. При наличии антибиотиков в молоке подавляется развитие микроорганизмов заквасок, что отрицательно сказывается на консистенции и вкусе ферментированных молочных продуктов [3]. Условием получения продуктов высокого качества являются активные закваски, устойчивые к остаточным количествам антибиотиков в молоке. Кроме того, использование устойчивых к антибиотикам микроорганизмов заквасок способствует приживаемости их в кишечнике и нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта, что особенно важно при пищевой аллергии, дисбактериозе.

Цель работы – исследование протеолитической активности и устойчивости к антибиотикам различных заквасок и бакконцентратов для использования их в создании продуктов функционального назначения.

Материалы и методы исследований

Из литературных данных известно, что наилучшими протеолитическими свойствами характеризуются молочнокислые палочки и кефирная закваска [3], поэтому в работе исследовалась протеолитическая активность кефирных заквасок и заквасок, в состав которых входят молочнокислые палочки. Перечень и состав исследованных бактериальных заквасок и концентратов представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Закваски и бакконцентраты для производства кисломолочных продуктов

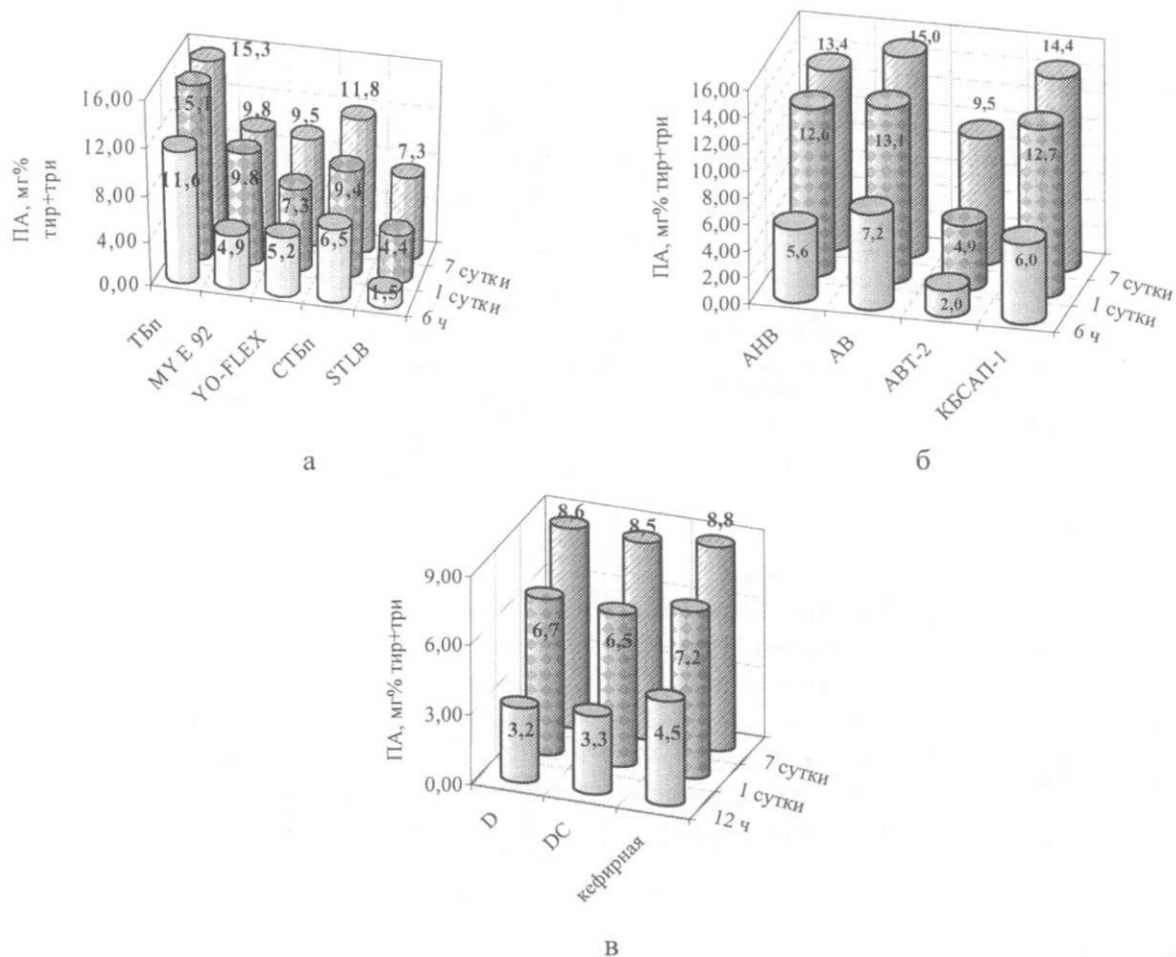
Наименование бактериальной закваски (БЗ) и бакконцентрата (БК)	Производитель	Буквенный код	Состав микрофлоры
БЗ болгарской палочки	БелНИКТИММП Республика Беларусь	ТпБ	<i>Lbc. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricum</i>
БЗ для йогурта прямого внесения	ESAL Франция	МУЕ92	<i>Lbc. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricum</i> , <i>Str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
БЗ для йогурта прямого внесения	CHR.HANSEN Дания	УО-Flex	То же
БЗ симбиотическая для йогурта	БелНИКТИММП Республика Беларусь	СТБп	То же
БЗ для йогурта прямого внесения	BEANTA Италия	STLB	То же
БЗ ацидофильной палочки	БелНИКТИММП Республика Беларусь	АНВ невяз. сгусток	<i>Lbc. acidophilus</i>
БЗ ацидофильной палочки	БелНИКТИММП Республика Беларусь	АВ вязкий сгусток	То же
БЗ для ацидофилина	CHR.HANSEN Дания	АВТ-2	То же, <i>str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
БК ацидофильной палочки	БелНИКТИММП Республика Беларусь	КБСАП-1	То же
БЗ для кефира	Производственная (Могилевский МК)	–	Мезофильные молочнокислые микроорганизмы, дрожжи, уксуснокислые бактерии
БЗ для кефира прямого внесения	BIOLACTA Польша	Kultura kefirova D	То же
БЗ для кефира прямого внесения	BIOLACTA Польша	Kultura kefirova DC	То же, <i>str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>

Протеолитическую активность (ПА) бактериальных заквасок и концентратов определяли по модифицированному методу Гула и выражали в мг% тирозина и триптофана (тир+три) в составе продуктов протеолиза, не осаждаемых 10%-й трихлоруксусной кислотой [4].

Результаты исследований и их обсуждение

Закваски и бакконцентраты засевали в стерилизованное обезжиренное молоко в количестве 3% и культивировали при оптимальных температурных режимах: 41 ± 1 °С - для болгарской палочки и симбиотических заквасок болгарской палочки и термофильного стрептококка, 38 ± 1 °С - для ацидофильной палочки, 23 ± 1 °С - для кефирных заквасок. ПА заквасок и бакконцентратов термофильных молочнокислых бактерий определяли через 6 ч, 1 и 7 суток культивирования, кефирных заквасок – через 12 ч, 1, 7 суток.

Результаты исследования представлены на рисунке 1.



а – закваски болгарской палочки и для йогурта; б – закваски и бакконцентрат ацидофильной палочки; в – кефирные закваски

Рисунок 1 - Протеолитическая активность заквасок в процессе культивирования при оптимальных температурах

Из рисунка 1 видно, что наибольшей ПА обладают закваски болгарской палочки и ацидофильной палочки. Максимальную ПА проявляет болгарская палочка на протяжении всего периода культивирования. Из заквасок ацидофильной палочки наибольшую ПА имеют закваски производства Белорусского научно-исследовательского и конструкторско-технологического института мясной и молочной промышленности (БелНИКТИММП) (13,4-14,9 мг% тир+три через 7 суток культивирования), а наименьшую – закваска фирмы Esal. Исследованные кефирные закваски по ПА мало отличаются между собой. Их ПА через 7 суток составляет 8,5-8,8 мг% тир+три.

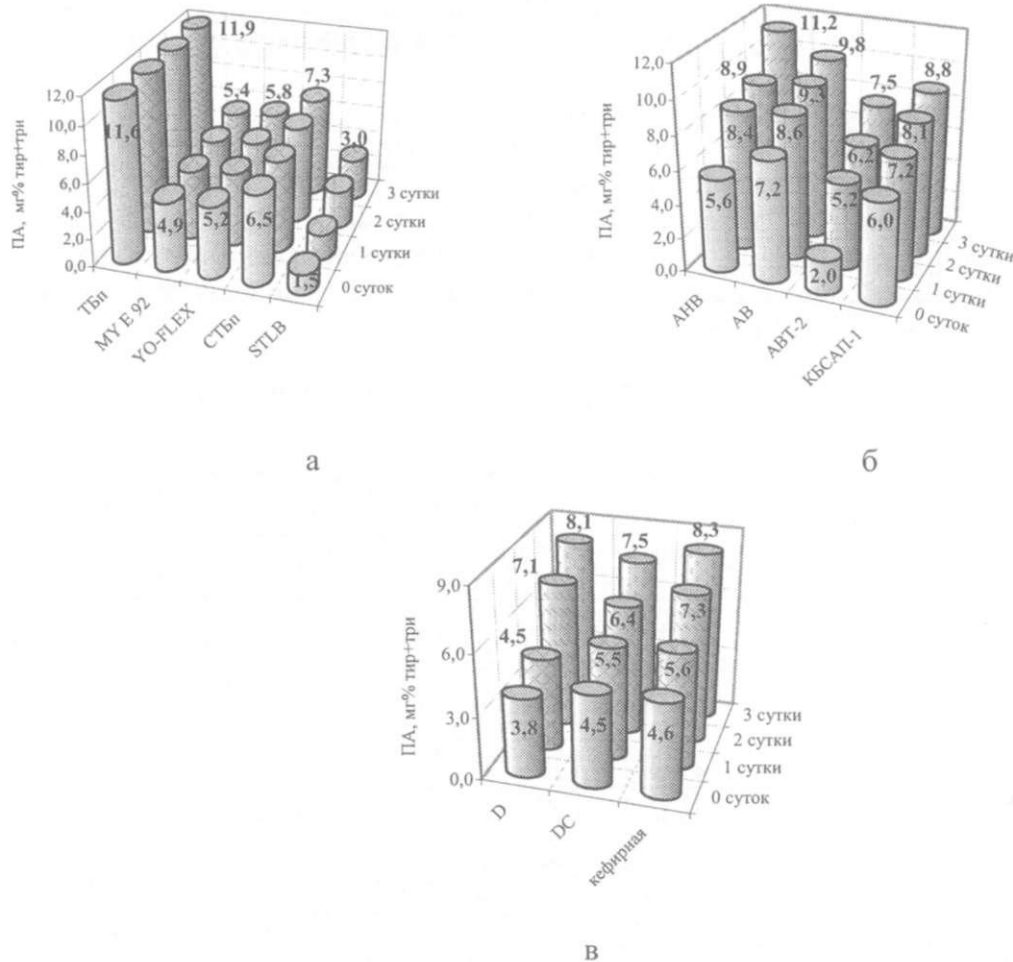
Среди симбиотических заквасок болгарской палочки и термофильного стрептококка наибольшую ПА имеет закваска производства БелНИКТИММП. Наименьшая ПА наблюдается у закваски прямого внесения для йогурта фирмы BEANTA (Италия).

Неодинаково происходит протеолиз при культивировании заквасок во времени. Так, например, для болгарской палочки наблюдается высокая ПА уже через 6 ч (11,6 мг% тир+три), которая в дальнейшем нарастает незначительно и к 7 суткам культивирования составляет 15,3 мг% тир+три. В то же время для заквасок ацидофильной палочки ПА через 6ч составляет всего 5-7 мг% тир+три, а к 7 суткам значительно возрастает до 12-13 мг% тир+три. Характер изменения ПА во времени для кефирных заквасок аналогичен закваскам ацидофильной палочки.

Культивирование заквасок термофильных молочнокислых бактерий при оптимальных температурах в течение 6 ч, а кефирных заквасок – в течение 24 ч (причем первые 12 ч – при

температуре 23 ± 1 °С, а последующие 12 ч – при температуре 14 ± 2 °С), соответствует продолжительности процесса получения готовых продуктов с их использованием. Поэтому через 6 ч и 24 ч соответственно культуральные среды помещали в холодильник и выдерживали при температуре 4 ± 2 °С, моделируя процесс хранения готовых продуктов. Определяли ПА заквасок через 1,2,3 суток хранения культуральных сред.

Результаты исследования представлены на рисунке 2.



а – закваски болгарской палочки и для йогурта; б – закваски и бакконцентрат ацидофильной палочки; в – кефирные закваски

Рисунок 2 - Протеолитическая активность заквасок в процессе хранения культуральных сред при температуре 4 ± 2 °С

Из рисунка 2 видно, что в процессе хранения культуральных сред в течение трех суток при температуре 4 ± 2 °С ПА закваски болгарской палочки и симбиотических заквасок незначительно увеличивается на 0,2-1,5 мг% тир+три. В то же время для заквасок ацидофильной палочки и кефирных заквасок наблюдается существенное увеличение ПА, что свидетельствует об активном развитии заквасочной микрофлоры даже при низких температурах.

В работе исследовалось влияние пенициллина, стрептомицина, хлорамфеникола на развитие исследуемых заквасок и бакконцентратов.

Устойчивость заквасок к антибиотикам определяли на восстановленном стерилизованном обезжиренном молоке. Перед работой обезжиренное молоко было проверено на отсутствие ингибирующих веществ. Растворы антибиотиков готовили на стерильной дистиллированной воде и добавляли в молоко в различных концентрациях перед заквашиванием. Контролем служила культуральная среда, не содержащая антибиотик. Образцы инкубировали в термостате при оптимальных температурах. Через 3, 6 и 18 ч

определяли титруемую кислотность опытных и контрольных образцов. Об устойчивости заквасок к антибиотикам судили по проценту прироста Π титруемой кислотности культуральных сред в опытных образцах по сравнению с контролем, который определяли по формуле

$$\Pi = \frac{T_0 - T_M}{T_K - T_M} 100, \quad (1)$$

где T_0 - титруемая кислотность культуральной среды с антибиотиком (опытный образец), °Т;

T_M - титруемая кислотность исходного молока, °Т;

T_K - титруемая кислотность культуральной среды без антибиотика (контроль), °Т.

Исследовали влияние антибиотиков на развитие микроорганизмов заквасок в следующих концентрациях: для пенициллина – 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 ед/мл; для стрептомицина – 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 30,0; 50,0 ед/мл; для хлорамфеникола – 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 мкг/мл. В таблице 2 представлены данные по устойчивости к антибиотикам заквасок для йогурта и болгарской палочки.

Таблица 2 – Влияние антибиотиков на кислотообразующую активность заквасок для йогурта и болгарской палочки

Концентрация антибиотика, ед (мкг) / мл	БЗ болгарской палочки (Беларусь)			БЗ для йогурта (Франция)			БЗ для йогурта (Дания)			БЗ для йогурта (Беларусь)			БЗ для йогурта (Италия)		
	Продолжительность культивирования, ч														
	3	6	18	3	6	18	3	6	18	3	6	18	3	6	18
Пенициллин															
0,01	98*	91	95	100	75	82	86	100	79	100	100	93	88	82	92
0,05	90	89	85	56	36	50	74	72	74	67	23	49	72	79	85
0,1	54	46	43	33	24	47	57	78	65	43	16	63	24	18	78
0,2	28	32	25	23	14	50	20	17	60	40	16	55	24	18	45
0,3	18	28	23	23	11	47	20	17	51	38	12	39	18	12	41
0,5	8	10	19	16	11	43	20	17	40	38	12	18	12	10	39
Стрептомицин															
0,5	85	89	92	96	93	94	96	97	98	64	76	73	93	97	99
1,0	81	70	96	88	87	91	96	96	97	52	55	53	87	91	94
5,0	75	71	78	81	84	82	92	80	96	44	40	48	77	82	71
10,0	68	61	72	81	82	76	85	80	92	24	34	40	70	70	61
30,0	59	49	68	69	31	58	24	51	85	4	4	32	20	10	33
50,0	61	47	67	69	29	57	21	48	83	4	4	31	7	4	30
Хлорамфеникол															
0,01	96	95	89	100	100	94	93	98	98	100	95	100	88	96	97
0,05	91	93	89	100	98	94	86	93	89	93	95	100	62	96	96
0,1	83	81	89	80	78	80	86	93	79	86	95	100	38	96	85
0,5	74	70	82	80	77	68	84	75	79	86	95	94	8	80	85
1,0	74	54	80	51	53	76	35	48	77	86	90	94	0	36	84
5,0	61	33	18	0	0	39	0	14	40	57	62	56	0	0	49
10,0	39	16	13	0	0	0	0	5	9	50	38	28	0	0	0

* Процент прироста титруемой кислотности от контроля

При исследовании влияния антибиотиков на болгарскую палочку и симбиотические закваски болгарской палочки и термофильного стрептококка установлено, что все исследованные закваски устойчивы к концентрации пенициллина в молоке 0,01 ед/мл, стрептомицина – 0,5 ед/мл, хлорамфеникола – 0,01 мкг/мл. Наибольшей устойчивостью к пенициллину в молоке отличались закваска болгарской палочки (БелНИКТИММП) и закваски для йогурта производства Дании и Италии. Эти закваски устойчивы к концентрации пенициллина в молоке 0,05 ед/мл. Наиболее устойчивыми к стрептомицину в молоке являются симбиотические закваски производства Дании и Франции. Они устойчивы к

концентрации стрептомицина в молоке 10,0 ед/мл. Наиболее чувствительной к стрептомицину оказалась симбиотическая закваска термофильного стрептококка и болгарской палочки производства БелНИКТИММП. Разную чувствительность проявляют исследованные закваски и к наличию в молоке хлорамфеникола. Наибольшей устойчивостью к хлорамфениколу отличается симбиотическая закваска производства БелНИКТИММП, которая устойчива к концентрации хлорамфеникола в молоке 1 мкг/мл.

На втором этапе исследовалась устойчивость к антибиотикам заквасок для кефира и ацидофильных продуктов. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние антибиотиков на кислотообразующую активность заквасок ацидофильной палочки и кефирных заквасок

Концентрация антибиотика, ед (мкг) / мл	БЗ ацидофильной палочки (АНВ, Беларусь)			БЗ ацидофильной палочки (АВ, Беларусь)			БК ацидофильной палочки (Беларусь)			БЗ для ацидофилина (Дания)			БЗ для кефира (Беларусь)		БЗ для кефира (D, Польша)		БЗ для кефира (DC, Польша)	
	Продолжительность культивирования, ч																	
	3	6	18	3	6	18	3	6	18	3	6	18	6	18	6	18	6	18
Пенициллин																		
0,01	100*	89	93	90	95	98	86	100	97	88	100	100	97	100	91	95	92	89
0,05	89	70	68	77	92	95	86	69	59	24	54	88	95	100	86	90	86	83
0,1	47	52	52	43	84	88	86	62	57	24	47	78	94	100	75	83	62	68
0,2	21	23	52	40	46	43	71	62	45	18	38	75	65	87	54	64	44	58
0,3	21	18	49	33	29	34	67	53	45	18	29	73	62	61	45	56	27	52
0,5	21	13	45	30	24	24	54	51	45	18	24	70	56	57	29	39	15	47
Стрептомицин																		
0,5	90	93	99	100	98	99	83	87	97	95	94	91	82	96	91	99	100	100
1,0	86	93	92	100	80	91	83	85	83	86	94	85	79	90	74	94	97	100
5,0	43	69	36	69	79	88	33	64	56	48	81	38	74	36	69	44	97	91
10,0	29	38	31	28	69	82	13	41	53	5	42	42	67	21	67	35	97	89
30,0	14	21	6	14	52	76	0	15	26	0	19	53	67	19	67	20	5	89
50,0	10	17	4	5	6	12	0	15	17	0	13	53	67	19	67	20	3	83
Хлорамфеникол																		
0,01	100	86	97	89	95	99	100	100	99	100	100	87	100	98	100	96	95	96
0,05	76	86	94	85	95	98	100	100	97	100	100	87	100	91	100	94	95	89
0,1	76	84	89	81	95	98	100	100	96	100	100	85	100	89	100	94	95	88
0,5	66	84	86	77	95	93	100	80	92	99	100	77	74	87	78	89	64	88
1,0	48	34	63	77	77	91	0	60	77	73	88	77	62	79	22	77	32	82
5,0	28	11	15	57	45	30	0	60	22	14	21	48	24	16	0	8	5	18
10,0	28	8	11	48	32	15	0	60	5	12	14	26	24	13	0	3	4	9

* Процент прироста титруемой кислотности от контроля

Установлено, что все исследованные закваски устойчивы к концентрации пенициллина в молоке 0,01 ед/мл, стрептомицина – 0,5 ед/мл, хлорамфеникола – 0,1 мкг/мл. Из заквасок для ацидофильных продуктов наиболее устойчива к пенициллину закваска ацидофильной палочки, образующей вязкий сгусток (БелНИКТИММП). Существенных различий в чувствительности исследованных заквасок к стрептомицину не наблюдалось. К хлорамфениколу наибольшую устойчивость показали закваска для ацидофилина производства Дании, а также закваска ацидофильной палочки (АВ) и бакконцентрат ацидофильной палочки производства Республики Беларусь.

Среди кефирных заквасок наибольшей устойчивостью ко всем антибиотикам характеризуется производственная закваска. Она устойчива к концентрации пенициллина в молоке 0,1 ед/мл, стрептомицина – 1 ед/мл, хлорамфеникола – 0,5 мкг/мл. Закваски прямого внесения (D и DC) по сравнению с кефирной производственной закваской являются устойчивыми к стрептомицину, хлорамфениколу и более чувствительными – к пенициллину.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что чувствительность заквасок к

различным антибиотикам неодинакова и зависит от состава заквасочной микрофлоры, от вида антибиотика, присутствующего в молоке. Из изученных заквасок стабильную устойчивость ко всем вышеуказанным антибиотикам проявляет производственная кефирная закваска и закваска ацидофильной палочки, образующей вязкий сгусток.

Заключение

На основании полученных данных для создания ферментированных молочных продуктов противоаллергической направленности были отобраны закваска ацидофильной палочки (АВ) и производственная кефирная закваска, так как они имели высокую протеолитическую активность и наибольшую устойчивость к антибиотикам. Болгарская палочка, хотя и имеет наибольшую протеолитическую активность, но при сбраживании ею глюкозы образуется оптический изомер Д(-) - молочной кислоты, который очень медленно распадается в организме, а дети его вовсе не утилизируют. Поэтому использование болгарской палочки для создания функциональных продуктов нежелательно.

Литература

1. Скурихин, И.М. Все о пище с точки зрения химика / И.М. Скурихин, А.П. Нечаев – М.: Высшая школа, 1991. – 288с.
2. Детское питание / М.В. Чичко [и др.]; под общ. ред. М.В. Чичко – Минск: Современное слово, 2001. – 256с.
3. Горбатова, К.К. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов / К.К. Горбатова. – СПб.: ГИОРД, 2003, - 352с.
4. Залашко, М.В. Исследование протеолитической активности молочнокислых бактерий / М.В. Залашко, Образцова Н.В., Савченко Э.И. // Физиология и биохимия микроорганизмов: Сб. / Отдел микробиологии Акад. Наук БССР. – Минск: Наука и техника, 1970. – С. 121-128.

Поступила в редакцию 07.07.2006