

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ БАККОНЦЕНТРАТА ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СОЕВО-МОЛОЧНЫХ И СОЕВЫХ СКВАШЕННЫХ ПРОДУКТОВ

Т.Г. Бережницкая, В.В. Ратушняк, Е.Ф. Забейда, Т.Н. Бурушкина, кандидат хим. наук
Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

Резюме. У роботі досліджено умови одержання чистих культур мікроорганізмів *S.thermophilus*, *L.acidophilus*, *bulgaricus*, *L.casei*, визначено їхню врожайність, термо-стійкість, граничну кислотність, часові параметри коагуляції сквашуваної композиції, взаємну толерантність чистих культур, антагоністичну активність чистих культур лактобактерій щодо ряду патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів. Використовуючи зазначені штами мікроорганізмів, розроблено технологію виготовлення сухого бактеріального концентрату, яка забезпечує максимальне збереження корисних властивостей кожної чистої культури мікроорганізмів. Одержані зразки соєво-молочних і соєвих сквашених продуктів із застосуванням розробленого бакконцентрату.

Ключові слова: чисті культури, бактеріальний концентрат, властивості, технологія отримання.

Резюме. В работе исследованы условия получения чистых культур микроорганизмов *S.thermophilus*, *L.acidophilus*, *bulgaricus*, *L.casei*, определена их урожайность, термостойкость, предельная кислотность, временные параметры коагуляции сквашеной композиции, взаимная толерантность чистых культур, антагонистическая активность чистых культур лактобактерий отношении ряда патогенных и условно патогенных микроорганизмов. С использованием определенных штаммов микроорганизмов разработана технология изготовления сухого бактериального концентрата, которая обеспечивает максимальное сохранение полезных свойства каждой чистой культуры микроорганизмов. Получены образцы соево-молочных и соевых сквашенных продуктов с использованием разработанного бакконцентрата.

Ключевые слова: чистые культуры, бактериальный концентрат, свойства, технология получения.

Summary. In this work the terms of receipting of clean cultures of the microorganisms *S.thermophilus*, *L.acidophilus*, *bulgaricus*, *L.casei* are explored. Their productivity, term stability, ultimate acidity, mutual tolerance, temporal parameters of coagulation of fermented product, antagonistic activity of clean cultures *Lactobacillus* in regard to pathogenic and de bene esse pathogenic microorganisms are defined. On the basis of selected strains of microorganisms the technology of producing dry bacterial concentrate, which provides maximal saving of useful properties of microorganisms developed. The standards of soy-bean-milk and soy-bean fermented products are produced using the developed bacterial concentrate.

Key words: clean cultures, bacterial concentrate, properties, the technology of producing.

Производство функциональных продуктов питания — одно из важных направлений в пищевой промышленности развитых стран. Использование витаминов, комплексных добавок, микроорганизмов или их метаболитов в пище является основой рационального питания, коррекции и поддержания нормальной экологии организма человека [1–4]. Исходя из данных о преимуществах качественного и количественного состава сои, ценности ее питательных, биологически активных и полезных составляющих, считаем обоснованным и перспективным создание ферментированных соевых продуктов лечебно-профилактического назначения с использованием в их производстве специально подобранных штаммов микроорганизмов.

Цель настоящей работы — определение условий получения чистых культур микроорганизмов, композиций и сухого бактериального концентрата для изготовления на основе необезжиренных семян сои продуктов с пробиотическими свойствами, содержащих в своем составе непатогенные микроорганизмы или их метаболиты, которые могут положительно влиять на здоровье или физиологию человека [5–7]. Наличие в сое сахаров (рафинозы и стахиозы), способных стимулировать размножение бифидобактерий, предопределяет возможность расширения спектра функциональных продуктов на основе сои. Молочнокислые и бифидобактерии — постоянные составляющие микрофлоры кишечника, с присутствием последних связывают проблему долголе-

тия, но количество их в кишечнике уменьшается с возрастом. Это обуславливает исследования в направлении перорального восполнения и стимуляции роста числа бифидобактерий в кишечнике с использованием компонентов растительной пищи [8, 9]. К числу таковых помимо сахаров сои относятся олиго- и полифруктаны топинамбура.

Выбор и культивирование штаммов-продуцентов из природных источников — важная задача биотехнологии, так как в естественном окружении они ассоциированы с другими балластными микроорганизмами. При выполнении работы были выделены молочнокислые бактерии из 15-ти образцов соевых продуктов, из 12-ти образцов самосквашенных молочных продуктов, из 10-ти образцов фекалий (толстый кишечник) и слизи (ротовая полость), взятых у здоровых детей 6-12 лет. От природы, чистоты, свойств и сочетания штаммов бактерий зависят характеристики ферментативного процесса (в данном случае сквашивания) и физико-химические показатели, а также органолептические свойства получаемого продукта. Отбор проводили сериями по 10 культур. Условия культивирования могут отличаться в зависимости от источника микроорганизмов. В работе использовали следующую схему:

- 1) инокуляция 5 %-ной культурой стерильного обезжиренного молока, экспозиция в течение 16, 24 ч;
- 2) микроскопия и определение уровня загрязнения свежей культуры, установление степени разведения для получения изолированных колоний на агаровых средах;
- 3) десятикратное разведение культуры в физиологическом растворе, посев 1 см³ бактериальной суспензии 5, 6 и 7-кратных разведений в питательную среду глубинным способом и 0,1 см³ суспензии тех же разведений для получения колонии на поверхности питательной среды;
- 4) 48-часовая экспозиция проб при оптимальной температуре, а затем 48–72 ч при (18–22)°C, перевивка в стерильное обезжиренное молоко 5–20 типичных для тестируемых культур колоний, микроскопический контроль взрослых культур в жидкой среде, контроль спустя 16–24 ч, отбор культур с однородной морфологией и размером 20–25 клеток в поле зрения.

Для характеристики объектов исследования (чистых культур микроорганизмов, бактериальных композиций и сухого бактериального концентрата) использовали методы:

- оптическую плотность бактериальной суспензии измеряли фотометрическим методом при длине волны 540 нм;
- общую численность бактерий определяли посевом в агаровых средах по ГОСТ 9225-84, количество бактерий группы кишечных палочек — по ГОСТ 9225-84, дрожжей и плесеней — по ГОСТ 10444-12;

- кислотность активную измеряли потенциометрическим методом, кислотность титрованную — по ГОСТ 3624-92;
- активность сбраживания углеводов изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии;
- галактозидазную активность исследовали в реакции со специфическим субстратом;
- антагонистическую активность микроорганизмов изучали методом совместного культивирования;
- активность бакконцентрата определяли по времени сквашивания 1 дм³ соевого “молока” и обезжиренного пастеризованного молока при внесении в них 1 г концентрата при T=(37,0±0,2) °C и по показателю титрованной кислотности через 3 ч культивирования.

При отборе штаммов для получения продуктов с пробиотическими свойствами изучали *in vitro* антагонистическую активность чистых культур лактобактерий, выращенных в течение 24 ч в трех различных по составу питательных средах. В качестве тест-организмов использовали большой набор культур патогенных и условно патогенных микроорганизмов из коллекции НИИЭИБ им. Л.В. Громашевского. Контролем служили стерильные растворы молочной кислоты с pH=3,7–5,2.

Все выделенные активные штаммы молочнокислых бактерий проявляли большую ингибирующую активность в отношении тест-организмов (исключение составили штаммы протей), чем растворы молочной кислоты (pH=3,7). Это позволяет предполагать возможность иного, кроме кислотообразования, механизма антагонистического влияния. По видимому, состав среды культивирования лактобактерий также является фактором влияния на интенсивность и диапазон антагонистического действия исследованных штаммов в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов.

Один из критериев отбора культур для сквашивающих композиций — активность фермента - галактозидазы. От нее зависит интенсивность утилизации углеводов бактериями и, соответственно, качество продукта. Наивысший показатель - галактозидазной активности установлен для штамма *Lactobacillus acidophilus* — 11(1990±20) ед/г ферментированного молока, у термофильных стрептококков этот показатель ниже — (1115±125) ед/г. При создании нового бактериального концентрата из бактерий различных видов необходимо учитывать взаимную толерантность штаммов.

Из числа исследованных 2 штамма лактобацилл (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 17, *L. acidophilus* 11) и 2 штамма термофильных стрептококков (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 7, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* 8) отвечают требованиям, которым должен удовлетворять сквашивающий бактериальный концентрат, — высокая

урожайность и молокосвертывающая активность, термо-резистентность и взаимная толерантность. В табл. 1 приведены результаты анализа некоторых технологически важных для бакконцентрата показателей. На основе подобранных штаммов микроорганизмов разработана техническая схема изготовления концентрата, которая обеспечивает максимальное сохранение полезных свойств отдельных микроорганизмов.

Процесс изготовления бакконцентрата включает следующие стадии:

1. Подготовка посевного материала (инокулянта).

Инокулянт готовится выращиванием в стерильном обезжиренном молоке чистых культур (1%) при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16 ± 1 ч.

2. Получение питательной среды, инокуляция, накопление биомассы.

1 дм³ основы питательной среды (на водопроводной воде) для накопления биомассы содержит: $10,00 \pm 0,1$ г сухого обезжиренного молока, $10,00 \pm 0,1$ г пептона, $5,00 \pm 0,05$ г натрия лимоннокислого трехзамещенного, $5,00 \pm 0,05$ г натрия уксуснокислого, $0,20 \pm 0,02$ г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,05 \pm 0,01$ г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $3,00 \pm 0,03$ г экстракта дрожжевого. pH среды устанавливается на уровне $8,2 \pm 0,1$, среда стерилизуется $30,0 \pm 0,5$ мин при $121 \pm 2^\circ\text{C}$ и охлаждается до $50 \pm 2^\circ\text{C}$. Перед инокулированием среды в основу вносятся стерильные растворы, содержащие $10,00 \pm 0,1$ г глюкозы, $10,00 \pm 0,1$ г лактозы и $0,5 \pm 0,05$ г аскорбиновой кислоты. Активная кислотность среды отвечает $\text{pH} = 6,3 \pm 0,1$. Для накопления биомассы в подготовленную питательную среду с $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$ при перемешивании вносится посевной материал в количестве 5%. Соотношение количества культур *S.salivarius* subsp. *Thermophilus*/*L.acidophilus*/*L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в инокулянте составляет 5:1:1, соотношение количества штаммов *S.salivarius* subsp. и *thermophilus* составляет 1:1.

3. Накопление биомассы

Накопление биомассы происходит при $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение $12 \pm 0,5$ ч при периодической или непрерывной нейтрализации культуральной среды 25%-ным аммиачным раствором до активной кислотности на уровне $\text{pH} = 6,3 \pm 0,1$. После окончания процесса жидкость охлаждают до $12 \pm 2^\circ\text{C}$. Отделение бактериальной массы от культуральной среды выполняется с помощью суперцентрифуги или сепаратора при температуре $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

4. Совмещение бактериальной массы с защитной средой.

Взвешенную бактериальную массу смешивают в соотношении 1:1,5 со стерильной защитной средой, 1 дм³ которой содержит $100,00 \pm 1,0$ г сахаразы, $50,00 \pm 1,0$ г лимоннокислого и $50,00 \pm 1,0$ г уксуснокислого натрия.

5. Замораживание, сушка суспензии клеток, измельчение биомассы.

Суспензия клеток разливается в стерильные кюветы слоем толщиной 6 ± 1 см, охлаждается до температуры $-40 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 16 ± 2 ч, высушивается в сублимационной камере при температуре от $-25 \pm 2^\circ\text{C}$ до $+30 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 18–20 ч. Высушенную суспензию измельчают в тонкодисперсный порошок.

Органолептические и физико-химические показатели бактериального концентрата представлены в табл. 2, в табл. 3 — данные микробиологического исследования.

Таким образом, в результате проведенного исследования разработан бактериальный концентрат “СМИ”, который представляет собой лиофилизированные живые культуры ацидофильной и болгарской палочек и двух термофильных стрептококков, которые могут придать продукту, изготовленному с их использованием, пробиотические свойства, разработана и утверждена нормативно-техническая документация на концентрат

Таблица 1

Характеристика свойств опытных культур

Вид	Количество штаммов, ед.	Урожайность $\times 10^3$, КУЕ/см ³	Молокосвертывающая активность, ч	Кислотообразующая активность, от	Термостойкость при нагревании до 60°C , время выдержки, мин	
					60	90
<i>S.thermophilus</i>	23	2,3—4,7	4,0—5,0	90	+	+
<i>L.acidophilus</i>	10	2,0—5,3	4,5—5,5	105	+	—
<i>L.bulgaricus</i>	5	3,5—5,8	4,0—4,5	100	+	—
<i>L.casei</i>	3	3,6—4,9	4,5—5,5	130	+	—

Таблица 2

Показатели качества бактериального концентрата

Наименование показателя, единицы измерения	Характеристика
Внешний вид	Рассыпчатый порошок без посторонних включений
Цвет	От кремового до светло-коричневого
Массовое содержание влаги, %	4,0–5,0
Активность при внесении 1 г концентрата в 1 дм ³ молока: – длительность сквашивания молока при 36°C, ч – титрованная кислотность через 3 ч, °Т	3,5–5,0 40–45

Таблица 3

Микробиологическая характеристика бактериального концентрата

Наименование показателя, единицы измерения	Значение
Общее число молочнокислых бактерий, КУЕ/г	(7–9) • 10 ¹⁰
БГКП (колиформы), в 1 г	Отсутствуют
Дрожжи и плесени, в 1 г	Отсутствуют
Staphylococcus aureus, в 1 г	Отсутствуют
Патогенные микроорганизмы в т.ч. сальмонеллы, в 10 г	Отсутствуют
Микроскопический препарат	Цепочки кокков различной длины, единичные диплококки, толстые палочки различной длины и ширины

бактериальный сухой [10], разработана рецептура и биотехнология получения новых соево-молочных функциональных продуктов (десертов, соусов) для специального диетического питания [11]. В основе новых продуктов соевое “молоко”, изготовленное из полножировой сои по технологии и в

аппаратуре ИПБГ НАН Украины [12]. В табл. 4 представлен состав четырех соево-молочных сквашенных продуктов, эффективность включения которых в диетическое питание детей с различными заболеваниями показана лабораторно-клиническими исследованиями.

ЛІТЕРАТУРА

1. Collins M.D. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating ecology of gut / M.D.Collins, G.R.Gibson // J.Am.Clin. Nutrition. –1999. –V. 69. –N 5. –P. 1052–1057.

2. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса / С.А.Шевелева // Вопросы питания. –1999. –№ 2. –С. 32–40.

3. Шендеров Б.А. Медицинская микробиология и функциональное питание / Б.А.Шендеров М.: «Грант», 2001. –190 с.

4. Функциональные пищевые продукты, их лечебное и профилактическое действие / Н.А.Бугаец, Е.В.Барашкина [и др.] // Изв. вузов. Пищев. технологии. –2004. –№ 2. –С. 48–51.

5. McCartney A.L. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans / A.L.McCartney, W.Wenzhi, G.W.Tannock // Appl.Environ.Microbiol. –1996. –V. 62. –N 12. –P. 4608–4613.

6. Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition / J. Schrezenmeir, M.De Vrese // Am.J.Clin. Nutrition. –2001. –V. 73. –N 2. –P. 410–416.

7. Quality assurance criteria for probiotic bacteria / E. Tuomola, R. Crittenden [et al.] // Am.J.Clin. Nutrition. –2001. –V.73. –N 2. –P. 393–398.

8. Market potential for probiotics /C.Stanton, G.Gardner [et al.] // Am.J.Clin.Nutrition. –2001. –V. 73. –N 2. –P. 380–385.

Состав разработанных соево-молочных продуктов сквашенных

Наименование сырья и полуфабрикатов	% масс.	кг/100 кг
Продукт 1		
Молоко соевое	60,0	62,16
Молоко коровье цельное	30,0	31,08
Фруктовый наполнитель	5,0	5,18
Сахар-песок	4,95	5,13
Бакконцентрат „СМИ”	0,05	0,0005
Всего:	100,0	103,6
Выход:	96,5	100,0
Продукт 2		
Молоко соевое	70,0	73,1
Молоко коровье цельное	20,0	20,9
Декстинмальтоза	3,0	3,13
Сахар-песок	1,95	2,035
Фруктовый наполнитель	5,0	5,22
Бакконцентрат „СМИ	0,05	0,0005
Всего:	100,0	104,4
Выход:	95,8	100,0
Продукт 3		
Молоко соевое	50,0	52,1
Молоко коровье цельное	40,0	41,68
Фруктовый наполнитель	5,0	5,21
Сахар-песок	5,0	5,21
Бакконцентрат „СМИ”	0,05	0,0005
Всего:	100,0	104,2
Выход:	96,0	100,0
Продукт 4		
Молоко соевое	30,0	31,38
Молоко коровье цельное	65,0	67,99
Фруктовый наполнитель	5,0	5,23
Бакконцентрат „СМИ”	0,05	0,0005
Всего:	100,0	104,6
Выход:	96,6	100,0

9. Волков М.Ю. Комбинированный пробиотический препарат. Бактистатин – продукт безотходной технологии / М.Ю. Волков // Хранение и переработка сельхозсырья. –2006. –№ 11. –С. 52–55.
10. Концентрат бактеріальний сухий “СМІ”. Технічні умови. ТУ У 24.4-02128514-008:2005.
11. Продукти для спеціального дієтичного споживання. Технічні умови. ТУ У 15.8-02128514-016:2008, ТУ У 15.8-02128514-017:2009.
12. Технологія і продукти з повножирової сої / В.Боровський, В Ратушняк [та ін.] // Харчова і переробна промисловість. –2009. –№ 7–8. –Ст. 21–23.

Надійшла до редакції 17.08 2010 р.