

Влияние на някои консерванти върху растежа и развитието на щамове *Lactobacillus plantarum* с пробиотични свойства и *Sacchromyces cerevisiae*

Ремзи Чолаков, Запряна Денкова, Величка Янакиева, Галя Вишева

Influence of some preservatives on the growth and development of *Lactobacillus plantarum* strains with probiotic properties and *Sacchromyces cerevisiae*: The resistance a *Lactobacillus plantarum* strain with proven probiotic properties and *Saccharomyces cerevisiae* to the preservatives: sodium benzoate (concentration 0,5%, 0,75% and 1%), potassium sorbate and calcium propionate (concentration 0.1%, 0.2% and 0.3%) was examined. It has been found that the cells of the examined *Lactobacillus* and yeast strains survived in the presence of different concentrations of the tested preservatives.

Key words: *Lactobacillus*, yeast, preservatives, fermented food

ВЪВЕДЕНИЕ

За удължаване срока на пригодност на храните се използват различни методи. Един от тези методи е добавянето на химични консервиращи агенти. При това те се прилагат в допустимите концентрации и проявяват своята активност при определени стойности на активна киселинност на средата .

Веществата, които се добавят към храните за потискане на растежа на микроорганизмите, за възпрепятстване на ензимните реакции и за предотвратяване на покафеняването им, се разделят в три групи: антимикробни (калиев сорбат, натриев бензоат); антиоксиданти, които предпазват храните от окисление и от гранясване, антипокафенинителни, които възпрепятстват ензимното и неензимно покафеняване на хранителните продукти (като витамин С, лимонена киселина, натриев сулфит). Хранителните киселини имат както антиоксидантна, така и консервираща дейност [1, 7].

При производството на зърнени храни в т.ч. напитки се използват соли на бензоената киселина (натриев бензоат), сорбиновата киселина (калиев сорбат) и пропионовата киселина (калциев пропионат).

Консервиращите агенти, добавени макар и в малки количества оказват неблагоприятно въздействие върху човешкия организъм. Според д-р J. Hay, 1997, бензоатът, който се влага в хлебни изделия, мляко, маргарин, майонеза, безалкохолни напитки води до копривна треска, предизвиква алергия и усилва астмата.

Изследванията на Walker, 1990 и Luck, 1993 сочат, че в организма на човека и животните сорбиновата киселина се метаболизира чрез β – окисление. Част от нея чрез образувания ацетил-КоА се включва в синтеза на мастни киселини, а останалата част се натрупва във вътрешните органи, мускулите и скелета (около 15%) [2]. Сорбиновата киселина и нейните соли калиев и калциев сорбат са разрешени като консервиращи агенти в концентрации 0,1 - 0,2% [4 ,6]. Калциевият пропионат (E281) се всмуква лесно от храносмилателния тракт, поради добрата му разтворимост във вода. Присъствието на калциев пропионат във високи концентрации потиска активността на ензимите, блокира обмяната на веществата. Получената при разтварянето пропионова киселина потиска растежа на клетките в организма и предизвиква мигрена.

Целта на настоящото изследване е определяне на влиянието на някои консерванти, влагани в производството на зърнени храни върху растежа и развитието на щам *Lactobacillus plantarum* с доказани пробиотични свойства и щам *Sacchromyces cerevisiae*.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Материали и методи:

Микроорганизми:

Млечнокисели бактерии: *Lactobacillus plantarum* BG 24, *Lactobacillus plantarum* BG 25 – изолирани от спонтанно ферментирали зърнени храни.

Дрожди: *Saccharomyces cerevisiae* 25-G, *Saccharomyces cerevisiae* 36-G - изолирани от спонтанно ферментирали зърнени храни.

Хранителни среди:

-MRS - бульон (среда на De Man, Rogosa & Sharpe)

Състав (g/dm³): пептон от казеин - 10; дрождев екстракт - 4; месен екстракт - 8; глюкоза - 20; K₂HPO₄ - 2; натриев ацетат - 5; диамониев цитрат - 2; MgSO₄ - 0,2; MnSO₄ - 0,04; Tween 80 - 1 cm³; pH=6,5. Средата се стерилизира за 15 min при 121°C.

- LAPTg10 - агар

Състав (g/dm³): пептон - 15; дрождев екстракт - 10; триптон - 10; глюкоза - 10. pH се довежда до 6,6 – 6,8 и се добавя Tween 80 - 1cm³/dm³ + 2% агар. Средата се стерилизира за 20 min при 121°C.

-Твърда среда LBG

Състав (g/dm³): триптон - 10; дрождев екстракт - 10; NaCl - 10; глюкоза - 10; агар-агар - 15; pH 7,5. Средата се стерилизира за 20 min при 121°C

-Среда агар пивна мъст за дрожди и плесенни гъби

Състав малцов екстракт (Каменица, България) в съотношение 1:1 с чешмяна вода + 2% агар (м.о.б.). pH=6,5 – 7,0. Средата се стерилизира за 25 минути при 121°C.

Определяне на живите клетки на лактобацили и дрожди.

От развита 24h култура на лактобацили се приготвят десетократни разреждания, от които се прави повърхностен посев върху среда 2.2. Петриевите блюда се инкубират 24-48h при температура 37±1°C до появата на единични колони, които се изброяват.

От дрождите се приготвят суспензии във физиологичен разтвор. Концентрацията на клетките се определя чрез камера за броене на Thoma.

Определяне на инхибиращото действие на консервантите върху растежа на лактобацилите, дрождите.

За изследване на действието на консервантите върху растежа на лактобацили и дрожди е използван агар дифузионен метод с ямки (d на ямката = 6 mm). В разтопената и охладена агарова среда (за лактобацили 2.2, а за дрождите, 2.3) се внася съответната тест-култура, така че крайната концентрация на активни клетки за шамовете лактобацили да надхвърля 10⁷ cfu/cm³; за дрождевите клетки и плесенните спори 10⁴ - 10⁵ cfu/cm³, а за патогенните микроорганизми над 10⁵ cfu/cm³.

Средата се разлива по 20 cm³ в петриevi панички (дебелината на слоя среда трябва да бъде 5-10 mm). След втвърдяването и петритата се поставят при температура 4±2°C за 1-2h, след което се изваждат и се оформят ямките (d=6 mm) в средата. В ямките се накапват по 60µl от контролата (буфер с pH=5,0; буфер с pH=6,0) и изследвания консервант в съответните концентрации: 0,1%, 0,2%, 0,3% калиев сорбат и калциев пропионат и 0,5%, 0,75%, 1% за натриев бензоат. Експериментът се провежда в две повторения. Следва термостатиране при температура оптимална за тест-микроорганизма за 24h-48h, след което се измерва диаметра на образуваните просветлени зони. За инхибиция се приемат зони с диаметър по-големи от 6 mm.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В храните протичат физични, химични, биологични и микробиологични процеси, които влияят върху качествата им. При развитието на микроорганизми в тях настъпва микробна развала и/или образуваните токсини, превръщат храните в опасни за здравето на човека.

Изследвана е влиянието на калиевия сорбат (в буфер с рН – оптимум за неговото действие) върху растежа на лактобацилите и дрождите. Резултатите от тези експериментални изследвания са показани на Табл.1.

Таблица 1.
Инхибиращата активност на калиев сорбат при различни концентрации върху растежа на патогенни микроорганизми

КОНСЕРВАНТИ	Калиев сорбат, d зона, mm			
	Концентрация, %			
	Контрола, буфер с рН=5	0,1	0,2	0,3
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 24, 1.10 ⁹ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 25, 1.10 ⁹ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 25-G, 1.10 ⁶ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 36-G, 1.10 ⁶ cfu/cm ³	-	-	-	-

Диаметър на ямката 6 mm. За инхибиция се приемат зони по-големи от 6 mm „-“ - не е определена зона на потискане на растежа на тест-микроорганизма

Опитните данни показват, че калиевият сорбат със съответните допустими концентрации не оказва влияние върху растежа на *Lactobacillus plantarum* BG 24, *Lactobacillus plantarum* BG 25, *Saccharomyces cerevisiae* 25-G и *Saccharomyces cerevisiae* 36-G (Табл. 1).

Действието на калиевия сорбат върху растежа на микроорганизмите е свързано с влияние върху техните ензимни системи и клетъчни мембрани. За да проявят своето действие консервиращите агенти трябва да проникват в клетката, преодолявайки клетъчната стена и цитоплазменната мембрана.

Висока е пропускливостта на клетъчната стена за недисоциираните форми. Това обяснява зависимостта на активността на сорбата от активната киселинност на средата. Антимикробна активност проявяват само недисоциираните форми. Поради това в определени области на рН консервиращите агенти не действат.

Определена е антимикробната активност на натриев бензоат върху растежа на изследваните лактобацили и дрожди (Табл. 2). Резултатите показват, че натриевият бензоат не влияе върху растежа на клетките на дрождите и лактобацилите. Те са устойчиви на неговото действие (Табл. 2), което е от особено значение за влагането им в състава на закваски за ферментирани храни.

Таблица 2
Инхибираща активност на натриев бензоат при различни концентрации върху растежа на лактобацили и дрожди

ТЕСТ-МИКРООРГАНИЗМИ	Натриев бензоат, d зона, mm			
	Концентрация, %			
	Контрола, буфер с рН=6	0,5	0,75	1
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 24, 1.10 ⁹ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 25, 1.10 ⁹ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 25-G, 1.10 ⁶ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 36-G, 1.10 ⁶ cfu/cm ³	-	-	-	-

Диаметър на ямката 6 mm. За инхибция се приемат зони по-големи от 6 mm „-“ - не е определена зона на потискане на растежа на тест-микроорганизма

При култивирането на лактобацилите и дрождите с добавка на калциев пропионат в различни концентрации е установено, че консервиращият агент не оказва влияние върху техния растеж (Табл. 3).

Таблица 3
Инхибиращата активност на калциев пропионат при различни концентрации върху растежа на патогенни микроорганизми

ТЕСТ-МИКРООРГАНИЗМИ	Калциев пропионат, d зона, mm**			
	Концентрация, %			
	Контрола, буфер с рН=5	0,1	0,2	0,3
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 24, 1.10 ⁹ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 25, , 1.10 ⁹ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 25-G, 1.10 ⁶ cfu/cm ³	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 36-G, 1.10 ⁶ cfu/cm ³	-	-	-	-

Диаметър на ямката 6 mm. За инхибция се приемат зони по-големи от 6 mm „-“ - не е определена зона на потискане на растежа на тест-микроорганизма

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведените изследвания по определяне на действието на най – често прилаганите консервиращи агенти в зърнените напитки показват, че селектираните от нас щамове *L. plantarum* BG24, *L. plantarum* BG25, *S. cerevisiae* 25-G, *S. cerevisiae* 36-G са устойчиви на действието на изследваните консерванти.

Това на свой ред разкрива възможност за приложението им в състава на стартерни култури за получаването на ферментирани зърнени храни в т.ч. напитки с високо съдържание на лактобацили, което е от особена важност за опазване на здравето на населението, тъй като чрез тях в стомашно-чревния тракт ще попаднат значимо количество жизнеспособни клетки на лактобацили.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Baird-Parker, A.C. (1980). Organic Acids, in Microbial Ecology of Foods, Vol. 1, Silliker, J.H., Ed., Academic Press, New York, p. 126.
- [2]. Fingerhut M., Schmidt B., Lang K.(1962). Über den Stoffwechsel der 1-14 C-Soprbinsäure. Biochem. Z., 336, 118-125.
- [3]. Hay J., (1997). Allergies: Questions you have, answers you need. "People's Medical Society", Pennsylvania.
- [4]. Jung R., Cojocel C., Müller W., Böttger D., Lück E. (1992). Evaluation of the genotoxic potential of sorbic acid and potassium sorbate. Food Chem. Toxicol., 30, 1-7.
- [5]. Lück E. (1993). Sorbic acid In: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry. Aufl Band A 24, S 507-513. Weinheim: VCH Publishers.
- [6]. Schlatter J., Würgler F., Kränlin R., Meier P., Holiger E., Graf U. (1992). The potential genotoxicity of sorbates: effects on cycle in vitro in V 79 cells and somatic mutations in Drosophila. Food Chem. Toxicol., 30, 843-851
- [7]. Tamime, A.Y., Robinson R.K. (2003). Yoghurt - Science and Technology, 2nd edition, CRC Press, New York, USA.
- [8]. Walker R. (1990). Toxicology of sorbic acid and sorbates. Food Add. Contam., 7, 671-676.

За контакти:

Докторант инж. Ремзи Гюлтекинов Чолаков, Катедра „Микробиология“, Университет по хранителни технологии гр. Пловдив. E-mail: inj.cholakov@gmail.com

Докладът е рецензиран