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 Орися Йосипівна,
доктор сільськогосподарських наук, професор,
https://orcid.org/0000-0002-0286-7463,
Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького,
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. Ґжицького,
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. Ґжицького,
79010, вул. Пекарська, 50, Львів, Україна.
Климик 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 Puluj National Technical University,
46001, Ruska Str., 56, Ternopil, Ukraine.
Orysia Tsisaryk,
Doctor of Agricultural Sciences, professor
https://orcid.org/0000-0002-0286-7463,
Stepan Gzhytskyi 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 Gzhytskyi 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 Gzhytskyi 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 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 (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; Murray et al., 2022).

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) (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 природнього походження для впливу на мікрофлору харчового продукту (хімічні консерванти, природні ефірні олії, тощо) (Awuchi et al., 2020; Martí-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 загальновизнаних 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 цілеспрямов аного 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; Połaska & Sokołowska, 2019; Agún 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 біоплівок 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 (Połaska & Sokołowska, 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 плазмокагуляції 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 протистафілококвих 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 загрозу 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 (Murray 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).

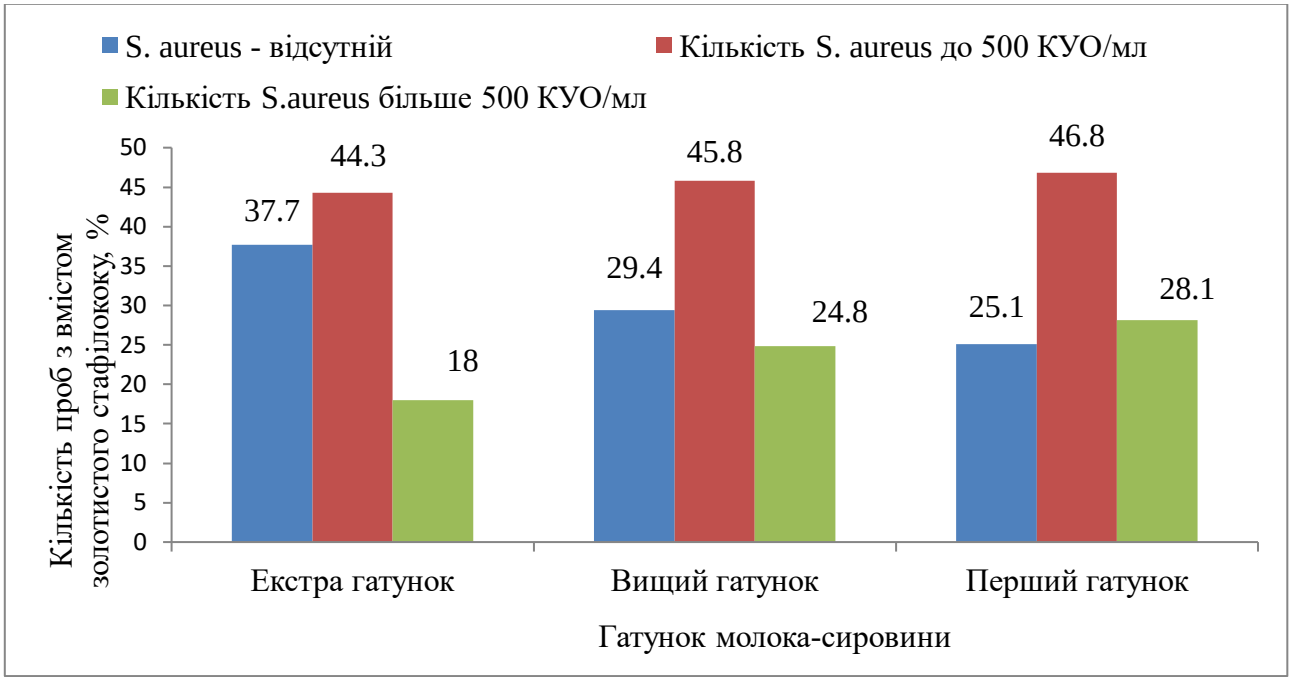

Рисунок 1. Контамінація молока-сировини на молокопереробних підприємствах золотистим стафілококом залежно від ґатунку

З результатів досліджень (рис. 1) спостерігаємо, що найменшу кількість проб сирого молока, у якому не виявлявся золотистий стафілокок, реєстрували серед ґатунку екстра – 37,7 ± 1,8 %. При цьому кількість проб ґатунку екстра, яка містила золотистий стафілокок до 5×10^2 КУО/мл була 44,3 ± 2,2 %, а проб молока сировини цього ґатунку більше 501 КУО/мл – 18,0 ± 1,3 %. Тобто навіть серед ґатунку екстра молоко сире, яке приймається на перероблення та використовується для виробництва твердого сиру, контаміноване золотистим стафілококом становить 62,3 % проб. Такою ситуацією можна пояснити допустимість у твердих сичужних сирах згідно ДСТУ 6003 : 2008 (DSTU, 2008) наявність золотистого стафілококу у кількості 5×10^2 КУО/г (500 КУО).

У пробах молока-сировини нижчих ґатунків (вищого й першого) реєструємо обсіменіння цим 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 ґатунку екстра. При цьому зростає кількість проб молока-сировини, у яких виявляли вміст коагулазопозитивних стафілококів більше 5×10^2 КУО/мл, так серед проб вищого ґатунку на 6,8 %, а серед першого на 10,1 %, порівнюючи з молоком найвищого – екстра ґатунку. Такі дані вказують, що стафілококи, в тому числі й золотистий, можна віднести до «нормальної» автохтонної мікрофлори молочної сировини, які практично постійно присутні в ній (Kukhtyn et al., 2017). 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 під час усього процесу.

Отже, молоко-сировина є беззаперечним джерелом контамінації твердих сичужних сирів золотистим стафілококом тому розроблення технології біоконсервації за допомогою фагів є перспективним для контролю цього патогена у готовому продукті.

Наукову зацікавленість становили результати досліджень відносно виявлення рівня контамінації золотистим стафілококом твердих сичужних сирів вітчизняного виробництва, які реалізуються в Україні (n=21). Результати наведено на рисунку 2.

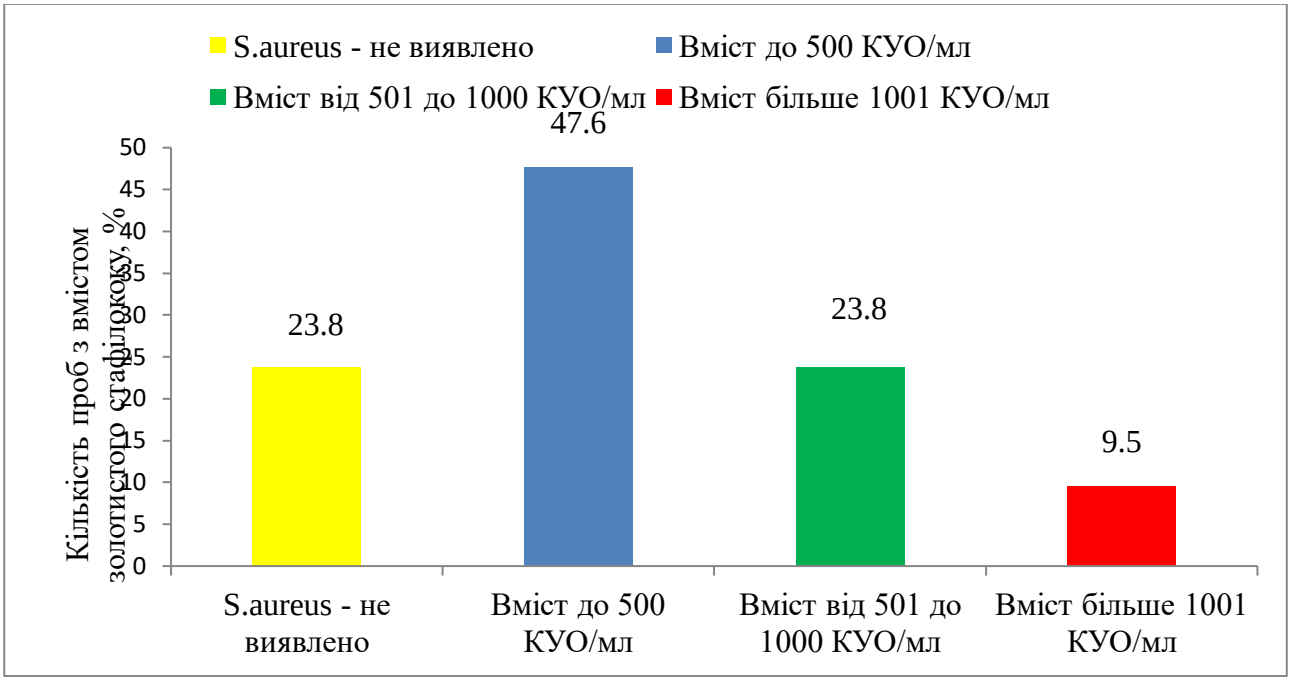

Рисунок 2. Контамінація золотистим стафілококом твердих сичужних сирів, які реалізуються в Україні

З результатів досліджень (рис. 2) спостерігаємо, що частка твердих сирів, у яких не виявляли доступними мікробіологічними методами наявність золотистого стафілококу, становила 23,8 ± 1,7 %. Водночас найбільше було сирів, які мали обсіменіння цим мікроорганізмом у діапазоні від 1 до 5×10^2 КУО/г – 47,6 ± 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 (DSTU, 2008) 5×10^2 КУО/г, становила 71,4 %. До того ж виявлено 23,8 ± 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 ентеротокисгенними 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»**							
	***S.aureus* з молока-сировини, n=10**				***S.aureus* 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°С. Нормалізація з гомогенізацією та пастеризацією за t ≈ +77°С протягом 20 с. Потім пастеризовану суміш піддають охолодженню до температури зсідання (37±2°С). 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 бактеріофаговій композиції становила не менше 10^8 БУО/мл. Таку концентрацію бактеріофагів для біоконтролю та консервації харчових продуктів пропонують ряд вчених (Kazi & Annapure, 2016; Hussain et al., 2017; Połaska & Sokołowska, 2019; Agún 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 38-42 °С). Надалі формували головки та проводили пресування сиру, соління здійснювали за температури 9-11°С й концентрації кухонної солі 20 %. Після процесу соління сир обсушували за температури 11 °С 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).

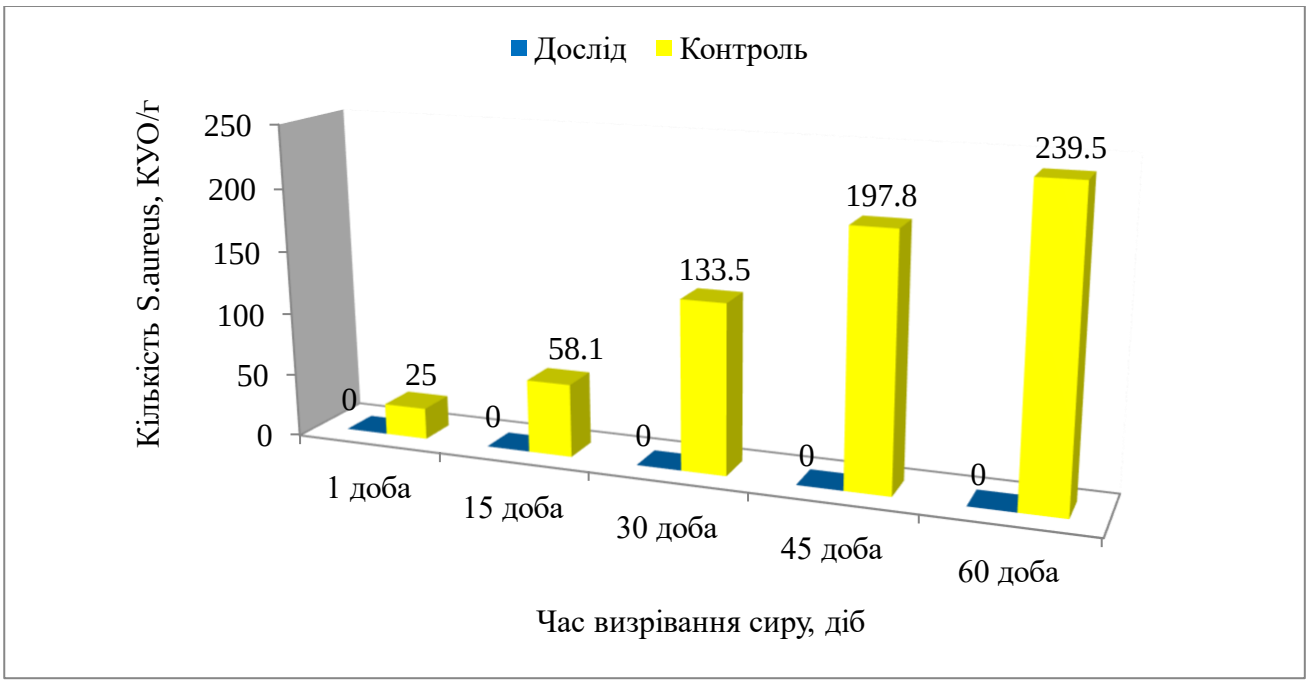

Рисунок 3. Динаміка кількості золотистого стафілококу за дозрівання твердого сиру Голландського із стафілококовим бактеріофагом

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 ± 1,7 КУО/г, а через 60 діб його кількість збільшилася в 9,5 рази і становила 239,5 ± 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±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 ґатунку 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

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. 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*. *Veterinární Medicína*, 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/nvlvet10208

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

Martí-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

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., ... & 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

Połaska, 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

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.