

5 - 27

ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ПРОТЕОЛИТИЧНАТА АКТИВНОСТ НА ПСИХРОФИЛНИ
МИКРООРГАНИЗМИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ТЕЛЕНШКО МЕСО

Росица Илиева, ст. н. с., Муса Донзо, аспирант, Анна Чмел, аспирант
Централен научноизследователски ветеринарномедицински институт -
София.

Протеолитичната активност на микрофлората на месото е хигиенен проблем, тясно свързан с качеството и трайността на продукта.

В специалната литература развалата на месото се разглежда като резултат от протеазната активност на микроорганизмите, влизащи в състава на неговата микрофлора. Многобройни научни изследвания са насочени върху микрофлората на месото въобще и бактериите, включени в протеолизата. /1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 17, 19, 20, 21/. Авторите изтъкват, че в протеолитичните процеси на месото и месните продукти вземат участие представители на различни таксономични групи. В проучвания върху микрофлората на хладилно съхранявано месо, редица изследователи установяват наличие на протеолитични микроорганизми с психрофилен характер на растеж, принадлежащи към различни родове /4, 11, 12, 20, 17, 19, 16, 13, 14, 15, 7/. Като най-активни в процесите на развала са посочени представители от групата на *Pseudomonas*. Установено е, че протеолитичните ензими на психрофилните микроорганизми имат строго специфично действие върху определени субстрати. Гнилостните микроорганизми могат да бъдат разграничени от непричиняващите развала въз основа увреждането на стерилен субстрат /мускулен сок или мускулатура/ докато тяхното диференциране чрез обикновени биохимични методи се е оказало невъзможно. При изследвания с агарова среда, в състава на която са включени различни видове месо е установено, че разтаянето на желатина не може да се приеме като индикатор за протеолитичната активност на микроорганизмите /17/. За определяне способността на един щам да предизвика развала на месо се препоръчва да се извърши изследване върху стерилно месо

или среда, съдържаща месо от същия вид /17, 5, 16/.

Целите на настоящето проучване е да се установи наличие ли са протеолитични микроорганизми с психрофилен характер на растеж в нормалната микрофлора на разфасованото телешко месо, предлагано на нашия пазар.

Проучванията се извършиха върху 248 бактериални култури с психрофилен характер на растеж, принадлежащи към различни родове /*Pseudomonas* ssp. II-53, *Pseudomonas* III-37, *Pseudomonas* ssp. IV-16, *Acinetobacter* - 55, *Micrococcus* - 32, *Enterobacter* - 22, *Flavobacter* - 10, *Aeromonas* - 9, *Corynebacter* - 9, *Vibrio* - 5/. Шамовите са изолирани от повърхността и вътрешността на 60 проби разфасовано и опаковано с и без вакуум телешко месо, при добив и съхранение до 72 час на 4 - 6 °C.

Протеолитичната активност на изследваните микроорганизми се определяше чрез белтъчната среда по Scheibner /17/ с телешко месо и прилаганите в рутинната лабораторна практика среда с желатина и воден агар с добавка на 30% обезмаслено мляко. При опитите белтъчната среда по Scheibner се приготвяше по рецептата на автора и чрез модифициране / смесваха се приготвени по оригиналната рецепта 85ml воден агар и 15ml суспензия от телешко месо и физиологичен разтвор /. Посевките се култивираха при 20 - 22 °C и резултатите се отчитаха всеки ден в продължение на 10 дни. Принципът на отчитането се основава на разграждането на месния белтък в състава на средата под влияние на бактериалните протеази, при което около колонията се появява прозрачна зона с ширина до 2 и повече милиметра. Степента на протеолитичната активност се определяше чрез измерване ширината на прозрачните зони около колонията. При опитите беше възприето зоните с ширина до 2mm да се означават с +, 2-5mm с ++ и над 5mm с +++.

Сравнителни изследвания върху протеолитичната активност на 21 щама от род *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Vibrio*, *Flavobacter* бяха извършени с белтъчен агар по Scheibner с телешко, свинско, овче, пилешко и рибно месо, млечен агар и желатин.

Резултатите от изследванията показват наличие на протеолитични микроорганизми с психрофилен характер на растеж в нормалната микрофлора на изследваните проби месо и са отразени в таблица 1.

От таблицата се вижда, че 29 / 11,6% / от проучените 248 бактериални култури са протеолитично активни върху белтъчен агар на Scheibner с телешко месо.

Следва да се отбележи по-голямото процентно съотношение на активни шамове от род *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* и *Vibrio*. Нашите данни в тази насока са сходни с посочените от други автори при подобни проучвания / 10, 11, 12, 13, 14, 17 /.

При сравняване резултатите за количественото наличие на протеолитични микроорганизми, определено чрез белтъчен агар по Scheibner, желатин и млечен агар се вижда, че количеството на активните шамове е различно при различните субстрати. Най-голяма част от изследваните 248 щама са активни към млечния белтък / 23,3% /, по-малка към желатина 48 / 19,3% / и най-малък към белтъчния агар с телешко месо по Scheibner - 29 / 11,6% /.

В таблица №2 са отразени резултатите от сравнителното проучване върху активността на подобрени бактериални култури от различни родове към различни белтъчни субстрати. От таблицата се вижда, че само 3 от изследваните 21 щама са активни към всички изпитани субстрати - по 1 шам *Pseudomonas* ssp. II / M1 /, *Pseudomonas* ssp. III / M6 / и *Acinetobacter* / M11 /, и степента на активност е различна към отделните видове белтък.

От други 7 бактериални култури, активни към телешко месо / №3, 14, 15, 16, 17, 18, 20 / 4 разтапят желатина и 3 са казеолитични. От друга страна, някои от неактивните към телешко месо 11 щама / №2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 21 / могат да разтапят желатина / №2, 4, 8, 11, 19 / и да атакуват в различна степен един или няколко вида месо, - овче, пилешко и риба / №5, 7, 8, 12, 21 /.

От изложените сравнителни данни се вижда, че не съществува строга корелация между активността на отделните шамове към различните изпитани субстрати.

Резултатите от най-често прилаганите в лабораторната практика тестове за протеолитичните свойства на микроорганизмите - разтапяне на желатин и казеолиза, не съвпадат с получените данни за активността на шамовете към специфичния субстрат, от който са изолирани - в случая телешко месо. В това отношение установените при настоящото проучване данни потвърждават становището, че разтапянето на желатина не може да се приема като индикатор за протеолитичната активност на един шам / 17 / и препоръката способността на микроорганизмите да предизвикват развала на месо да се изпитва на специфичния субстрат / 4, 15, 17 /.

Резултатите от сравнителните изследвания с 40 щама за степента на активност върху среда с телешко месо, приготвена по оригиналната рецепта на Scheibner / 17 / и чрез модифициране, са отразени в таблица №3.

От таблицата се вижда, че изпитаните култури показват еднаква степен на активност върху двете среди.

Изводи:
1. Нормалната микрофлора на разфасовано телешко месо / опаковано с и без вакуум / съдържа протеолитично активни микроорганизми от родовете *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Flavobacter*, *Aeromonas* и *Enterobacter*.

2. Активни към телешко месо са 11,6%, към желатина - 19,3% и към казеина - 23,3% от проучените 248 бактериални култури.
3. Протеолитичната активност на микроорганизми с психрофилен характер на растеж, изолирани от телешко месо, следва да се изпитва върху специфичния субстрат, от който са изолирани. Разтапянето на желатина не може да се приема като критерий за протеолитичната активност на щамовете, както и казеолизата.
4. Белтъчният агар на Scheibner, модифициран от нас / воден агар с добавка на 15% емулсия от телешко месо с физиологичен разтвор / е приложим за доказване на протеолитично активни микроорганизми с психрофилен характер на растеж, изолирани от телешко месо.

ЛИТЕРАТУРА

1. Илиева, Р., Й. Гогов, Психрофили в хранителните продукти /Обзор/, София, 1978
2. Цивоваров, В. П. - В со.: Актуални въпроси гигиены, Москва, 1970, 103.
3. Цивоваров, В. П., М. Ахимов - В со.: Актуални въпроси гигиены, Москва, 1970,
4. Смолина, Л. Н., Рыбное хоз., 17, 1966, №3, 67.
5. Bojarscki J., E. Prost Medycyna weterynaryja 38, 1982, 339.
6. Borton R., F. Bratzler J. of Food Sci. 35, 1970, 779.
7. Cox, N. A. Poultry Sci., 54, 1975, №6, 2001.
8. Dainty R. et al. J. Appl. Bact. 39, 1975, 73.
9. Hasegawa T. et al. J. of Food Sci. 35, 1970, 720.
10. Jenistea, C. et al. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 29, 1970, №1 - 2, 299.
11. Joksimvic, P. J., M. Sutic, M. Nedonic Technol. Mesa, 14, 1973, №2, 43.
12. Kraus, H. Archiv Lebensmittelhyg. 12, 20 Dezember 1961, Sonderdruck.
13. Lachellee, C. et al. J. Appl. Bact. 38, 1975, 89.
14. Lott, G. Wien Tierärztl. Monatssch, 58, 1971, 402.
15. Mast, M. G., J. F. Stephens Poultry Sci., 51, 1972, 1256.
16. Maxcy R., G. Froning, T. Hartung Poultry Sci. 52, 1973, 486.
17. Scheibner, G. Habilitationsschrift, Berlin, 1965.
18. Shewan, J. M. J. Appl. Bacteriol., 34, 1971, №2, 299.
19. Sinell, H. J. Archiv Lebensmittelhyg. 32, 1981, 33.
20. Tarrant, P. J. V. et al. Appl. Microbiol., 22, 1971, 224.
21. Zawadzki Z. Medycyna weterynaryja 38, 1982, 344.

Протеолитична активност и родова принадлежност на микроорганизмите

Таблица №1

Микроорганизми	Брой на култури	Белтъчен агар с телешко месо				Желатина				Млечен агар			
		неактивни		активни		неактивни		активни		неактивни		активни	
		бр.	%	бр.	%	бр.	%	бр.	%	бр.	%	бр.	%
Pseudomonas ssp. II	53	47	19.0	6	2.41	46	18.6	7	2.8	45	18.2	8	3.2
Pseudomonas ssp. III	37	35	14.1	2	0.80	34	13.7	3	1.2	32	13.0	5	2.0
Pseudomonas ssp. IV	16	12	4.9	4	1.61	13	5.3	3	1.2	11	4.4	5	2.0
Acinetobacter	55	50	20.2	5	2.01	39	15.7	16	6.5	40	16.1	15	6.1
Micrococcus	32	28	11.3	4	1.61	23	9.3	9	3.6	29	11.7	3	1.2
Enterobacter	22	20	8.0	2	0.80	21	8.5	1	0.40	13	5.3	9	3.6
Flavobacter	10	8	3.2	2	0.80	6	2.4	4	1.6	3	1.2	7	2.8
Aeromonas	9	8	3.2	1	0.40	7	2.8	2	0.80	7	2.8	2	0.8
Corynebacter	9	9	3.6	0	-	9	3.6	-	-	8	3.2	1	0.4
Vibrio	5	2	0.80	3	1.20	2	0.80	3	1.2	2	0.80	3	1.2
Общо:	248	219	88.4	29	11.6	200	80.7	48	19.3	190	76.7	58	23.3

Протеолитична активност на микроорганизмите

към различни белтъчни субстрати

Таблица №2

Микроорганизми	Pseudomonas ssp.									Acinetobacter				Enterobacter	Micrococcus	Vibrio	Flavobacter		
	II					III				IV				14	15	16	17	18	19
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13						
Субстрати	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. Белтъчен агар по Scheibner с :																			
- телешко месо	++	-	+++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	++	+	-
- овче месо	+	-	++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-	-
- свинско месо	+	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	+	+++	++	-	+
- пилешко месо	+	-	++	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	-	+	+	-
- рибно месо	++	-	+++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	++	-
2. Желатина	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
3. Млечен агар	++	-	+	-	-	++	+	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-	++

Забележка: Интензивност на протеолизата /зона на просветляване около колонии/: до 2 mm = +; 2-5 mm = ++; над 5 mm = +++.

Протеолитична активност на микроорганизмите върху оригиналния и модифициран белтъчен агар по Scheibner

Таблица №3

Микроорганизми	Брой	Интензивност на протеолизата							
		Белтъчен агар по Scheibner				Модифициран агар по Scheibner			
		+++	++	+	-	+++	++	+	-
Pseudomonas ssp. II									
активни	6	2	4	0	0	2	4	0	0
неактивни	4	0	0	0	4	0	0	0	4
Pseudomonas ssp. III									
активни	2	0	2	0	0	0	2	0	0
неактивни	3	0	0	0	3	0	0	0	3
Acinetobacter									
активни	5	0	5	0	0	0	5	0	0
неактивни	5	0	0	0	5	0	0	0	5
Micrococcus									
активни	4	0	3	1	0	0	3	1	0
неактивни	2	0	0	0	2	0	0	0	2
Flavobacter									
активни	2	0	0	2	0	0	0	2	0
неактивни	7	0	0	0	7	0	0	0	7
общо	40	2	14	3	21	2	14	3	21