

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО**

Факультет харчових технологій та біотехнології
Кафедра технології молока та молочних продуктів

До захисту допущено

Завідувач кафедри

Орися ЦІСАРИК

« 2 » 12 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на здобуття освітнього ступеня магістра**

спеціальності **181 – Харчові технології**

(код та найменування спеціальності)

освітньо-професійної програми «Технології зберігання, консервування та
переробки молока»

тему: Дослідження бактеріофагів та розробка технології твердого
сирного сиру підвищеної мікробіологічної стійкості до зберігання

Виконавець:

Здобувач

Кухтин Микола Дмитрович

Керівник:

Цісарик Орися Йосипівна

Рецензент:

Драчук Уляна Романівна

Львів – 2024 року

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО**

Факультет Харчових технологій та біотехнології
Кафедра Технології молока і молочних продуктів
Навчальний ступінь Магістр
Спеціальність 181 Харчові технології
Навчально-професійна програма «Технології зберігання, консервування і
переробки молока»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Орися ЦІСАРИК

« 16 » 03 2024 р.

ЗАВДАННЯ

на кваліфікаційну роботу здобувача вищої освіти

Кухтин Микола Дмитрович

(прізвище, ім'я та по батькові)

Тема роботи: **Дослідження бактеріофагів та розробка технології твердого
сичужного сиру підвищеної мікробіологічної стійкості до зберігання**

Виконавець роботи: **Цісарик Орися Йосипівна, д.с.-г.н., професор**

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

Затверджені наказом закладу вищої освіти від « 12 » 03 2024 року

№ 115-У

1. Строк подання здобувачем роботи грудень 2024 року

2. Вихідні дані до роботи Спеціальна, періодична література та нормативна
документація з питань досліджень. Методики та методи досліджень, стандартні
визначення

3. Зміст кваліфікаційної роботи (перелік питань, які потрібно розробити) _____

Обґрунтувати доцільність використання бактеріофагів для впливу на умовно-патогенну
мікрофлору.

Визначити контамінацію молока-сировини та твердих сичужних сирів золотистим
стафілококом.

Виділити стафілококові фаги із молока-сировини на молокопереробних підприємствах
та визначити їх літичний спектр.

Визначити сиропридатність молока для приготування сиру твердого (Голландського).

Розробити технологію виробництва сиру твердого (Голландського) консервованого
стафілококовим бактеріофагом.

Визначити зміну мікробіоти сиру твердого Голландського консервованого
стафілококовим бактеріофагом за зберігання.

5. Перелік графічного матеріалу рисунки, таблиці, схеми, діаграми

6. Консультанти розділів роботи

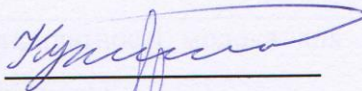
Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1, 2, 3	Мисарик О.Г.	12.03.24	
4	Березенко С.П.	2.09.24	

7. Дата видачі завдання 12.03.24 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

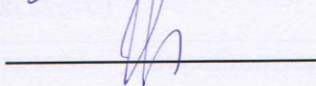
№ з/п	Назва етапів роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Аналітичний огляд та патентний пошук інформації відповідно до теми магістерської роботи	29.01.24 р. – 24.05.24 р.	Виконано
2.	Складання схеми досліджень	17.06.24 р. – 28.06.24 р.	Виконано
3.	Опрацювання методики досліджень	01.07.24 р. – 31.07.24 р.	Виконано
4.	Виконання експериментальних досліджень (Частина I)	01.08.24 р. – 30.08.24 р.	Виконано
5.	Завершення експериментальних досліджень (Частина II)	02.09.24 р. – 20.09.24 р.	Виконано
6.	Закінчення написання розділів	14.10.24 р. – 22.11.24 р.	Виконано
7.	Подання магістерської роботи до захисту	02.12.24 р.	

Здобувач



Микола КУХТИН

Керівник роботи



Орися ЦІСАРИК

ЗМІСТ

	Анотація	5
	Вступ	6
1	Огляд літератури	
1.1	Перспективність застосування бактеріофагів у харчовій промисловості	10
1.2	Дослідження впливу комерційних літичних фагів та їх ензимів на патогенні в харчових продуктах	13
1.3	Використання бактеріофагів для санації поверхонь технологічного обладнання у харчовій промисловості	17
1.4	Негативне значення від циркуляції бактеріофагів специфічних до молочнокислих бактерій на молочних підприємствах	22
1.5	Токсикози стафілококової етіології, які виникають через споживання молока і молочних продуктів	24
2	Матеріали і методи досліджень	30
2.1	Етапи виконання роботи	30
2.2	Використанні методи досліджень	32
3	Результати дослідження та їх обговорення	34
3.1	Обґрунтування доцільності використання бактеріофагів для впливу на умовно-патогенну мікрофлору	35
3.2	Контамінація молока-сировини та твердих сичужних сирів золотистим стафілококом	36
3.3	Виділення стафілококових фагів із молока-сировини на молокопереробних підприємствах та оцінка їх літичного спектру	39
3.4	Визначення сиропридатності молока для приготування сиру твердого (Голландського)	44
3.5	Розробка технології виробництва сиру твердого (Голландського) консервованого стафілококовим бактеріофагом	48

3.6	Зміна мікробіоти сиру твердого Голландського консервованого стафілококовим бактеріофагом за зберігання	54
4	Економічна та соціальна ефективність від впровадження розробки	57
	Висновки та рекомендації виробництву	60
	Список використаних літературних джерел	61
	Додатки	71

АНОТАЦІЯ

Для підвищення безпечності швидкопсувних харчових продуктів під час їх виробництва та реалізації використовують декілька технологічних підходів. Зокрема, це застосування температури, високого тиску, ультрафіолетового опромінення та додають консерванти. Метою даного дослідження було провести контроль твердих сичужних сирів за вмістом золотистого стафілококу та розробити технологію його консервування за допомогою літичного стафілококового бактеріофагу.

Встановлено, що в молоці-сировині, яке надходить на переробку для виробництва твердих сирів у 25 до 40 % проб золотистий стафілокок не виявлявся, в середньому 45 % проб молока були контаміновані даним патогеном до 5×10^2 КУО/мл та від 18 до 30 % проб мали вміст стафілококів більше 5×10^2 КУО/мл. У твердих сирах, які реалізуються у торговельній мережі, в середньому в 25 % проб не виділяли золотистий стафілокок, водночас даним мікроорганізмом контаміновані приблизно 30 % проб у кількості більше 5×10^2 КУО/г, що перевищує вимоги стандарту. Відібрано два бактеріофаги, які проявляли в 75,0 – 80,0 % літичну активність відносно культур золотистого стафілококу з молока та з твердих сирів. Дані бактеріофаги були використані у технології консервування твердого сиру Голландського. Розроблено технологію сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом для підвищення його безпечності під час реалізації. Застосування для біоконтролю золотистого стафілококу у сичужному сирі літичних бактеріофагів дозволяє практично повністю знешкодити їх у технології виробництва та визрівання.

Отже, використання літичних бактеріофагів для підвищення безпечності молочних продуктів є екологічно чистим способом стримування розвитку патогенних бактерій, тим самим не впливаючи на заквасочну мікрофлору продукту.

Ключові слова: МОЛОКО-СИРОВИНА, ТВЕРДИЙ СИР, ЛІТИЧНІ БАКТЕРІОФАГИ, ЗОЛОТИСТИЙ СТАФІЛОКОК, БЕЗПЕЧНІСТЬ.

ANNOTATION

Several technological approaches are used to increase the safety of perishable food products during their production and sale. In particular, this is the use of temperature, high pressure, ultraviolet radiation and the addition of preservatives. The aim of this study was to control hard rennet cheeses for the content of *Staphylococcus aureus* and develop a technology for its preservation using a lytic staphylococcal bacteriophage.

It was found that in raw milk, which is processed for the production of hard cheeses, *Staphylococcus aureus* was not detected in 25 to 40% of samples, on average 45% of milk samples were contaminated with this pathogen up to 5×10^2 CFU/ml and from 18 to 30% of samples had a staphylococcal content of more than 5×10^2 CFU/ml. In hard cheeses sold in the retail chain, on average, 25% of samples did not isolate *Staphylococcus aureus*, while approximately 30% of samples were contaminated with this microorganism in an amount of more than 5×10^2 CFU/g, which exceeds the requirements of the standard. Two bacteriophages were selected that showed 75.0 - 80.0% lytic activity against cultures of *Staphylococcus aureus* from milk and from hard cheeses. These bacteriophages were used in the technology of preserving hard Dutch cheese. The technology of Dutch cheese with staphylococcal bacteriophage was developed to increase its safety during sale. The use of lytic bacteriophages for biocontrol of *Staphylococcus aureus* in rennet cheese allows them to be almost completely neutralized in the technology of production and ripening.

Therefore, the use of lytic bacteriophages to improve the safety of dairy products is an environmentally friendly way to inhibit the development of pathogenic bacteria, thereby not affecting the starter microflora of the product.

Keywords: RAW MILK, HARD CHEESE, LYTIC BACTERIOPHAGS, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, SAFETY.

ВСТУП

Тверді сичужні сири характеризуються високою поживною цінністю, біологічним складом та є джерелом добре засвоєного білка. Зазвичай виробництво твердих сичужних сирів здійснюють із коров'ячого молока, а технологічний процес є досить тривалим. Основну мікрофлору даного молочного продукту складає молочнокисла мікробіота внесеної закваски, незначну частину становить залишкова мікрофлора пастеризованого молока, технологічного обладнання та предметів, які мають контакт під час усього технологічного процесу дозрівання [1]. Тому, якісний твердий сир вважається не тільки цінним завдяки харчовим компонентам молока, але й завдяки життєдіяльності його заквасочної мікрофлори, яка селекціонується та виживає під час складного технологічного процесу дозрівання. Згідно ДСТУ 6003 : 2008 Сири тверді, в ньому контролю наступні мікробіологічні показники безпечності: БГКП, *S. aureus*, *Salmonella* та *Listeria monocytogenes*. Зокрема, БГКП не допускаються в 0,01 г, золотистий стафілокок в 1 г не більше 5×10^2 КУО, сальмонели й лістерії в 25 г [2]. Не зважаючи на контроль твердого сиру, як і інших молочних продуктів за мікробіологічними показниками дана категорія продуктів віднесена до тих, які найчастіше є причиною аліментарних інфекцій та отруєнь у споживачів [3]. За даними Європейського управління з безпечності харчових продуктів і Європейського центру профілактики та контролю захворювань, у 2021 році в усіх країнах ЄС та Великобританії було зареєстровано 4005 харчових спалахів, у яких постраждали 32 543 людини [4]. Аналогічна статистика в США, де приблизно 56 000 людей госпіталізуються щороку через хвороби харчового походження [5]. За оцінками ВООЗ, у всьому світі протягом року небезпечна їжа є причиною 600 мільйонів випадків захворювань харчового походження, що спричиняє 420 000 смертей [6]. При цьому найбільш небезпечні харчові патогенні – це *Campylobacter*, *Salmonella* та збудниками, що виробляють токсини – *Staphylococcus aureus* [7, 8].

Тому враховуючи таку тенденцію питання підвищення мікробіологічної безпечності молочних продуктів, в тому числі й твердого сиру є постійно актуальним, а розроблення нових безпечних способів гальмування розвитку

патогенної мікрофлори в ньому або зниження їх у процесі зберігання протягом реалізації є завжди перспективним.

Для підвищення безпечності швидкопсувних харчових продуктів під час їх виробництва та реалізації використовують декілька технологічних підходів. Зокрема, це температурна обробка (пастеризація, стерилізація, заморожування) [9], обробка під високим тиском [10], ультразвуком [11], ультрафіолетовим опроміненням [12], тощо. Водночас досить значного поширення має використання антимікробних речовин синтетичного чи природнього походження для впливу на мікрофлору харчового продукту (хімічні консерванти, природні ефірні олії, тощо) [13]. Кожен із даних способів має свої переваги та недоліки щодо впливу як на мікробіоту продукту, так на основні інгредієнти харчової матриці.

Одним із загальновизнаних і спільних недоліків усіх цих способів є те, що вони впливають на всі мікроорганізми, тобто інгібують, як патогенні, так і потенційно корисні автохтонні молочнокислі бактерії «нормальної» мікрофлори ферментованих продуктів [12]. До того ж, навіть за використання даних доступних способів знешкодження мікрофлори, спалахи харчового походження все ще відбуваються відносно часто [6]. Наведені чинники сукупно ілюструють необхідність цілеспрямованого антимікробного підходу, який можна використовувати у харчовій технології окремо або в поєднанні з іншими способами для встановлення додаткових бар'єрів з метою запобігання потраплянню харчових бактеріальних патогенів до споживачів.

Екологічно безпечним способом пригнічення та знищення мікробіоти у харчовому продукті може бути технологія «біологічного консервування» за допомогою літичних фагів специфічних до конкретного патогена продукту без шкідливого впливу на нормальну заквасочну мікрофлору. Цей підхід називають «біоконтролем бактеріофага» або «біоконтролем фага» [8, 12, 14].

Бактеріофаги – це віруси, які поширені повсюдно в природі і вражають лише бактеріальні клітини. Ці організми характеризуються високою специфічністю, що є важливою ознакою, яка дозволяє використовувати їх у харчовій промисловості. Фаги застосовуються в трьох секторах харчової

промисловості: первинне виробництво, біосанітарія та біоконсервація. Під час біосанітарії фаги або ферменти (ендолізени), які вони виробляють, в основному використовуються для запобігання утворенню біоплівки на поверхні обладнання, що використовується у виробничих приміщеннях. У разі біоконсервації фаги використовуються для продовження терміну зберігання продуктів шляхом боротьби з патогенними бактеріями, які псують їжу [14]. Крім того в останні роки все частіше поширюється тенденція про споживання корисної без хімічних консервантів харчових продуктів, а бактеріофаги можуть бути доброю альтернативою даному процесу [15].

Отже, застосування у технології виробництва молочних продуктів специфічних бактеріофагів проти конкретних збудників харчових інфекцій та токсикозів для покращення їхньої безпечності без шкідливого впливу на самі продукти та корисну мікрофлору, тенденція є актуальна та потребує ґрунтовного дослідження.

Метою даної роботи було провести контроль твердих сичужних сирів за вмістом золотистого стафілококу та розробити технологію його консервування за допомогою літичного стафілококового бактеріофагу.

- оцінити рівні вмісту золотистого стафілококу у молоці-сировині в залежності від гатунку на молокопереробних підприємствах.
- провести контроль твердих сичужних сирів за мікробіологічними показниками та за кількісним вмістом золотистого стафілококу.
- виділити літичні фаги із об'єктів навколишнього середовища специфічні до золотистого стафілококу.
- застосувати специфічні стафілококові бактеріофаги у технологію виробництва твердого сичужного сиру (Голландського) для підвищення його безпечності.
- визначити зміни вмісту бактеріофагів та кількості золотистого стафілококу під час процесу дозрівання сиру.
- оцінити безпечність виробленого твердого сиру із застосуванням літичних стафілококових бактеріофагів протягом усього терміну зберігання.

Об'єкт дослідження – технологія твердого сиру Голландського підвищеної безпечності та мікробіологічної стійкості.

Предмет дослідження – молоко-сировина як джерело літичних проти-стафілококових бактеріофагів, біоконсервування твердих сирів сичужних, технологія твердого сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом, динаміка зміни стафілококів у сирі з бактеріофагом.

Методи досліджень – мікробіологічні (вміст МАФАНМ, БГКП, золотистого стафілококу, бактеріофагів, молочнокислих й масляно-кислих бактерій, інгібувальні речовини) у молоці та сирі твердому) та фізико-хімічні (кислотність, густина, сухі речовини, лактози, величина рН, точка замерзання), мікроскопічні (соматичні клітини) методи оцінки молока-сировини, твердих сирів, статистичні.

Структура роботи. Робота складається зі вступу, розділів «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результатів власних досліджень», списку використаних літературних джерел, який налічує – 92 джерело, додатків. Робота ілюстрована 6 таблицями та 10 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Перспективність застосування бактеріофагів у харчовій промисловості

Продукти харчування слугують основним шляхом передачі понад 200 відомих захворювань. Основними бактеріальними харчовими патогенами, що викликають занепокоєння у органів з контролю за безпечністю харчових продуктів вважається види *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *E. coli*, які продукують токсин Shiga, *S. aureus*, який продукує термостійкі ентеротоксини і *Listeria monocytogenes* [18, 19]. Кожен з цих патогенів може бути пов'язаний з серйозними шлунково-кишковими інфекціями та токсикозами. Тому виникнення захворювань харчового походження залишаються основною причиною госпіталізації та смерті в усьому світі, незважаючи на багато досягнень у сучасних технологіях з виробництва продуктів харчування, включаючи застосовані способи санітарної обробки всього комплексу технологічного обладнання та пакувальних матеріалів і спостереження за патогенами. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), близько 600 мільйонів, а це майже кожна десята людина у світі хворіє після вживання заражених продуктів харчування, при цьому приблизно 420 000 із них помирають щороку [20]. У зв'язку з цим, щоб підвищити безпечність харчових продуктів під час їх виробництва, технологи застосовують багато антимікробних підходів, водночас спалахи аліментарних інфекцій та токсикозів, які передаються через харчові продукти трапляються відносно часто.

В останні роки наукова спільнота все частіше запроваджує у виробництво харчових продуктів новий підхід із кількома перешкодами, щоб запобігти потраплянню харчових бактеріальних патогенів до споживачів, – це використання літичних бактеріофагів для націлювання на певні харчові бактерії в харчових продуктах без шкідливого впливу на їх нормальну – і часто корисну – мікрофлору. Цей підхід називається «бактеріофаг або фаговий біоконтроль»

[12]. Крім того, біоконтроль фагів є, мабуть, найбільш екологічним антимікробним втручанням, доступним на сьогодні. Більшість, якщо не всі, доступні на даний момент комерційні продукти біоконтролю фагів містять природні фаги, тобто фаги, виділені з навколишнього середовища, які не є генетично модифікованими. Багато з цих препаратів також не містять жодних добавок чи консервантів, зазвичай це розчини на водній основі, що складаються з очищених фагів і низьких рівнів солей. Деякі фагові препарати на ринку також сертифіковані як кошерні та халяльні та доступні для використання в органічних харчових продуктах.

Біологічні властивості літичних бактеріофагів та інші якості комерційних продуктів біоконтролю фагів, як пояснено вище, роблять біоконтроль фагів дуже привабливим методом для подальшого підвищення безпечності харчових продуктів, і все більше компаній у всьому світі беруть участь у їх розробці та комерціалізації [22]. Однак поряд із значними перевагами фаговий біоконтроль має свої обмеження та недоліки. Наприклад, фагові препарати вимагають зберігання в холодильнику (зазвичай $+2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$), і якщо вони використовуються разом із хімічними дезінфікуючими засобами, їх, можливо, доведеться застосовувати окремо, оскільки агресивні хімікати також можуть інактивувати фагові частинки та зробити біоконтроль фагів менш ефективним [12]. Крім того, завдяки своїй високій природній специфічності фагові препарати можуть ефективно боротися з цільовими патогенами в харчових продуктах, але якщо продукти харчування забруднені двома або більше харчовими бактеріальними патогенами, фагові препарати, спрямовані проти одного патогена, не будуть ефективними для видалення інших бактерій. Як останнє міркування, слід бути обережним, щоб використовувати літичні фаги та виключити помірні фаги з препаратів бактеріофагів. Помірні фаги зазвичай менш ефективні, ніж літичні фаги, у знищенні своїх бактеріальних господарів. Крім того, помірні фаги здатні інтегрувати свою ДНК у бактеріальну хромосому, а отже, потенційно можуть сприяти передачі генів вірулентності або інших небажаних генів (наприклад, генів, що кодують стійкість до антибіотиків) серед штамів бактерій, що може

призвести до появи нових патогенних штамів. Ризик такого виникнення значно нижчий при використанні літичних фагів [12].

Отже, враховуючи наведені дослідження відмічаємо, що на сучасному етапі розвитку органічних продуктів харчування та зростання обізнаності про здорове харчування нехімічні засоби захисту харчових продуктів стають все більш популярними. Поряд із різними природними способами збереження харчових продуктів використання бактеріофагів із цією метою вважається надзвичайно перспективним. Оскільки, фагові коктейлі відповідають усім критеріям, щоб бути визнаними екологічно чистими технологіями для боротьби з патогенними бактеріями, що передаються через харчовий ланцюг, і бактеріями, що спричиняють вади харчових продуктів. Тому застосування бактеріофагів у харчовій промисловості має ряд суттєвих переваг перед іншими методами боротьби із аліментарними збудниками, а саме [14]:

- Бактеріофаги є високоспецифічними і зазвичай можуть інфікувати лише один вид або один рід бактерій. Таким чином, природна комменсальна мікробіота в шлунково-кишковому тракті людини і тварин не руйнується.
- При застосуванні бактеріофагів не спостерігалось негативного або токсичного впливу на еукаріотичні клітини. Бактеріофаги всюдишні та присутні в багатьох продуктах харчування та різних типах ґрунтів і водних джерелах.
- Бактеріофаги не змінюють фізико-хімічні та сенсорні властивості харчових продуктів.
- Бактеріофаги проявляють високу стійкість до теплового, хімічного та фізичного стресу, що виникає під час обробки харчових продуктів [16, 17].
- Порівняно з іншими застосованими заходами для забезпечення безпечності харчових продуктів, вартість застосування бактеріофагів є відносно низькою і зазвичай суттєво не збільшує собівартість готових виробів. Тоді як обробка консервантами чи застосування фізичних способів зазвичай збільшує витрати на виробництво [21].

Бактеріофаги в основному використовуються в трьох секторах харчової промисловості для забезпечення безпеки харчових продуктів: первинне

виробництво, біоконсервація та біосанітарія [17]. У первинному виробництві фаготерапія використовується шляхом додавання фагів на етапі передзбирального виробництва під час росту рослин або тварин для усунення ймовірності захворювань рослин або тварин. Бактеріофаги також можна застосовувати на стадії після збору врожаю під час обробки харчових продуктів і пакування для контролю зараження потенційними патогенами. Під час біосанітарії бактеріофаги застосовуються для запобігання та зменшення мікробних біоплівки на поверхні технологічного обладнання. При біоконсервації бактеріофаги безпосередньо додають до харчових продуктів для продовження терміну придатності харчових продуктів [16].

1.2. Дослідження впливу комерційних літичних фагів та їх ензимів на патогени в харчових продуктах

Біоконсервація – спосіб інгібування харчових патогенів і мікробіоти, що викликають псування, з метою збільшення терміну придатності харчових продуктів за допомогою природних агентів, тим самим підвищуючи їх безпечність та запобігаючи псуванню [23]. Однією з головних переваг використання бактеріофагів та їхніх ферментів (ендолізинів) як біоконсервантів є їх висока специфічність. Дійсно, дію їх можна спрямувати на конкретні бактерії в харчових продуктах тим самим не впливаючи на мікробну екосистему даного продукту, так і мікробіоту споживачів. У той же час літичні фагові білки мають ширший діапазон, ніж їхні продуценти – бактеріофаги, що полегшує їх застосування. Хоча повідомлялося, що лізини ефективні в різноманітних харчових продуктах, їх використання в молочних продуктах, мабуть, досліджено найбільше. Патогени харчового походження, які виробляють ентеротоксини, такі як *S. aureus* є найбільш цільовими мікроорганізмами в молочних продуктах, оскільки деякі ентеротоксини термостійкі і можуть зберігатися в їжі навіть після того, як бактерії вбиті термічною обробкою [24]. У зв'язку з цим дуже важливо контролювати ці мікроби якомога раніше, перш ніж вони вироблять і виділять ентеротоксини в харчову матрицю. Крім того, дані ентеротоксини можна

виявити в сирі, виготовленому із сирого молока та інших кустарних молочних продуктах, так і за промислового їх виробництва. У таких випадках стафілококові бактеріофаги можуть бути хорошою стратегією для запобігання проліферації бактерій, що продукують ентеротоксин, залишаючи неушкодженими мікроорганізми, що приймають участь у ферментативних процесах.

Деякі патогени здатні протистояти методам обробки харчових продуктів, і цю проблему можна вирішити за допомогою активної харчової упаковки, яка відноситься до системи упаковки, яка взаємодіє з харчовими поверхнями, вивільняючи біоактивні сполуки [25]. У цьому контексті, наприклад, фагові літичні білки можуть бути додані до матриці матеріалу для підвищення безпечності харчових продуктів як антимікробної системи пакування. Знову ж таки, цей підхід був випробуваний лише з бактеріофагами шляхом включення їх у біополімери для створення антимікробних плівок [26, 27], але бактеріофагові лізини також є перспективним варіантом. Крім того, літичні білки не мають деяких потенційних недоліків фагів, особливо щодо розвитку резистентності.

На сьогоднішній день є кілька повідомлень про застосування біоконсервації на основі літичних фагів та їх ендолізинів у різних харчових продуктах, найбільш широко вивченими є молочні продукти. Дійсно, численні ендолізени були успішно протестовані проти *S. aureus* у молоці. Наприклад, проти стафілококовий бактеріофаговий лізин LysH5 досягав 8-логарифмічного зниження за 6 годин, а CHAP-SH3b міг усунути *S. aureus* за 15 хвилин у різних гатунках коров'ячого молока [28]. Подібним чином діяли бактеріофагові ендолізени CHAPK_CWT-LST і Ami2638A, які також показали швидку антистафілокову активність у молоці, а ензим Lys109 досяг такого ж самого ефекту, але потребував 45 хвилин інкубації [29, 30]. У недавньому дослідженні ендолізени LysRODI та його похідний варіант LysRODIΔAmi показали добру ефективність проти *S. aureus* у молоці та під час виробництва свіжого сиру в лабораторних масштабах [30]. Цікаво, що сконструйований лізин LysRODIΔAmi продемонстрував набагато вищу літичну активність порівняно з його вихідним білком, що є перспективним кандидатом для біоконсервації молочних продуктів.

Дослідники вказують на позитивному ефекті від застосування очищеного фагового ендолізину, який безпосередньо додавали до пастеризованого молока, попередньо зараженого *S. aureus*, у концентраціях 10^6 і 10^3 КУО/мл. Найвища протестована доза ендолізину (88 мкг/мл) зменшила кількість життєздатних клітин бактерій до невизначеного рівня через 4 години після застосування ферменту. Через 60 хвилин обробки 88 мкг/мл бактеріофаговим ендолізином відбулося зменшення кількості бактеріальних клітин на одиницю log нижче контрольної культури. Нижчий рівень забруднення вимагав пропорційно меншої дози ферменту для завершення елімінації бактеріальних клітин через 4 години [42].

Listeria monocytogenes відноситься до основного харчового патогену, що викликає занепокоєння у сфері охорони здоров'я, оскільки з цією бактерією пов'язаний із високим рівень смертності серед осіб із групи ризику, таких як вагітні жінки, новонароджені, особи з ослабленим імунітетом та люди похилого віку [38]. Тому надзвичайно важливо забезпечити безпеку харчового ланцюга, особливо у випадку готових до споживання продуктів. Показано, що застосування бактеріофагів до різноманітних харчових продуктів ефективно зменшує забруднення *L. monocytogenes*. Специфічний для *Listeria* фаг був ефективним проти *L. monocytogenes* при окремому застосуванні та, крім того, підвищував ефективність інших протимікробних препаратів, таких як діацетат натрію та лактат калію, при спільному застосуванні [39, 40].

Інші дослідження були зосереджені на потенціалі фагових літичних білків таких як PlyP100 для усунення *Listeria monocytogenes* у сирі, даний ендолізін, може протистояти високим температурам, високим концентраціям NaCl, низькому рН і тривалому зберіганню у свіжому сирі [32]. Іншим гарним прикладом боротьби з *L. monocytogenes* є використання ендолізину LysZ5 у соєвому молоці при температурах охолодження, де зниження на 4 log було досягнуто протягом 3 годин після обробки [33]. Дослідники також виявили, що бактеріофаговий ендолізін LysZ5 був специфічним для *Listeria spp.* і здатний руйнувати клітини-господарі при холодних температурах зберігання.

З моменту офіційного схвалення першого продукту на основі фагів, ListShield™ (схваленого в 2006 році як «загальновизнаного та безпечного») для використання в боротьбі з *L. monocytogenes* у м'ясі та продуктах з птиці, спроби розробити нові на основі фагів технології контролю патогенів у харчових продуктах після збору врожаю зросли [33, 34].

Інфекції сальмонелою харчового походження є серйозною проблемою для охорони здоров'я в усьому світі. Усі фаги сальмонели, про які повідомлялося на даний момент, змогли зменшити кількість життєздатних клітин, присутніх у сирому м'ясі, оброблених харчових продуктах і харчових продуктах, що переробляються, а також у свіжих продуктах, але не на скибочках яблук. Це вказує на те, що кислий рН яблук міг інактивувати фаги [41].

Повідомляється, що бактеріофаги PA13076 і PC2184 при 1×10^8 БУО/мл також виявилися ефективними для інгібування *S. enteritidis* у пастеризованому незбираному молоці при температурі охолодження, про що свідчить зменшення приблизно на 4 логарифми кількості життєздатних бактерій [47]. Подібним чином діяв проти сальмонельозний бактеріофаг LPSE1, який продемонстрував здатність знезаражувати молоко питне контаміноване сальмонелою *S. enteritidis* при $+ 28^\circ\text{C}$ у кількості приблизно $2,37 \log$ бактеріальних клітин в мл [48].

Основними організаціями, які схвалюють коктейлі з бактеріофагів для використання в агропродовольчому секторі, є Європейське агентство з безпеки харчових продуктів (EFSA) і Управління з контролю за продуктами й ліками США (FDA). Виробництво комерційно доступних коктейлів із бактеріофагів має здійснюватися відповідно до належної виробничої практики. Бактеріофаги, що використовуються в продуктах на основі фагів, повинні бути суворо літичними (використання лізогенних фагів для фагової терапії небажано через горизонтальний перенос генів) і ефективними проти максимально можливої кількості штамів, що належать до цільової бактерії [35]. Рекомендується використовувати коктейлі, що складаються із суміші бактеріофагів, щоб досягти підвищення ефективності та уникнути утворення штамів, стійких до бактеріофагів [33, 36]. Зміни в складі фагових коктейлів слід проводити

систематично, однак це може бути пов'язано з додатковими труднощами у виробництві цих коктейлів. Наприклад, відповідно до регламентів ЄС (1107/2009 ЕС), зміни складу засобів захисту рослин на основі бактеріофагів можуть потребувати нової реєстрації [37].

Стратегія технології перешкод була застосована в харчовій промисловості після спостережень про те, що швидкість виживання мікроорганізмів значно знижується, коли мікроорганізми стикаються з кількома антимікробними факторами або перешкодами [43]. Декілька досліджень продемонстрували синергічний ефект використання бактеріофага з іншим харчовим антимікробним препаратом, таким як нізин [44] і *транс*-коричним альдегідом олії [45]. Дослідники також вказують, що антибактеріальний ефект покращувався, коли фаги поєднували із захисною культурою або упаковкою в модифікованій атмосфері [46].

Таким чином з підрозділу випливає, що застосування природніх бактеріофагів та їх ензимів є надзвичайно актуальний напрям наукових досліджень у харчовій промисловості з метою консервування харчових продуктів, зменшення мікробіологічного ризику та збільшення терміну їх зберігання. До того ж ми можемо підсумувати, що для розроблення ефективних літичних бактеріофагів, які б можна додавати до харчового продукту необхідно знати мікробіологічний склад даного продукту. При цьому переваги будуть мати бактеріофаги у вигляді коктейлів, які будуть діяти на ширший діапазон харчових патогенів.

1.3. Використання бактеріофагів для санації поверхонь технологічного обладнання у харчовій промисловості

Утворення мікробіологічних біоплівки на поверхнях обладнання є однією з головних проблем підприємств харчової промисловості. Бактеріальні біоплівки визначаються як агрегати клітин, укладених у матрицю позаклітинних полімерних речовин, яка самостійно виробляється, і прикріплені до біотичних або абіотичних поверхонь [49]. Бактеріальні клітини, що утворюють біоплівки,

характеризуються високою стійкістю до несприятливих умов навколишнього середовища, антибіотиків і дезінфікуючих засобів [49]. У харчовій промисловості з виробництва молочних продуктів більшість патогенних бактерій включають: види *Staphylococcus spp.*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Yersinia spp.*, які здатні прилипати до поверхонь обладнання, де вони можуть рости, утворюючи біоплівки [50]. Доступність проникнення дезінфікуючих засобів у структуру матриксу біоплівок даних мікроорганізмів ускладнена внутрішньою будовою біоплівок. Це вимагає створення нешкідливих для людини екологічно безпечних препаратів, які усувають біоплівки на поверхнях обладнання. У цьому контексті бактеріофаги дають надію на створення безпечних для людини дезінфікуючих засобів [50].

Campylobacter jejuni є однією з патогенних бактерій, які можуть утворювати біоплівки на матеріалах, які зазвичай використовуються в харчовій промисловості (наприклад, на полівінілхлориді та нержавіючій сталі). Виділені літичні бактеріофаги CP8 і CP30 з екскрементів птиці, використовували для запобігання утворенню біоплівки *C. jejuni* в лабораторних умовах на чашках Петрі. Дослідники помітили, що бактеріофагова обробка кожної утвореної мікробної біоплівки призводила до зменшення кількості життєздатних клітин на 1,0–3,0 log КУО/см² через 24 години після інфікування, порівнюючи з контрольною біоплівкою, не обробленою бактеріофагами. Рівень зниження та можливість розвитку резистентності до фага варіював залежно від штаму, що утворював біоплівку. Штам *Campylobacter jejuni* PT14 характеризувався здатністю виробляти набагато більшу кількість біоплівки на поверхні скла, ніж штам *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. Крім того, серед бактерій, які вижили після обробки бактеріофагами не залишалося резистентних клітин *Campylobacter jejuni* [51].

Listeria monocytogenes є ще однією патогенною бактерією, яка викликає харчове отруєння, і здатна утворювати біоплівку на поверхнях технологічних ліній, обладнання з нержавіючої сталі молокопереробних підприємств. Ефективність комерційно доступного бактеріофага P100 перевіряли на біоплівці, яка була сформована *Listeria monocytogenes* на поверхні зразка з нержавіючої

сталі. У цьому дослідженні автори використали 21 штам, які були з 13 різних серотипів. Виявлено значні відмінності в здатності різних штамів *L. monocytogenes* утворювати біоплівки. Зменшення популяції *L. monocytogenes* до рівня $5,4 \log/\text{cm}^2$ спостерігалася через 24 години після обробки фагом дводенної біоплівки, що була сформована поверхні обладнання з нержавіючої сталі. Бактеріофагова обробка багатошарової 1-тижневої біоплівки призводила до зменшення клітин у біоплівці до рівня $3,5 \log/\text{cm}^2$. з цих досліджень автори зробили висновок, що бактеріофаг P100 характеризується широким спектром господарів *Listeria monocytogenes* і демонструє значну здатність до зменшення матриксу біоплівки сформованої *L.monocytogenes* незалежно від серотипу чи щільності біоплівки [52].

Отже, мікробні біоплівки – це динамічні структури, сприйнятливість яких до бактеріофагів залежить від типу бактеріофага та його здатності виробляти ензими, які можуть впливати на деградацію екзополісахаридного матриксу біоплівки, до того ж від наявності чутливих рецепторів для фага.

Наукові дослідження повідомляють, що крім бактеріофагів найбільший потенціал для боротьби з бактеріальними біоплівками проявляють їхні ферменти, що виробляються бактеріофагами (деполімерази та ендолізینی). Фагові деполімерази й ендолізینی можуть розщеплювати клітинно-асоційовані полісахариди, такі як структурні або капсульні полісахариди, а також біоплівковий матрикс, щоб полегшити клітинну адгезію бактеріофагів. З моменту відкриття та першого опису фагової деполімерази у 1929 році було описано активність 160 передбачуваних бактеріофагових деполімераз, які специфічні для *E. coli*, *E. amylovora*, *Azotobacter vinelandii*, *Vibrio cholerae* O139 та *Pseudomonas agglomerans*. Більшість досліджених деполімераз виділено з бактеріофагів родини *Myoviridae*, *Siphoviridae* та *Podoviridae*. Фагові деполімерази є невід'ємною частиною фагових частинок, які знаходяться переважно на хвостових волокнах і базових пластинках бактеріофагів. Ці ферменти також можуть з'явитися у формі розчинних білків, що виділяються під час лізису клітин-господарів. Було помічено, що деякі бактеріофаги здатні продукувати лише одну форму деполімераз, тоді як деякі (тобто фаги F1 і F29,

специфічні для *E. coli*) здатні продукувати обидві форми деплімераз – пов'язану та не пов'язану з фаговими частинками [53]. Активність деполімераз визначається по площі постійно зростаючої чистої зони бактеріофагової бляшки. Ефект ореолу є результатом надмірної секреції деполімераз, яка дифундує в середовище і позбавляє бактерії капсули під час стаціонарної фази їх росту. Залежно від їх каталітичної активності, бактеріофагові деполімерази можна класифікувати на дві групи, гідролази (також відомі як полісахарази) і ліази, які далі поділяються на різні підкласи, наприклад, полісахарази поділяються на ендоглюкозидазу, ендогалактозидазу та ендорамнозидазу, а ліази є поділяється на альгінат і гіалуронанліазу [53, 54]. Більшість бактеріофагів і фагоподібних ферментів характеризуються високою специфічністю до своїх мікробів-господарів. Щоб підвищити життєздатність бактеріофагів під час застосування в польових умовах, була розроблена система «носій-фаг», яка використовує непатогенну епіфітну бактерію, яку називають «носієм». «Носій» захищає бактеріофаги під час обробки та польового застосування. Екзополісахаридний шар є першим клітинним компонентом, з яким стикаються бактеріофаги під час інфікування бактерій, які перебувають у біоплівці [55]. Описано антимікробну активність деполімераз, що продукується фагом SF153b, проти біоплівки, утвореної патогеном *Enterobacter agglomerans*. Біоплівку бактерій обробляли сумішшю специфічного фага *E. agglomerans* та бактеріофаговими деполімеразами протягом 180 хвилин. Наприкінці впливу в біоплівці спостерігалось зниження кількості бактеріальних клітин у 1992 рази. Вплив на біоплівку лише ферментом деполімеразою призвело до 120-кратного зменшення життєздатних клітин біоплівки. Зменшення кількості клітин біоплівки в 61 раз відбулося, коли для обробки біоплівки, утвореної резистентним штамом M53b, використовували суміш фага та фагової деполімерази [56]. Виявлено синергічний ефект застосування бактеріофагової деполімерази та діоксиду хлору на руйнування структури бактеріальної біоплівки сформованої клебсіелою. Встановлено, що штам *Klebsiella* spp., яка була виділена з харчового обладнання у виробничому цеху здатна утворювати біоплівку. Водночас, після 4-годинного впливу на біоплівку бактеріофагової деполімерази було досягнуто на 80 %

зменшення бактеріальних клітин у біоплівці. Дослідники також помітили, що обробка біоплівки сформованої *Klebsiella* бактеріофаговими деполімеразами протягом 4 годин з наступною 30-хвилинною обробкою діоксидом хлору спричиняла до усунення 92 % клітин в біоплівці [57].

Другим типом ензимів, який виробляють бактеріофаги, які потенційно можуть застосовуватися в біодезінфекції є ендолізینی. Ендолізینی виробляються бактеріофагами під час кінцевої стадії їхнього літичного циклу та дозволяють вивільняти потомство віріонів через деградацію пептидоглікану, присутнього в клітинній стінці [53]. Їх також можна застосовувати екзогенно для знищення грампозитивних бактеріальних клітин, водночас грамнегативні бактерії мають зовнішню мембрану, яка захищає їх від активності ендолізіну. Лізини класифікуються на п'ять різних груп на основі їх сайтів розщеплення в пептидоглікані: глікозамінідази, літичні трансглікозилази, мурамідази, амідози та ендопептидази [58]. Виявлено, що ендолізін LysH5, що виробляється фагом *S. aureus* *vB_SauS-phiIPLA88*, знижує кількість стафілококів на 1,0–3,0 логарифмічних одиниць у біоплівці нанесеної на полістирол, порівнюючи з необробленим контролем [59]. Згідно з Oliviera та ін. (2014), для досягнення високої ефективності ендолізінів проти грамнегативних бактерій потрібен додатковий фактор, який руйнує зовнішню мембрану шляхом дії на оболонку бактерії [60]. Їхнє дослідження показало, що лимонна або яблучна кислоти є пермеабілізаторами зовнішньої мембрани, і показало, що комбінація лізіну Lys68 з лимонною або яблучною кислотою призвела до зниження на 3,0–5,0 логарифмів клітинної концентрації біоплівки сформованої сальмонелою *S. Typhimurium* LT2 після 2 годин обробки [61]. Також доведено синергічний ефект ендолізіну LysK і деполімерази DA7 на біоплівку стафілокока. Навіть дуже низькі концентрації нано- та мікромолярних сумішей цих двох ферментів були ефективними для видалення біоплівки з полістиролу та скляних поверхонь сформованих стафілококами [62]. Нещодавно відкритий ендолізін LysCSA13, виділений з вірулентного фага CSA13, також мав великий потенціал для боротьби з біоплівками *S. aureus*. LysCSA13 проявляв сильну антимікробну активність проти штамів *S. aureus* при pH 7,0–9,0, 4,0–37,0 °C і в

присутності Ca^{2+} і Mn^{2+} . Ендолізин LysCSA13 був здатний зменшувати біоплівки на 80–90 % на поверхні полістиролу, скла та нержавіючої сталі [63].

Отже, специфічні бактеріофаги можуть бути корисними в молочній промисловості, завдяки високій літичній специфічності фаги можуть бути використані для знищення хвороботворних мікроорганізмів, наприклад, стафілокока, який часто зустрічаються в молочних продуктах. Забруднене стафілококом пастеризоване молоко було піддано впливу трьох літичних фагів: SA, SANF і SA2. Усі три фаги показали підвищену здатність зменшувати вміст бактерій роду *Staphylococcus* від 4 до 6 годин після зараження [68].

Таким чином бактеріофаги та синтезовані ними ензими вважаються перспективними, екологічно чистими об'єктами, які можуть бути використані для розроблення сануючих засобів здатних впливати на основні аліментарні патогени наявні на поверхнях технологічного обладнання. До того ж їхня дія є активною, як до вільно плаваючих, так і біоплівкових форм бактерій, що може розширити їх використання у технології виробництва навіть органічної продукції.

1.4. Негативне значення від циркуляції бактеріофагів специфічних до молочнокислих бактерій на молочних підприємствах

Поряд із важливою позитивною роллю можливості використання бактеріофагів у боротьбі з аліментарними патогенами у харчових продуктах, деякі фаги являються небажаними та технічно шкідливими у харчових технологіях де проходять ферментативні процеси. Оскільки, завдяки повсюдній присутності та постійному підтримці бактеріальних популяцій бактеріофаги можуть призвести до величезних фінансових втрат у харчовій промисловості. Присутність специфічних бактеріофагів особливо небажана в промисловості, де бактерії використовуються для виробництва біомолекули або хімічної сполуки. Небажана присутність бактеріофагів найчастіше фіксується у фармацевтичній, хімічній, кормовій, пробіотичній та харчовій промисловості. Зокрема, у

молочній промисловості бактеріофаги можуть гальмувати або повністю руйнувати процес бродіння шляхом лізису молочнокислих бактерій [64]. Найпоширенішими заквасками, які використовуються в молочній промисловості вважаються препарати у склад яких входять молочнокислі бактерії *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc spp.* і *Lactobacillus spp.* Було визначено, що бактеріофаги, які здатні знищувати заквасочні мікроорганізми належать до родин вірусів *Caudovirales*, *Podoviridae* та *Siphoviridae* [65]. Існує багато джерел фагового забруднення ферментованих продуктів, які включають сире молоко та суху сироватку [65]. Сире молоко є природним резервуаром лабораторних бактерій і, отже, також може містити специфічні бактеріофаги. Джерелом зараження бактеріофагами можуть бути також закваски лабораторних культур. Помірні фаги інтегрують свій генетичний матеріал із генетичним матеріалом бактерії-господаря, який може пасивно передаватись клітинам-нащадкам бактерій під час реплікації бактеріальних клітин. У життєвому циклі фага помірний бактеріофаг молочнокислих бактерій може залишатися у формі профага тривалий час, не приводячи до лізису бактеріальних клітин. Потім під час виробництва молочних продуктів виникає стрес у бактерій, який пов'язаний з обробкою сировини, це може активувати профаг і запустити літичний цикл, що в кінцевому випадку призводить до загибелі клітин молочнокислих бактерій під час ферментації [65]. У дослідженнях було перевірено 30 комерційних штамів молочнокислих бактерій *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* або *Lactobacillus rhamnosus*, які виділені з молочних продуктів на наявність профагів у геномі. Виявлено, що з 30 протестованих штамів 25 мали в геномі індукцйбельні профаги [66]. Тому більшість комерційно доступних заквасок для молочних продуктів перевіряють на наявність фагів, перш ніж вони потраплять до споживачів. Іншими важливими джерелами зараження бактеріофагами є повітря та поверхня молочних заводів. Це є основною проблемою на сироварнях, тому що відділення сироватки часто призводить до аерозольних фагів і, отже, до забруднення навколишнього середовища підприємства. Тому сироваткові білки, які використовуються для переробки в на різні сирні продукти піддаються УФ-випромінюванню, термічній обробці та

мембранній фільтрації. Ці методи спрямовані на усунення ризику збою бродіння під час переробки сироватки [67]. Таким чином через всюдищу природу бактеріофагів, які інфікують закваски з молочнокислими бактеріями, у виробничому середовищі важко повністю усунути потенційну інфекцію та запобігти збою ферментації. Однак ризики зриву процесу бродіння молочної сировини можна зменшити за допомогою наступного:

- Використання ефективних дезінфікуючих засобів – надоцтова кислота та гіпохлорит натрію є одними з найефективніших біоцидів, перевірених щодо специфічних молочнокислих фагів. Доступно дуже мало даних щодо ефективності обробки озоном та ультрафіолетового опромінення фагів у промисловому середовищі.
- Простий і старий метод, який все ще використовується на виробничих підприємствах (переважно сироварні), – це ротація штамів молочнокислих бактерій.
- Перспективними є методи генної інженерії, які дозволяють конструювати стійкі до бактеріофагів штами молочнокислих бактерій.

1.5. Токсикози стафілококової етіології, які виникають через споживання молока і молочних продуктів

Літературні дані повідомляють, що молочні продукти є другим провідним джерелом патогенних для людини мікроорганізмів, які спричиняють близько 14 % захворювань харчового походження та 10 % смертей [72]. Серед аліментарних харчових патогенів – бактерії роду *Staphylococcus* займають одне із провідних місць, оскільки ці мікроорганізми широко розповсюджені у навколишньому середовищі та вважаються убіквітарними. Рід *Staphylococcus* – грампозитивні бактерії, сферичні клітини цього роду зазвичай розташовані у формі винограду та нагадують нерегулярні скупчення. На сьогоднішній день рід *Staphylococcus* включає щонайменше 40 видів, які є звичайними мешканцями шкіри та дихальних шляхів людини та теплокровних тварин, деякі види також зустрічаються в ґрунті та водному середовищі як частина природної мікробної

флори [7]. Більшість видів стафілококів є коагулазонегативними, виняток становлять *Staphylococcus aureus*, *Staph. intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus lutrae* та деякі штами *Staphylococcus hyicus*. Такі представники роду *Staphylococcus*, як наприклад *Staphylococcus aureus* (золотистий стафілокок) мають здатність викликати у людини різні інфекції, починаючи від легкого отруєння до захворювань, що загрожують життю [3], інші види, зокрема такі як *Staphylococcus epidermidis* визнаний новим патогеном, що спричиняє ряд інфекцій у пацієнтів з ослабленим імунітетом [13]. Золотистий стафілокок розглядається як важливий збудник харчового отруєння і його присутність у харчових продуктах вказує на недотримання правил гігієни [3]. Інші види стафілококів відомі своєю позитивною роллю у харчовій промисловості, зокрема ферментації харчових продуктів, такі види як *Staphylococcus saprophyticus* і *Staphylococcus scuri* використовують у складі закваски у виробництві ферментованого м'яса [9]. Зважаючи на те, що харчові продукти можуть бути легко заражені патогенними стафілококами (наприклад *S. aureus*) і тому стійкі до антибіотиків гени та інші детермінанти вірулентності можуть легко переноситися між патогенними та непатогенними стафілококами (наприклад, *S. scuri*), які використовуються в стартових культурах. З точки зору охорони здоров'я це вимагає оцінка харчових продуктів на наявність і характеристику видів стафілококів, що містяться в харчових продуктах.

Патогенність *S. aureus* і його здатність спричиняти захворювання пояснюється рядом факторів вірулентності, таких як термостабільні ентеротоксини [3]. *S. aureus* виробляє 15 ентеротоксинів, зокрема відомо, що п'ять класичних ентеротоксинів (SE, тип А, В, С, D і Е) є відповідальними за 95 % випадків стафілококових харчових отруєнь, решта випадків викликана новими типами SE (SEG- SEO) [70]. Золотистий стафілокок є універсальним патогеном, який виробляє низку екзопротейнів із токсикологічним ефектом щодо людини та тварини, такі як гіалуронідаза, стафілокіназа, нуклеази, ліпази, протеази, колагенази, гемолізینی, ексфоліативні токсини та суперантигенні білки, що викликають токсичні реакції в організмі [68]. Токсин синдрому шоку-1 (TSST-1),

стафілококові ентеротоксин-подібні білки (SEIs) і стафілококові ентеротоксини (SEs). Серед цих екзотоксинів ентеротоксин найчастіше асоціювали з отруєнням молочними продуктами.

Однак роль нещодавно виявлених ентеротоксинів у харчових отруєннях повністю не з'ясована і тому розробка нових методів профілактики харчових отруєнь шляхом покращення гігієни технологічного процесу та застосування біологічних агентів – бактеріофагів є оправданим і перспективним.

Стафілококовий харчовий токсикоз – це легка інтоксикація, яка виникає після вживання продуктів, що містить від 20 нг до 1 мкг стафілококового ентеротоксину (SE), якого достатньо, щоб викликати симптоми у людини [71]. Симптоми стафілококового токсикозу з'являються через 1 – 6 годин після прийому зараженої їжі, залежно від індивідуальної чутливості та прийнятої токсичної дози. Вони включають нудоту, спазми в животі, діарею та характерну блювоту. Клінічні ознаки стафілококового токсикозу зазвичай зникають протягом 24 – 48 год. Смертельні випадки трапляються рідко, найчастіше у малих дітей або літніх людей [3, 70]. Пастеризація молока вбиває клітини *S. aureus*, а ферментація або дозрівання сиру може запобігти росту *S. aureus* у сирі. Однак після продукування термостабільних ентеротоксинів SEs їх біологічну активність не змінюється [70].

До того ж види коагулазонегативних стафілококів, які використовуються в молочних продуктах, зазвичай зустрічаються у навколишньому середовищі та харчових продуктах, як невід'ємна частина природної флори. Ризик спалахів отруєнь або інфекцій, спричинених коагулазонегативними стафілококами, пов'язаних зі споживанням молочних продуктів, має бути практично нульовим, оскільки, наскільки відомо, що жоден вид коагулазонегативних стафілококів, виділених із молока чи молочних продуктів, ніколи не був виділений під час розслідування випадків харчових отруєнь [73].

У дослідженнях [74] повідомляється, що *Staphylococcus aureus* є важливим умовно-патогенним мікроорганізмом, який може викликати інфекції у теплокровних тварин і є основною причиною нозокоміальних інфекцій у людей і маститу великої рогатої худоби. Також *Staphylococcus aureus* є одним із

найпоширеніших збудників харчових отруєнь [75], що призводить до 241 000 захворювань на рік у Сполучених Штатах і є одним із основних агентів, причетних до хвороб харчового походження в Бразилії [76]. У харчових продуктах ентеротоксигенні штами *S. aureus* можуть виробляти термостабільні та стійкі до протеази стафілококові ентеротоксини (SE), що спричиняє одну з найпоширеніших інтоксикацій харчового походження, що призводить до швидких клінічних симптомів, таких як спазми в животі, нудота, блювання та діарея [75]. На сьогоднішній день описано понад 20 різних стафілококових ентеротоксинів, включаючи SEA та SED, відповідальний за більшість стафілококових харчових отруєнь, а також у меншій кількості випадків SEB, SEC, SEE, SEG, SEH [77]. У 2012 році в Європі було зареєстровано 346 спалахів, спричинених стафілококовими ентеротоксинами [78]. Однак не всі штами *S. aureus* несуть гени, що продукують термостабільний стафілококовий ентеротоксин, тому ризик для людей від різних *S. aureus* може бути різним.

Staphylococcus aureus було виділено з кількох харчових продуктів, включаючи декілька готових до вживання продуктів і неналежна гігієна персоналу, а також погана санітарія є одними з основних причин перекресного забруднення [79]. *S. aureus* здатний виживати на сухій нержавіючій сталі, і його можна легко перенести з губок на поверхні з нержавіючої сталі, а потім і на харчові продукти [7]. У молочній промисловості *S. aureus* можна виділити майже на кожному етапі виробництва. Крім танків охолоджувачів та навколишнього середовища, сире молоко може бути одним із шляхів контамінації, як наслідок субклінічного або клінічного маститу великої рогатої худоби [3]. *S. aureus* може потрапляти в молоко і виробляти ентеротоксини, що є однією з найпоширеніших проблем безпечності харчових продуктів [3]. Крім того, стафілококові ентеротоксини можуть вироблятися у продукті під час зберігання, якщо умови дозволяють розвитку *S. aureus*. Повідомляється, що у Бразилії до 30 % молока виробляють дрібні виробники [80], а м'які сири, такі як Minas frescal широко споживаються у країні. Цей конкретний сир є незрілим напівжирним і має високу вологість, що забезпечує сприятливі умови для росту багатьох патогенів, включаючи *S. aureus*, який часто є причиною харчових захворювань [77]. У

багатьох країнах мікробіологічні правила для сирів мають максимальні рівні контамінації *S. aureus* 10^3 КУО/г. Однак технологія виробництва сирів вважається сприятливою щодо розвитку *S. aureus* по ходу всього технологічного процесу.

Крім харчових отруєнь *S. aureus* викликає серйозне занепокоєння через його здатність набувати гени стійкості до антибіотиків, поширюватися в навколишньому середовищі та протистояти лікуванню [73]. Стійкі до метициліну штами *Staphylococcus aureus* (MRSA) спричиняють більшість внутрішньолікарняних інфекцій у всьому світі [78] і спостерігається збільшення випадків виявлення MRSA в суспільстві, середовищі худоби та харчових продуктах [7].

Таким чином, підсумовуючи оглянуті літературні джерела щодо перспективності використання бактеріофагів та продуктів їх синтезу – деполімераз і ендолізинів у технології виробництва молочних продуктів як екологічно чистих консервантів відмічаємо наступне. Бактеріофаги проявляють високу літичну активність щодо специфічних мікробіних клітин – господарів, при цьому не впливають негативно на сенсорні, органолептичні, фізико-хімічні показники молочного продукту та технологічний процес виробництва. Крім того додавання бактеріофагів до харчових продуктів сприяє підвищенню їх безпечності за харчовими патогеннами, а отже і продовження терміну реалізації. Дослідження також повідомляють, що доцільніше виробляти препарати бактеріофагів у складі, яких наявні декілька активних фагів проти різних патогенів, це дозволить розширити профілактичний потенціал їхньої дії. Водночас серед харчових продуктів – молочні вважаються тими, з якими найчастіше пов'язують аліментарні захворювання. Серед збудників харчових інфекцій та токсикозів – золотистий стафілокок посідає одне з перших місць, який контамінує молочні продукти. Тому практично усі молочні продукти містять вимогу щодо максимально допустимої кількості цього патогенна. Однак під час технології виробництва і реалізації продуктів часто складаються умови, що зумовлюють розвиток ентеротоксигенних стафілококів – збудників токсикозу. Тому на нашу думку є надзвичайно актуальним у технології

виробництва твердих сичужних сирів додавати літичні проти стафілококові бактеріофаги для підвищення мікробіологічної стійкості даних видів продуктів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Увесь комплекс досліджень за темою кваліфікаційної роботи проведений у науково-дослідних лабораторіях кафедри технологія молока та молочних продуктів Львівського національного університету ветеринарної медицини та

біотехнологій імені С.З. Гжицького. Блок схема виконання експериментів за темою магістерського дослідження наведено на рис. 2.1.

2.1. Етапи виконання роботи

З блок-схеми видно, що робота виконувалася за п'ятьма етапами, які мали на меті розробити технологію сиру Голландського безпечного за вмістом стафілококу навіть за тривалої реалізації.

На першому етапі (розділ 1) нами проведено значний огляд літературних джерел з проблеми зниження стійкості молочних продуктів за їх зберігання, щодо збудників, які найчастіше спричиняють аліментарні інфекції та токсикози, використання бактеріофагів для боротьби із патогенними харчових продуктів.

На другому етапі (проведення експериментів) здійснено моніторинговий аналіз щодо наявності ентеротоксигенних стафілококів у молоці-сировині та твердих сирах на відповідність гранично допустимої кількості.

На третьому – проведено мікробіологічний аналіз молочної сировини на наявність літичних фагів, які б лізували культури коагулазопозитивних стафілококів виділених з твердих сирів. Перевірено спектр літичних властивостей у виділених бактеріофагів та відібрано для введення у технологію сиру два найбільш літичні фаги.

На четвертому – удосконалено технологію сиру Голландського шляхом консервування його стафілококовими бактеріофагами, здійснено комплекс досліджень (мікробіологічні й фізико-хімічні) щодо визначення впливу доданих бактеріофагів на технологічний процес визрівання сиру Голландського.





Рис. 2.1. Блок-схема проведення дослідження

На п'ятому – було досліджено вплив стафілококових бактеріофагів на кількість коагулазопозитивних стафілококів у сирі Голландському за двох режимів зберігання продукту.

2.2. Використанні методи досліджень

Під виконання кваліфікаційної роботи використанні, в основному стандартні методи, які передбачали визначення мікробіологічних й фізико-хімічних показників сировини й готового продукту виробленого за удосконаленої технологією. Зокрема, у молоці-сировині та Голландському сирі визначали контамінацію їх золотистим стафілококом шляхом посіву відібраних проб та десятикратних розведень на селективне середовище гемоагар з 5 % натрію хлориду, з наступним термостатування за +37 – 48 год та підрахунку колоній з інтерпретацією на 1 мл/г продукту. Культури золотистого стафілококу – це гемолітичні, які ферментують глюкозу зі здатністю до плазмокагуляції кролячої плазми [1, 3].

Виділення бактеріофагів з молочної сировини проводили шляхом використання бактеріальних клітин золотистих стафілококів в якості специфічних господарів відповідно до загальних методик [87], при цьому використовували відділення бактеріофагів від клітин мікроорганізмів шляхом фільтрації через бактеріальні фільтри 0,45 мкм. Спектр літичної дії виділених з молочної сировини протистафілококвих фагів визначали до культур з твердих сирів.

Під час виробництва твердих сирів (дослідного й контрольного зразка) використовували наступні методи для визначення сиропридатності молока-сировини: сичужну, бродильну, сичужно-бродильну проби згідно мікробіологічного практикуму [1], вміст МАФАНМ, БГКП, молочнокислі бактерії (в сирі) за ДСТУ 7357 : 2013 [89, 90], соматичні клітини у молоці сировині за ДСТУ [91] метод Прескотта-Бріда, інгібувальні речовини (антибіотики) за допомогою комерційного експерес-тесту – BRT, кислотність молока – титрометричним методом, білок, жир, густину за допомогою автоматичних аналізаторів типу Екомілк.

Під час удосконалення технології сиру Голландського зі стафілококовим бактеріофагом було вироблено два зразки сиру – один дослідний зі бактеріофагом, а другий був контрольний – без бактеріофагу.

Мікробіологічні показники сиру під час визрівання визначали за ДСТУ [89], а фізико-хімічні за методиками з практикуму з біохімії молока [92].

Усі отримані результати піддавалися загально визначеним методам статистичної обробки, з використанням програми Statistica 10 при цьому за $P \leq 0,05$ цифрові дані вважали вірогідними.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Обґрунтування доцільності використання бактеріофагів для впливу на умовно-патогенну мікрофлору

У технології твердих сирів мікробна активність має вирішальне значення у формуванні смакових, структурно-механічних, біохімічних властивостей та показників безпечності готового продукту [81, 82]. Унаслідок чого інтерес до розуміння походження та складу мікробіоти в дозрілих сирах а, отже, до розуміння ролі, яку виконують різні мікроорганізми щодо розвитку та виникнення тих чи інших властивостей є постійною сферою досліджень науковців-технологів молочної справи [83].

Тверді сичужні сири – це дуже популярна й типова група молочних продуктів в Україні та Європі в цілому, які виготовляються із коров'ячого або козиного молока з використанням комерційних термофільних і мезофільних (наприклад, *Lactob. lactis*) культур молочнокислих бактерій [81]. Така група твердих сирів, як Гауда, Голландський, Мааздам, Корольвський тощо, зазвичай споживаються у найбільшій кількості. Для отримання сиру активність протеази в основному забезпечується додаванням сичужного ферменту. Крім того, під час попередніх етапів виготовлення сиру переважно додають живі молочнокислі мікроорганізми у формі натуральних заквасок прямого внесення [83]. Час і температура формування згустку твердих сирів є основними параметрами в технології для розвитку молочної мікробіоти. Крім того, на процес суттєво впливає час дозрівання, що забезпечує послідовність різної мікробної динаміки. Таким чином важливим фактором, що впливає на мікробіоту сиру, є використання комерційних заквасок, яка полегшує прогнозування майбутніх біохімічних та смакових властивостей молочних продуктів, підвищуючи відтворюваність, зменшуючи варіації. Практично у всіх ферментативних молочних продуктах (кисломолочні та тверді сири) ріст молочнокислих бактерій і їх метаболічна активність необхідна для забезпечення високоякісного кінцевого продукту. Ці мікроорганізми виробляють молочну кислоту шляхом бродіння лактози, що призводить до швидкого зниження рН. Виробництво сирів і кисломолочних продуктів значною мірою залежить від цього фактора, який також має вирішальне значення для забезпечення контролю патогенних і псувальних мікроорганізмів [1].

Разом з тим незважаючи на те, що всі технологічні етапи обробки твердого сиру проводяться з дотриманням умов гігієни та санітарії, поряд із специфічною мікробіотою готового продукту можуть бути присутні умовно-патогенні мікроорганізми, БГКП, технічно-шкідлива мікрофлора. Власне ця стороння мікробіота найбільше впливає на стійкість твердого сиру до зберігання, органолептичні та мікробіологічні показники. Тому враховуючи участь специфічної мікрофлори в розвитку якості та органолептичних властивостей сиру під час дозрівання, додавання консервуючих речовин загального впливу на всю мікрофлору є проблематичним. Водночас застосування природних біологічних агентів – бактеріофагів специфічних за дією конкретно на певні роди чи види умовно-патогенних чи патогенних бактерій має сенс у плані підвищення мікробіологічної безпечності продукту. До того ж останніми роками споживачі дедалі частіше проявляють небажання купувати харчові продукти, які були оброблені хімічними консервуючими речовинами та антибіотиками, або продукти, які є «генетично модифікованими». Водночас відбувається постійне зростання попиту на органічні продукти харчування та продукти, які вироблені на місцевих фермерських ринках тобто на невеликих потужностях [84]. Ця тенденція є провісником провісником для фагового біоконтролю, який пропонує нехімічний, зелений та цілеспрямований антимікробний підхід для підвищення безпечності харчових продуктів.

Отже, зважаючи на актуальність й перспективність щодо можливого застосування бактеріофагів як консервантів молочних продуктів, нами було поставлено завдання дослідити літичну дію стафілококових бактеріофагів щодо золотистого стафілококу твердого сиру та розробити технологію сичужного сиру (Голландського) підвищеної мікробіологічної стійкості за даним мікроорганізмом.

3.2. Контамінація молока-сировини та твердих сичужних сирів золотистим стафілококом

Поряд із проблемою харчового токсикозу спричиненого ентеротоксигенними стафілококами ще більшою загрозою дані бактерії становлять для громадського здоров'я як резистентні до антимікробних препаратів. Адже стійкість до протимікробних препаратів стала однією з головних загроз громадському здоров'ю двадцять першого століття. Згідно з останніми оцінками, у 2019 році 1,27 мільйона смертей були спричинені бактеріями стійкими до антибіотиків [85]. Серед них *Staphylococcus aureus* посідає друге місце в списку мікроорганізмів, відповідальних за смертність внаслідок стійкості до антибіотиків у країнах з високим рівнем доходу [86]. Оскільки, *S. aureus* є відповідальним за безліч інфекцій, які варіюються від нозокоміальних інфекцій, які пов'язані з високим рівнем захворюваності та смертності серед людей, до інфекцій у продуктивних тварин, які використовуються людиною [80]. Отже, враховуючи наслідки, які може спричинити молочна продукція, яка надмірно контамінована даним убіквітарним мікроорганізмом нами на першому етапі кваліфікаційного дослідження було визначено рівень обсіменіння молока-сировини на переробних підприємствах золотистим стафілококом. Це молоко приймається за державним стандартом і використовується для виробництва твердих сирів (рис. 3.1).

З досліджень (рис. 3.1) спостерігаємо, що найменшу кількість проб сирого молока, у якому не виявлявся золотистий стафілокок реєстрували серед гатунку екстра – $37,7 \pm 1,8 \%$. При цьому кількість проб гатунку екстра, яка містила золотистий стафілокок до 5×10^2 КУО/мл була $44,3 \pm 2,2 \%$, а проб молока сировини даного гатунку більше 501 КУО/мл – $18,0 \pm 1,3 \%$. Тобто навіть серед гатунку екстра молоко сире, яке приймається на переробку та використовується для виробництва твердого сиру контаміноване золотистим стафілококом у 62,3 % проб. Такою ситуацією можна пояснити допустимість у твердих сичужних сирах згідно ДСТУ6003 : 2008 [2] наявність золотистого стафілококу у кількості 5×10^2 КУО/г (500 КУО).

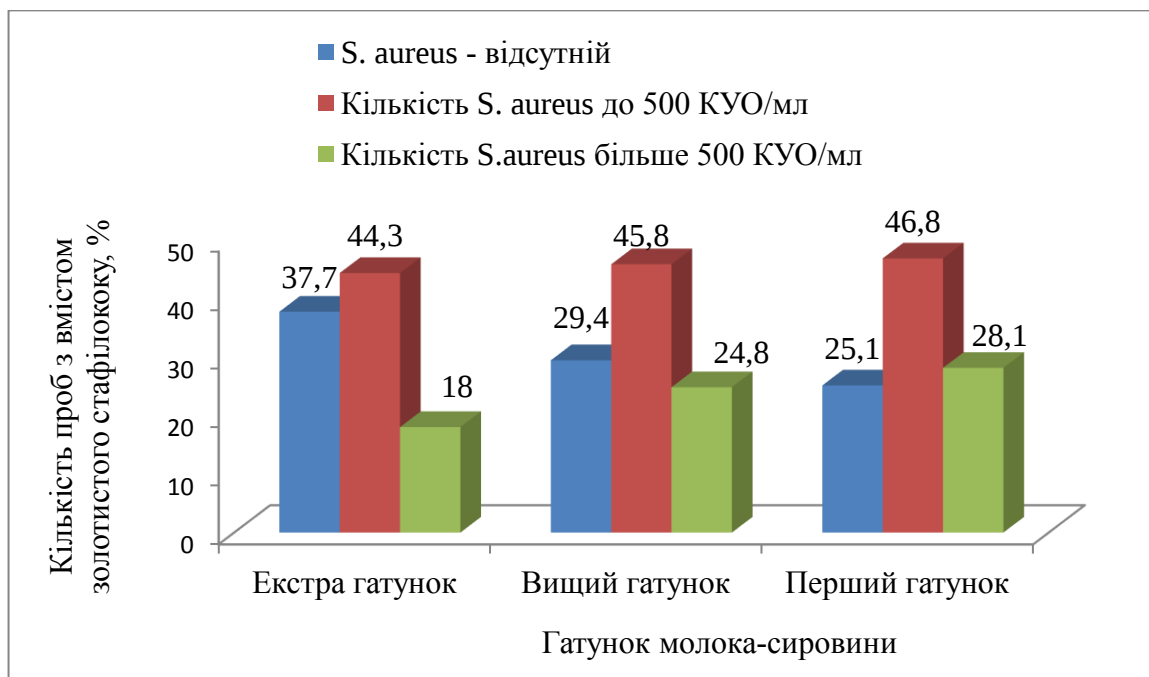


Рис. 3.1. Контамінація молока-сировини на молокопереробних підприємствах золотистим стафілококом у залежності від гатунку

У пробах молока-сировини нижчих гатунків (вищого й першого) реєструємо обсіменіння даним мікроорганізмом у більшій кількості. Зокрема кількість проб у яких золотистий стафілокок був відсутній була на 8,3 та 12,6 %, відповідно менша, ніж у пробах гатунку екстра. При цьому зростає кількість проб молока-сировини, у яких виявляли вміст коагулазопозитивних стафілококів більше 5×10^2 КУО/мл, так серед проб вищого гатунку на 6,8 %, а серед першого на 10,1 %, порівнюючи з молоком найвищого – екстра гатунку. Такі дані вказують, що стафілококи, в тому числі й золотистий можна віднести до «нормальної» автохтонної мікрофлори молочної сировини, які практично постійно присутні в ній. Тому під час виробництва молочних продуктів, такі заходи як пастеризація спрямовані на знищення цієї умовно-патогенної мікрофлори. Водночас все ж таки, у готових виробах таких як тверді сири, у зв'язку зі складною технологією виробництва відбувається вторинне забруднення золотистим стафілококом походу усього процесу.

Отже, молоко-сировина є беззаперечним джерелом контамінації твердих сичужних сирів золотистим стафілококом тому розробка технології

біоконсервації за допомогою фагів є перспективним для контролю даного патогенна у готовому продукті.

Наукову зацікавленість становили результати досліджень відносно виявлення рівня контамінації золотистим стафілококом твердих сичужних сирів вітчизняного виробництва, які реалізуються в Україні. Результати наведено на рис. 3.2.

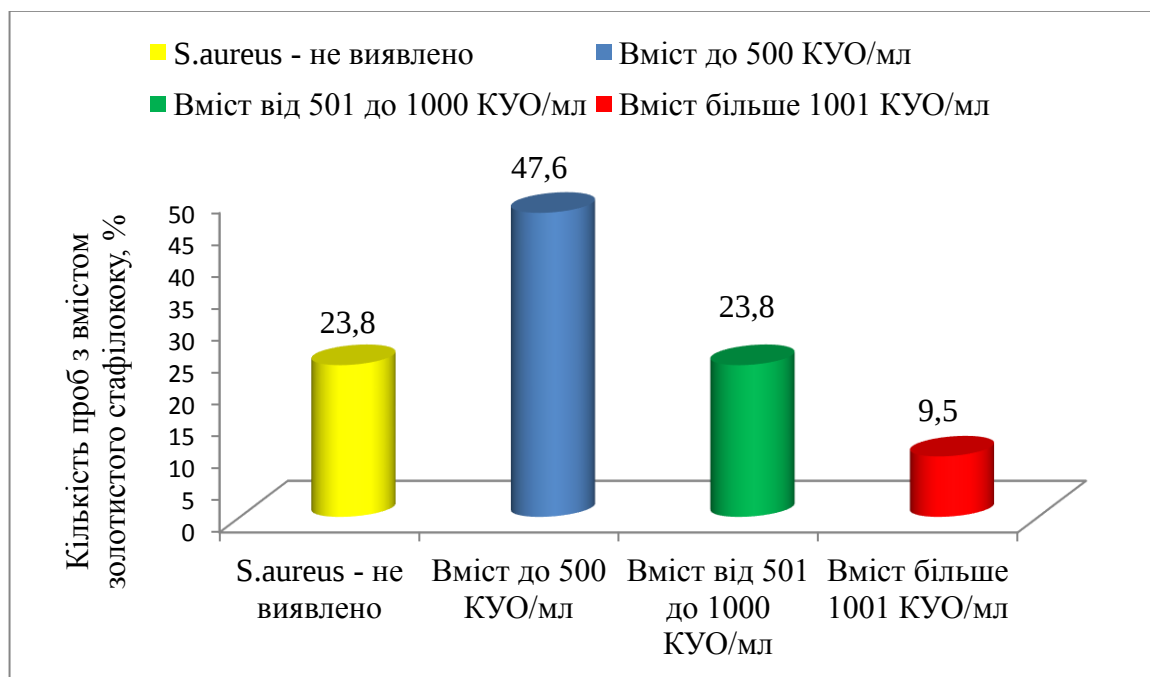


Рис. 3.2. Контамінація золотистим стафілококом твердих сичужних сирів, які реалізуються в Україні

З досліджень (рис. 3.2) спостерігаємо, що частка твердих сирів, у яких не виявляли доступними мікробіологічними методами наявність золотистого стафілококу становила $23,8 \pm 1,7$ %. Водночас найбільше було сирів, які мали обсіменіння даним мікроорганізмом у діапазоні від 1 до 5×10^2 КУО/г – $47,6 \pm 3,3$ %. Тобто з досліджених нами твердих сирів кількість проб, які були забруднені коагулазопозитивними стафілококами, проте не перевищували допустимий рівень відповідно до національного стандарту ДСТУ6003 : 2008 [2] 5×10^2 КУО/г становила в загальному 71,4 %. До того ж виявлено $23,8 \pm 1,6$ % проб твердих сирів, у яких рівень забруднення золотистим стафілококом був у дещо більшому діапазоні (501 – 1000 КУО/г) від дозволеного стандартом рівня. Близько 10 % проб досліджених сирів були контаміновані коагулазопозитивними

стафілококами у кількості більше 10^3 КУО/г, тобто більше як в два рази допустимого стандартом рівня. Це може бути наслідком можливого розвитку стафілококів під час реалізації у торговельній мережі або під час транспортування. Водночас більшість дослідників вважають [61, 70], що для виникнення харчового токсикозу спричиненого ентеротоксигенними стафілококами необхідно, що їх кількість у продукті сягала близько 10^6 КУО/г/мл. Проте на нашу думку значення має більше не остаточна кінцева кількість золотистого стафілококу в продукті, а з якої кількості вони розмножилися. У випадку першого варіанту, кількість у 10^6 КУО може бути наслідком контамінації на завершальній стадії технологічного процесу або реалізації, тоді стафілококи не встигнуть накопичити достатню кількість ентеротоксину відповідального за токсикоз. У другому випадку, якщо створюються сприятливі умови для розвитку стафілококів, то навіть за незначної початкової кількості 10^2 КУО/г їх кількість поступово зростає та накопичується ентеротоксин.

Отже, тверді сири, які реалізуються в торговельній мережі контаміновані золотистим стафілококом приблизно в 30 % у кількості більше 5×10^2 КУО/г, що не відповідає вимогам стандарту.

3.3. Виділення стафілококових фагів із молока-сировини на молокопереробних підприємствах та оцінка їх літичного спектру

Найкраще фаги проявляють літичну активність до своїх бактерій-господарів якщо вони виділені з того ж самого середовища, що їхні цільові клітини. Тому нами виділено 10 культур золотистого стафілококу з молока-сировини та 8 із твердих сичужних сирів. Дані виділені культури були вибрані як господарі для репродукції стафілококових бактеріофагів. Загальновідомо, що молоко-сировина на молокопереробних підприємствах являється первинним природним джерелом з якого розповсюджуються, як технічно-шкідливі фаги молочнокислих мікроорганізмів, так і літичні патогенних бактерій. У зв'язку з цим нами перевірено проби молока-сировини із різним мікробним числом на

наявність специфічних бактеріофагів до культур золотистого стафілококу, які були виділені з твердих сичужних сирів та молока-сировини (табл. 3.1). Адже для біоконсервації харчових продуктів підходять лише активні літичні бактеріофаги.

Таблиця 3.1

Наявність стафілококових фагів у молоці-сировині на молокопереробних підприємствах, n=28

Культури <i>S.aureus</i> з молока-сировини, №	Кількість проб молока-сировини різних гатунків із наявністю фагів, %		
	екстра, n=11	вищий, n=9	перший, n=8
1	5 (45,5 %)	5 (55,5 %)	4 (50,0 %)
2	7 (63,6 %)	6 (66,7 %)	6 (75,0 %)
3	4 (36,4 %)	6 (66,7 %)	6 (75,0 %)
4	5 (45,5 %)	5 (55,5 %)	5 (62,5 %)
5	6 (54,5 %)	7 (77,8 %)	5 (62,5 %)
6	4 (36,4 %)	5 (55,5 %)	6 (75,0 %)
7	7 (63,6 %)	5 (55,5 %)	5 (62,5 %)
8	6 (54,5 %)	6 (66,7 %)	4 (50,0 %)
9	5 (45,5 %)	4 (44,4 %)	4 (50,0 %)
10	5 (45,5 %)	5 (55,5 %)	5 (62,5 %)

З табл. 3.1 спостерігається наявність літичних бактеріофагів у молоці-сировині до культур золотистого стафілококу виділеного з цього об'єкту дослідження. Практично в половині пробах молока-сировини екстра гатунку виділялися літичні фаги щодо культур золотистого стафілококу. У молоці вищого гатунку, яке в три рази більше містить мікроорганізмів, наявність літичних фагів виявлялася частіше – від 44,4 % до 66,7 % проб, тобто за більшого мікробного забруднення виявляється багатша вірусна мікробіота. Молоко-сировина першого гатунку є найбільш контаміноване мікроорганізмами, як наслідок у такому молоці найчастіше виявляли літичні бактеріофаги до золотистого стафілококу – у 50,0 – 75,0 % випадків.

Отже, результати досліджу вказують, що природня сировина характеризується значним біорізномаяттям не тільки бактеріальної, а й вірусної популяції мікроорганізмів. Виділення специфічних бактеріофагів з молока-сировини до стафілококів є доброю умовою для створення препарату для консервації молочної продукції.

Культури золотистого стафілококу характеризуються різною біологічною приналежністю до своїх господарів, тому виділені мікробні клітини стафілококів з одного природного джерела можуть не лізуватися бактеріофагами виділених з інших об'єктів. Враховуючи такий біологічний процес було досліджено здатність циркулюючих у молоці-сировині бактеріофагів лізувати золотисті стафілококи виділені з твердого сичужного сиру. Отримані результати зможуть вказати можливість застосування виділених бактеріофагів з молока-сировини бути активними до культур стафілококів із сичужного сиру (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Наявність стафілококових фагів у молоці-сировині щодо культур *S.aureus* виділених з **твердих сирів**, n=28

Культури <i>S.aureus</i> з твердих сирів , №	Кількість проб молока-сировини різних гатунків із наявністю фагів, %		
	екстра, n=11	вищий, n=9	перший, n=8
1	4 (36,4 %)	6 (66,7 %)	5 (62,5 %)
2	5 (45,5 %)	6 (66,7 %)	4 (50,0 %)
3	5 (45,5 %)	5 (55,5 %)	5 (62,5 %)
4	6 (54,5 %)	6 (66,7 %)	5 (62,5 %)
5	5 (45,5 %)	4 (44,4 %)	6 (75,0 %)
6	6 (54,5 %)	5 (55,5 %)	5 (62,5 %)
7	5 (45,5 %)	6 (66,7 %)	6 (75,0 %)
8	6 (54,5 %)	4 (44,4 %)	5 (62,5 %)

Виявлено (табл. 3.2), що усі виділені культури золотистого стафілококу з твердого сиру містили специфічні бактеріофаги, які наявні у молоці-сировині різних гатунків. Це дає підставу вважати про походження даних культур

стафілоkokів із того ж самого джерела. Зокрема до вісім культур *S.aureus* з твердих сирів були присутні специфічні бактеріофаги у молоці-сировині екстра гатунку в 36,4 – 54,5 % проб. У молоці вищого гатунку відсоток позитивних проб із літичними бактеріофагами був дещо вищий, ніж у екстра і становив від 44,4 до 66,7 %. Найбільша кількість позитивних проб із бактеріофагами до золотистого стафілококу була серед проб першого гатунку до 75,0 %.

Таким чином, золотисті стафілококи, які контамінують тверді сири у більшості випадків лізувалися бактеріофагами, які наявні у молоці сировині, що свідчить про їх походження від тварин. Тому молоко-сировина може підходити, як джерело для виділення бактеріофагів при розробці технології боротьби із стафілококами у твердому сири.

Зазвичай найбільшою технічною проблемою фагового біоконтролю харчових продуктів є його ефективність, тобто для обробки харчових продуктів ми маємо використовувати тільки літичні, а не лізогенні бактеріофаги. Іншими словами фаги можуть ефективно знижувати рівень цільових бактерій у харчових продуктах, але вони не завжди повністю їх усувають, коли перебувають у лізогенному стані. До того ж для активної дії бактеріофагу він повинен контактувати з чутливими до лізису бактеріальними клітинами. У такому випадку необхідно його вносити у середовище у великих концентраціях не менше 10^7 БУО/мл, при цьому буде відбуватися пасивна імунізація бактеріальних клітин. Якщо у харчовій системі буде велика кількість цільових бактеріальних клітин то може проходити й активна фагова інфекція із зараженням їх та виділенням у середовище значної кількості віріонів, які будуть заражувати нові бактерії.

У результаті досліджень (табл. 3.1 та 3.2) було виділено з молока-сировини 7 літичних штамів бактеріофагів, які лізували культури золотистого стафілококу з твердих сирів та молока сирого. Оцінка літичної активності даних бактеріофагів наведена в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Оцінка літичної активності бактеріофагів до культур золотистого стафілококу з молока-сировини й сиру твердого, n=7, %

Штами фагів, №	Літична активність фагів у методі «стікаючої краплі»							
	<i>S.aureus</i> з молока-сировини, n=10				<i>S.aureus</i> з твердого сиру, n=8			
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
Фаг 1	–	10	40	50	–	–	25,0	75,0
Фаг 2	–	–	30	70			37,5	62,5
Фаг 3	–	–	20	80	–	–	25,0	75,0
Фаг 4	–	20	20	60	12,5	12,5	25,0	50,0
Фаг 5	–	10	30	60	–	25,5	37,5	37,5
Фаг 6	–	30	20	50	–	25,0	12,5	62,5
Фаг 7	–	–	20	80	–	–	25,0	75,0

Примітка. Міра лізису фагу: «++++» – повний лізис – відсутній ріст колоній S.aureus; «+++» – напівзливний лізис, наявність кілька колоній S.aureus; «++» – плямистий лізис, виявляємо ≥ 50 фагів; «+» – виявляємо близько 20–50 фагів; У випадку лізису в «++++» та «++++» результат є позитивним [87].

З табл. 3.1 спостерігаємо, що виділені сім фагів лізували всі культури золотистого стафілококу, однак їх літична активність характеризувалася різною інтенсивністю. Зокрема фаги №2, №3 та №7 у 100 % випадків лізували культури золотистого стафілококу виділених з молока-сировини у три та чотири хрести. Культури *S.aureus* з твердого сиру також добре лізувалися виділеними фагами, зокрема міра лізису в три та чотири хрести була у вище перерахованих фагів та у фагу №1. Це дає підставу до використання даних виділених фагів у технології консервування молочних продуктів, які контаміновані *S.aureus*, що походить з коров'ячого молока-сировини. При цьому на нашу думку найдоцільніше використати для створення фагової композиції високолітичні фаги №3 та №7.

Отже, фаг №3 та фаг №7 проявляли в 75,0 – 80,0 % літичну активність у вигляді трьох та чотирьох хрестів, як відносно культур золотистого стафілококу з молока, так і виділених з твердого сичужного сиру. Це вказує на можливість їх використання у якості біоконсервантів для зменшення рівня стафілококів у твердих сирах під час реалізації.

3.4. Визначення сиропридатності молока для приготування сиру твердого (Голландського)

Виділені нами бактеріофаги проти золотистого стафілококу для біоконтролю його у твердому сичужному сирі були використанні у технологічному процесі виробництва сиру Голландського. У зв'язку з цим на наступному етапі роботи ми оцінювали молоко-сировину для виробництва сиру за показниками сиропридатності, якості та безпечності. Результати наведено в табл. 3.4 – 3.6.

Таблиця 3.4

Фізико-хімічні показники молока-сировини для виробництва сиру твердого, $M \pm m$

Показники	Дослід	Контроль	Норми для екстра гатунку [88]
Кислотність, °Т	$17,5 \pm 0,1$	$17,0 \pm 0,1$	16,0 – 18,0
Густина, кг/м ³	$1028,8 \pm 0,002$	$1029,0 \pm 0,002$	Не нижче 1028,0
Масова частка сухих речовин, %	$12,4 \pm 0,1$	$12,5 \pm 0,1$	$\geq 12,0$
Точка замерзання, °С	$0,511 \pm 0,001$	$0,512 \pm 0,001$	Не вище – 0,520
Інгібувальні речовини	Не виявлено	Не виявлено	Не допускається

З табл. 3.4 спостерігаємо відповідність нормативним вимогам ДСТУ 3662 2018 молока-сировини дослідних й контрольних зразків. Зокрема, такі фізико-хімічні показники, які впливають на технологічні й структурно-механічні параметри твердих сирів, як густина молока та масова частка сухих речовин були вищими за базисні нормативи стандарту й становили $1028,8 - 1029,0$ кг/м³ та $12,4 - 12,5$ %. Кислотність у двох зразках молока також мала значення, які вкладалися у діапазон для екстра гатунку й становила $17,5 \pm 0,1$ °Т та $17,0 \pm 0,1$ °Т, це вказує на відсутність розвитку у такому молоці мікробіоти, що розкладає вуглеводи. За величиною точка замерзання обидва зразки молока-сировини мали показники нижче нормативної, що свідчить про відсутність у ньому води. Також нами не

виявлено залишків антибактеріальних речовини у даних зразках молока за допомогою експрес методу (BRT-тест).

Отже, зразки молока-сировини цілком придатні за фізико-хімічними показниками для виробництва твердого сиру Голландського.

Не менш важливі у технології твердого сичужного сиру є використання молока-сировини відповідної мікробіологічної якості, адже від мікробіоти молока залежить правильність перебігу мікробіологічного процесу, можливий розвиток вадів сиру та в подальшому його безпечність й стійкість за реалізації у торговельній мережі. У сироварінні особливо небезпечні – це спорові анаеробні бактерії, БГКП, які можуть спричиняти раннє та пізнє спучування, до того ж умовно-патогенні, які є збудниками аліментарних отруєнь. Результати мікробіології двох зразків молока-сировини наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Мікробіологічні та цитологічні показники молока-сировини для виробництва сиру твердого, $M \pm m$

Показники	Дослід	Контроль	Норми для екстра гатунку [88]
МАФАНМ, КУО/мл	$7,3 \pm 0,1 \times 10^4$	$6,8 \pm 0,1 \times 10^4$	Не більше 1×10^5 [88]
Титр БГКП, мл	0,1	0,1	Не нормується
<i>S. aureus</i> , КУО/мл	$1,24 \pm 0,1 \times 10^2$	$1,33 \pm 0,1 \times 10^2$	Не нормується (вимога ЄС до 5×10^2)
Соматичні клітини, мл	$2,07 \pm 0,2 \times 10^5$	$2,18 \pm 0,2 \times 10^5$	Не більше 4×10^5 [88]

З табл. 3.5 видно, що два зразки молока-сировини були віднесені до гатунку екстра, оскільки нормативний показник МАФАНМ не перевищував 1×10^5 КУО/мл і становив у дослідних зразках молока $7,3 \pm 0,1 \times 10^4$ та $6,8 \pm 0,1 \times 10^4$ КУО/мл у контрольних. За кількістю БГКП зразки молока-сировини також характеризувалися високою якістю, оскільки титр цієї групи бактерій не перевищував 0,1 мл, що навіть менше на один порядок, ніж дозволено стандартом на сири тверді сичужні [2].

Кількісна оцінка молока-сировини на вміст золотистого стафілококу національним стандартом не проводиться, однак закордонні нормативні документи рекомендують, що ця величина не перевищувала значення у 500 КУО/мл. Наші результати виявили практично в 3,8 раза меншу кількість золотистого стафілококу в молоці-сировині двох зразках ($1,24 \pm 0,1 \times 10^2$ та $2,18 \pm 0,2 \times 10^5$ КУОмл, відповідно).

Молоко-сировина обов'язково оцінюється за вмістом соматичних клітин при прийманні на переробку, адже наднормативний вміст їх вказує на отримання молока від уражених маститом корів і в такому молоці наявні збудники. До того ж таке молоко має зміни фізико-хімічного складу, особливо щодо мінеральних солей і дані зміни негативно впливають на структуру та дозрівання сиру. У наших зразках молока сировини кількість соматичних клітин становила у дослідному – $2,07 \pm 0,2 \times 10^5$ та $2,18 \pm 0,2 \times 10^5$ в мл, відповідно, в контрольному.

Отже, молоко-сировина за мікробіологічними та цитологічними показниками повністю задовольняє вимогам для виробництва сиру твердого високої якості.

Технологи-сировари під час виробництва твердого сиру перевіряють кожен партію молока за показниками, які характеризують його сиропридатність: сичужною, бродильною чи сичужно-бродильною пробами. Суть цих проб зводиться до здатності молока до звертання, а також виявлення в ньому технічно-шкідливої споруутворюючої мікрофлори, яка зумовлює здуття головок сиру. Ми також оцінили наші проби молока-сировини за даними пробами (табл. 3.6).

З табл. 3.6 видно, що за сичужною пробою обидві проби були з високою зсідальною здатністю, оскільки час за який сичужний фермент звернув молоко був менше 10 хв, а відповідно становив $8,25 \pm 0,12$ с та $8,17 \pm 0,11$ с.

У пробі на бродіння, як в основному характеризує біохімічну активність молочнокислої мікробіоти встановлено, що дослідні й контрольні зразки молока згорталися протягом 12 год, а утворений згусток був без виділення сироватки, не мав пухирців газу, на розрізі мав щільний без тріщин вигляд, тому наші зразки молока належить до першого класу за бродильною пробою.

Таблиця 3.6

Показники сиропридатності молока-сировини для виробництва сиру твердого,
 $M \pm m, n=3$

Показники	Дослід	Контроль	Вимоги
Сичужна проба (час зсідання, хв)	$8,25 \pm 0,12$ (високий тип)	$8,17 \pm 0,11$ (високий тип)	Висока зсідальна здатність – до 10 хв; Нормальна – 10 – 15 хв; Слабка – більше 15 хв
Бродильна проба (час зсідання, характеристика згустка)	За 12 год згорнулося, I клас, згусток без виділення сироватки, пухирців газу, щільний без тріщин		I клас - придатний II – придатний III, IV – непридатний, згусток розірваний, з пухирцями газу
Сичужно-бродильна проба	Згусток із гладкою поверхнею, без вічок, пружний, в прозорій сироватці, яка не гірка і не тягуча		Молоко придатне для сиру; Молоко підозріле; Молоко непридатне.

За сичужно-бродильною пробою обидва зразки молока-сировини також характеризувалися як придатні для виробництва твердого сиру Голландського.

Отже, підсумовуючи результати даного підрозділу ми відмічаємо, що наші зразки молока-сировини відповідають вимогам національного стандарту та нормативним документам, які підтверджують їх високу якість за фізико-хімічними властивостями, мікробіологічними показниками та придатність його до виробництва твердих сирів.

3.5. Розробка технології виробництва сиру твердого (Голландського) консервованого стафілококовим бактеріофагом

Під час удосконалення технології виробництва твердого сичужного сиру із стафілококовим бактеріофагом ми за основу взяли класичну технологію сиру Голландського. Вона передбачала наступні стандартні технологічні операції й режими (рис. 3.3). Приймання – оцінка кількості та за вмістом жиру, білку, кислотності, тощо з наступним визначенням мікробіологічних показників та сиропридатності молока-сировини. Очищення, охолодження та тимчасове резервування молока з наступним його дозріванням до 12 год за температури від + 8 до 10 °C.

Нормалізація з гомогенізацією та пастеризацією за $t \approx + 77\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 20 с, щоб фосфатаза не виявлялася. Потім пастеризовану суміш піддають охолодженню до температури зсідання ($37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Водночас відмінність технології полягала в тому, що на такій технологічній операції як внесення в молочну суміш закваски, солей кальцію, сичужного ферменту, ми додатково додавали композицію стафілококового бактеріофагу у кількості 1 мл на 1 л молочної суміші. При цьому концентрація фагів у бактеріофазовій композиції становила не менше 10^8 БУО/мл. Таку концентрацію бактеріофагів для біоконтролю та консервації молочних продуктів пропонують ряд вчених [8, 14, 15, 16], які застосовували протисальмонельозні та протилістеріозні бактеріофаги для забезпечення мікробіологічної стійкості харчових продуктів. У подальшому технологія виробництва твердого Голландського сиру мала стандартні технологічні операції (рис. 3.3). Зокрема перевірка готовності згустку, обробка його та постановка зерна до нагрівання (температура другого нагрівання 38 – 42 °C). Надалі формували головки та проводили пресування сиру, соління здійснювали за температури 9 – 11 °C й концентрації кухонної солі 20 %. Після процесу соління сир обсушували за температури 11 °C протягом двох діб, процес визрівання становив 60 діб. У контрольному зразку сиру технологічні операції були аналогічні, але без додавання проти стафілококового бактеріофагу.



Рис. 3.3. – Технологічна схема виробництва сиру «Голландського» з бактеріофагом до золотистого стафілококу

3.5.1 Зміни мікробіологічних й фізико-хімічних показників у твердому сирі за консервування його стафілококовим бактеріофагом

Заквасочна молочнокисла мікрофлора вважається домінантною у твердому сирі, саме за її біохімічної участі відбуваються ферментативні трансформації азотистих речовин під час його дозрівання та формування властивих даному продукту органолептичних властивостей. У зв'язку з цим ми провели дослідження впливу доданого бактеріофагу на розвиток молочнокислого процесу у сирі, що проходив стадію дозрівання (рис. 3.4).

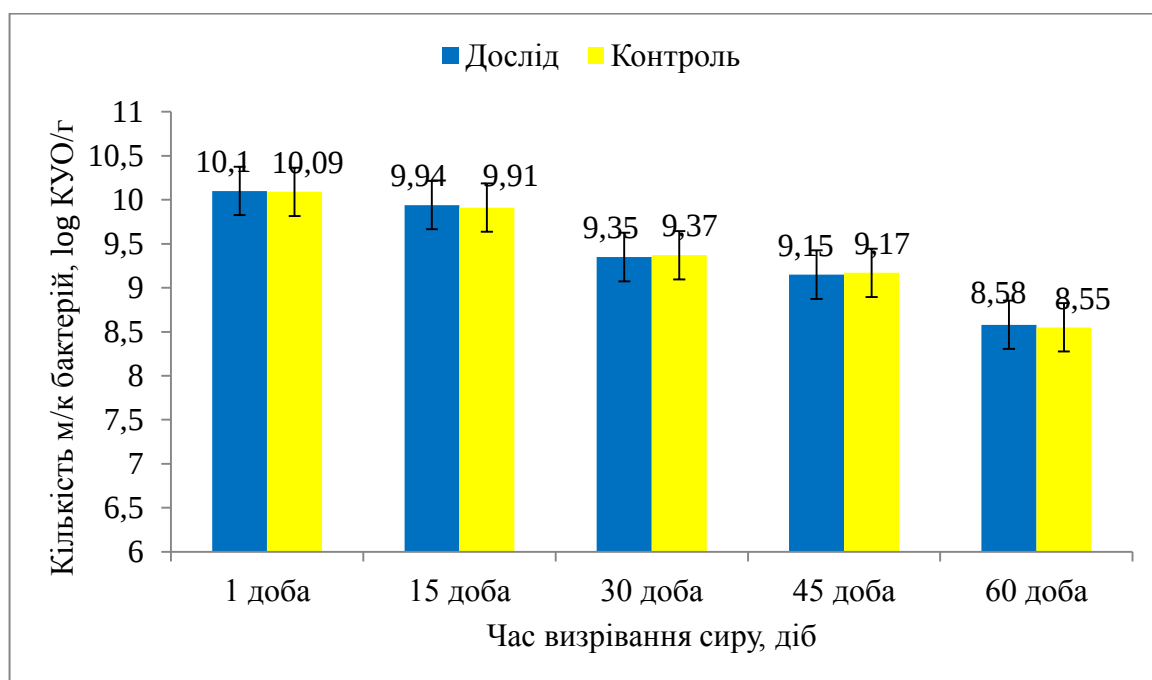


Рис. 3.4. Динаміка м/к мікроорганізмів за дозрівання твердого сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

Виявлено (рис. 3.4), що кількість м/к бактерій на першу добу визрівання сиру реєструвалася найбільше й вірогідної різниці між контрольним і дослідним зразком твердого сиру не спостерігали. У ході процесу визрівання (15 доба) вміст м/к бактерій поступово зменшувався, що пояснюється зменшенням вуглеводів у сирі. Проте динаміка зменшення м/к мікрофлори не мала вірогідних змін у сирі консервованому бактеріофагом (дослідний зразок), та контрольним зразком.

Через 30 діб визрівання загальна кількість м/к бактерій у двох зразках сиру зменшилася приблизно в п'ять разів, однак різниці щодо вмісту між ним знову не було 9,35 проти 9,37 log КУО/г. Аналогічна закономірність розвитку м/к мікробіоти у дослідному й контрольному сирі була й на 45 та 60 добу визрівання. Тобто, можемо констатувати, щодо стафілококовий бактеріофаг доданий у дослідний зразок сиру не пригнічує розвиток м/к мікробіоти. Це пояснюється строгою специфічністю бактеріофагів до бактерій своїх господарів, про що повідомляють чисельні дослідження [58, 59, 60, 62, 65, 67].

Отже, стафілококові бактеріофаг доданий у технологію твердого сиру не лізує заквасочні мікроорганізми.

Для підтвердження розвитку м/к мікрофлори за визрівання сирів із стафілококовим бактеріофагом було досліджено концентрацію лактози за цього процесу (рис. 3.5).

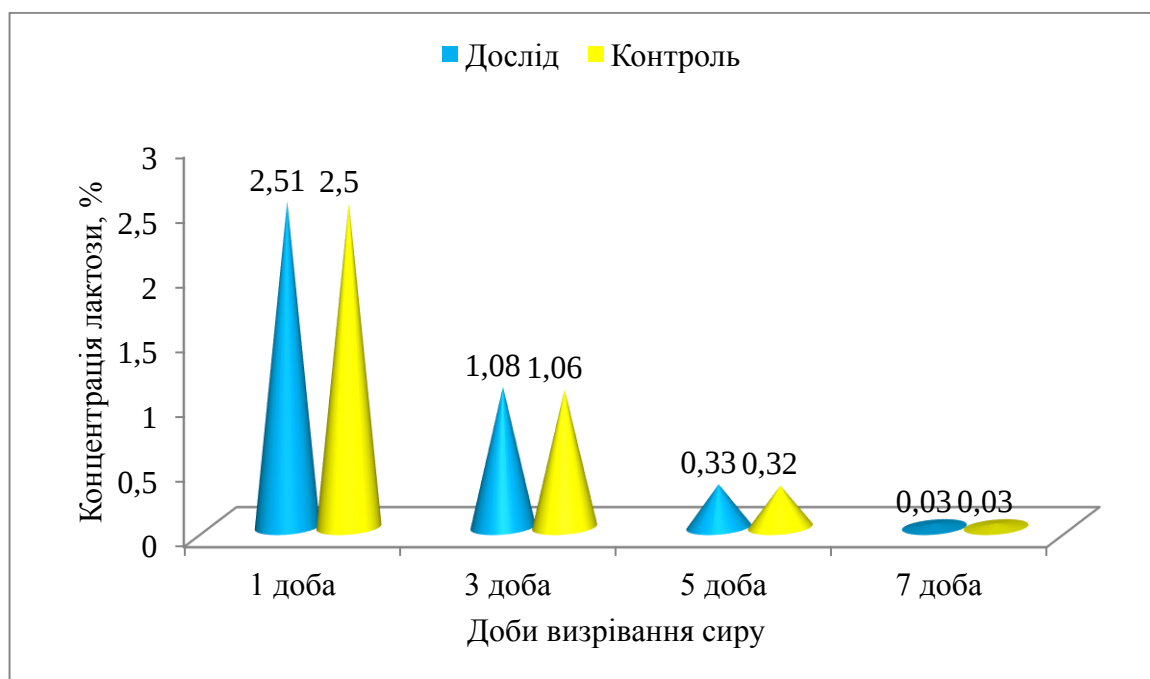


Рис. 3.5. Зміна концентрації лактози за дозрівання твердого сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

З дослідів наведено на рис. 3.5 спостерігаємо добре виражену динаміку у двох зразка сиру (дослідному й контрольному) зі зниження концентрації лактози протягом 60 добового визрівання. Це пояснюється активними метаболічними процесами у м/к мікробіоти за визрівання сиру. При цьому вірогідних змін щодо

різниці у лактозі у сирі з стафілококовим бактеріофагом та сирі твердому без нього на всіх досліджуваних контрольних точках не відмічали.

Отже, динаміка лактози за визрівання сиру зі стафілококовим бактеріофагом підтверджує інтенсивний мікробіологічний процес за участі заквасочної м/к мікробіоти.

Введений у технологічний процес виробництва сиру виділені нами стафілококові бактеріофаги мають на меті лізувати клітини золотистого стафілококу та не допускати їх розвиток до рівня, який вважається критичним для виникнення стафілококового токсикозу. Крім цього, щоб кількість коагулазопозитивних стафілококів у продукті під час реалізації не перевищувала вимоги ДСТУ 6003 : 2008 [2]. Тому важливо було проконтролювати кількісні зміни золотистого стафілококу під час 60-ти добового визрівання сиру (рис. 3.6).

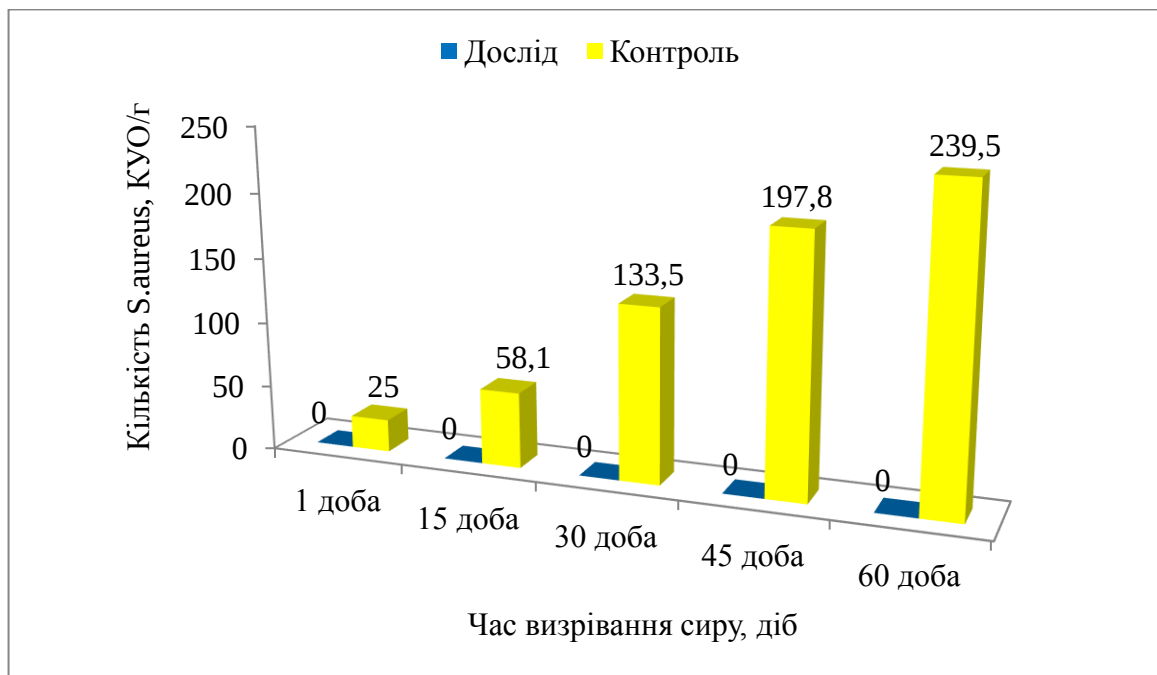


Рис. 3.6. Динаміка золотистого стафілококу за дозрівання твердого сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

Виявлено (рис. 3.6), що додавання літичних стафілококових бактеріофагів у молочну суміш під час технології твердого сиру дозволяє провести її консервування щодо розвитку золотистого стафілококу у сирі за його визрівання. Так спостерігаємо, що у твердому сирі із стафілококовим бактеріофагом протягом 60 добового визрівання клітин золотистого стафілококу не виділяли

стандартними мікробіологічними методами. Втім у контрольному зразку сиру за його дозрівання золотистий стафілокок виявлявся на першу добу у кількості $25,0 \pm 1,7$ КУО/г, а через 60 діб його кількість збільшилася в 9,5 раза і становила $239,5 \pm 14,6$ КУО/г. Хоча вміст стафілококу суттєво збільшилася за весь період визрівання, водночас дана кількість була більше, як в два рази менша рівня прийнятого стандартом 5×10^2 КУО/г [2].

Отже, застосування для біоконтролю золотистого стафілококу у твердому сичужному сирі літичних бактеріофагів дозволяє практично повністю знешкодити їх у технології виробництва та визрівання.

Величина рН сиру є показником мікробіологічних й біохімічних закономірностей, які проходять у ньому за його визрівання, тобто свідчить про розклад вуглеводів за розвитку м/к мікроорганізмів. Дослідження рН двох сирів (рис. 3.7) виявило постоє зменшення цієї величини упродовж 15 діб визрівання до $5,21 \pm 0,01$ од, а потім протягом наступних 45 діб практично рН був на цьому ж рівні. До того ж динаміка рН у сирі зі стафілококовим бактеріофагом нічим не відрізнялася від сиру в контролі.

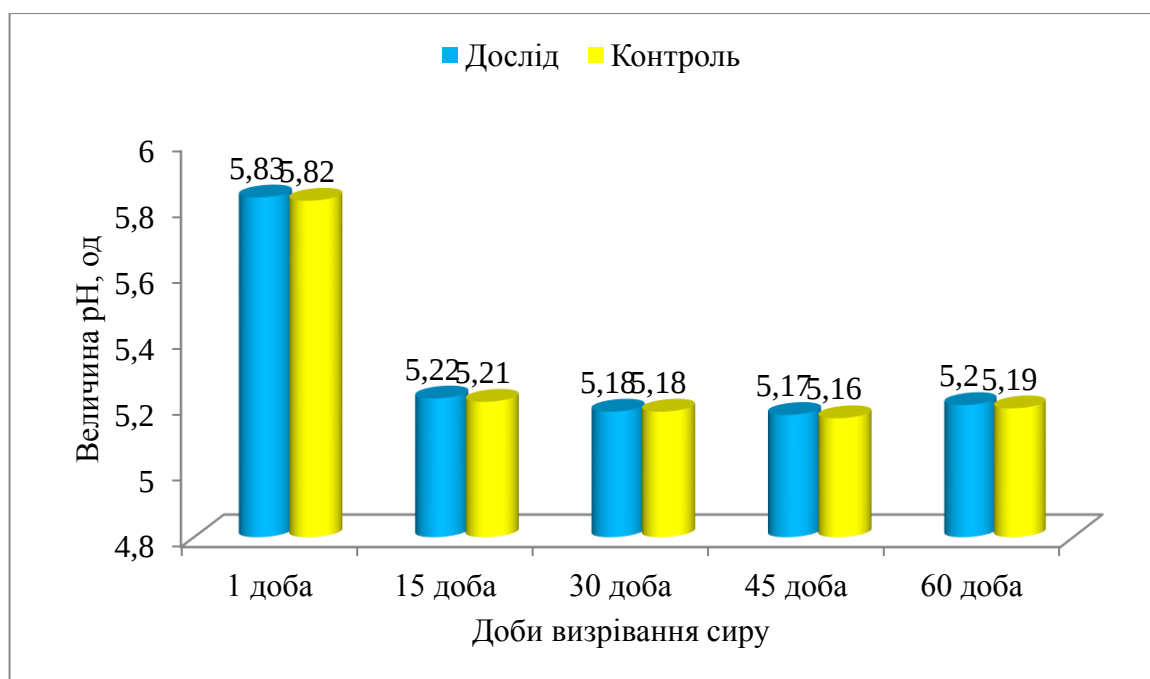


Рис. 3.7. Зміна величини рН за дозрівання твердого сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

Отже, величина рН у дослідному й контрольному сири за його визрівання показує відсутність впливу стафілококового бактеріофагу на технологію виробництва й визрівання.

3.6. Зміна мікробіоти сиру твердого Голландського консервованого стафілококовим бактеріофагом за зберігання

Рекомендовані національним стандартом тверді сири, які зберігають без вакууму мають термін придатності за температури від 0 до + 6 °С максимум 10 діб [2]. У цьому розділі ми поставили за завдання визначити кількість золотистого стафілококу у сири твердому з стафілококовим бактеріофагом (дослід) та у контролі (без фагу) за їх зберігання при двох температурах. Зокрема одну температуру вибрали, які рекомендує стандарт + 4 °С, а другу вищу (+ 10 °С) для виявлення інтенсивнішого розвитку стафілококу. Результати наведено на рис. 3.8 та 3.9.

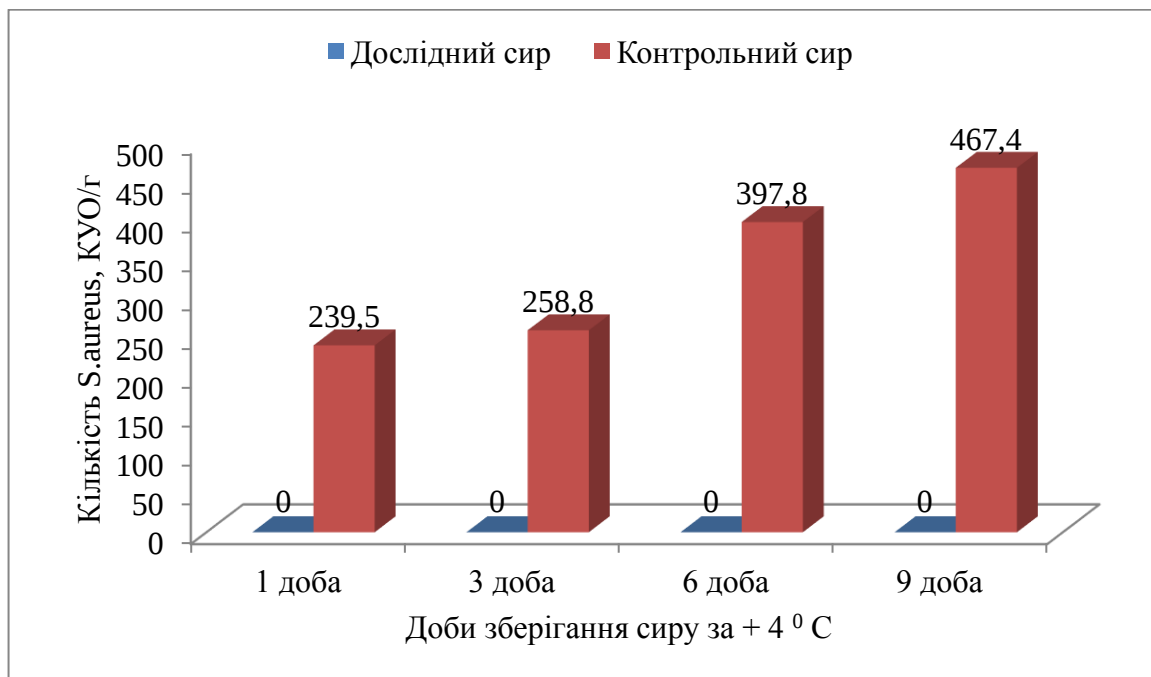


Рис. 3.8. Зміна золотистого стафілококу у дослідному й контрольному Голландському сири за зберігання при + 4 °С протягом 9 діб

Встановлено (рис. 3.9), що у сири зі стафілококовим бактеріофагом клітин золотистого стафілококу не реєстрували протягом усього терміну зберігання

його за температури визначеної стандартом для сиру без вакууму. Водночас у контрольному твердому сирі реєстрували зростання цього мікроорганізму, зокрема на шосту добу вміст *S.aureus* був в 1,7 раза більший, ніж на першу, а на дев'яту в 1,9 раза. Втім така кількість цього ентеротоксигенного мікроорганізму не перевищувала допустимий рівень – 5×10^2 КУО/г, хоч і була на межі граничної величини.

Отже, у сирі твердому консервованому стафілококовим бактеріофагом не виявляли клітини *S.aureus* протягом усього терміну зберігання за температури стандарту, що підвищує його безпечність.

Визначення динаміки *S.aureus* у твердих сирах за вищої температури зберігання (рис. 3.9) виявило інтенсивну динаміку розвитку у сирі в контролі, проте не реєстрували у дослідному сирі зі стафілококовим бактеріофагом.

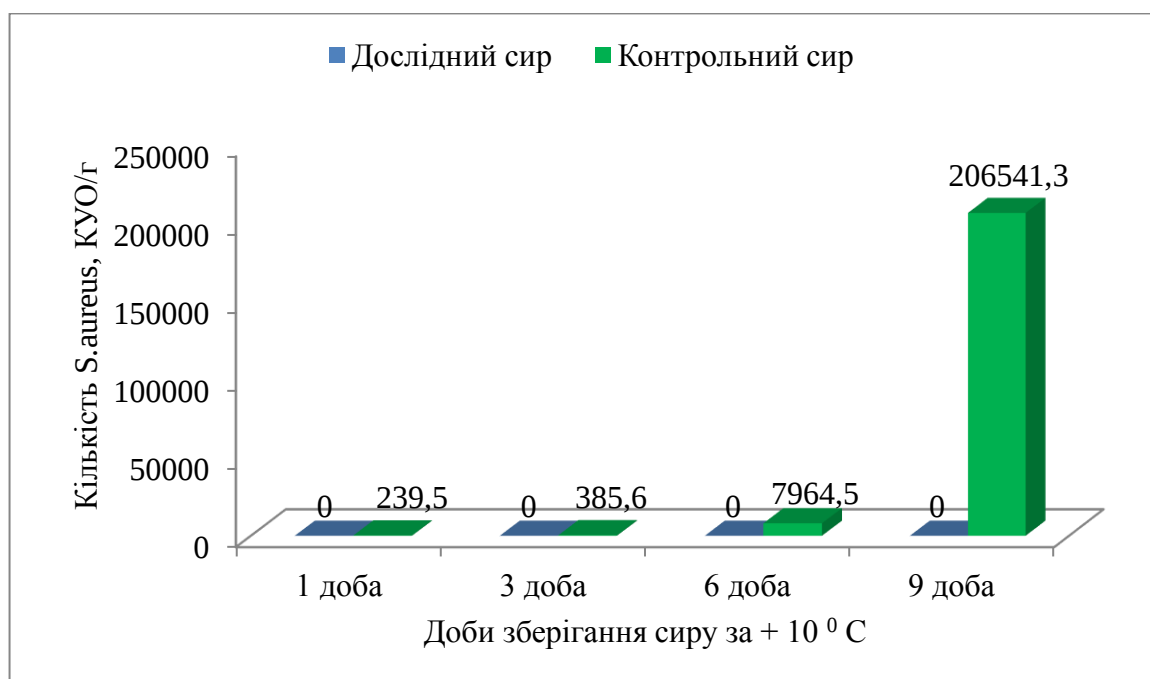


Рис. 3.9. Зміна золотистого стафілококу у дослідному й контрольному Голландському сирі за зберігання при + 10 °С протягом 9 діб

Це вказує, що стафілококовий бактеріофаг проявляв літичну дію на стафілококи, які були у молочній суміші за виробництва сиру, внаслідок чого у готовому виробі їх не відмічали. Водночас у контрольному сирі без фагу відмічаємо інтенсивний розвиток *S.aureus* протягом дев'ятиденного терміну зберігання. При цьому на дев'яту добу кількість *S.aureus* була порогової

концентрації, за якої уже реєструється значний вміст ентеротоксину і може виникнути стафілокова інтоксикація у разі споживання такого сиру.

Отже, підсумовуючи результати усього кваліфікаційного дослідження вважаємо, що застосування бактеріофагів для контролю патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах явище дуже перспективне. Оскільки бактеріофаги, ймовірно, є одним із найбільш екологічно чистих доступних заходів для біоконтролю патогенів та не мають шкідливого впливу на біологічно-активні речовини вироблених продуктів. У нашому випадку виділені нами два літичних стафілококових бактеріофаги з молока-сировини проявляли добру активність на стафілококи у технології виробництва Голландського сиру.

РОЗДІЛ 4
ЕКОНОМІЧНА ТА СОЦІАЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВІД
ВПРОВАДЖЕННЯ РОЗРОБКИ

Під час розроблення нового виду харчового продукту, будь яке переробне підприємство, в тому числі й молочне, перш за все ставить за мету виробляти безпечну готову молочну продукцію з високими якісними показниками. До того ж найоптимальнішим вважається, коли витрачаються найменші затрати на електроенергію та матеріальні ресурси.

Удосконалена технологія сиру Голландського з стафілококовим бактеріофагом може бути застосована на будь якому сирзаводі. Оскільки запропонована технологія відрізняється тільки тим, що на такій технологічній операції як внесення в молочну суміш закваски, солей кальцію, сичужного ферменту, додатково додавали композицію стафілококового бактеріофагу у кількості 1 мл на 1 л молочної суміші.

Опираючись на результати, що були нами отримані за удосконалення технології виробництва сиру Голландського з стафілококовим бактеріофагом, розрахована повна собівартість 100 кг готової продукції.

У табл. 4.1 наведено розрахунок вартості сировини і основних матеріалів сиру Голландського з стафілококовим бактеріофагом за розробленою рецептурою вагою 100 кг. При цьому розрахунки економічної ефективності виробництва сиру Голландського з стафілококовим бактеріофагом здійснено за цінами 2024 року.

Таблиця 4.1

Вартість сировини і основних матеріалів сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

Найменування сировини	Маса, кг.	Ціна грн./кг.	Вартість, грн.
Молоко, з м.ч.ж. 3,2%	1270	15,00	19050,00
Закваски hensen chn-19	0,03		1200,00

Кальцій хлористий	0,13	50,00	6,50
Фермент сичужний Natural Extra (Італія)	0,04	15000	600,00
Стафілококовий бактеріофаг	1	500,00	500,00
Всього	100	-	21356,50

З табл. 4.1 видно, що для виробництва 100 кг сиру собівартість сировини становить 21356,50 грн за цінами літа 2024 року.

Використовуючи отримані результати табл. 4.1 розраховуємо виробничу собівартість сиру Голландського зі стафілококовим бактеріофагом. Розрахунки наведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Виробнича собівартість сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

Статті витрат	Питома вага, %	Виробнича собівартість, грн.
Матеріальні витрати:	87,6	26880,06
– сировина	69,6	21356,76
– транспортні витрати	2,3	705,76
– упаковка	11,5	3528,78
– паливно-енергетичні	4,2	1288,76
Умовно-постійні витрати	1,8	552,33
Зарплата з відрахуванням	8,8	2700,28
Амортизація	1,8	552,33
Разом	100	30685,00

Прибутки від реалізації молочної продукції визначаємо за формулою 4.1

$$\Pi = (C_n \times P / 100\% \quad (4.1)$$

де P – рентабельність для молочної промисловості, 20 %

$$П = \frac{30685,00 \times 20}{100} = 6137,00 \text{ грн}$$

$$П = 6137,00 \text{ грн}$$

Розрахунок оптової ціни 100 кг сиру Голландського з стафілококовим бактеріофагом за формулою 4.2.

$$Ц_0 = C_n + П \quad (4.2)$$

$$Ц_0 = 30685,00 + 6137,00 = 36822,00$$

$$Ц_0 = 36822,00$$

$$\text{Оптова ціна 1 кг сиру } Ц_0 = \frac{36822,00}{100} = 368,22 \text{ грн}$$

У результаті здійснених розрахунків отримано основні показники економічної ефективності виробництва сиру Голландського з стафілококовим бактеріофагом. Ціна продукції складає 30685,00 грн./100 кг. або ж 306,85 грн./1 кг.

Таким чином запропонована технологія виробництва сиру Голландського з стафілококовим бактеріофагом є економічно вигідною.

До того ж запропонована нами розробка крім економічної ефективності матиме значний соціальний ефект, оскільки застосування біологічних агентів для підвищення безпечності молочної продукції дозволяє зменшити використання хімічних консервантів. Також підвищення безпечності молочної продукції за допомогою застосування літичних бактеріофагів дозволяє знизити формування антибіотикорезистентних штамів харчових інфекцій і токсикозів у твердих сирах, що є внеском у глобальну проблему боротьби з антибіотикорезистентністю.

ВИСНОВКИ ТА РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. У молоці-сировині, яке надходить на переробку для виробництва твердих сирів у 25 до 40 % проб золотистий стафілокок не виявлявся, в середньому 45 % проб молока були контаміновані золотистим стафілококом до 5×10^2 КУО/мл та від 18 до 30 % проб мали вміст коагулазопозитивного стафілококу більше 5×10^2 КУО/мл.

2. У твердих сирах, які реалізуються в торговельній мережі, в середньому в 25 % проб не виділяли золотистий стафілокок, водночас даним мікроорганізмом контаміновані приблизно 30 % проб у кількості більше 5×10^2 КУО/г, що перевищує вимоги стандарту.

3. Відібрано два бактеріофаги, які проявляли в 75,0 – 80,0 % літичну активність відносно культур золотистого стафілококу з молока та з твердого сичужного сиру, які використані у технології консервування твердого сичужного сиру Голландського.

4. Розроблено технологію сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом для підвищення його безпечності під час реалізації. Застосування для біоконтролю золотистого стафілококу у твердому сичужному сирі літичних бактеріофагів дозволяє практично повністю знешкодити їх у технології виробництва та визрівання.

5. У сирі твердому консервованому стафілококовим бактеріофагом не виявляли клітини *S.aureus* протягом усього терміну зберігання за температури стандарту, що підвищує його безпечність. Отже, використання літичних бактеріофагів для підвищення безпечності молочних продуктів є екологічно чистим способом стримування розвитку патогенних бактерій, тим самим не впливаючи на заквасочну мікрофлору продукту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кухтин, М. Д., & Кравченко, Х. Ю. (2023). Лабораторний практикум з мікробіології молока і молочних продуктів: навчальний посібник. ТНТУ ім. І.Пулюя. 157 с.
2. ДСТУ 6003 : 2008 Сири тверді. Загальні технічні умови. Національний стандарт України, 2009. 22 с.
3. Кухтин, М., & Горюк, Ю. (2023). Мікробіологія молочних продуктів вироблених з молока коров'ячого сирого: монографія. ТНТУ ім. І.Пулюя. 157 с.
4. EFSA, ECDC, The European Union One Health 2019 Zoonoses Report, EFSA Journal. 19 (2021). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6406>.
5. Interagency Food Safety Analytics Collaboration (IFSAC), Foodborne illness source attribution estimates for 2019 for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter* using multi-year outbreak surveillance data, United States, 2019. <https://www.cdc.gov/foodsafety/ifsac/projects/index.html>.
6. Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., ... & Devleesschauwer, B. (2021). Burden of foodborne diseases: Think global, act local. *Current Opinion in Food Science*, 39, 152-159. 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.006>.
7. Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Salata, V. Z., Klymyk, V. T., Vorozhbit, N. M., & Rushchinskaya, T. M. (2021). Staphylococcus aureus of raw cow's milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 23(102), 53-59.
8. Agún, S., Fernández, L., Rodríguez, A., & García, P. (2024). Phage lytic proteins: a natural approach to agro-food safety. *Food Science and Human Wellness*.
9. Кухтин М.Д., Салата В.З. Мікробіологічні та біохімічні процеси у м'ясі яловичини за холодильного зберігання / Кухтин М.Д., Салата В.З. – Тернопіль: Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2023. – 305 с.

10. Wolbang, C. M., Fitos, J. L., & Treeby, M. T. (2008). The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 196-200.

11. Bajovic, B., Bolumar, T., & Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat science*, 92(3), 280-289.

12. Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 10(4), 205.

13. Awuchi, C. G., Twinomuhwezi, H., Igwe, V. S., & Amagwula, I. O. (2020). Food additives and food preservatives for domestic and industrial food applications. *Journal of Animal Health*, 2(1), 1-16.

14. Połaska, M., & Sokołowska, B. (2019). Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS microbiology*, 5(4), 324.

15. Hussain, M. A., Liu, H., Wang, Q., Zhong, F., Guo, Q., & Balamurugan, S. (2017). Use of encapsulated bacteriophages to enhance farm to fork food safety. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13), 2801-2810.

16. Kazi, M., & Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of food science and technology*, 53(3), 1355-1362.

17. Gilmore, B. F. (2012). Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(5), 533-535.

18. Authority, E. F. S. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2016. *EFSA journal*, 15(12).

19. Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Pokotylo, O. S., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., & Pokotylo, O. O. (2017). Staphylococcal contamination of raw milk and handmade dairy products, which are realized at the markets of Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 3/1, 12-16.

20. World Health Organization (2019) Food safety. Available from: <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/food-safety>

21. Viator, C.L.; Muth, M.K.; Brophy, J.E. *Costs of Food Safety Investments*; Report; RTI International: Research Triangle Park, NC, USA, 2015. Available online: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0cdc568ef6b1-45dc-88f1-45f343ed0bcd/Food-Safety-Costs.pdf?MOD=AJPERES> (accessed on 19 March 2018).

22. Sulakvelidze, A. (2013). Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3137-3146.

23. Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open veterinary journal*, 8(1), 104-111.

24. Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751-1773.

25. Irkin, R., & Esmer, O. K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal of food science and technology*, 52, 6095-6111.

26. Alves, D., Marques, A., Milho, C., Costa, M. J., Pastrana, L. M., Cerqueira, M. A., & Sillankorva, S. M. (2019). Bacteriophage ϕ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage. *International journal of food microbiology*, 291, 121-127.

27. Weng, S., López, A., Sáez-Orviz, S., Marcet, I., García, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2021). Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 121, 107666.

28. Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D. M., García, P., & Rodríguez, A. (2013). Potential of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 and its derivative fusion proteins in milk biopreservation. *PloS one*, 8(1), e54828.

29. Verbree, C. T., Dätwyler, S. M., Meile, S., Eichenseher, F., Donovan, D. M., Loessner, M. J., & Schmelcher, M. (2018). Corrected and republished from: identification of peptidoglycan hydrolase constructs with synergistic staphylolytic activity in cow's milk. *Applied and environmental microbiology*, 84(1), e02134-17.

30. Son, B., Kong, M., Lee, Y., & Ryu, S. (2021). Development of a novel chimeric endolysin, Lys109 with enhanced lytic activity against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 615887.

31. Agún, S., Fernández, L., Rodríguez, A., & García, P. (2022). Deletion of the amidase domain of endolysin LysRODI enhances antistaphylococcal activity in milk and during fresh cheese production. *Food Microbiology*, 107, 104067.

32. Van Tassell, M. L., Ibarra-Sánchez, L. A., Hoepker, G. P., & Miller, M. J. (2017). Hot topic: Antilisterial activity by endolysin PlyP100 in fresh cheese. *Journal of dairy science*, 100(4), 2482-2487.

33. Zhang, H., Bao, H., Billington, C., Hudson, J. A., & Wang, R. (2012). Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food microbiology*, 31(1), 133-136.

33. Sarhan, W. A., & Azzazy, H. M. (2015). Phage approved in food, why not as a therapeutic?. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(1), 91-101.

34. Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual review of food science and technology*, 5, 327-349.

35. Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Application of bacteriophages in the agro-food sector: A long way toward approval. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 296.

36. de Melo, A. G., Levesque, S., & Moineau, S. (2018). Phages as friends and enemies in food processing. *Current opinion in biotechnology*, 49, 185-190.

37. Fernández L, Gutiérrez D, Rodríguez A, et al. (2018) Application of bacteriophages in the agrofood sector: a long way toward approval. *Front Cell Infect Microbiol* 8: 1–5.

38. Farber, J. M., & Peterkin, P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, 55(3), 476-511.

39. Soni, K. A., Desai, M., Oladunjoye, A., Skrobot, F., & Nannapaneni, R. (2012). Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 155(1-2), 82-88.

40. Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Sabour, P. M., Kropinski, A. M., & Balamurugan, S. (2013). Efficacy of bacteriophage LISTEX™ P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *International journal of food microbiology*, 167(2), 208-214.

41. Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., ... & Sulakvelidze, A. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *Journal of food protection*, 64(8), 1116-1121.

42. Obeso, J. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ΦH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International journal of food microbiology*, 128(2), 212-218.

43. Leistner, L., & Gorris, L. G. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in food science & technology*, 6(2), 41-46.

44. Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., ... & Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4519-4526.

45. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., & Diez-Gonzalez, F. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food microbiology*, 28(1), 149-157.

46. Boyacioglu, O., Sharma, M., Sulakvelidze, A., & Goktepe, I. (2013). Biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut leafy greens. *Bacteriophage*, 3(1), e24620.

47. Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L., & Wang, R. (2015). Bio-control of *Salmonella* Enteritidis in foods using bacteriophages. *Viruses*, 7(8), 4836-4853.

48. Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 189912.

49. Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current opinion in biotechnology*, 37, 76-87.
50. Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 189912.
51. Siringan, P., Connerton, P. L., Payne, R. J., & Connerton, I. F. (2011). Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3320-3326.
52. Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne pathogens and disease*, 7(4), 427-434.
53. Maszewska, A. (2015). Phage associated polysaccharide depolymerases—characteristics and application. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 69, 690-702.
54. Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., & Maciejewska, B. (2015). Bacteriophages and phage-derived proteins—application approaches. *Current medicinal chemistry*, 22(14), 1757-1773.
55. Lehman, S. M. (2007). Development of a bacteriophage-based biopesticide for fire blight. PhD Thesis. Department of Biological Sciences, Brock University, Canada.
56. Hughes, K. A., Sutherland, I. W., & Jones, M. V. (1998). Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144(11), 3039-3047.
57. Chai, Z., Wang, J., Tao, S., & Mou, H. (2014). Application of bacteriophage-borne enzyme combined with chlorine dioxide on controlling bacterial biofilm. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1159-1165.
58. Love, M. J., Bhandari, D., Dobson, R. C., & Billington, C. (2018). Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care. *Antibiotics*, 7(1), 17.

59. Gutierrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martinez, B., Rodríguez, A., & Garcia, P. (2014). Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PloS one*, 9(9), e107307.

60. Oliveira, H., Thiagarajan, V., Walmagh, M., Sillankorva, S., Lavigne, R., Neves-Petersen, M. T., ... & Azeredo, J. (2014). A thermostable Salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PLoS One*, 9(10), e108376.

61. Obeso, J. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ΦH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International journal of food microbiology*, 128(2), 212-218.

62. Olsen, N. M., Thiran, E., Hasler, T., Vanzielegheem, T., Belibasakis, G. N., Mahillon, J., ... & Schmelcher, M. (2018). Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase. *Viruses*, 10(8), 438.

63. Cha YoYeon, C. Y., Son BoKyung, S. B., & Ryu SangRyeol, R. S. (2019). Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13.

64. Кухтин, М. Д. (2008). Динаміка мікробіологічного та біохімічного процесу в молоці сирому при зберіганні за різних температур. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*, 10(3-3 (38)), 229-237.

65. Garneau, J. E., & Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial cell factories*, 10(Suppl 1), S20.

66. Mercanti, D. J., Carminati, D., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. (2011). Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *International journal of food microbiology*, 144(3), 503-510.

67. Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., J. Heller, K., & Hinrichs, J. (2013). Elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology*, 4, 191.

68. Tahir, A., Asif, M., Abbas, Z., & Rehman, S. U. (2017). Three bacteriophages SA, SA2 and SNAF can control growth of milk isolated Staphylococcal species. *Pak J Zool*, 49, 425-759.
69. Li, G., Wu, C., Wang, X., & Meng, J. (2015). Prevalence and characterization of methicillin susceptible Staphylococcus aureus ST398 isolates from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 94-97.
70. Akineden, Ö., Hassan, A. A., Schneider, E., & Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of Staphylococcus aureus isolated from goats' milk cheese. *International journal of food microbiology*, 124(2), 211-216.
71. Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M., Parisi, A., ... & Celano, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. *International journal of food microbiology*, 115(3), 290-296.
72. Rahimi, E. (2013). Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 393-399.
73. Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International journal of food microbiology*, 126(3), 302-310.
74. Peton, V., and Le Loir, Y. (2014). Staphylococcus aureus in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* 21, 602–615.
75. Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). Staphylococcus aureus and staphylococcal food- borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed research international*, 2014(1), 827965.
76. Gomes, B. C., Franco, B. D. G. D. M., & De Martinis, E. C. P. (2013). Microbiological food safety issues in Brazil: bacterial pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(3), 197-205.
77. Arfatahery, N., Davoodabadi, A., & Abedimohtasab, T. (2016). Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates in fishery products in Iran. *Scientific reports*, 6(1), 1-7.

78. EFSA and ECDC (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. Parma: EFSA.

79. Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., ... & Kozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and infection*, 130(1), 33.

80. Lee, S. H. I., Camargo, C. H., Gonçalves, J. L., Cruz, A. G., Sartori, B. T., Machado, M. B., & Oliveira, C. A. F. D. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7377-7383.

81. Arutiunian, D., & Kukhtyn, M. (2023). Microbiological indicators of quality and safety of hard rennet cheese with linseed content during storage. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Food Technologies*, 25(100), 3-8.

82. Gobetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P. F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 167-178.

83. Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., ... & Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534.

84. Reganold, J.P., Wachter, J.M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nat. Plants*, 2, 15221

85. Turchi, B., Campobasso, C., Nardinocchi, A., Wagemans, J., Torracca, B., Lood, C., ... & Di Luca, M. (2024). Isolation and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage Hesat from dairy origin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 299.

86. Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The lancet*, 399(10325), 629-655.
87. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Kernychnyi, S., Tarasenko, L. (2020). Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinárni Medicína*, 65 (10), 421–426.
88. ДСТУ 3662 : 2018 Молоко-сировина коров'яче. Загальні технічні умови. Національний стандарт України, 2019. 13 с.
89. ДСТУ 7357 : 2013. Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання. Національний стандарт України, 2013. 34 с.
90. ДСТУ IDF 100B:2003 Молоко і молочні продукти. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 30 °C (IDF 100B:1991, IDT). Національний стандарт України, 2013. 12 с.
91. ДСТУ ISO 13366-1/IDF 148-1:2014 Молоко. Підрахування соматичних клітин. Частина 1. Мікроскопічний (контрольний) метод. Національний стандарт України, 2015. 35 с.
92. Кравців Р.Й., Цісарик О.Й., Параняк Р.П., Дроник Г.В., Островський Я.Ю. Біохімія молока. Практикум – Львів: ТеРус, 2000. 150 с.

УДК 664.8/9

<https://doi.org/10.31548/humanhealth.3.2024.47>**БІОКОНСЕРВУВАННЯ ТВЕРДОГО СИЧУЖНОГО СИРУ З ВИКОРИСТАННЯМ
БАКТЕРІОФАГІВ****Кухтин Микола Дмитрович,**

доктор ветеринарних наук, професор,

<https://orcid.org/0000-0002-0195-0767>,

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя,

46001, вул. Руська, 56, Тернопіль, Україна.

Цісарик Оріся Йосипівна,

доктор сільськогосподарських наук, професор,

<https://orcid.org/0000-0002-0286-7463>,

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій

імені С. З. Гжицького,

79010, вул. Пекарська, 50, Львів, Україна.

Салата Володимир Зеновійович,

доктор ветеринарних наук, професор,

<https://orcid.org/0000-0002-7175-493X>,

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій

імені С. З. Гжицького,

79010, вул. Пекарська, 50, Львів, Україна.

Коваль Галина Михайлівна,

кандидат ветеринарних наук, доцент,

<https://orcid.org/0000-0002-8503-3412>,

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій

імені С. З. Гжицького,

79010, вул. Пекарська, 50, Львів, Україна.

Клиник Віра Теодозіївна,

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник,

<https://orcid.org/0000-0002-0197-4988>,

Тернопільська дослідна станція Інституту ветеринарної медицини НААН,

46023, вул. Тролейбусна, 12, Тернопіль, Україна.

Анотація. Для підвищення безпечності швидкопсувних харчових продуктів під час їх виробництва та реалізації використовують декілька технологічних підходів. Зокрема, це застосування температури, високого тиску, ультрафіолетового опромінення та додають консерванти. Одним із загальновизнаним і спільним недоліком усіх цих способів є те, що вони впливають на всі мікроорганізми, тобто інгібують, як патогенні, так і потенційно корисні автохтонні молочнокислі бактерії «нормальної» мікрофлори ферментованих продуктів. Метою дослідження було провести контроль твердих сичужних сирів за вмістом золотистого стафілококу та розробити технологію їх консервування за допомогою літичного стафілококового бактеріофагу. Контамінацію молока-сировини та Голландського сиру золотистим стафілококом визначали шляхом посіву відібраних проб та проведених десятикратних розведень на селективне середовище гемоагар з 5 % натрію хлориду з наступним термостатуванням за +37 – 48 год. Виділення бактеріофагів з молочної сировини проводили шляхом фільтрації через бактеріальні фільтри з порами 0,45 мкм. Під час удосконалення технології сиру Голландського зі стафілококовим бактеріофагом було вироблено два зразки сиру – один дослідний із бактеріофагом, а другий контрольний – без бактеріофагу.

Встановлено, що в молоці-сировині, яке надходить на переробку для виробництва твердих сирів, у 25 до 40 % проб золотистий стафілокок не виявлявся, в середньому 45 % проб молока були контаміновані цим патогеном до 5×10^2 КУО/мл та від 18 до 30 % проб мали вміст стафілококів більше 5×10^2 КУО/мл. У твердих сирах, які реалізуються у торговельній мережі, в середньому в 25 % проб не виділяли золотистий стафілокок, водночас цим мікроорганізмом контаміновані приблизно 30 % проб у кількості більше 5×10^2 КУО/г, що перевищує вимоги стандарту. Відібрано два бактеріофаги, які проявляли в 75,0 – 80,0 % літичну активність відносно культур золотистого стафілококу з молока та з твердих сирів. Ці бактеріофаги були використані у технології консервування твердого сиру Голландського. Розроблено технологію сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом для підвищення його безпечності під час реалізації. Застосування для біоконтролю золотистого стафілококу у сичужному сирі літичних бактеріофагів дозволяє практично повністю знешкодити їх у технології виробництва.

Отже, використання літичних бактеріофагів для підвищення безпечності молочних продуктів є екологічно чистим способом стримування розвитку патогенних бактерій, тим самим не впливаючи на закваскову мікрофлору продукту.

Ключові слова: молоко-сировина, твердий сир, літичні бактеріофаги, золотистий стафілокок, безпечність.

UDC 664.8/9

<https://doi.org/10.31548/humanhealth.3.2024.47>

BIOCONSERVATION OF HARD RENT CHEESE USING BACTERIOPHAGES

Mykola Kukhtyn,

Doctor of Veterinary Sciences, professor,

<https://orcid.org/0000-0002-0195-0767>,

Ternopil Ivan Puliuj National Technical University,

46001, Ruska Str., 56, Ternopil, Ukraine.

Orysia Tsisaryk,

Doctor of Agricultural Sciences, professor

<https://orcid.org/0000-0002-0286-7463>,

Stepan Gzhyskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv,

79010, Pekarska Str., 50, Lviv, Ukraine.

Volodymyr Salata,

Doctor of Veterinary Sciences, professor,

<https://orcid.org/0000-0002-7175-493X>,

Stepan Gzhyskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv,

79010, Pekarska Str., 50, Lviv, Ukraine.

Halyna Koval,

PhD, Associate Professor,

<https://orcid.org/0000-0002-8503-3412>,

Stepan Gzhyskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv,

79010, Pekarska Str., 50, Lviv, Ukraine.

Vira Klymyk,

PhD, senior researcher,

<https://orcid.org/0000-0002-0197-4988>,

Ternopil Research Station of the Institute of Veterinary Medicine,

46012, Trolleybusna Str., 12, Ternopil, Ukraine.

Abstract. Several technological approaches are used to increase the safety of perishable food products during their production and realization. In particular, it is the use of temperature, high pressure, ultraviolet radiation and added preservatives. One of the generally recognized and common disadvantages of all these methods is that they have an influence on the microorganisms indiscriminately, that is, they inhibit both pathogenic and potentially beneficial autochthonous lactic acid bacteria of the "normal" microflora of fermented products. The purpose of this investigation was to monitor hard rennet cheeses for the content of *Staphylococcus aureus* and to develop a technology for its preservation using a lytic staphylococcal bacteriophage. Contamination of milk-raw material and Dutch cheese with *Staphylococcus aureus* was determined by inoculating the selected samples and carrying out tenfold dilutions on a selective hemoagar medium with 5% sodium chloride, followed by thermostating for +37-48 hours. Isolation of bacteriophages from milk raw materials was carried out by filtering through bacterial filters with pores of 0.45 μm . During the improvement of the technology of Dutch cheese with staphylococcal bacteriophage, two samples of cheese were produced - one experimental with bacteriophage, and the second control - without bacteriophage.

It was set up that in milk-raw material, which is processed for the production of hard cheeses, *Staphylococcus aureus* was not detected in 25 to 40% of the samples, on average 45% of the milk samples were contaminated with this pathogen up to 5×10^2 CFU/ml and from 18 to 30% samples had a staphylococci content of more than 5×10^2 CFU/ml. In hard cheeses which are realized in the retail network, *Staphylococcus aureus* was not isolated in an average of 25% of the samples, while approximately 30% of the samples were contaminated with this microorganism in the amount of more than 5×10^2 CFU/g, which exceeds the requirements of the standard. Two bacteriophages were selected that showed 75.0-80.0% lytic activity against cultures of *Staphylococcus aureus* from milk and hard cheeses. These bacteriophages were used in the technology of preserving hard Dutch cheese. The technology of Dutch cheese with staphylococcal bacteriophage has been developed to increase its safety during implementation. The use of lytic bacteriophages for the biocontrol of *Staphylococcus aureus* in rennet cheese makes it possible to almost completely neutralize them in the technology of production.

Therefore, the use of lytic bacteriophages to increase the safety of dairy products is an environmentally clean way of restraining the development of pathogenic bacteria, thereby not influencing on the fermentation microflora of the product.

Key words: raw milk, cheese, lytic bacteriophages, *Staphylococcus aureus*, safety.

Вступ. Тверді сичужні сири характеризуються високою поживною цінністю, біологічним складом та є джерелом добре засвоєного білка. Більша частка сичужних сирів виробляється з коров'ячого молока, а технологічний процес є досить тривалим (Zheng et al., 2021; Zhao et al., 2021). Основну мікрофлору цього молочного продукту становить молочнокисла мікробіота внесеного заквашувального препарату, незначну частину становить залишкова мікрофлора пастеризованого молока, технологічного обладнання та предметів, які мають контакт під час усього технологічного процесу (Korena et al., 2023; Arutiunian & Kukhtyn, 2023). Тому якісний твердий сир вважається не тільки цінним завдяки харчовим компонентам молока, але й завдяки життєдіяльності його закваскової мікрофлори, яка селекціонується та виживає під час складного технологічного процесу дозрівання (Fox et al., 2017; Vacca et al., 2024). Згідно ДСТУ 6003:2008 Сири тверді. Загальні технічні умови, в ньому контролюють такі мікробіологічні показники безпечності: БГКП, *S. aureus*, *Salmonella* та *Listeria monocytogenes*. Зокрема, БГКП не допускаються в 0,01 г, золотистий стафілокок в 1 г не більше 5×10^2 КУО, сальмонели й лістерії в 25 г (DSTU, 2008). Незважаючи на контроль твердого сиру, як і інших молочних продуктів за мікробіологічними показниками ця категорія продуктів віднесена до тих, які найчастіше є причиною аліментарних інфекцій та отруєнь у споживачів (Akineden et al., 2008; Rahimi,

2013; Tilocca et al., 2020). За даними Європейського управління з безпеки харчових продуктів і Європейського центру профілактики та контролю захворювань, у 2021 році в усіх країнах ЄС та Великобританії було зареєстровано 4005 харчових спалахів, у яких постраждали 32 543 людини (EFSA, ECDC, 2021). Аналогічна статистика в США, де приблизно 56 000 людей госпіталізуються щороку через хвороби харчового походження (IFSAC, 2019). За оцінками ВООЗ, у всьому світі протягом року небезпечна їжа є причиною 600 мільйонів випадків захворювань харчового походження, що спричиняє 420 000 смертей (Pires et al., 2021). При цьому найбільш небезпечні харчові патогени – це *Campylobacter*, *Salmonella* та збудниками, що виробляють токсини – *Staphylococcus aureus* (Kukhtyn, et al., 2021; Murtay et al., 2022).

Враховуючи таку тенденцію, питання підвищення мікробіологічної безпеки молочних продуктів, в тому числі й твердого сиру, є постійно актуальним, а розроблення нових безпечних способів гальмування розвитку патогенної мікрофлори в ньому або зниження їх у процесі зберігання протягом реалізації є завжди перспективним.

Для підвищення безпеки швидкопсувних харчових продуктів під час їх виробництва та реалізації використовують декілька технологічних підходів. Зокрема, це температурна обробка (пастеризація, стерилізація, заморожування) (Cheng et al., 2017; Kukhtyn et al., 2017; Azizi-Lalabadi et al., 2023), обробка під високим тиском (Wolbang et al., 2008), ультразвуком (Bajovic et al., 2012), ультрафіолетовим опроміненням (Moye et al., 2018), тощо. Водночас досить значного поширення має використання антимікробних речовин синтетичного чи природного походження для впливу на мікрофлору харчового продукту (хімічні консерванти, природні ефірні олії, тощо) (Awuchi et al., 2020; Marti-Quijal et al., 2021). Кожен із цих способів має свої переваги та недоліки щодо впливу як на мікробіоту продукту, так і на основні інгредієнти харчової матриці.

Одним із загальноновизнаних і спільним недоліком усіх цих способів є те, що вони впливають на всі мікроорганізми, тобто інгібують, як патогенні, так і потенційно корисні автохтонні молочнокислі бактерії «нормальної» мікрофлори ферментованих продуктів (Moye et al., 2018). До того ж, навіть за використання цих доступних способів знешкодження мікрофлори, спалахи харчового походження все ще відбуваються відносно часто (Pires et al., 2021). Наведені чинники сукупно ілюструють необхідність цілеспрямованого антимікробного підходу, який можна використовувати у харчовій технології окремо або в поєднанні з іншими способами для встановлення додаткових бар'єрів з метою запобігання потраплянню харчових бактеріальних патогенів до споживачів.

Екологічно безпечним способом пригнічення та знищення мікробіоти у харчовому продукті може бути технологія «біологічного консервування» за допомогою літичних фагів специфічних до конкретного патогена продукту без шкідливого впливу на нормальну закваскову мікрофлору. Цей підхід називають «біоконтролем бактеріофага» або «біоконтролем фага» (Moye et al., 2018; Polaska & Sokolowska, 2019; Agün et al., 2024).

Бактеріофаги – це віруси, які поширені повсюдно в природі і вражають лише бактеріальні клітини. Ці організми характеризуються високою специфічністю, що є важливою ознакою, яка дозволяє використовувати їх у харчовій промисловості. Фаги застосовуються в трьох секторах харчової промисловості: первинне виробництво, біосанітарія та біоконсервація. Під час біосанітарії фаги або ферменти (ендолізини), які вони виробляють, в основному використовуються для запобігання утворенню біоплівки на поверхні обладнання, що використовується у виробничих приміщеннях. У разі біоконсервації фаги використовуються для продовження терміну зберігання продуктів шляхом боротьби з патогенними бактеріями, які псують їжу (Polaska & Sokolowska, 2019). Крім того, в останні роки все частіше поширюється тенденція про споживання корисної без хімічних консервантів харчових продуктів, а бактеріофаги можуть бути доброю альтернативою цьому процесу (Hussain et al., 2017).

Отже, застосування специфічних бактеріофагів проти конкретних збудників харчових інфекцій та токсикозів у технології виробництва молочних продуктів для підвищення їхньої безпечності без шкідливого впливу на самі продукти та корисну мікрофлору є актуальним та потребує ґрунтовного дослідження.

Метою роботи було провести контроль твердих сичужних сирів за вмістом золотистого стафілококу та розробити технологію їх консервування за допомогою літичного стафілококового бактеріофагу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Контамінацію молока-сировини ($n=72$) та Голландського сиру ($n=21$) золотистим стафілококом визначали шляхом посіву відібраних проб ($n=93$) та проведених десятикратних розведень на селективне середовище гемоагар з 5 % натрію хлориду з наступним термостатуванням за $+37 - 48$ год та підрахунком колоній з інтерпретацією на 1 мл/г продукту. Культури золотистого стафілококу – це гемолітичні, які ферментують глюкозу зі здатністю до плазмокоагуляції кролячої плазми (Kukhtyn et al., 2017).

Виділення бактеріофагів з молочної сировини проводили шляхом використання бактеріальних клітин золотистих стафілококів як специфічних господарів відповідно до загальних методик (Horiuk et al., 2020). Відділення бактеріофагів від клітин мікроорганізмів здійснювали шляхом фільтрації через бактеріальні фільтри з порами 0,45 мкм. Спектр літичної дії виділених з молочної сировини протистафілококових фагів визначали до культур стафілококів із твердих сирів.

Під час удосконалення технології сиру Голландського зі стафілококовим бактеріофагом було вироблено два зразки сиру – один дослідний із бактеріофагом, а другий контрольний – без бактеріофагу. Усі отримані результати піддавалися загальновизнаним методам статистичної обробки з використанням програми Statistica 10, при цьому за $P \leq 0,05$ цифрові дані вважали вірогідними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Поряд із проблемою харчового токсикозу, спричиненого ентеротоксигенними стафілококами, ще більшою загрозою ці бактерії становлять для громадського здоров'я як резистентні до антимікробних препаратів. Адже стійкість до протимікробних препаратів стала однією з головних загроз громадському здоров'ю двадцять першого століття. Згідно з останніми оцінками, у 2019 році 1,27 мільйона смертей були спричинені бактеріями стійкими до антибіотиків (Turchi et al., 2024). Серед них *Staphylococcus aureus* посідає друге місце в списку мікроорганізмів, відповідальних за смертність внаслідок стійкості до антибіотиків у країнах з високим рівнем доходу (Muttay et al., 2022). Оскільки, *S. aureus* є відповідальним за безліч інфекцій, які варіюються від нозокоміальних інфекцій, що пов'язані з високим рівнем захворюваності та смертності серед людей, до інфекцій у продуктивних тварин, які використовуються людиною (Lee et al., 2012). Отже, враховуючи наслідки, які може спричинити молочна продукція, яка надмірно контамінована цим убіквітарним мікроорганізмом, нами на першому етапі дослідження було визначено рівень обсіменіння молока-сировини на переробних підприємствах золотистим стафілококом. Це молоко приймається за державним стандартом і використовується для виробництва твердих сирів (рис. 1).

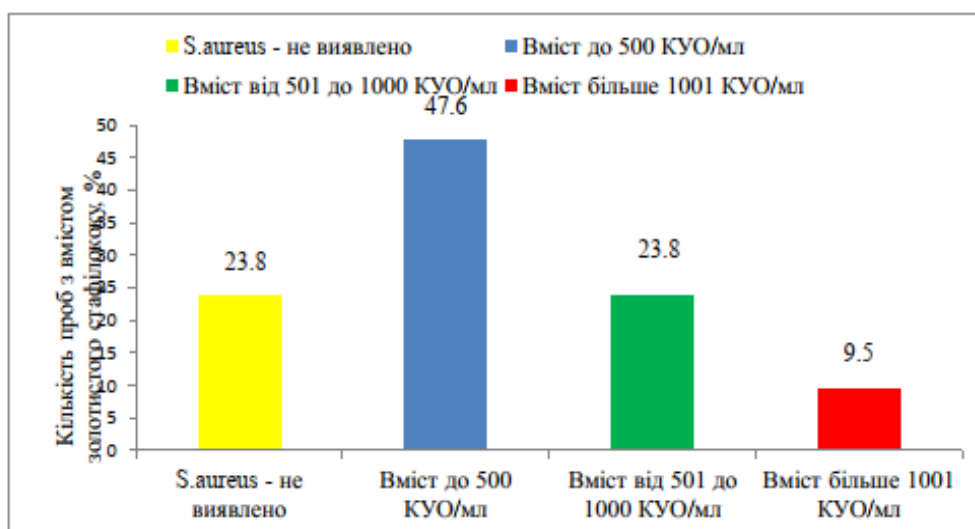


Рисунок 2. Контамінація золотистим стафілококом твердих сичужних сирів, які реалізуються в Україні

З результатів досліджень (рис. 2) спостерігаємо, що частка твердих сирів, у яких не виявляли доступними мікробіологічними методами наявності золотистого стафілококу, становила $23,8 \pm 1,7$ %. Водночас найбільше було сирів, які мали обсіменіння цим мікроорганізмом у діапазоні від 1 до 5×10^2 КУО/г – $47,6 \pm 3,3$ %. Тобто з досліджених нами твердих сирів кількість проб, які були забруднені коагулазопозитивними стафілококами, проте не перевищували допустимий рівень відповідно до національного стандарту ДСТУ 6003 : 2008 (DSTU, 2008) 5×10^2 КУО/г, становила 71,4 %. До того ж виявлено $23,8 \pm 1,6$ % проб твердих сирів, у яких рівень забруднення золотистим стафілококом був у дещо більшому діапазоні (501 – 1000 КУО/г) від дозволеного стандартом рівня. Близько 10 % проб досліджених сирів були контаміновані коагулазопозитивними стафілококами у кількості більше 10^3 КУО/г, тобто більше як в два рази допустимого стандартом рівня. Це може бути наслідком розвитку стафілококів під час реалізації у торговельній мережі або під час транспортування. Водночас більшість дослідників вважають (Obeso et al., 2008; Akineden et al., 2008), що для виникнення харчового токсикозу, спричиненого ентеротоксигенними стафілококами, необхідно, щоб їх кількість у продукті сягала близько 10^6 КУО/г/мл. Проте, на нашу думку, більше значення має не остаточна кінцева кількість золотистого стафілококу в продукті, а з якої кількості вони розмножилися. У випадку першого варіанту, кількість у 10^6 КУО може бути наслідком контамінації на завершальній стадії технологічного процесу або реалізації, тоді стафілококи не встигнуть накопичити достатню кількість ентеротоксину відповідального за токсикоз. У другому випадку, якщо створюються сприятливі умови для розвитку стафілококів, то навіть за незначної початкової кількості 10^2 КУО/г їх кількість поступово зростає та накопичується ентеротоксин.

Отже, тверді сири, які реалізуються в торговельній мережі, контаміновані золотистим стафілококом приблизно в 30 % у кількості більше 5×10^2 КУО/г, що не відповідає вимогам стандарту.

Зазвичай, найбільшою технічною проблемою фагового біоконтролю харчових продуктів є його ефективність, тобто для обробки харчових продуктів маємо використовувати тільки літичні, а не лізогенні бактеріофаги. Іншими словами, фаги можуть ефективно знижувати рівень цільових бактерій у харчових продуктах, але вони не завжди повністю їх усувають, коли перебувають у лізогенному стані. До того ж для активної дії

бактеріофагу він повинен контактувати з чутливими до лізису бактеріальними клітинами. У такому випадку необхідно його вносити у середовище у великих концентраціях не менше 10^7 БУО/мл, при цьому буде відбуватися пасивна імунізація бактеріальних клітин. Якщо у харчовій системі буде велика кількість цільових бактеріальних клітин то може проходити й активна фагова інфекція із зараженням їх та виділенням у середовище значної кількості віріонів, які будуть заражувати нові бактерії (Hussain et al., 2017).

Найкраще фаги проявляють літичну активність до своїх бактерій-господарів якщо вони виділені з того ж самого середовища, що й їхні цільові клітини (Turchi et al., 2024). Тому нами виділено 10 культур золотистого стафілококу з молока-сировини та 8 із твердих сичужних сирів. Ці виділені культури були вибрані як господарі для репродукції стафілококових бактеріофагів. У результаті проведених досліджень було виділено з молока-сировини 7 літичних штамів бактеріофагів, які лізували культури золотистого стафілококу з твердих сирів та молока сирого. Оцінка літичної активності цих бактеріофагів наведена в табл. 1.

Таблиця 1. Оцінка літичної активності бактеріофагів до культур золотистого стафілококу з молока-сировини й сиру твердого, $n=7$, %

Штами фагів, №	Літична активність фагів у методі «стікаючої краплі»							
	<i>S. aureus</i> з молока-сировини, $n=10$				<i>S. aureus</i> з твердого сиру, $n=8$			
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
Фаг 1	–	10	40	50	–	–	25,0	75,0
Фаг 2	–	–	30	70	–	–	37,5	62,5
Фаг 3	–	–	20	80	–	–	25,0	75,0
Фаг 4	–	20	20	60	12,5	12,5	25,0	50,0
Фаг 5	–	10	30	60	–	25,5	37,5	37,5
Фаг 6	–	30	20	50	–	25,0	12,5	62,5
Фаг 7	–	–	20	80	–	–	25,0	75,0

Примітка: міра лізису фагу: «++++» – повний лізис – відсутній ріст колоній *S. aureus*; «+++» – напівзливний лізис, наявність кілька колоній *S. aureus*; «++» – плямистий лізис, виявляємо ≥ 50 фагів; «+» – виявляємо близько 20–50 фагів; У випадку лізису в «+++» та «++++» результат є позитивним [87].

З даних таблиці 1 спостерігаємо, що виділені сім фагів лізували всі культури золотистого стафілококу, однак їх літична активність характеризувалася різною інтенсивністю. Зокрема фаги №2, №3 та №7 у 100 % випадків лізували культури золотистого стафілококу, виділених з молока-сировини у три та чотири хрести. Культури *S. aureus* з твердого сиру також добре лізувалися виділеними фагами, зокрема міра лізису в три та чотири хрести була у вище перерахованих фагів та у фагу №1. Це дає підставу до використання цих виділених фагів у технології консервування молочних продуктів, які контаміновані *S. aureus*, що походить з коров'ячого молока-сировини. При цьому, на нашу думку, найдоцільніше використати для створення фагової композиції високолітичні фаги №3 та №7.

Отже, фаг №3 та фаг №7 проявляли в 75,0 – 80,0 % літичну активність у вигляді трьох та чотирьох хрестів як відносно культур золотистого стафілококу з молока, так і виділених з твердого сичужного сиру. Це вказує на можливість їх використання у якості біоконсервантів для зменшення рівня стафілококів у твердих сирах під час реалізації.

Під час технології виробництва твердого сичужного сиру із стафілококовим бактеріофагом ми за основу взяли класичну технологію сиру Голландського. Вона передбачала такі стандартні технологічні операції й режими. Приймання – оцінка кількості та за вмістом жиру, білку, кислотності, тощо з наступним визначенням мікробіологічних показників та сиропридатності молока-сировини. Очищення, охолодження та тимчасове

резервування молока з наступним його дозріванням до 12 год за температури від + 8 до 10°C. Нормалізація з гомогенізацією та пастеризацією за $t \approx +77^\circ\text{C}$ протягом 20 с. Потім пастеризовану суміш піддають охолодженню до температури зсідання ($37 \pm 2^\circ\text{C}$). Водночас відмінність технології полягала в тому, що на такій технологічній операції як внесення в молочну суміш заквашувального препарату, солей кальцію, сичужного ферменту ми додатково додавали композицію стафілококового бактеріофагу у кількості 1 мл на 1 л молочної суміші. При цьому концентрація фагів у бактеріофазовій композиції становила не менше 10^5 БУО/мл. Таку концентрацію бактеріофагів для біоконтролю та консервації харчових продуктів пропонують ряд вчених (Kazi & Annarpure, 2016; Hussain et al., 2017; Polaska & Sokołowska, 2019; Agün et al., 2024), які застосовували протисальмонельозні та протилістеріозні бактеріофаги для забезпечення мікробіологічної стійкості харчових продуктів. У подальшому технологія виробництва твердого Голландського сиру мала стандартні технологічні операції (рис. 3). Зокрема перевірка готовності згустку, обробка його та постановка зерна до нагрівання (температура другого нагрівання $38\text{--}42^\circ\text{C}$). Надалі формували головки та проводили пресування сиру, соління здійснювали за температури $9\text{--}11^\circ\text{C}$ й концентрації кухонної солі 20 %. Після процесу соління сир обсушували за температури 11°C протягом двох діб, процес визрівання становив 60 діб. У контрольному зразку сиру технологічні операції були аналогічні, але без додавання протистафілококового бактеріофагу.

Внесення у молочну суміш під час технологічного процесу виробництва сиру виділені нами стафілококові бактеріофаги має на меті лізувати клітини золотистого стафілококу та не допускати їх розвиток до рівня, який вважається критичним для виникнення стафілококового токсикозу та, крім цього, щоб кількість коагулазопозитивних стафілококів у продукті під час реалізації не перевищувала вимоги ДСТУ 6003 : 2008. Тому важливо було проконтролювати кількісні зміни золотистого стафілококу під час 60-ти добового визрівання сиру (рис. 3).

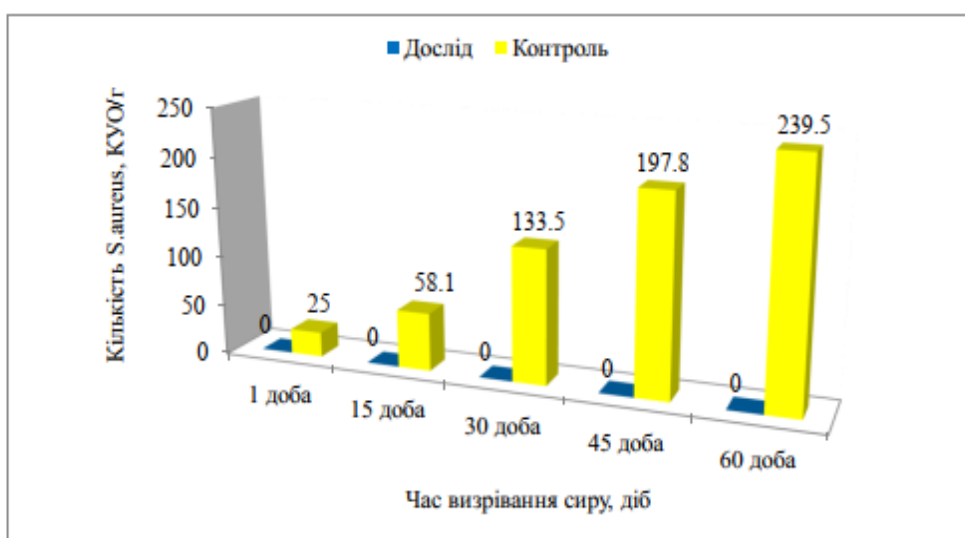


Рисунок 3. Динаміка кількості золотистого стафілококу за дозрівання твердого сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

Виявлено (рис. 3), що додавання літичних стафілококових бактеріофагів у молочну суміш під час технології твердого сиру дозволяє провести її консервування щодо розвитку золотистого стафілококу у сирі за його визрівання. Так спостерігаємо, що у твердому сирі із стафілококовим бактеріофагом протягом 60-ти добового визрівання клітин золотистого стафілококу не виділяли стандартними мікробіологічними методами. Втім, у контрольному зразку сиру за його дозрівання золотистий стафілокок виявлявся на першу добу у кількості $25,0 \pm 1,7$ КУО/г, а через 60 діб його кількість збільшилася в 9,5 рази і становила $239,5 \pm 14,6$ КУО/г. Хоча вміст стафілококу суттєво збільшився за весь період визрівання, водночас вказана кількість була понад два рази меншою рівня, визначеного стандартом – 5×10^2 КУО/г [2].

Також було проведено органолептичні та фізико-хімічні дослідження дослідного та контрольного зразків сиру на відповідність показникам ДСТУ 6003:2008 Сири тверді. Загальні технічні умови. Встановлено, що обидва зразки відповідали нормативу стандарту за показником масової частки вологи, яка становила $44,3 \pm 0,2$ %, до того ж різниці між дослідним і контрольним зразками за органолептичними властивостями дегустаційна комісія не виявила.

Отже, застосування літичних бактеріофагів для біоконтролю золотистого стафілококу дозволяє практично повністю його знешкодити у твердому сичужному сирі у технології виробництва.

ВИСНОВКИ. 1. У молоці-сировині, яке надходить на перероблення для виробництва твердих сирів, у 25-40 % проб залежно від гатунку золотистий стафілокок не виявлявся, в середньому 45 % проб молока були контаміновані золотистим стафілококом у кількості до 5×10^2 КУО/мл та від 18 до 30 % проб мали вміст коагулазопозитивних стафілококів понад 5×10^2 КУО/мл.

2. У твердих сирах, які реалізуються у торговельній мережі, в середньому в 25 % проб не виділяли золотистий стафілокок, водночас цим мікроорганізмом контаміновані приблизно 30 % проб у кількості більше 5×10^2 КУО/г, що перевищує вимоги стандарту.

3. З молока та з твердого сичужного сиру відібрано два бактеріофаги, що проявляли в 75,0 – 80,0 % літичну активність відносно культур золотистого стафілококу, які були використані у технології консервування твердого сиру Голландського.

4. Розроблено технологію сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом для підвищення його безпечності під час реалізації. Застосування літичних бактеріофагів для біоконтролю золотистого стафілококу дозволяє практично повністю його знешкодити у сичужному сирі. Використання літичних бактеріофагів для підвищення безпечності молочних продуктів є екологічно чистим способом стримування розвитку патогенних бактерій, тим самим не впливаючи на закваскову мікрофлору продукту.

References

- Agún, S., Fernández, L., Rodríguez, A., & García, P. (2024). Phage lytic proteins: a natural approach to agro-food safety. *Food Science and Human Wellness*
- Akineden, Ö., Hassan, A. A., Schneider, E., & Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *International journal of food microbiology*, 124(2), 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.027>
- Arutunian, D., & Kukhtyn, M. (2023). Microbiological indicators of quality and safety of hard rennet cheese with linseed content during storage. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Food Technologies*, 25(100), 3–8. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-f10001>

- Awuchi, C. G., Twinomuhwezi, H., Igwe, V. S., & Amagwula, I. O. (2020). Food additives and food preservatives for domestic and industrial food applications. *Journal of Animal Health*, 2(1), 1–16.
- Azizi-Lalabadi, M., Moghaddam, N. R., & Jafari, S. M. (2023). Pasteurization in the food industry. In *Thermal Processing of Food Products by Steam and Hot Water*, pp. 247–273. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818616-9.00009-2>
- Bajovic, B., Bolumar, T., & Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat science*, 92(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.024>
- Cheng, L., Sun, D. W., Zhu, Z., & Zhang, Z. (2017). Emerging techniques for assisting and accelerating food freezing processes: A review of recent research progresses. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(4), 769–781. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1004569>
- DSTU 6003 (2008). Hard cheeses. General technical conditions. National Standard of Ukraine, 22 p.
- EFSA, ECDC, The European Union One Health 2019 Zoonoses Report, EFSA Journal. 19 (2021). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2017). Microbiology of Cheese Ripening. In: Fundamentals of Cheese Science. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_11
- Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Kernychnyi, S., Tarasenko, L. (2020). Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Veterinarni Medicina*, 65 (10), 421–426. <https://doi.org/10.17221/55/2020-VETMED>
- Hussain, M. A., Liu, H., Wang, Q., Zhong, F., Guo, Q., & Balamurugan, S. (2017). Use of encapsulated bacteriophages to enhance farm to fork food safety. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13), 2801–2810. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1069729>
- Interagency Food Safety Analytics Collaboration (IFSAC), Foodborne illness source attribution estimates for 2019 for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter* using multi-year outbreak surveillance data, United States, 2019. <https://www.cdc.gov/foodsafety/ifsac/projects/index.html>
- Kazi, M., & Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of food science and technology*, 53(3), 1355–1362. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1996-8>
- Korena, K., Krzyzankova, M., Florianova, M., Karasova, D., Babak, V., Strakova, N., & Juricova, H. (2023). Microbial succession in the cheese ripening process—competition of the starter cultures and the microbiota of the cheese plant environment. *Microorganisms*, 11(7), 1735. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071735>
- Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Pokotylo, O. S., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., & Pokotylo, O. O. (2017). Staphylococcal contamination of raw milk and handmade dairy products, which are realized at the markets of Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, (3, Iss. 1), 12–16.
- Kukhtyn, M., Berhilevych, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horiuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. *Eastern-European journal of Enterprise Technologies*, (5 (11)), 26–33. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.110488>
- Kukhtyn, M., Horiuk, Y., Salata, V., Klymyk, V., Vorozhbit, N., & Rushchinskaya, T. (2021). Staphylococcus aureus of raw cow's milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 23(102), 53–59. <https://doi.org/10.32718/hvvet10208>
- Lee, S. H. I., Camargo, C. H., Gonçalves, J. L., Cruz, A. G., Sartori, B. T., Machado, M. B., & Oliveira, C. A. F. D. (2012). Characterization of Staphylococcus aureus isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel

electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7377–7383. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5733>

Marti-Quijal, F. J., Khubber, S., Remize, F., Tomasevic, I., Roselló-Soto, E., & Barba, F. J. (2021). Obtaining antioxidants and natural preservatives from food by-products through fermentation: A review. *Fermentation*, 7(3), 106. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030106>

Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 10(4), 205. <https://doi.org/10.3390/v10040205>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Obeso, J. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ΦH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International journal of food microbiology*, 128(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.010>

Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., ... & Devleeschauwer, B. (2021). Burden of foodborne diseases: Think global, act local. *Current Opinion in Food Science*, 39, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.006>

Polaska, M., & Sokołowska, B. (2019). Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS microbiology*, 5(4), 324. <https://doi.org/10.3934/2Fmicrobiol.2019.4.324>

Rahimi, E. (2013). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 393–399. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200008>

Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., ... & Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>

Turchi, B., Campobasso, C., Nardinocchi, A., Wagemans, J., Torracca, B., Lood, C., ... & Di Luca, M. (2024). Isolation and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage Hesat from dairy origin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 299. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13129-y>

Vacca, M., Celano, G., Serale, N., Costantino, G., Calabrese, F. M., Calasso, M., & De Angelis, M. (2024). Dynamic microbial and metabolic changes during Apulian Caciocavallo cheese-making and ripening produced according to a standardized protocol. *Journal of Dairy Science*. In Press. [Journal Pre-proof. https://doi.org/10.3168/jds.2023-24049](https://doi.org/10.3168/jds.2023-24049)

Wolbang, C. M., Fitos, J. L., & Treeby, M. T. (2008). The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.08.001>

Zhao, Z., Ning, C., Chen, L., Zhao, Y., Yang, G., Wang, C., ... & Li, S. (2021). Impacts of manufacture processes and geographical regions on the microbial profile of traditional Chinese cheeses. *Food Research International*, 148, 110600. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110600>

Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Front. Microbiol.* 12: 703284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>

Отримано 02.08.2024 р., прийнято до публікації 12.08.2024 р.