

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ НА МІКРОФЛОРУ ЗАКВАШУВАЛЬНОЇ КУЛЬТУРИ ДЛЯ КЕФІРУ

*В.В. Гудима, н. с.,
О.В. Науменко, к. т. н.,
Інститут продовольчих ресурсів НААН*

Досліджено вплив захисних середовищ на збереження життєздатності складових мікроорганізмів кефірних грибків, кефірної грибкової закваски та заквашувальних культур для виробництва кефіру під час ліофілізації. Розроблено склад захисного середовища з додатковим вмістом буферних солей та активаторів росту, що забезпечувало ступінь виживання лактобактерій не менше 98% та дріжджів не менше 87%.

Вивчено молокозсідальну активність заквашувальних культур після ліофільного сушіння. Встановлено, що вони здатні швидко ферментувати молоко впродовж 8,2-9,0 год. Таким чином створені заквашувальні культури є перспективними для виробництва бактеріальних препаратів прямого внесення для виробництва кефіру в промислових умовах завдяки високій активності ферментації, відповідності ДСТУ 4417 за складом мікрофлори та органолептичними характеристиками кінцевих продуктів.

***Ключові слова:** захисне середовище, ліофілізація, кефір, грибкова кефірна закваска, заквашувальна культура, молочнокислі бактерії, дріжджі*

RESEARCH OF LYOPHILIZATION INFLUENCE ON FERTILIZING CULTURE FOR KEFIR

*V.V. Gudyma, researcher,
O.V. Naumenko, Ph. D. Technique,
Food Resources Institute of NAAS*

The influence of protective environments on the preservation of viable components of kebabs, kefir fungus and fertilizing cultures for kefir production during lyophilization is investigated. The composition of the protective medium with an additional content of buffer salts and growth promoters was developed, which ensured the survival rate of lactobacilli of at least 98% and yeast at least 87%.

The milk clotting activity of fertilizing cultures after lyophilic drying was studied. It is found that they are capable of rapid fermenting milk for 8.2-9.0 h. Thus, the established fermentation cultures are promising for the production of direct-injection bacterial preparations for the production of kefir in industrial conditions due to the high activity of fermentation, the compliance of DSTU 4417 with the composition of the microflora and the sensorial characteristics of end products

***Key words:** protective environment, lyophilization, kefir, fungal kefir, fermentation culture, lactic acid bacteria, yeast*

У практиці сучасного виробництва молочних продуктів найбільшою популярністю користуються сухі бактеріальні препарати прямого внесення. Для отримання таких препаратів застосовують різні способи сушіння біомаси, серед яких найуживанішими є ліофілізація.

Слід зауважити, що сушіння є доволі жорсткою технологічною операцією і вимагає ретельного опрацювання умов та режимів заморожування і сушіння, які здатні забезпечити високий ступінь виживання мікрофлори та її активності.

Особливо це складно для багатокомпонентних заквасок, серед яких кефірні грибки, та кефірна закваска не є винятком.

Для того, щоб зменшити технологічне навантаження на мікрофлору на стадії заморожування, застосовують спеціальні захисні середовища.

Ліофілізація є найпрогресивнішим способом консервування кефірних грибків, що дозволяє зберігати їх упродовж 12-18 місяців без втрати вихідних властивостей. Тривалість відновлення їх мікробіологічного балансу та здатності до репродукування становить не менше 14 діб за умови щоденного промивання або внесення у молоко додаткових стимуляторів росту (наприклад, дріжджового екстракту, пептону та глюкози) [1]. Проте, досі мало уваги приділяється вивченню умов заморожування та підбору захисних середовищ. До складу кефірних грибків та заквасок, виготовлених на їх основі, входять мікроорганізми, яким властива різна чутливість до умов ліофільного висушування.

Так, М.І. Дмитриченко дійшла висновку, що для запобігання незворотним змінам у структурі кефірних грибків та бактеріальних клітин під час сублімаційного висушування із замороженого стану необхідно вилучати біля 86% вологи [2]. Вона зазначає, що вміст вологи у кефірних грибах та грибковій заквасці має коливатися, відповідно, в межах 4,0-4,6% і 2,9-3,5% та відповідати вмісту вологи мономолекулярної адсорбції. Крім того, для найповнішого збереження активності кефірних грибків та життєздатності дріжджів у її роботі аргументовано доцільність повільного заморожування перед сублімаційним висушуванням зі швидкістю 0,2-0,3 град/хв.

Під час розроблення бакпрепаратів значна увага приділяється максимальному забезпеченню стабільності культур, що проявляється у збереженні їхньої життєздатності, метаболізму та відновленню технологічних властивостей після ліофілізації.

Найбільш значним для виживання і збереження життєздатності фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів є вплив спеціальних захисних середовищ [3].

Незважаючи на те, що протекторні компоненти є предметом численних досліджень у всьому світі впродовж останніх 50 років, все ж таки для кожного біологічного об'єкту, окремого виду чи штаму, необхідно підбирати індивідуальні захисні середовища для успішного захисту клітини.

Враховуючи те, що дріжджова мікрофлора кефірних грибків чутлива до заморожування, для отримання симбіотичної грибкової закваски, запропоновано технологію сублімації сушінням кефірних грибків у захисному середовищі, що складається із молочної сироватки з додаванням 0,5 % сахарози і 0,01% аскорбінової кислоти [4].

Аналізуючи літературні дані, відзначимо, що ефективними у захисті бактеріальних клітин є також глютамат натрію та сорбіт. Вони запобігають руйнуванню важливих представників мікрофлори кефірних грибків – молочнокислих паличок виду *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*. Стабілізація білкової структури відбувається завдяки взаємодії між аміногрупами глютамату натрію і карбоксильними групами білків мікроорганізмів, у результаті чого під час ліофільного висушування утримується значна кількість води [5].

Іншими науковцями було доведено, що з-поміж набору вуглеводів: трегалози, мальтози, сахарози, глюкози, лактози – найкращий захист клітин досягається за участі трегалози у концентрації 32 %. Цей дисахарид, утворюючи тонкий скловидний шар, який обволікає клітину, лімітує внутрішньомолекулярний обмін, і таким чином, запобігає руйнуванню цілісності структури. Особливу потребу у цьому вуглеводі, як зазначено авторами, відчувають *Lactobacillus bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus* [6].

Деякими дослідниками встановлено необхідність залучення до складу захисних середовищ знежиреного молока у кількості, яке не тільки захищає клітини, але є відомим поживним субстратом для бактерій виробничих штамів [7].

У ході мікробіологічних випробувань, В.В. Малова виявила істотні переваги щодо застосування сахарозо-желатозного середовища у роботі з мезофільними молочнокислими

паличками. Воно забезпечувало, крім високого ступеню виживання мезофільних лактококів *Lactococcus lactis ssp.* та паличок *Lactobacillus casei*, ще й достатній рівень ферментативної активності цих культур. Запропоноване багатоконпонентне середовище з вмістом 4% лактози, 4% сахарози, 4% трегалози, 9% знежиреного молока та 79% дистильованої води забезпечувало виживання штамів *Lactococcus lactis ssp.* на 12-20% більше в порівнянні з окремо взятими кріопротекторами [8].

Слід зазначити, що ступінь виживання клітин після заморожування та сушіння у значній мірі залежить від їхнього розміру. Згідно з сучасними науковими гіпотезами, значні пошкодження мембран відбуваються внаслідок утворення кристаликів льоду на поверхні самої клітини під час її заморожування. Завдяки цьому здатність до виживання кокових форм бактерій є набагато вищою, ніж бацил та дріжджів [9].

Важливим фактором, що впливає на збереження життєздатності бактеріальних клітин, особливо, при заморожуванні, є співвідношення бактеріальної маси та захисного середовища у суспензії, що направляється на сушіння. Зазвичай це співвідношення становить на рівні 1:1, однак в ряді робіт відмічено, що для покращення виживання мікроорганізмів доцільно підвищувати частку захисного середовища у суспензії [10].

Мета роботи: опрацювати умови ліофілізації кефірних грибків, грибкової кефірної закваски та заквашувальних композицій для одержання бакпрепарату з максимальною активністю.

Об'єкти досліджень: кефірні грибки, грибкова кефірна закваска, захисні середовища, рідкі та сухі заквашувальні композиції.

Методи досліджень: стандартні та модифіковані фізико-хімічні, біохімічні, мікробіологічні.

Результати досліджень та їх обговорення

Кефірні грибки та кефірна грибкова закваска перед процесом сублімаційного сушіння були змішані із захисними середовищами у співвідношенні 1:1, склад цих середовищ наведено в табл. 1.

Таблиця 1

**Склад захисних середовищ для кефірних грибків та
грибкової кефірної закваски, %**

Компоненти	№1	№2	№3
Сахароза	23,0	-	
Желатин	2,5	1,0	-
Дріжджовий екстракт	-	1,0	-
Аскорбінова кислота	-	0,25	-
Глюкоза	-	1,0	-
Інулін	-	-	7,5
Глутамат натрію	-	-	2,0
Вода	74,5	96,75	85,5

Захисні середовища №2 та №3, що містять дріжджовий екстракт, інулін та глутамат натрію є рекомендованими для кращого збереження і життєздатності дріжджової мікрофлори [11]. Одержані експериментальні дані свідчать про істотні зміни у складі мікрофлори кефірних грибків та грибкової кефірної закваски після їх заморожування до -35°C упродовж 24 годин та сублімаційного сушіння (рис.1).

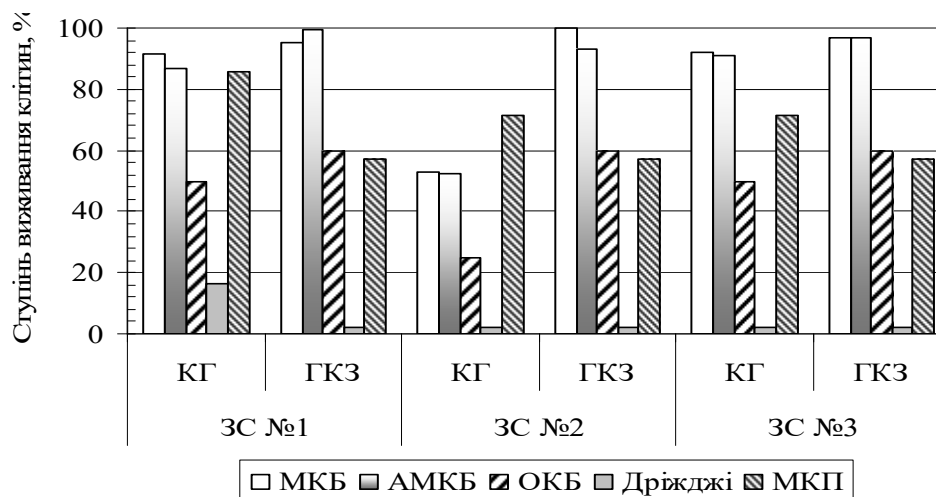


Рис. 1. Ступінь виживання мікрофлори кефірних грибків та грибової кефірної закваски після ліофілізації

Встановлено, що ступінь виживання мікрофлори кефірних грибків був на 8-18% вищим, ніж аналогічний показник для грибової кефірної закваски. Це свідчить про природну стабільність грибків.

За використання усіх варіантів середовищ, особливо №1 та №2, спостерігали високе збереження молочнокислих мікроорганізмів гомо- та гетероферментативного типу (91-97%). Застосоване ЗС №1 забезпечувало максимальне виживання лактобацил за ліофілізації. Ступінь виживання оцтовокислих бактерій кефірних грибків та грибової закваски з використанням середовищ №1 та №3 складав 50 % і 60% відповідно.

Незадовільні результати було отримано щодо дріжджів: жодне з запропонованих захисних середовищ не забезпечувало належний високий рівень виживання цього складника у сухій культурі. Після сушіння чисельність дріжджів знижувалась майже на 6 порядків. Лише використання середовища №1 дозволило зберегти 16% клітин. Очевидно, що основною причиною різкого спаду життєздатних дріжджових клітин є температурний шок під час заморожування і внутрішньоклітинне утворення кристаликів льоду, які мають руйнівну дію щодо, власне, клітин.

Отже, найефективніше збереження життєздатності мікрофлори кефірних грибків та грибової кефірної закваски можливе у разі використання ЗС №1, що містить такі кріопротектори, як желатин та сахароза.

Однак воно не давало бажаного позитивного ефекту. Препарати кефірного грибка та грибової закваски, висушені з використанням згаданого середовища, характеризувались такими мікробіологічними показниками (КУО/см³): мезофільні лактококи, відповідно, $1,1 \cdot 10^7$ та $4 \cdot 10^7$, в тому числі ароматуотворювальні – $6 \cdot 10^6$ та $8 \cdot 10^7$, лактобацили – $1 \cdot 10^6$ та $1 \cdot 10^4$, оцтовокислі бактерії – $1 \cdot 10^2$ та $1 \cdot 10^3$. Що стосується дріжджів, то їхня чисельність складала $1 \cdot 10^2$ лише для кефірних грибків. Тобто, одержана таким чином суха культура не містила бактерії у співвідношенні, характерному для симбіотичної грибової закваски, і використання її у виробництві кефіру не може повністю відтворити його смакові якості.

Водночас, дія ліофілізації позначилася і на активності кефірних грибків. Якщо нативні кефірні грибки сквашували пастеризоване молоко за температури 18-20°C за 14-16 годин, то утворення молочного згустку в разі внесення сухих кефірних грибків спостерігали лише через 36-40 годин. Стосовно кефірної грибової закваски, то після сушіння її активність знижувалася на 2 години, при цьому згусток утворювався після 11 годин сквашування.

Оскільки окремі складники мікрофлори кефірної грибової закваски показали високу чутливість до ліофілізації, то цілком очевидно, що під час розроблення нової

заквашувальної культури на основі мікрофлори кефірного грибка необхідно передбачити корекцію складу композицій за найвразливішими складниками, а саме дріжджами. Водночас, для підсилення молокозгортальної активності вартує на увагу додаткове збагачення молочнокислими лактококами.

Було створено три види заквашувальних культур для виробництва кефіру, що різняться за бажаними для виробництва органолептичними характеристиками. Їхня технологія передбачає збагачення природного симбіозу грибкової кефірної закваски мікрофлорою, виділеною виключно з кефірних грибків: лактобактеріями *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis* *bv. diacetilactis*, *Streptococcus thermophilus* та дріжджами *Saccharomyces unisporus*, нездатними до зброджування лактози.

К I – заквашувальна культура на основі грибкової кефірної закваски, збагачена *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis* *bv. diacetilactis* та дріжджами, характерною особливістю якої є забезпечення м'якого смаку та в міру щільної консистенції продукту;

К II – заквашувальна культура на основі грибкової кефірної закваски, збагачена лише *Lactococcus lactis ssp. lactis* *bv. diacetilactis* та дріжджами, яка дозволяє отримувати продукт, дещо ароматніший та гостріший за смаком від традиційного, злегка пінної консистенції;

К III – заквашувальна культура на основі грибкової кефірної закваски, збагачена *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis* *bv. diacetilactis*, *S.thermophilus* та дріжджами, яка забезпечує у продукті м'який обволікаючий смак та достатньо в'язку консистенцію.

Для досліджень використовували 4 види різних захисних середовищ (табл. 2). Зокрема, було взято сахарозо-желатозне середовище (№1), яке на попередньому етапі давало змогу максимально зберегти мікрофлору грибкової кефірної закваски після її заморожування та сушіння. До складу інших захисних середовищ було залучено такі кріозахисні складові: глюкозу та знежирене молоко, як компоненти для прискорення реактивації сухої заквашувальної культури; подвійну кількість желатину та лимоннокислого натрію для підвищення рівня зв'язування вільної вологи; фосфати калію та амонію для забезпечення буферної ємності системи, хлорид кальцію для посилення міцності молочного згустку після відновлення сухої культури та сульфат магнію, як стимулятор росту лактобактерій під час реактивації.

Таблиця 2

Склад захисних середовищ для заквашувальних композицій, %

Компоненти	№1	№4	№5	№6
Сахароза	23,0	-	10,0	20,0
Желатин	2,5	2,5	5,0	2,5
Глюкоза	-	10,0	-	-
Глутамат натрію	-	-	2,0	-
Лимоннокислий натрій	-	2,5	5,0	1,0
Знежирене молоко	-	10,0	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	1,0
MgSO ₄	-	-	-	1,0
CaCl ₂	-	-	-	1,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	-	-	1,0
Вода	74,5	75,0	78,0	72,5

Ступінь виживання всіх складових мікрофлори трьох заквашувальних композицій К I-III, узятих для мікробіологічних випробувань, з різними варіантами захисними середовищами представлено на рис. 2.

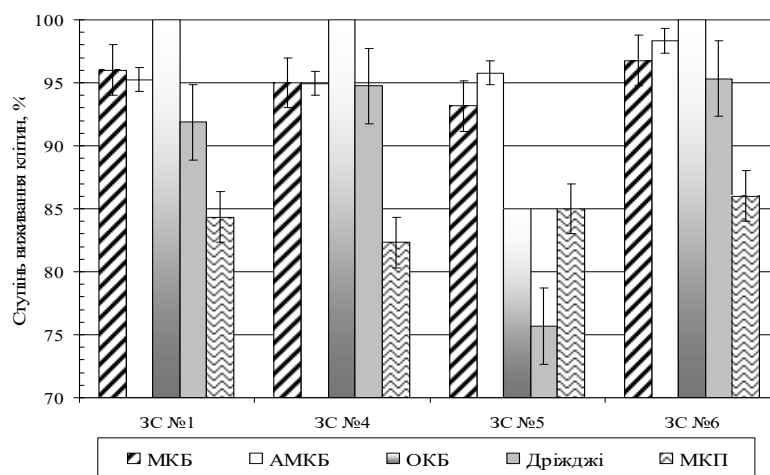


Рис. 2. Ступінь виживання мікрофлори заквашувальних композицій після ліофілізації

За результатами проведених досліджень встановлено, що доволі успішні результати зі збереження всіх видів мікроорганізмів полікомпонентних заквашувальних композицій можна досягти у разі використання середовища №6, яке забезпечувало виживання близько 96 та 98% молочнокислих бактерій відповідно гомо- та гетероферментативного типу. Майже однакові результати помічено у варіанті з захисним середовищем №1 – ступінь виживання лактобактерій сягав 95%.

Позитивним моментом застосування цих захисних середовищ також є забезпечення виживання клітин дріжджів, оскільки вони відіграють важливу роль у формуванні специфічних смакових характеристик кефіру. Слід зазначити, що варіанти середовищ №1,4,6 вирізнялися як ефективні, оскільки дали можливість зберегти високу урожайність лактококів та оцтовокислих бактерій до 94-97%.

Під час ліофільного сушіння спостерігали незначні втрати молочнокислих паличок – близько 12-15% у всіх заквашувальних композиціях із захисними середовищами №5 та №6.

На відміну від вище описаних груп мікроорганізмів, оцтовокислі бактерії були найстійкішими. Ступінь виживання наближався майже до 100%, за винятком варіанту зі захисним середовищем №1, яке забезпечувало виживання лише 85% клітин.

Для отримання симбіотичної заквашувальної композиції і збереження співвідношення її основних груп мікроорганізмів, рекомендовано застосування захисних середовищ №1 та №6. Їх використання дозволяє зберегти всі види мікроорганізмів. Очевидно, це пов'язано з багатим складом нутрієнтів. Зокрема, додаткове введення буферних солей K_2HPO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$ обмежує згубну дію кислоти на мікробну популяцію, а сахарози та желатози – підвищує захист клітин.

Поясненням цього є те, що субстанції з великою кількістю зв'язаної води, на відміну від вільної вологи, запобігають пошкодженню мікробних клітин за рахунок уповільнення формування кристаликів льоду усередині самої клітини, які утворюються на стадії заморожування бактеріальних культур. Як свідчать дослідники, сахароза в порівнянні з іншими вуглеводами, за низьких температур містить більшу кількість зв'язаної вологи.

Відомо, що високе збереження життєздатності мікробної асоціації після ліофілізації у значній мірі впливає і на її активність. У зв'язку з цим, було вивчено молокозсідальну активність всіх бактеріальних композицій. Встановлено, що вони здатні швидко ферментувати молоко впродовж 8,2-9,0 год за умови використання середовищ №1 та №6 (табл. 3).

Молокозсідална активність заквашувальних культур після ліофілізації, год.

Заквашувальні культури	Захисні середовища			
	№1	№4	№5	№6
К I	8,20	8,20	10,00	8,20
К II	9,30	9,40	10,00	8,25
К III	9,10	10,00	10,15	9,00

Створені бактеріальні консорціуми є перспективними для виробництва бактеріальних препаратів прямого внесення для кефіру в промислових умовах завдяки високій активності ферментації та відповідності ДСТУ за складом мікрофлори та відповідно органолептичними характеристиками кінцевих продуктів.

Висновки

Досліджено вплив ліофілізації на мікрофлору заквашувальних композицій та запропоновано оптимальне захисне середовище з додатковим вмістом буферних солей та активаторів росту, що забезпечувало ступінь виживання лактобактерій не менше 98% та дріжджів не менше 87%.

Література

1. Witthuhn R. C. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains / R. C. Witthuhn, A. Cilliers, T.J. Britz // Journal of Dairy Research. – 2005. – Vol. 72. – P.125-128.
2. Дмитриченко М.И. Исследование технологического режима сублимационной сушки кефирных грибков и молочнокислых заквасок: автореферат дис-ции ... к.т.н. – Ленинград, 1971. – 26 с.
3. Кретов И.Т. Исследование процесса сублимационной сушки молочных заквасок / И.Т. Кретов, С.Т. Антипов, С.В. Шахов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1996. – №4. – С.15-16.
4. Горбачева Е.С. Пробиотические свойства природного микробного симбиоза напитка «Айран». – Автореферат дис-ции ... к.б.н. – Ставрополь, 2008. – 17с.
5. Carvalho A.S. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria / A.S. Carvalho, J. Silva, P. Teixeira, F.X. Malcata // Lait. – 2003. – Vol.83, N2. – P.203-210.
6. Nanasombat S. Improving viability of freeze-dried lactic acid bacteria using lyoprotectants in combination with osmotic and cold adaptation / S. Nanasombat, N. Sriwong // KMITL Sci. Tech. J. – 2007. – Vol. 7, No. S1. – P.61-69.
7. Ямборко Г.В. Ефективність різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* / Г.В. Ямборко, І.Л. Соловйова // Мікробіологія і біотехнологія. – 2007. – №1. – С. 53-59.
8. Кігель Н.Ф. Вплив захисних середовищ на збереження життєздатності та ферментативної активності заквашувальних культур для простокваші / Н.Ф. Кігель, В.В.Малова // Вісник аграрної науки. – 2006. – №8. – С. 65-68.
9. Garrote G. L. Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study / G. L. Garrote, A.G.Abraham, G. L. De Antoni // Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. – 1997. – Vol. 30, N1.– P. 77-84.
10. Лагода И.В. Исследование основных факторов при сублимационной сушке, влияющих на качество и стойкость заквасок молочнокислых бактерий. – Автореферат дис-ции ... к.т.н. – Москва, 1972. – 24с.