

УДК 637.1

РАЗРАБОТКА ЗАКВАСОК ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ДЕТСКИХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Л.В. Сафроненко,

доцент каф. управления и научно-технического прогресса ИПК БГАТУ, канд. техн. наук

Н.К. Жабанос,

зав. лабораторией прикладных биотехнологий детского питания РУП «Институт мясо-молочной промышленности», канд. техн. наук

Н.Н. Фурик,

зав. отделом биотехнологий РУП «Институт мясо-молочной промышленности», канд. техн. наук

Е.В. Сафроненко,

директор ОАО «Бона Фуд»

Изложены результаты исследований по разработке технологических режимов производства бактериальных заквасок, включающие разработку состава питательных сред для культивирования микроорганизмов.

The results of studies on the development of the industrial valuable parameters of the production of the bacterial concerrates which include development of culture media for the cultivation of microorganisms are presented.

Введение

В мировом промышленном производстве молочных продуктов широко используется способ получения ферментированных продуктов, когда в подготовленное сырье вносятся микроорганизмы в виде высококонцентрированных заквасок, содержащих высокоактивную микрофлору (титр клеток 10^{10} - 10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток), способную без длительной активизации вызывать молочнокислое брожение, по своей интенсивности отвечающее требованиям нормального технологического процесса. Известно, что ведущая роль в поддержании и нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта и усилении иммунитета принадлежит бифидо- и лактобактериям, которые осуществляют защиту организма, образуя барьер, препятствующий прикреплению патогенных организмов к слизистой оболочке кишечника, и составляют более 90 % нормальной микрофлоры детей.

Лакто и бифидобактерии подавляют размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, как во время технологического процесса, так и в желудочно-кишечном тракте в случае сохранения их жизнеспособности (аллохтонности). Молочная, уксусная, муравьиная и янтарная кислоты, аминокислоты и белки, витамины В1, В2, К, никотиновая, пантотеновая и фолиевая кислоты, пиридоксин, цианкобаламин и другие биологически активные вещества являются типичными метаболитами молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий. [1].

Механизмами антибиотической активности могут быть: выработка диацетила, перекиси водорода,

лизоцима и бактериоцинов. Именно с бактериоцинами в последнее десятилетие связывают большие надежды, так как они (в отличие от антибиотиков, которые действуют на мишени клеточной стенки бактерий и часто приводят к образованию антибиотикоустойчивых штаммов), уничтожают патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. Данные микроорганизмы обеспечивают устойчивость иммунной системы организма человека к инфекционным заболеваниям, являются естественными био-сорбентами, обезвреживающими многие соединения тяжелых металлов, фенолы, формальдегиды и другие токсические вещества, попадающие в организм человека из окружающей среды и влияющие на снижение иммунитета. [2, 3].

Разработка заквасок прямого внесения для производства кисломолочных продуктов представляет собой многостадийную кропотливую работу, основными этапами которой являются:

– подбор штаммов микроорганизмов и их консорциумов с учетом комплекса медико-биологических, биохимических, технологически-ценных свойств;

– разработка параметров культивирования микроорганизмов – разработка и оптимизация питательных сред, как фактора успешного роста и развития пробиотических культур;

– отработка параметров накопления биомассы, режимов ее отделения и лиофилизации;

– подбор соотношения микроорганизмов и заквасок в состав поливидовых высококонцентриро-

ванных заквасок для обеспечения оптимальных стабильных параметров технологического процесса получения кисломолочных продуктов, исследование бактериальных заквасок по комплексу медико-биологических, токсикологических параметров и др.

Учитывая незначительный ассортимент кисломолочных продуктов для питания детей раннего возраста и их высокую биологическую ценность, особую актуальность приобретает разработка новых технологий кисломолочных продуктов, обогащенных пробиотической микрофлорой.

Целью проведенных исследований является разработка отечественных заквасок прямого внесения для производства кисломолочных продуктов детского питания, которые позволят нормализовать микрофлору желудочно-кишечного тракта и стабилизировать иммунитет.

Основная часть

Для исследований по оптимизации сред для пробиотических микроорганизмов использовались стандартные и известные из литературных источников питательные среды и компоненты.

В ходе исследований для культивирования бифидобактерий использовалась основа питательной среды, включающая следующие компоненты в различных процентных соотношениях и комбинациях:

– гидролизованное молоко	– 30,0-50,0;
– осветленная творожная сыворотка	– 30,0-50,0;
– экстракт кормовых дрожжей	– 2,0-3,0;
– кукурузный экстракт	– 0,5-1,0;
– пептон	– 2,0-3,0;
– натрий хлористый	– 0,3-0,5;
– калий фосфорнокислый однозамещенный	– 0,1-0,15;
– калий фосфорнокислый двухзамещенный	– 0,3-0,4;
– аскорбиновая кислота	– 0,01-0,05;
– цистеин	– 0,01-0,02;
– агар-агар	– 0,1-0,2;
– дистиллированная вода	– остальное;
значение pH устанавливалось	– 6,8-7,0 ед.

Для культивирования культур *Streptococcus sal.ssp.thermophilus* использовались следующие компоненты в различных процентных соотношениях и комбинациях: осветленная творожная сыворотка, гидролизованное молоко, натрий лимоннокислый, дрожжевой экстракт, марганец сернокислый, дрожжевой экстракт, обезжиренное молоко, аскорбиновая кислота, агар-агар, сахароза, кукурузный экстракт, лактоза, комплекс микроэлементов кислотности, устанавливали значение активной pH – 6,7-7,0 единиц.

Количество клеток (урожайность) в 1 см³ культуральной среды определяли методом предельных разведений посевом в полуагаризованной питательной среде и выражали в единицах КОЕ/см³, lg КОЕ/см³.

Активную кислотность (pH) регистрировали потенциометрически на pH-метре 222.2. и выражали в единицах pH (ед.pH).

При культивировании микроорганизмов *Bifidobacterium* доза инокулята составляла 7-10 % от объема среды, температура – (37±1) °С, продолжительность процесса – 12-18 часов.

Для определения активности роста в питательной среде бифидобактерий в питательную среду инокулировали 10 % культуры бифидобактерий и термостатировали при температуре 37 °С в течение 18-20 часов. Учитывали количество жизнеспособных клеток и активную кислотность. Активность роста и жизнеспособность выражали в единицах КОЕ/см³ или lg КОЕ/см³.

Число колониеобразующих единиц (КОЕ/см³) (количество клеток) рассчитывали методом предельных разведений в полужидких средах.

Активность кислотообразования определяли титрометрическим и потенциометрическими методами по ГОСТ 3624-92.

Для изучения динамики роста и кислотообразования, через каждые 2 часа производили отбор проб для определения количества клеток, активной (pH) и титруемой кислотности.

Титруемую кислотность определяли титрометрическим методом, выражая в градусах Тернера (°Т).

Препараты для световой микроскопии готовили по стандартным методикам и окрашивали по Граму в модификации Хукера или метиленовой синью по Леффлеру.

Подбор питательных сред велся с учетом анализа существующих сред с добавлением дешевых и доступных компонентов, позволяющих получить максимально возможное количество жизнеспособных бактерий. Питательная среда подбиралась на основе творожной сыворотки, гидролизованного ферментом молока с добавлением ростовых факторов, как наиболее приемлемого и дешевого молочного сырья.

Обработку режимов культивирования проводили в лабораторном ферментере «СНЕМАР» с автоматическим поддержанием pH и температуры.

Традиционно молочнокислые микроорганизмы культивируются и поддерживаются в стерильном молоке, однако при создании технологии сухих высококонцентрированных заквасок использование стерильного молока как среды культивирования неприемлемо с технологической точки зрения. В связи с этим рассматривались различные варианты состава питательных сред, обеспечивающие развитие культур.

При подборе компонентов питательных сред учитывалась потребность молочнокислых бактерий в источниках азотного питания, витаминах, углеводах, а также возможность применения дешевых и простых компонентов, позволяющих получить максимально возможное количество жизнеспособных клеток. В качестве основы разрабатываемых питательных сред как наиболее доступного и дешевого молочного сы-

рья использовалась осветленная творожная сыворотка и гидролизованное ферментом молоко.

Культуры термофильного стрептококка развиваются в молоке в широком интервале температур от 30 до 45 °С, при этом время сквашивания составляет от 2,5–3,5 до 5,0–6,5 часов. Кислотность сгустков невелика и составляет 62–67°Т, предельная кислотность не превышает 100–115°Т. В молочной промышленности каждый кисломолочный продукт вырабатывается при определенной температуре и требует применения различных видов молочнокислых культур, поэтому указанный для термофильного стрептококка температурный интервал делает широкий спектр его применения [4].

Добавление в среду 10 %-го гидролизованного панкреатином молока, освобожденного от большей части нативных белков, значительно обогащало растворимыми формами азота и способствовало повышению урожая клеток. В качестве источника азотного питания и витаминов группы В использовался дрожжевой экстракт в количестве 3 % от объема питательной среды.

В качестве стимуляторов роста использовались соли лимоннокислого натрия и сернокислого марганца. Источником дополнительного углеводного питания служила сахароза в количестве 1–2 % от объема питательной среды [5, 6].

Добавление небольшого количества аскорбиновой кислоты и агар-агара снижало редокс-потенциал, что является необходимым условием при культивировании анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий. В результате исследований разработана оптимизированная питательная среда [2] для культивирования термофильных молочнокислых стрептококков, рецептура которой представлена в таблице 1.

Таблица 1. Рецептура питательной среды для термофильных молочнокислых стрептококков

Наименование компонентов	Количество, %	
	Среда 1	Среда 2
Осветленная творожная сыворотка	30,0	-
Гидролизованное молоко	10,0	40,0
Дрожжевой экстракт	3,0	3,0
Натрий лимоннокислый	0,1	0,1
Обезжиренное молоко	5,0	5,0
Аскорбиновая кислота	0,05	0,05
Марганец сернокислый	0,0164	0,0164
Сахароза или сахар рафинированный	2,0	2,0

Среды имели одинаковые значения активной кислотности 6,7–6,8. Урожайность тестовой культуры термофильного стрептококка на среде 2 была выше на 50 % и составляла 8,7 lg КОЕ/см³. Дальнейшие ис-

следования по изучению пригодности разработанной среды для производства закваски термофильного стрептококка проводили с 5-ю рабочими коллекционными штаммами.

На рис. 1 представлены результаты исследований урожайности штаммов термофильного стрептококка при развитии в разработанной питательной среде.

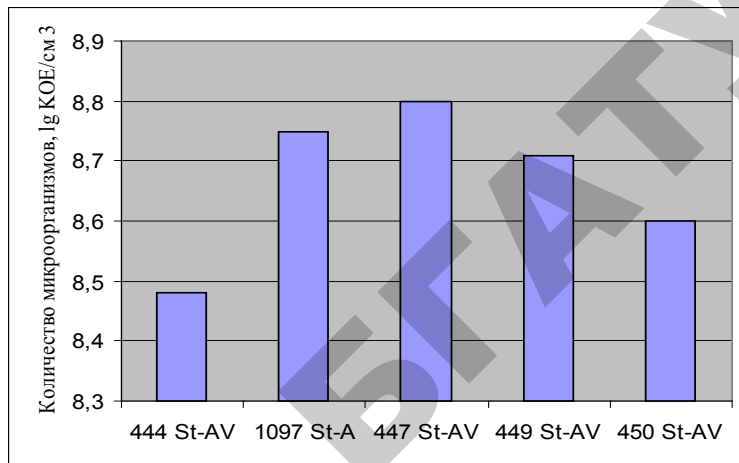


Рисунок 1. Урожайность штаммов термофильного стрептококка

Титр клеток на данной среде составляет не менее 10⁸ КОЕ/см³ (на других средах титр клеток не превышал 10⁷). При накоплении биомассы следует учитывать, что культуры термофильного стрептококка очень чувствительны к молочной кислоте, которую накапливают в процессе роста. Поэтому конечный продукт метаболизма – молочная кислота в определенной концентрации является ингибитором дальнейшего роста микроорганизмов. Для активизации процесса накопления биомассы термофильного стрептококка необходимо применять нейтрализующие средства, т.е. проводить культивирование с постоянным поддержанием оптимального значения активной кислотности.

На рис. 2 представлены результаты изменения значений активной кислотности в процессе развития *Streptococcus sal. ssp. thermophilus* в питательной среде.

При внесении 3% инокулята в питательную среду продолжительность культивирования должна составлять 14 – 16 часов.

Наряду с компонентным составом питательной среды на рост микробной популяции оказывают существенное влияние следующие факторы: доза внесения инокулята, температура и продолжительность культивирования, активная кислотность культуральной среды. Снижение значений pH до 5,0–5,5 уже через 4–6 часов после инокулирования питательной среды может приводить к торможению роста штаммов термофильного стрептококка. Поэтому посевной материал нужно готовить из расчета его внесения в ферментер, т.е. не более 10% от объема питательной среды.

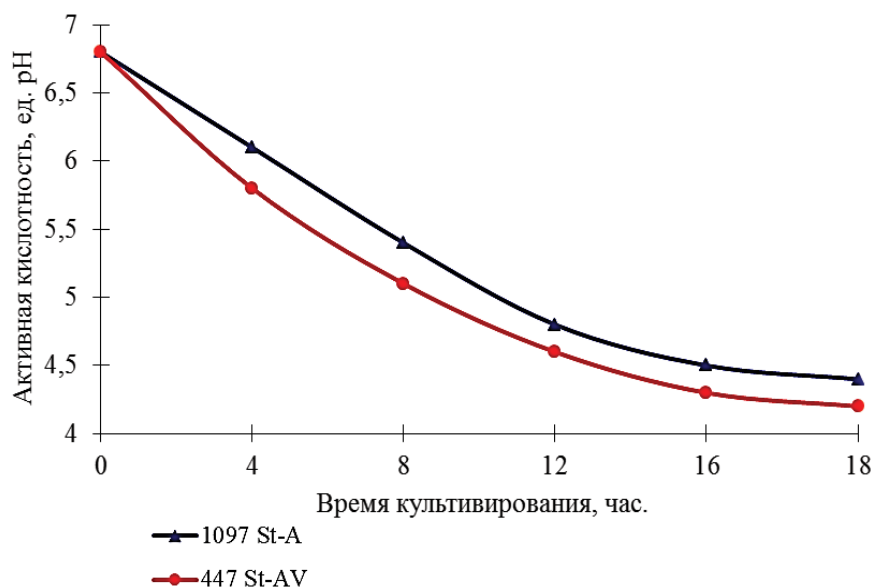


Рисунок 2. Изменение активной кислотности в процессе культивирования термофильных стрептококков в питательной среде

Оптимальное значение активной кислотности для развития термофильного стрептококка составляет 6,7-6,8 ед. рН, температура культивирования – 40-42 °С.

В настоящее время в литературе предложено большое количество питательных сред для культивирования бифидобактерий. Одной из сред для выделения и поддержания бифидобактерий, применяемых до сегодняшнего дня, является печеночно-цистеиновая среда Блаурокка. Однако в связи с тем, что основной ее компонент – печеночный бульон, довольно сложно получить среду стандартного состава. Поэтому целью нашей работы было конструирование питательной среды, обеспечивающее максимальное накопление клеток бифидобактерий. Для этого проведена оценка следующих питательных сред:

- тиогликолевой (ТГ);
- Блаурокка (Бл);
- гидролизатно-молочной (ГМС);
- солодовой среды (СС);
- гидролизатно-казеиновой (ГКС);
- кукурузно-лактозной (КЛС).

В средах устанавливали величину активной кислотности (рН) 6,8-7,0, оптимальную для развития бифидобактерий, и проводили в них культивирование

производства авторами была разработана питательная среда на основе осветленной творожной сыворотки и среда на основе гидролизованного ферментом молока. Сыворотку разбавляли водой 1:1 для установления оптимальной концентрации лактозы, которая является источником углеводного питания. Пептон заменили более дешевым дрожжевым автолизатом. В разбавленную сыворотку или гидролизованное молоко добавляли кукурузный экстракт в качестве ростовых веществ, минеральные добавки – сернокислый магний и натрий лимоннокислый, буферные соли – однозамещенный фосфат калия и двухзамещенный фосфат натрия. В таблице 3 приведены результаты сравнительного культивирования в течение 18 часов штаммов бифидобактерий на кукурузно-лактозной среде, среде на основе сыворотки и гидролизованного молока.

Данные таблицы 3 свидетельствуют, что у большинства штаммов при культивировании в питательных средах на основе творожной сыворотки и гидролизованного молока титр культуры и значения активной кислотности аналогичны этим значениям при культивировании на контрольной среде. Таким образом, новые питательные среды не угнетают рост бифидобактерий и являются более дешевыми и более

культур этих микроорганизмов. Результаты исследований питательных сред приведены в таблице 2.

Результаты сравнительных исследований питательных сред показали, что наибольшее количество клеток бифидобактерий выросло на среде Блаурокка, гидролизатно-казеиновой и тиогликолевой средах.

В состав кукурузно-лактозной среды, которая была взята за основу при культивировании всех выделенных в процессе работы штаммов бифидобактерий, входят такие дорогостоящие компоненты, как пептон, лактоза, а также другие реактивы, которые усложняют процесс ее приготовления. Для культивирования в условиях промышленного

Таблица 2. Развитие штамма *Bifidobacterium longum* C₁₄ на различных питательных средах

Питательные среды	Значение рН через X часов				Титр клеток через X час., КОЕ/мл			
	X=0	X=6	X=10	X=18	X=0	X=6	X=10	X=18
ТГ	6,4	5,95	5,1	4,5	2 10 ⁷	5,5 10 ⁷	4 10 ⁸	1 10 ⁹
Бл	6,6	5,8	4,95	4,3	2 10 ⁷	7,5 10 ⁷	5 10 ⁸	2 10 ⁹
ГМС	6,45	6,1	5,02	4,5	2 10 ⁷	6,5 10 ⁷	8 10 ⁸	8 10 ⁸
СС	6,3	6,19	5,4	4,7	2 10 ⁷	5,0 10 ⁷	7 10 ⁸	6,5 10 ⁸
ГКС	6,7	5,5	4,85	4,4	2 10 ⁷	7,5 10 ⁷	9 10 ⁸	2 10 ⁹
КЛС	6,62	5,95	4,8	4,35	2 10 ⁷	7,5 10 ⁷	6 10 ⁸	1 10 ⁹

Таблица 3. Сравнительные показатели развития бифидобактерий в различных средах

№ штамма	Кукурузно-лактозная среда		Среда на основе сыворотки		Среда на основе гидролизованного молока	
	Количество клеток, КОЕ/см ³	Значение pH в конце культивирования	Количество клеток, КОЕ/см ³	Значение pH в конце культивирования	Количество клеток, КОЕ/см ³	Значение pH в конце культивирования
433 OR	4,0 10 ⁹	4,61	3,6 10 ⁹	4,68	3,8 10 ⁹	4,6
432 OR	1,8 10 ⁹	4,7	1,2 10 ⁹	5,0	1,3 10 ⁹	4,9
1159 OR	4,8 10 ⁹	4,59	1,1 10 ⁹	4,65	1,4 10 ⁹	4,6
1201 OR	2,8 10 ⁹	4,4	3,0 10 ⁹	4,8	3,1 10 ⁹	4,7
1206 OR	4,6 10 ⁹	4,52	2,5 10 ⁹	4,75	2,8 10 ⁹	4,5
1204 OR	4,0 10 ⁹	4,6	1,0 10 ⁹	4,7	2,0 10 ⁹	4,75

простыми в приготовлении. При культивировании бифидобактерий на этой среде происходит интенсивное снижение значения pH, достигается достаточно высокий титр клеток, что позволяет использовать ее для накопления биомассы бифидобактерий в условиях промышленного производства, для создания лиофилизованных высококонцентрированных заквасок.

Заключение

Для создания заквасок, необходимых для производства детских молочных продуктов, произведен подбор необходимых компонентов в состав питательных сред. Определены температурные параметры культивирования термофильного стрептококка и бифидобактерий, а также оптимальная доза их внесения в новые, исследованные для каждого вида культур питательные среды, обеспечивающие ростовые потребности вышеперечисленных микроорганизмов, отобранных в качестве микрофлоры для получения ферментированных молочных продуктов для детского питания. Данные изученные параметры технологического процесса культивирования микроорганизмов позволяют в дальнейшем приступить к получению высококонцентрированных заквасок в промышленном производстве.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гастроэнтерология [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: http://medinform.net/gastro_por22.htm. – Дата доступа: 15.05.2015.
2. Полянская, И.С. Антибиотическая активность молочнокислых бактерий к стафилококкам / И.С. Полянская, В.Ф. Семенихина // Молочная промышленность, 2014. – №7. – С 15–18.
3. Сакс, Дж. С. Микробы хорошие и плохие. Наше здоровье и выживание в мире бактерий / Дж. С. Сакс. – М.: Элемент, 2013. – 153 с.
4. Белова, Л.П. Питательная среда для получения бактериального препарата термофильных молочнокислых бактерий: патент RU 1057534 / А.В. Гудков, Л.А. Остроумов и др.
5. Хамагаева, И.С. Исследование биохимической активности пропионовокислых бактерий / Л.М. Белозерова, М.Б. Данилов // Ресурсосберегающие технологии пищевых производств: сб. научных трудов междунар. науч.-практич. конф. – Санкт-Петербург, 1998. – С 39.
6. Семенихина, В.Ф. Питательная среда для биомассы бифидобактерий / В.Ф. Семенихина, Я.А. Яркина // Молочная промышленность, 2003. – № 10. – С. 26-27.

ПОСТУПИЛА В РЕДАКЦИЮ 05.06.2015

“Агропанорама” - научно-технический журнал для работников агропромышленного комплекса. Это издание для тех, кто стремится донести результаты своих исследований до широкого круга читателей, кого интересуют новые технологии, кто обладает практическим опытом решения задач.

Журнал “Агропанорама” включен в список изданий, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией для опубликования результатов диссертационных исследований по техническим (сельскохозяйственное машиностроение и энергетика, технический сервис в АПК), экономическим (АПК) и сельскохозяйственным наукам (зоотехния).

Журнал выходит один раз в два месяца, распространяется по подписке и в розницу в киоске БГАТУ. Подписной индекс в каталоге Республики Беларусь: для индивидуальных подписчиков - 74884, предприятий и организаций - 748842. Стоимость подписки на 2-е полугодие 2015 года: для индивидуальных подписчиков - 111 900 руб., ведомственная подписка - 152 052 руб.