

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

ФАБІЯНСЬКА ІРИНА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК [637.524:637.136.3]:66.022.3

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ПРЕПАРАТІВ ЛАКТОБАЦИЛ І ЇХ
ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ СИРОКОПЧЕНИХ КОВБАС**

Спеціальність 03.00.20 - біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса - 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Одеському національному університеті імені І.І. Мечникова Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник:

кандидат біологічних наук, доцент
Єлинська Наталія Олексіївна,
Одеський національний університет
імені І.І. Мечникова, доцент кафедри
мікробіології і вірусології

Офіційні опоненти:

доктор технічних наук, професор
Безусов Анатолій Тимофійович,
Одеська національна академія
харчових технологій, завідувач
кафедри технології консервування

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Коваленко Надія Костянтинівна,
провідний науковий співробітник
відділу фізіології промислових
мікроорганізмів Інституту
мікробіології і вірусології імені
Д.К. Заболотного НАН України

Захист відбудеться “30” травня 2008 р. о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.02 Одеської національної академії харчових технологій за адресою: вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Одеської національної академії харчових технологій за адресою: вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039

Автореферат розісланий “24” квітня 2008 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д.т.н., професор

Г.М. Станкевич

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним із важливих факторів, що визначає здоров'я населення, є правильне, раціональне і повноцінне харчування. На сьогоднішній день велика увага приділяється створенню новітніх технологій виробництва харчових продуктів, зокрема продуктів з пробіотичними властивостями, а також збільшенню об'ємів виробництва харчових виробів з підвищеною харчовою і біологічною цінністю, гарантованою безпекою і тривалим терміном придатності. Із широкого асортименту м'ясних продуктів наведені характеристики притаманні сирокоченим ковбасам [Петрова Е.В., 2005; Лисицын А. Б. и соавт., 2005; Гельдыш Т.Г., Храмченко С.В., Мещерякова Е.В., 2006; Rubio V. et al., 2007].

На сучасному етапі розвитку вітчизняної м'ясної промисловості, зокрема у виробництві ковбас, одним із важливих напрямків є науково-технічні проблеми, пов'язані із використанням принципово нових виробничих процесів, заснованих на ефективних методах біотехнології.

На сьогоднішній день ведуться окремі дослідження по створенню і розробці бактеріальних препаратів для інтенсифікації виробництва м'ясних продуктів, особливо при створенні нових високоякісних видів сирокочених ковбас. Успіх такого підходу залежить, у першу чергу, від підібраних штамів мікроорганізмів, які здатні прискорювати спрямований розвиток комплексу фізико-хімічних і біохімічних процесів виготовлення виробів, покращувати їхні мікробіологічні, органолептичні та інші показники якості, а також забезпечувати безпеку продукції для споживача [Лисицын А.Б., Кудряшов Л.С., Алексахина В.А., 2003; Король Ц.О., 2007].

Питання про те, які мікробіологічні процеси мають особливе значення для дозрівання сирокочених ковбас, в основному з'ясовано. Це дало змогу здійснювати керування цими процесами шляхом використання стартових культур (бактеріальних препаратів), які складаються із спеціально підібраних штамів/штаму мікроорганізмів, і цілеспрямовано діють на скорочення технологічного процесу і отримання стабільних якісних показників продукту.

Зараз у світі існують окремі розробки щодо використання одноштамових і багатоштамових стартових культур для виробництва сирокочених і сиров'ялених ковбас. Однак основними їх виробниками і постачальниками в Україну є іноземні фірми і компанії [Montel M.C., Talon R., 1993; Богач О.Н., Кручек О.Г., 2002; Підгорський В.С., 2006].

Тому розробка вітчизняних бактеріальних препаратів, які б володіли не тільки необхідними біотехнологічними, але й пробіотичними властивостями, а також мали тривалий термін придатності має науковий і практичний інтерес і відкриває можливості створення нових технологій м'ясопродуктів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у

рамках держбюджетних тем кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (ОНУ) (тема № 189 “Вивчення таксономічного складу і окремих представників мікробних ценозів людини”, № реєстрації ОНУ 189; тема № 344 “Вивчення екології, таксономії, фізіолого-біохімічних та біотехнологічних властивостей молочнокислих бактерій півдня України” № держреєстрації 0103U0033799). Дисертант була співвиконавцем тем.

Мета і задачі досліджень. Метою дисертаційної роботи є розробка технології бактеріальних препаратів на основі пробіотичних штамів лактобацил та наукове обґрунтування їх застосування у технології сирокочених ковбас.

Для реалізації поставленої мети були сформульовані і вирішувались наступні задачі:

- виділити чисті культури лактобацил у здорових дітей-мешканців м. Одеси, вивчити їх біологічні властивості, провести ідентифікацію, створити колекцію виділених культур і вивчити умови їх зберігання;

- вивчити біотехнологічні властивості культур, необхідні при виготовленні сирокочених виробів, і провести відбір перспективних штамів для застосування у виробництві сирокочених ковбас;

- з’ясувати пробіотичні властивості відібраних штамів лактобацил;

- розробити технологію сухих препаратів на основі пробіотичних штамів лактобацил, дослідити активність створених препаратів і визначити економічну ефективність розробленої технології сухого бактеріального препарату Лактоплан 1005;

- провести дослідно-промислову апробацію препаратів у виробництві сирокочених ковбас;

- розробити нормативну документацію на препарати, створені на основі пробіотичних штамів лактобацил, і на сирокочені ковбаси, виготовлені на основі застосування створених препаратів.

Об’єкт дослідження – технологія препаратів лактобацил і сирокочених ковбас.

Предмет дослідження – штами бактерій роду *Lactobacillus*, сухі бактеріальні препарати на основі пробіотичних штамів лактобацил, ковбасні вироби зі створеними препаратами.

Методи дослідження – мікробіологічні, технологічні, біохімічні, фізико-хімічні і статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше на основі регіональних біологічно активних штамів лактобацил, виділених у здорових дітей, створено пробіотичні бактеріальні препарати для м’ясної промисловості. Вперше показано, що створені препарати володіють стабільними біотехнологічними і пробіотичними властивостями. Підібрано

оптимальні умови культивування виробничих культур лактобацил для отримання максимальної кількості біомаси. Вперше для виготовлення ліофільно висушених бактеріальних препаратів застосовано сахарозо-желатозо-пептонне захисне середовище і показано, що дане захисне середовище забезпечує отримання якісних препаратів зі стабільними властивостями і тривалим терміном зберігання. Вперше створені препарати використано у технології сирокочених ковбас і показано, що препарати Лактоплан 13, 130, 1005, Лактоферм 25 і Лактокур 904 дозволяють отримати якісні вироби і скоротити тривалість технологічного процесу на 7 діб. Вперше на основі виділених штамів бактерій роду *Lactobacillus* створено музей, який увійшов до складу Колекції морських та практично корисних для екологічної біотехнології штамів мікроорганізмів.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено технологію сухих бактеріальних препаратів на основі пробіотичних штамів лактобацил і технологію сирокочених ковбас із використанням створених препаратів. Розраховано річний економічний ефект виготовлення препарату бактеріального сухого Лактоплан 1005, який склав 21874 грн. при річному об'ємі продукції 100 кг. Термін окупності розробленої технології отримання препарату бактеріального сухого Лактоплан 1005 склав 0,69 року. На підставі отриманих даних розроблена нормативно-технічна документація на виробництво препарату бактеріального сухого Лактоплан 1005 (ТУ У 15.8-02071091-001:2006 і ТІ) і на ковбасу сирокочену з використанням препарату бактеріального сухого Лактоплан 1005 (ТУ У 15.1-02071091-002:2007 і ТІ). Розроблена технологія виробництва препаратів, яка апробована на базі ТОВ “Відродження М”. Розроблена технологія виробництва сирокочених ковбас із використанням пробіотичних препаратів лактобацил, яка апробована на базі фірми “ГАРМАШ”.

За результатами досліджень отримано патент на корисну модель № 28136 А23В 4/00 “Препарат для виробництва ферментованих м'ясних продуктів”.

Отримані результати використовуються у навчальному процесі при підготовці фахівців із спеціальності “Мікробіологія і вірусологія” при викладанні загальних курсів мікробіології і біотехнології, спеціальних курсів “Мікроекологія людини”, “Мікробні біотехнології”, “Прикладна екологія та мікробні біотехнології”, а також у розділах великого спецпрактикуму “Ізоляція, ідентифікація та систематика бактерій”, “Збереження культур мікроорганізмів”, “Антимікробні агенти”.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто проведено виконання аналітичної і основної частини експериментальної роботи: отримання чистих культур лактобацил, вивчення їх біологічних властивостей, проведення ідентифікації, дослідження біотехнологічних і пробіотичних властивостей, створення сухих бактеріальних препаратів,

дослідження їх біологічної активності, розробка нормативно-технічної документації, організація промислової апробації створених препаратів у технології сирокочених ковбас. Вивчення фізико-хімічних показників сирокочених ковбас проводилось здобувачем спільно із асистентом кафедри технології м'яса та м'ясних продуктів Одеської національної академії харчових технологій (ОНАХТ) Шлапак Г.В., визначення органолептичних показників і оцінку якості готових виробів - спільно із завідуючою промислової лабораторії фірми "ГАРМАШ" Пехотою О.В. Постановка завдань і обґрунтування науково-практичних висновків проводились спільно з науковим керівником доцентом кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова Єлинською Н.О. Друковані роботи підготовлено автором особисто при безпосередній участі наукового керівника. Особистий внесок здобувача підтверджується поданими документами і науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень доповідались і обговорювались на ІХ і Х з'їздах товариства мікробіологів України (Чернігів, 2000 р., Одеса, 2004 р.), на конгресі європейських мікробіологів (Любляна, Словенія, 2003 р.), на міжнародній науково-практичній конференції "Пробіотики – ХХІ століття. Біологія. Медицина. Практика" (Тернопіль, 2004 р.), на 8-ій і 9-ій міжнародних Пушчинській школі-конференції молодих вчених "Біологія – наука ХХІ века" (Пушино, Росія, 2004, 2005 рр.), на міжнародній науковій конференції "Eurobio 2005" (Краків, 2005 р.), на міжнародній науковій конференції "Мікробні біотехнології" (Одеса, 2006 р.), на 67 Науковій конференції ОНАХТ (Одеса, 2007 р.), The Young Scientists' And Students' International Scientific Conference "Modern Problems Of Microbiology And Biotechnology" (Odessa, 2007), 2nd Polish-Ukrainian Conference In Memory Of Professor Rudolf Stefan Weigl "Microbiology In The XXI Century" (Warsaw, Polish, 2007), а також на 56 (2001 р.), 57 (2002 р.), 58 (2003 р.), 59 (2004 р.), 60 (2005 р.), 61 (2006 р.), 62 (2007 р.) наукових конференціях професорсько-викладацького складу і наукових співробітників ОНУ імені І.І. Мечникова.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових робіт, включаючи 3 статті у фахових виданнях, 6 тез доповідей і 1 деклараційний патент України на корисну модель № 28136 А23В 4/00.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 198 сторінках і складається з вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел з 224 найменувань (22 сторінки) та 14 додатків (110 сторінок). Дисертація ілюстрована 52 таблицями (22 сторінки) та 17 рисунками (15 сторінок).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми досліджень, визначено її мету та основні задачі, показано наукову новизну і практичну цінність отриманих результатів.

У **першому розділі** “Сучасний стан питання виробництва ферментованих ковбас” проведено аналітичний огляд літератури стосовно застосування нових, заснованих на ефективних методах біотехнології, виробничих процесів, що дозволяють як інтенсифікувати технологію виробництва, так і прискорювати спрямований розвиток комплексу фізико-хімічних і біохімічних процесів виготовлення ферментованих м'ясних виробів, покращувати їхні мікробіологічні, органолептичні та інші показники якості, а також забезпечувати безпеку продукції для споживача. Розглянуто різні способи виробництва сирокоччених ковбас. Виявлено, що успішність протікання технологічного процесу при виробництві ферментованих ковбас залежить від активності бактеріальних заквасок. Показано доцільність використання деяких видів молочнокислих бактерій, зокрема лактобацил, у виробництві сирокоччених ковбас, оскільки ці бактерії дозволяють скоротити термін дозрівання ковбаси, гарантують отримання якісних виробів з тривалим терміном зберігання. Окрім цього, лактобацили є продуцентами багатьох біологічно активних речовин.

У **другому розділі** “Організація експериментальних досліджень” наведено структурну схему, яка показує взаємозв'язок головних етапів роботи (рис. 1), дано стислу характеристику об'єктів і методів досліджень.

Виділення штамів лактобацил проводили шляхом 5-кратних пересівів проб у середовище накопичення (стерильне молоко). Після цього отримані зразки пересівали із середовища накопичення на щільне поживне середовище MRS [De Man J.C. et al., 1960] у чашках Петрі за методом Коха з метою отримання чистих культур. Культивування чистих культур, вивчення культуральних, морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей проводили у рідкому і на щільному середовищах MRS за стандартними методиками. Ідентифікацію виділених культур проводили, використовуючи “Визначник бактерій Бергі” (1986). Здатність до синтезу тіаміну визначали, культивуючи лактобацили у рідкому середовищі MRS з додаванням 4-метил-5-в-оксіетилтіазолу (попередника тіаміну) та без нього визначали за [Начев Л. И. и др., 1978]. Визначення локалізації протеолітичних ферментів проводили за [Каверзнева Е.Д., 1971; Березова Т.Т. 1976]. Визначення антагоністичної активності проводили методом агарових блоків. Визначення резистентності до лікарських препаратів визначали методом дифузії в MRS-агар з використанням стандартних паперових дисків. Визначення граничної кислотності проводили титрометричним методом і виражали у градусах Тернера [ГОСТ 8764-73]. Адгезивні властивості вивчали на моделі “еритроцит – лактобацила” [Брилис В.И. и др., 1986]. Токсикологічну оцінку штамів лактобацил проводили на самцях білих лабораторних мишей.

Культивування виробничих заквасочних культур лактобацил проводили у середовищі для нарощування біомаси у виробничому ферментері місткістю 40 дм³ (ОНУ імені І.І. Мечникова, м. Одеса) при перемішуванні з частотою обертання мішалки 250...300 об/хв, температурі 37 ± 1 °С, рН 6,6...6,9. Концентрування біомаси виробничих заквасочних культур здійснювали на центрифугі MPW-310 (Польща) при 1500 г протягом 20 хв. Фільтрат зливали, а сконцентровану бактеріальну масу змішували із захисним середовищем.

Ліофільне висушування сконцентрованої біомаси у захисному середовищі проводили у сублимаційній установці ТГ-50. Визначення біологічної активності створених препаратів проводили за загальноприйнятими методиками.

Визначення фізико-хімічних, мікробіологічних і органолептичних характеристик у ході технологічного процесу виготовлення сирокочених ковбас проводили за загальноприйнятими методиками.

Статистичне опрацювання отриманих даних проводили з використанням програми „Excel XP” за загальноприйнятими методиками з урахуванням t-критерію Стюдента, рівень вірогідності становив 95 %, n = 3 [Лапач С.Н. и др., 2001].

У **третьому розділі** “Дослідження біологічних властивостей бактерій роду *Lactobacillus* і розробка методів їх зберігання” наведено результати власних досліджень відносно виділення штамів лактобацил у здорових дітей, що проживають в Одеському регіоні, вивчення їх біологічних властивостей і умов зберігання з метою запровадження у виробництво сирокочених ковбас з лікувально-профілактичним призначенням.

У виділених культур молочнокислих бактерій були вивчені біологічні властивості, які дозволили встановити родову і видову належність виділених культур.

У результаті проведених досліджень 67 штамів лактобацил, ізольованих із вмісту шлунково-кишкового тракту здорових дітей, було віднесено до 17 видів. Найбільшою часткою штамів був представлений вид *L. plantarum* (13,4 % від усіх виділених штамів), дещо меншою кількістю були представлені штами видів *L. delbrueckii s/sp. lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei s/sp. tolerans* і *L. fermentum*.

Для визначення оптимальних умов, при яких ізольовані і колекційні штами бактерій роду *Lactobacillus* зберігають найкращу життєздатність, застосовано методи: субкультивування, субкультивування під шаром вазелінової олії, зберігання у суспензійному стані у запаяних ампулах і ліофілізація. Дослідження життєздатності проводили на протязі 3 місяців, а при зберіганні методом ліофілізації – 12 місяців. Виявлено, що для короткочасного зберігання лактобацил можна застосовувати метод субкультивування, для довготермінового зберігання - метод ліофілізації.

У **четвертому розділі** “Біолого-технологічні властивості штамів бактерій роду *Lactobacillus*” наведено результати вивчення біотехнологічних властивостей, якими мають володіти заквасочні культури. У досліджуваних штамів визначали здатність до росту при низьких плюсових температурах, високих концентраціях солі, у присутності консервувальних речовин; антагоністичну активність; активність кислотоутворення; ліполітичну і протеолітичну здатність; резистентність до антибактеріальних препаратів.

На підставі вивчених особливостей для створення препаратів, що можуть бути застосовані у м'ясній промисловості, було відібрано 8 штамів, у яких досліджені властивості були найбільш вираженими. Це штами *L. plantarum* 13, 130, 898 і 1005, *L. fermentum* 25, *L. acidophilus* 291, *L. curvatus* 215 і 904.

У **п'ятому розділі** “Пробіотичні властивості лактобацил” наведено результати дослідження життєздатності 8 відібраних штамів в умовах впливу деяких чинників макроорганізму *in vitro*; адгезивну активність і здатність до синтезу вітамінів.

Встановлено, що досліджені штами характеризувались досить високою життєздатністю і відзначались високою стійкістю як у кислому, так і лужному середовищах, а також стійкістю до дії протеолітичних ферментів шлунково-кишкового тракту (особливо до впливу хілотрипсину). Усі штами були здатні до росту з різною інтенсивністю у присутності різних концентрацій жовчі. Найбільшою стійкістю до усіх вивчених чинників макроорганізму характеризувався штам *L. plantarum* 1005 (рис. 2 а, б).

При визначенні адгезивної активності встановлено, що усі штами були здатні до адгезії. Ступінь адгезії був середнім і високим в залежності від дослідженого штаму. Найвищі показники адгезії зафіксовані у штамів *L. acidophilus* 291 і *L. plantarum* 1005.

Усі досліджені штами володіли здатністю синтезувати тіамін, яка залежала від наявності попередника тіаміну – тіазолу - у середовищі культивування, часу культивування і дослідженого штаму.

Усі штами синтезували максимальну кількість тіаміну як при додаванні попередника, так і без нього через 20 год культивування. Додавання у середовище культивування тіазолу сприяло швидшому початку синтезу і утворенню більшої кількості тіаміну. Максимальну кількість вітаміну В₁ продукував штам *L. plantarum* 1005 через 20 год культивування (рис.3).

У **шостому розділі** “Розробка технології виробництва сухих бактеріальних препаратів лактобацил” наведено результати створення препаратів та дослідження активності створених препаратів, а також розраховано економічну ефективність виробництва розроблених препаратів і розроблено нормативно-технічну документацію на “Препарат бактеріальний сухий Лактоплан 1005”.

Технологічний процес виробництва сухих бактеріальних препаратів включав етапи,

подані на рис. 4.

У промислових умовах для культивування і отримання значної кількості бактеріальної маси виробничих культур важливе значення має підбір поживного середовища, умов культивування та оптимальної концентрації посівного матеріалу. На основі експериментальних досліджень було підібрано поживне середовище, до складу якого входить (%): автолізат пекарських дріжджів (0,5), пептон ферментативний (1,0), натрій оцтовокислий безводний (0,5) і глюкоза кристалічна (2,0). Визначено оптимальну посівну дозу - 10 % інокуляту (добових бульйонних культур відповідних штамів) від об'єму поживного середовища і умови культивування (нейтралізація поживного середовища через 10 год культивування 30 % розчином Na_2CO_3 дозволила збільшити майже на один порядок кількість життєздатних клітин усіх штамів лактобацил через 12 год культивування) для отримання максимальної кількості біомаси виробничих культур (рис. 5 а, б).

Концентрування біомаси виробничих культур здійснювали на центрифугі MPW-310 (Польща) при 1500 g протягом 20 хв. Фільтрат зливали, а сконцентровану біомасу змішували із захисним середовищем у співвідношенні 1 : 1. Сконцентровану біомасу у захисному середовищі розливали у флакони заморожували та ліофільно сушили за встановлених режимів у сублимаційній установці ТГ-50.

Відразу після ліофілізації, через 3, 6, 9 і 12 місяців після висушування при зберіганні флаконів із препаратами при 4 °C визначали кількість життєздатних клітин. Найкращі результати були отримані при ліофілізації сконцентрованої біомаси у розробленому захисному середовищі, до складу якого входить (%): сахароза (10,0), желатоза (1,5), пептон ферментативний (4,0). Через 12 місяців зберігання у ньому життєздатними залишились 95 % клітин усіх штамів.

Результати проведених досліджень були використані для розробки дослідно-промислового регламенту на виробництво сухих бактеріальних препаратів на основі 8 пробіотичних штамів бактерій роду *Lactobacillus*. Використання розробленої технології виготовлення препаратів (зокрема Лактоплан 1005) дозволяє отримати річний економічний ефект, який складає 21874 грн. при річному об'ємі продукції 100 кг. Термін окупності розробленої технології складає 0,69 року.

Встановлено *in vivo* на самцях щурів лінії *Wistar*, що препарати є не токсичними. Дослідження активності препаратів через 12 місяців зберігання свідчать, що препарати були активними за усіма дослідженими показниками (табл. 1).

Усі препарати мали вигляд однорідного порошку, світло-кремового кольору зі специфічним, кисло-молочним смаком і запахом. У препаратах виявлені тільки клітини відповідних штамів лактобацил.

Таблиця 1

Біологічна активність препаратів

Показник		Лак топ лан 13	Лак тоф ерм 25	Лак топ лан 130	Лак ток ур 215	Лак тоа цид 291	Лак топ лан 898	Лак ток ур 904	Лак топ лан 100 5
Ріст при	10 °С	I	I	C	I	I	C	C	I
	15 °С	I	I	I	I	I	I	C	I
	20 °С	I	I	I	I	I	I	C	I
	6,0 % NaCl	I	I	I	I	I	I	I	I
Кислотоутворення, °Т		70,1 ± 0,4	72,4 ± 0,1	78,7 ± 0,2	72,6 ± 0,4	85,4 ± 0,3	59,8 ± 0,2	65,4 ± 0,1	75,3 ± 0,2
рН		4,9	4,9	4,8	4,9	4,6	5,1	5,0	4,9
Масова частка вологи, %		2,98	2,95	2,98	2,94	2,91	2,98	2,96	2,94
Антагонізм до	<i>E. coli</i>	C	C	C	C	B	C	C	C
	<i>S. aureus</i>	C	C	C	C	C	C	C	C
Адгезивна активність (СПА), кл/ер		2,44 ± 0,21	4,32 ± 0,28	4,00 ± 0,22	2,54 ± 0,37	5,78 ± 0,37	4,02 ± 0,32	2,58 ± 0,29	5,86 ± 0,30
Синтез тіаміну (без тіазолу), мкг/мл		0	18,9 ± 0,76	0	20,1 ± 0,85	24,4 ± 0,56	0	21,9 ± 0,93	30,8 ± 0,88

Примітка: I – інтенсивний, C – середній, B – високий

Таким чином, отримані результати показують, що створені препарати володіють стабільними біотехнологічними і пробіотичними властивостями протягом тривалого часу.

У цьому розділі “Дослідно-промислова апробація сухих бактеріальних препаратів лактобацил у виробництві сиркопчених ковбас” наведено результати визначення фізико-хімічних, мікробіологічних і органолептичних показників у ході технологічного процесу виготовлення ковбас.

Безпосередньо перед застосуванням ліофілізовані препарати переводили у суспензійний стан. Витримували протягом години при 37 °С. Контролем була ковбаса, виготовлена за такою ж рецептурою, але із внесенням імпортової бактеріальної закваски.

У процесі виготовлення дослідних зразків ковбас із застосуванням створених препаратів значення рН в необхідному інтервалі 5,2...5,3 досяглось на 4-ту добу ферментації, у контрольних зразках виробів необхідна величина рН була досягнута на 7-му добу. У готових дослідних виробках через 18 діб після початку технологічного процесу даний

показник становив 5,4 у контрольних виробках - 5,5, але виробки були ще не придатними для реалізації. Дозрівання контрольних зразків завершилось на 25 добу.

У готових дослідних виробках на 18 добу масова частка вологи становила не більше 35 %, масова частка солі не перевищувала 6,0 %. Показники титруємої кислотності виробів, виготовлених із застосуванням препаратів лактобацил, коливались від 438,1 °Т до 528,9 °Т. У готових контрольних виробках величина титруємої кислотності склала 428,3 °Т (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика сиркопчених ковбас, виготовлених із додаванням препаратів лактобацил

Показники		Кон трол ь	Лак топ лан 13	Лак тоф ерм 25	Лак топ лан 130	Лак току р 215	Лак тоац ид 291	Лак топ лан 898	Лак току р 904	Лак топ лан 100 5
Мі кр обі ол огі чні , lg К У О/ г	МАФам у 1,0 г	1,47	1,18	1,04	1,28	0,85	1,20	1,26	1,00	1,23
	БГКП у 1,0 г	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Бактерії роду <i>Clostridium</i> у 0,01 г	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> у 1,0 г	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i> у 25 г	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Бактерії роду <i>Salmonella</i> у 25 г	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Молочнокислі коки у 1,0 г	5,90	6,45	5,57	5,63	5,29	5,53	5,39	5,22	5,29

	Внесені культури у 1,0 г	5,0	6,0	10,0	6,0	5,0	10,0	7,0	6,0	10,0
Фізи-ко-хімічні	Ма вологи	32	32	28	31	31	29	30	30	30
	білка	13,97	13,93	14,01	13,91	13,97	13,93	13,96	13,91	14,03
	жиру	35,46	35,44	35,47	35,45	35,47	35,46	35,44	35,44	35,46
	NaCl	5,9	5,5	5,4	5,4	5,2	5,5	5,3	5,3	5,4
	NaNO ₂	0,003	0,001	0,001	0,004	0,003	0,003	0,004	0,004	0,001
		9	4		4	5	0	4	9	4
	pH	5,80	5,40	5,36	5,50	5,40	5,40	5,55	5,42	5,40
	Титруєма кислотність, °Т	428	508	464	462	438	528	464	458	482

При визначенні мікробної контамінації м'ясного фаршу до внесення препаратів встановлено, що кількість мікроаерофільних факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФаМ) становила $4,93 \pm 0,04$ lg КУО/г, бактерій групи кишкової палички (БГКП) – $3,86 \pm 0,01$ lg КУО/г, молочнокислих коків – $4,74 \pm 0,02$ lg КУО/г. Лактобацили були представлені одиничними клітинами.

У готових виробах визначено незначну кількість МАФаМ, не виявлено БГКП і патогенних бактерій, що відповідає вимогам стандартів, але у дослідних зразках ці бактерії не виявлялись уже на 18 добу, а у контрольних - аж на 25 добу. Кількість молочнокислих коків після ферментації дещо зросла в усіх зразках ковбаси, у середині процесу сушки – зменшилась, у готових виробах визначена у межах від $5,22 \pm 0,04$ lg КУО/г до $6,45 \pm 0,03$ lg КУО/г. Щодо лактобацил, внесених із відповідними препаратами, то після ферментації у деяких зразках ковбаси їх кількість зменшилась, у деяких – залишилась без змін, у деяких - зросла. Але вже починаючи із середини процесу сушки, їх кількість починає поступово зростати. В готових виробах, виготовлених при внесенні у фарш препаратів Лактоферм 25, Лактоацид 291 і Лактоплан 1005, кількість відповідних штамів становила 10,0 lg КУО/г, тобто збільшилась у порівнянні із кількістю, що була внесена у м'ясний фарш (табл. 2).

Органолептична оцінка сиркопчених ковбас показала, що внесення препаратів Лактоплан 13, 130, 1005, Лактоферм 25 і Лактокур 904 позитивно впливає на якість ковбас. Найкращі результати отримані при оцінці зразків, виготовлених із застосуванням препарату

Лактоплан 1005.

Тривалість технологічного процесу виготовлення сирокочених ковбас із застосуванням препаратів лактобацил склала 18 діб, на відміну від більш тривалого процесу (25 діб) виготовлення ковбасних виробів із застосуванням імпоротної закваски.

Таким чином, порівняльний аналіз застосування восьми створених препаратів у технології сирокочених ковбас свідчить про можливість використання п'яти препаратів (Лактоплан 13, 130, 1005, Лактоферм 25 і Лактокур 904) у виробництві ферментованих м'ясних виробів, оскільки дозволяє скоротити технологічний процес виготовлення ковбас на 7 діб у порівнянні з контрольними зразками, а також дає стабільні якісні показники готових виробів: формується приємний смако-ароматичний комплекс і тверда еластична монолітна структура, темно-червоний колір, а також запобігається розвиток небажаної мікробіоти.

Отримані результати було підтверджено промисловими виробками сирокочених ковбас.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення і практичне вирішення наукової проблеми, що виявляється у дослідженні біотехнологічних і пробіотичних властивостей бактерій роду *Lactobacillus*, виділених у здорових дітей, і необхідних для створення пробіотичних препаратів для м'ясної промисловості. Показано, що створені препарати Лактоплан 13, 130, 1005, Лактоферм 25 і Лактокур 904 дозволяють скоротити технологічний процес виготовлення сирокочених ковбас і гарантують отримання якісних виробів.

1. Визначено видовий склад бактерій роду *Lactobacillus*, виділених у здорових дітей-мешканців м. Одеси, і встановлено, що більшість виділених штамів (13,4 %) представлені видом *L. plantarum*. На основі виділених культур створено колекцію і з'ясовано, що для довготермінового зберігання штамів лактобацил найбільш придатним є метод ліофілізації, для короткочасного зберігання – метод субкультивування.

2. Відібрано за критеріями біотехнологічної придатності 8 штамів лактобацил *L. plantarum* 13, 130, 898, 1005, *L. fermentum* 25, *L. acidophilus* 291, *L. curvatus* 215 і 904 перспективних для застосування у виробництві сирокочених ковбас і створення на їх основі ліофілізованих бактеріальних препаратів.

3. Встановлено в експериментах *in vitro*, що досліджені штами лактобацил є життєздатними у широкому діапазоні значень рН, під дією протеолітичних ферментів шлунково-кишкового тракту і жовчі; володіють адгезивною активністю і здатністю до синтезу тіаміну. Встановлено *in vivo* на самцях білих мишей, що у штамів лактобацил

відсутня токсичність.

4. Експериментально підібрано оптимальний склад поживного середовища (%): автолізат пекарських дріжджів – 0,5, пептон ферментативний – 1,0, натрій оцтовокислий безводний – 0,5, глюкоза кристалічна – 2,0, рН 6,6...6,8; концентрацію посівної дози виробничих культур лактобацил – 10 % і умови культивування для отримання максимальної кількості біомаси виробничих культур.

5. Встановлено, що ліофільне висушування сконцентрованої біомаси у захисному середовищі, до складу якого входить (%): сахароза – 10,0, желатоза – 1,5, пептон ферментативний – 4,0 у співвідношенні 1 : 1 : 1,5, забезпечує високий вихід життєздатних клітин відразу після сушки і у процесі зберігання протягом 12 місяців при плюс 4 ± 2 °С. Показано, що у препаратів відсутні вірулентність і токсичність і вони володіють стабільними біотехнологічними і пробіотичними властивостями.

6. Розроблено технологічний регламент виготовлення сухих бактеріальних препаратів на основі 8 штамів лактобацил з пробіотичними властивостями і проведено промислову апробацію розробленої технології на базі ТОВ “Відродження М”. Розрахована собівартість отриманого препарату бактеріального сухого Лактоплан 1005 складає для 1 кг продукту 1988,57 грн. у цінах на вересень 2007 року. Використання розробленої технології дозволяє отримати річний економічний ефект 21874 грн. при річному об’ємі продукції 100 кг; термін окупності розробленої технології отримання препарату Лактоплан 1005 складає 0,69 року.

7. Проведено дослідно-промислову апробацію створених препаратів у технології сирокочених ковбас на базі фірми “ГАРМАШ” і показано, що за фізико-хімічними і мікробіологічними показниками зразки експериментальних ковбасних виробів відповідали нормам стандартів на 18 добу технологічного процесу, у порівнянні з контрольними зразками, показники яких відповідали вимогам на 25 добу. Готові ковбасні вироби мали гарантовані санітарно-гігієнічні показники. За органолептичними показниками ковбасні вироби, виготовлені із застосуванням препарату Лактоплан 1005, були кращими контрольних виробів, а також виробів, виготовлених із використанням інших створених препаратів лактобацил.

8. Розроблено нормативно-технічну документацію на отримання “Препарату бактеріального сухого Лактоплан 1005” і на “Ковбаси сирокочені з використанням препарату бактеріального сухого Лактоплан 1005”.

Перелік публікацій за темою дисертаційної роботи

1. Єлинська Н.О. Антагонізм і антибіотикорезистентність штамів лактобацил,

виділених із кишечника дітей / Н.О. Єлинська, І.В. Фабіянська // Наук. пр. ОНАХТ. – О., 2003. – Вип. 25. – С. 122 - 124.

Особистий внесок: проведення досліджень, обробка та обґрунтування отриманих результатів, підготовка до друку.

2. Визначення фізико-хімічних параметрів у процесі виготовлення сировокопчених ковбас із застосуванням препаратів лактобацил / І.В. Фабіянська, Н.О. Єлинська, Л.Г. Віннікова, Г.В. Шлапак // Наук. пр. ОНАХТ – О., 2007. – Т. 2, Вип. 31. – С. 192 - 196.

Особистий внесок: проведення досліджень щодо визначення фізико-хімічних показників на різних етапах виготовлення ковбас, обробка отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.

3. Єлинська Н.О. Розробка технології виробництва сухого бактеріального препарату на основі штаму *Lactobacillus plantarum* 1005 / Н.О. Єлинська, І.В. Фабіянська, І.М. Григорашева // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: Зб. наук. пр. ХДУХТ. – Х., 2007. – Вип. 2 (6). – С. 40 – 47.

Особистий внесок: розробка сухого бактеріального препарату та дослідження його активності, обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку.

4. ПАТ. 28136 Україна МПК А23В 4/00. Препарат для виробництва ферментованих м'ясних продуктів / І.В. Фабіянська, Н.О. Єлинська, В.О. Іваниця, Н.В. Кур'ята-Стасів. – и 2007 08387; Заявлено 20.07.2007; Опубл. 26.11.2007., Бюл. № 19.

Особистий внесок: проведення літературного та патентного пошуку, узагальнення та систематизація отриманих експериментальних даних, оформлення заявки на патент.

5. Біологічні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із шлунково-кишкового тракту дітей / Н.О. Єлинська, І.В. Фабіянська, К.С. Рудьова та ін. // Вісник ОНУ. Біологія. - 2001. – Т. 6, Вип. 4. – С. 101 - 105.

Особистий внесок: виділення лактобацил, дослідження біологічних властивостей, підготовка отриманих результатів до друку.

6. Фабіянська І.В. Кислотоутворююча активність колекційних штамів та культур лактобацил, виділених із вмісту шлунково-кишкового тракту дітей / І.В. Фабіянська, Н.О. Єлинська // Вісник ОНУ. Біологія. – 2005. – Т. 10, Вип. 7. – С. 224 – 228.

Особистий внесок: опрацювання літературних даних з теми, планування та проведення досліджень, обробка отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.

7. Фабиянская И.В. Свойства бактерий рода *Lactobacillus* как стартерных культур в производстве колбасных изделий // Тез. докл. 9-ой Международ. Пущинской школы-конф. молодых ученых “Биология – наука XXI века”, 18 – 22 апреля 2005 г. – Пущино, 2005. - С. 366.

Особистий внесок: проведення експериментальних досліджень, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку.

8. Удосконалення технології виробництва сировокопчених ковбас на основі нових заквасочних культур / І.В. Фабіянська, Н.О. Єлинська, Г.В. Шлапак, Л.Г. Віннікова // Тези доп. Міжнарод. наук. конф. “Мікробні біотехнології”, 11 – 15 вересня 2006 р. – Одеса, 2006. – С. 102.

Особистий внесок: проведення досліджень щодо впливу заквасок лактобацил на фізико-хімічні і мікробіологічні параметри зразків сировокопчених ковбас у процесі їх дозрівання, обробка отриманих результатів і підготовка матеріалів до друку.

9. Fabiyanska I. Capacity of lactobacilli for the synthesis of vitamins // The abstracts of International Scientific Conference “The Young Scientists’ and Students”, 28 – 31 May 2007. – Odesa, 2007. – P. 148.

Особистий внесок: аналіз даних літератури, проведення експериментальних досліджень щодо виявлення тіамінсинтезуючої активності лактобацил, підготовка матеріалів до друку.

10. Fabiyanska I.V. Features of lactobacilli probiotics that are used in fermented meat production / I.V. Fabiyanska, N.O. Yelinska // The abstracts of 2nd Polish-Ukrainian Conference In Memory Of Professor Rudolf Stefan Weigl “Microbiology In The XXI Century”, 24 – 26 September 2007. - Warsaw, 2007. – P. 204.

Особистий внесок: проведення досліджень, обробка, обґрунтування та узагальнення отриманих результатів, підготовка до друку.

АНОТАЦІЯ

Фабіянська І.В. Розробка технології препаратів лактобацил і їх використання для виготовлення сировокопчених ковбас. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій Міністерства освіти і науки України, Одеса, 2008.

Дисертація присвячена розробці технології бактеріальних препаратів на основі біологічно активних культур лактобацил та науковому обґрунтуванню їх застосування у технології сировокопчених ковбас.

Проведено відбір серед регіональних штамів лактобацил, виділених у здорових дітей, за критеріями біотехнологічної придатності для застосування у виробництві ферментованих ковбас. Досліджено пробіотичні властивості для 8 відібраних штамів.

Вперше створено пробіотичні бактеріальні препарати для м'ясної промисловості, які володіють стабільними властивостями і функціональною активністю протягом тривалого часу. Опрацьовано умови технологічного процесу і розроблено технологічний регламент виробництва сухих бактеріальних препаратів на основі пробіотичних штамів лактобацил для сировокопчених ковбас.

У лабораторних та промислових умовах доведено функціональну активність створених препаратів та ефективність їх застосування у виробництві сировокопчених ковбас гарантовано високої якості і скороченого терміну дозрівання.

Ключові слова: біотехнологія, лактобацили, біотехнологічні і пробіотичні властивості, бактеріальні препарати, сировокопчені ковбаси.

АННОТАЦІЯ

Фабиянская И.В. Разработка технологии препаратов лактобацилл и их использование для производства сырокопченых колбас. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Одесская национальная академия пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Одесса, 2008.

Диссертация посвящена разработке технологии бактериальных препаратов на основе биологически активных культур лактобацилл и научному обоснованию их применения в технологии сырокопченых колбас.

Из содержимого желудочно-кишечного тракта здоровых детей-жителей г. Одессы, проходивших профилактическое обследование, было выделено 67 штаммов лактобацилл. В результате проведенной идентификации изолированные штаммы отнесены к 17 видам. Наибольшим количеством штаммов (13,4 %) был представлен вид *L. plantarum*. Показано, что для долгосрочного хранения лактобацилл наиболее подходящим является метод лиофильного высушивания.

В результате целенаправленного скрининга по критериям биотехнологической пригодности для применения в производстве ферментированных колбас было отобрано 8 штаммов: *L. plantarum* 13, 130, 898 и 1005, *L. fermentum* 25, *L. acidophilus* 291, *L. curvatus* 215 и 904. Установлено, что данные штаммы способны к росту при низких плюсовых температурах (от 10 °С до 25 °С), при внесении в среду культивирования NaCl от 2,5 % до 10,0 %, в присутствии консервирующих веществ (ацетона, фенола и формальдегида в концентрациях 0,5 %). Показано, что все исследованные штаммы характеризуются антагонистической, кислотообразующей, липолитической и протеолитической активностью, а

также устойчивостью к антибиотическим препаратам.

Установлено, что отобранные штаммы владеют стабильными пробиотическими свойствами. В исследованиях *in vitro* показано, что штаммы лактобацилл проявили устойчивость к рН среды, действию протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта и желчи. Наибольшую устойчивость ко всем изученным факторам макроорганизма проявил штамм *L. plantarum* 1005. Все исследованные штаммы лактобацилл проявили адгезивную активность, степень которой зависела от штамма. Наивысшие показатели адгезии зафиксированы у штаммов *L. acidophilus* 291 и *L. plantarum* 1005 (средний показатель адгезии составил $6,34 \pm 0,33$ кл/эр и $6,01 \pm 0,59$ кл/эр, соответственно). Установлено, что исследованные штаммы лактобацилл способны к синтезу тиамин, максимальную концентрацию которого продуцировал штамм *L. plantarum* 1005 ($87,2 \pm 5,60$ мкг/см³) через 20 часов культивирования в среде с предшественником тиамин - тиазолом.

Впервые на основе региональных штаммов лактобацилл созданы пробиотические бактериальные препараты для мясной промышленности, владеющие стабильными свойствами и функциональной активностью в течение длительного времени. Подобран оптимальный состав питательной среды, условия культивирования, концентрация посевной дозы культур лактобацилл для получения максимального количества бактериальной массы производственных культур. Впервые для изготовления лиофильно высушенных бактериальных препаратов применена сахарозо-желатозо-пептонная защитная среда и показано, что данная защитная среда обеспечивает получение качественных препаратов со стабильными свойствами и длительным сроком хранения. Отработаны условия технологического процесса и разработан технологический регламент производства сухих бактериальных препаратов на основе пробиотических штаммов лактобацилл для сырокопченых колбас. Разработанная технология позволяет получить с 1 дм³ питательной среды до 6 г концентратов. В 1 г препаратов, созданных в результате лиофильного высушивания сконцентрированной биомассы соответствующих штаммов лактобацилл в сахарозо-желатозо-пептонной защитной среде, через 12 месяцев хранения при 4 ± 2 °С количество жизнеспособных клеток лактобацилл составляет от $8,34 \lg$ КОЕ/г до $8,76 \lg$ КОЕ/г в зависимости от препарата.

В результате опытно-промышленной апробации созданных препаратов лактобацилл в технологии сырокопченых колбас показано, что по физико-химическим и микробиологическим показателям образцы экспериментальных изделий, изготовленных с применением препаратов Лактоплан 13, 130, 1005, Лактоферм 25 и Лактокур 904, соответствовали нормам стандартов на 18 сутки технологического процесса, по сравнению с контрольными образцами, которые созревали на 25 сутки. Готовые колбасные изделия имели

гарантированные санитарно-гигиенические показатели. По органолептическим показателям колбасные изделия, изготовленные при применении препарата Лактоплан 1005, были лучше контрольных образцов, а также образцов, изготовленных с применением других созданных препаратов лактобацилл.

Ключевые слова: биотехнология, лактобациллы, биотехнологические и пробиотические свойства, бактериальные препараты, сырокопченые колбасы.

SUMMARY

Fabiyanska I.V. Creation of lactobacilli preparations technology and their using for the production of fermented sausages. – Manuscript.

The dissertation is subjected for the granting of Ph.D. scientific degree of engineering science, speciality 03.00.20 – biotechnology. – Odesa National Academy of Food Technologies, Ministry of Education and Science of Ukraine, Odesa, 2008.

The dissertation is dedicated to the creation of bacterial preparations technology on the basis of biologically active cultures of lactobacilli and scientific substantiation of their using in the fermented sausages technology.

The regional lactobacilli strains were isolated from healthy children. It was carried out the selection among isolated strains on the basis of biotechnologic properties suitable for using in the fermented sausages production. The probiotic properties of 8 lactobacilli selected strains have been investigated.

For the first time probiotic bacterial preparations with stability properties and functional activities during long time for meat production were created. These probiotic lactobacilli preparations can be used for fermented meat production.

The technological process conditions and the technological regulation of lyophilic bacterial preparations production on the basis of lactobacilli probiotic strains for fermented sausages have been created.

Laboratory and industrial approbation of the created preparations approved their functional activities and effectiveness in using for improving technological process production of fermented sausages of guaranteed high quality.

Key words: biotechnology, lactobacilli, biotechnologic and probiotic properties, bacterial preparations, fermented sausages.

Підписано до друку 09. 04. 2008. Формат 60x90/16. Ум.-друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.

Віддруковано з готового оригінал-макету в ПП “Фенікс”

65009, Україна, м. Одеса, вул. Зоопаркова, 25
Свідоцтво ДК № 1044 від 17. 09. 02.