

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

The influence of inhibitors at the dairy acid bacteria has been studied by microcalorimetric method. The sensitivity of *Str. lactis* and *Str. thermophilus* to some antibiotics, консервантов, disinfectants was measured. It has been shown that microcalorimetric method is more profitable than reductase probe for detection of inhibitors in milk.

Молочнокислые бактерии являются довольно требовательными микроорганизмами к химическому составу натурального молока и чувствительными к содержанию в нем чужеродных веществ. Присутствие в молоке ингибирующих веществ вызывает нарушение процессов молочнокислого брожения и наносит значительный экономический ущерб маслодельным и сыродельным заводам, предприятиям, производящим кисломолочные продукты, детское и лечебное питание [1]. Симптомы наличия в молоке ингибирующих веществ хорошо известны в молочной промышленности. Это нарушение кислотообразования, задержка протеолитических и липолитических процессов, значительное удлинение процессов свертывания и сквашивания молока. Продукция, полученная из загрязненного ингибиторами молока, не соответствует требованиям нормативно-технической документации и бракуется.

Под ингибирующими веществами в биологии понимают широкий класс природных и синтетических веществ, угнетающих активность ферментов и клеток. Эти вещества различаются по характеру, специфичности и механизму действия, но объединяются общим свойством - способностью снижать скорость биологических процессов. Многообразие типов, видов ингибирующих веществ и механизмов их действия на биологические объекты затрудняет задачу их быстрого количественного определения. В то же время, благодаря общему свойству данных веществ замедлять физиологические процессы у микроорганизмов, они могут быть выявлены в среде с помощью интегральных методов анализа.

Микрокалориметрия является одним из таких интегральных методов анализа, основанном на фундаментальном свойстве всех живых организмов обмениваться энергией с окружающей средой. Данный

метод нашел уже широкое применение при исследовании процессов роста и обмена веществ клеток, при изучении влияния лекарственных и токсических веществ на микроорганизмы [2].

Цель настоящей работы - микрокалориметрическое исследование влияния ингибирующих веществ на молочнокислые микроорганизмы и оценка возможности использования микрокалориметрии для обнаружения ингибирующих веществ в молоке.

В качестве объектов исследования использовали штаммы мезофильного и термофильного молочнокислых стрептококков из коллекции лаборатории бактериальных заквасок ГП "БелНИКТИММП", образцы натурального сборного молока, поступающего на опытно-экспериментальный завод ГП "БелНИКТИММП", не содержащие ингибиторов. Наличие ингибирующих веществ в молоке определяли по ГОСТ 23454-79 [3] с тест-культурой термофильного молочнокислого стрептококка.

В работе использовали также наиболее часто встречаемые в молоке антибиотики: бензилпенициллин натриевую соль во флаконах (1 млн МЕ), стрептомицин сульфат во флаконах (0,25 г), окситетрациклин дегидрат в таблетках по 0,25 г, а также консервирующие вещества: перекись водорода - (30%-ный раствор, хч), формалин (40%-ный раствор, ч.д.а.). Рабочие растворы антибиотиков готовили в соответствии с ГОСТ 10444.12-88 и использовали в течение 2 суток, сохраняя в закрытых сосудах в холодильнике. Рабочие растворы перекиси водорода и формалина приготавливали методом разведений из концентрированных растворов непосредственно перед началом измерений. Диапазон концентраций H_2O_2 в изучаемой среде варьировали от 0,01 до 1,0 %, формалина - от 0,005 до 0,1 %, антибиотиков - от 0,01 до 0,5 МЕ/мл (пенициллин), других исследуемых антибиотиков - от 0,1 до 5 мкг/мл. К выращенным на гидролизованном стерильном молоке 18-часовым культурам молочнокислых стрептококков добавляли рабочие растворы соответствующих ингибирующих веществ для получения концентраций, находящихся в изучаемом диапазоне. Образцы молока с добавками ингибирующих веществ готовили путем смешивания натурального молока с соответствующим рабочим раствором ингибитора в соотношении 10:1-100:1 для получения необходимых для изучаемого диапазона концентраций ингибирующих веществ. После внесения ингибирующих веществ образцы выдерживали в течение 30 мин для установления стационарного состояния, а затем заправляли в рабочие кюветы микрокалориметра. В качестве контрольных ис-

пользовали исходные образцы с культурами клеток, подвергнутые тепловой обработке в течение 10 мин на водяной бане при $T=95^{\circ}\text{C}$. Микрокалориметрические исследования проводили на микрокалориметре МКМ-Ц. Физиологическую активность молочнокислых микроорганизмов определяли по уровню теплопродукции клеток в отсутствие и в присутствии ингибирующих веществ. Статистическую обработку результатов измерений проводили по общепринятой методике [4].

В основе микрокалориметрического анализа физиологической активности микроорганизмов лежит прямая зависимость между скоростью метаболических процессов в клетках и мощностью тепловыделения. Для экспериментальной проверки возможности использования микрокалориметрического метода для обнаружения ингибиторов нами было проведено исследование влияния добавок различных ингибирующих веществ на теплопродукцию молочнокислых стрептококков. Полученные результаты приведены на рис. 1а. В присутствии ингибиторов скорость метаболических процессов молочнокислых стрептококков уменьшается, что приводит к снижению тепловыделения клеток в зависимости от концентрации ингибирующих веществ.

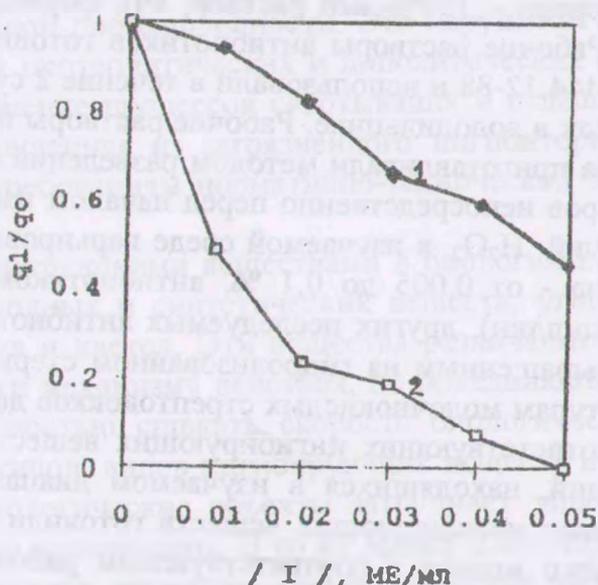


Рис. 1а. Влияние пенициллина на изменение теплопродукции молочнокислых бактерий в молоке: 1 - *Str. lactis*; 2 - *Str. thermophilus*

Математическая обработка экспериментальных данных показывает, что для термофильного молочнокислого стрептококка наблюдаемая зависимость хорошо описывается экспоненциальной кривой:

$$q_1/q_0 = a \cdot \exp(-b/I), \quad (1)$$

где q_0 , q_1 - тепловой поток от образцов с культурами клеток в отсутствии и присутствии антибиотика соответственно; I - концентрация ингибитора; a и b - показатели экспоненты, найденные экспериментально.

В случае мезофильного молочного стрептококка экспериментальные данные подчиняются экспоненциальной зависимости вида:

$$q_1/q_0 = a \cdot \exp(-b \cdot (I - I/p)), \quad (2)$$

где I/p - пороговая концентрация пенициллина.

Экспоненциальное уменьшение теплопродукции молочнокислых стрептококков при воздействии пенициллина указывает на необратимый характер действия данного антибиотика.

Иная картина наблюдается при воздействии на молочнокислые бактерии стрептомицина и окситетрациклина (рис.16). Зависимость q_0/q_1 от I носит линейный характер:

$$q_0/q_1 = a + b \cdot I, \quad (3)$$

что может указывать на обратимое влияние данных антибиотиков на молочнокислые стрептококки.

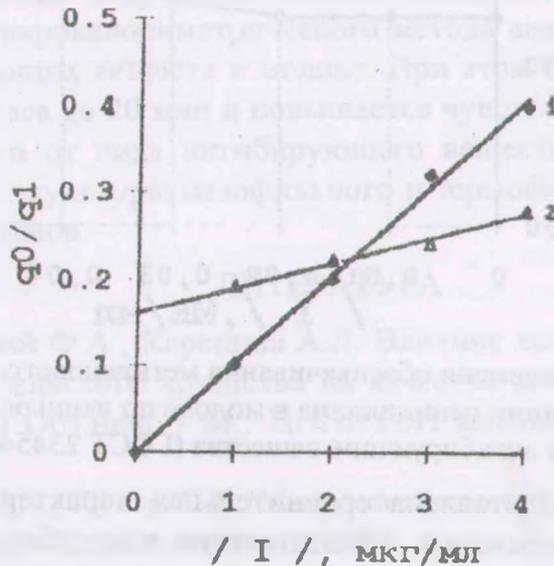


Рис.16. Влияние антибиотиков на теплопродукцию *Str.lactis*: 1 - окситетрациклин, 2 - стрептомицин

Для оценки возможности замены метода определения ингибирующих веществ в молоке по ГОСТ 23454-79 на микрокалориметри-

ческий метод нами изучено влияние различных концентраций пенициллина, добавленного в молоко, на теплопродукцию тест-культуры термофильного молочнокислого стрептококка. О степени ингибирования тест-культуры в методе по ГОСТ 23454-79 судили по времени начала обесцвечивания редокс-красителя метиленового голубого, полученные данные приведены на рис.2. Увеличение концентрации пенициллина приводит к торможению обесцвечивания красителя. Чувствительность редуктазного метода обнаружения пенициллина, по нашим данным, составила 0,025 МЕ/мл, тогда как для микрокалориметрического метода с термофильным стрептококком - 0,002 МЕ/мл. При этом время проведения измерений по определению содержания антибиотика микрокалориметрическим методом - 20 мин, редуктажным - 1 ч 50 мин.

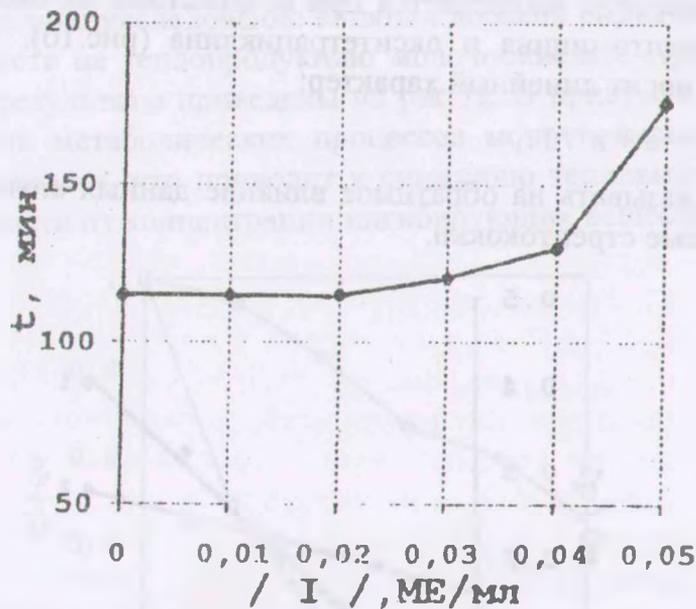


Рис.2. Изменение времени обесцвечивания метиленового синего в зависимости от концентрации пенициллина в молоке по данным редуктазной пробы на ингибирующие вещества (ГОСТ 23454-79)

В табл. представлена сравнительная характеристика чувствительности молочнокислых стрептококков к ингибирующим веществам, определенная с помощью метода микрокалориметрии и редуктазной пробы по ГОСТ 23454-79.

Сравнительный анализ чувствительности молочнокислых стрептококков к ингибирующим веществам по данным микрокалориметрии и редуктазной пробы по ГОСТ 23454-79

Наименование	Str. lactis	Str. thermophilus	ГОСТ 23454-79
Пенициллин, МЕ/мл	0,042	0,002	0,01
Стрептомицин, мкг/мл	1,0	5,0	30,0
Окситетрациклин, МЕ/мл	0,2	0,1	1,0
Формалин, мкг/мл	15,0	20,0	30,0
Перекись водорода, мкг/мл	2,0	10,0	100,0

Мезофильный молочнокислый стрептококк проявляет более высокую чувствительность к консервирующим веществам, а также стрептомицину, тогда как термофильный молочнокислый стрептококк более чувствителен к пенициллину и окситетрациклину.

Таким образом, полученные данные указывают на возможность использования микрокалориметрического метода анализа для обнаружения ингибирующих веществ в молоке. При этом время анализа сокращается с 1,5 часа до 20 мин и повышается чувствительность анализа. В зависимости от вида ингибирующего вещества целесообразно использовать тест-культуры мезофильного и термофильного молочнокислых стрептококков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вышемирский Ф.А., Каранина А.Л. Влияние химизации и интенсификации сельского хозяйства на качество молока и молочных продуктов // Обз.инф. - М.: ЦНИИТЭИ мясомолпрома СССР. - 1990. - №11.
2. Анатычук Л.И., Лусте О.Я. Микрокалориметрия. - Львов: Выща школа. Изд-во Львовского ун-та, 1981.
3. ГОСТ 23454-79. Молоко. Методы определения ингибирующих веществ.
4. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика, 3-е изд., испр.-Мн.:Выш.школа, 1973.