

Н.Ф. Кігель, д-р. техн. наук,
зав. відділом біотехнології,
О.В. Науменко, канд. техн. наук, с.н.с.,
Інститут продовольчих ресурсів
НААН України

ПРИНЦИПИ КОНСТРУЮВАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЗАКВАШУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР ІПР

Виділено з природних джерел і відібрано за критеріями функціональної активності та технологічної придатності промислово цінні штами молочнокислих, пропіоновокислих та біфідобактерій. Як критерії відбору використовували такі, що визнані для виявлення пробіотиків, а саме: здатність до трансформації жовчних кислот та холестерину, стійкість до агресивних сполук кишкового тракту, здатність до адгезії, антибактеріальна активність щодо патогеної та умовно-патогеної мікрофлори. Створено вітчизняні біотехнології заквашувальних препаратів для виробництва функціональних продуктів із використанням біологічно активних культур. Науково обґрунтовано та опрацьовано способи застосування новостворених препаратів.

Ключові слова: заквашувальний препарат, пробіотик, функціональна активність.

Выделены из природных источников и отобраны по критериям функциональной активности и технологичности промышленно-ценные штаммы молочнокислых, пропионовокислых и бифидобактерий. Критериями отбора были признанные для пробиотиков свойства, а именно: способность к трансформации желчных кислот и холестерина, устойчивость к агрессивным соединениям кишечного тракта, способность к адгезии, антимикробная активность по отношению к условно- патогенной и патогенной микрофлоре. Созданы отечественные биотехнологии заквасочных препаратов для производства функциональных продуктов с использованием биологически активных культур.

Научно обоснованы и разработаны способы применения новых препаратов.

Ключевые слова: заквасочный препарат, пробиотик, функциональная активность.

We studied the influence of Lactobacillus species L. plantarum; L. casei, L. rhamnosus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus and L. acidophilus on spontaneous flora of the meat during pickling. It is established that Lactobacillus species L. plantarum; L. casei, L. rhamnosus adapted to hypertensive solutions versus cultures L. acidophilus and L. delbrueckii subsp. bulgaricus.

Key words: lactic acid bacteria, Ambassador, brine, spontaneous microflora.

Безперечно, що для виробництва якісної ферментованої продукції необхідно мати відповідні заквашувальні культури. Закваски є, напевно, найважливішим фактором, що визначає кінцеву якість та властивості того чи іншого продукту. За останні роки відбулися колосальні зміни на ринку заквашувальних культур України. Так, всі ми знайомі з культурами прямого внесення, так званими DVS (Direct Vat Set) культурами європейських фірм Texel (Франція), Chr. Hansen (Данія), DSM Food Specialities (Голландія) та ін. Ці бакпрепарати, як правило, є багатокомпонентними (окремі містять до 10 штамів різних видів бактерій), універсальними (одна культура може бути застосована для виробництва різних продуктів), зручними у використанні (не потребують попередньої підготовки) [1–3]. Однак на даний час виробники та споживачі висувають суворіші вимоги до заквасок і ферментованої ними продукції. Так, продукти, виготовлені з використанням закордонних DVS-культур, інколи дуже подібні між собою за органолептичними характеристиками та не забезпечують характерного оригінального смаку, властивого конкретному типу продуктів. Необхідно також відзначити, що імпортовані бакпрепарати інколи містять генномодифіковані мікроорганізми, пролонгований вплив яких на організм людини недостатньо вивчено. Крім того, споживачі все частіше надають перевагу “автентичним продуктам” (тобто справжнім). Тому і заквашувальні

мікроорганізми, і продукти, вироблені за їх допомогою, повинні бути природними, характерними, звичними для харчового раціону певного регіону України.

З огляду на надзвичайну актуальність та необхідність створення власних заквашувальних препаратів (ЗП) для ферментованих молочних продуктів таку роботу було проведено у відділі біотехнології ІПР.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були молочнокислі, пропіоновокислі та біфідобактерії, ізольовані з біологічного матеріалу, отриманого від здорових людей та з некомерційних молочних продуктів. Загальну чисельність бактерій, оцінку технологічних властивостей проводили загальноприйнятими методами [4]. За допомогою високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі LC-6A (Shimadzu) визначали вміст вуглеводів. Рівень холестерину у продуктах та холестеразну активність бактерій – за різницею між величинами залишкового холестерину у культуральній рідині та стерильному середовищі методом М.Кейтс [5]. Для скринінгу жовчостійких штамів застосовували метод F.A.M. Klaver, використовуючи сухий препарат жовчі “Oxgall”, Sigma [6]. Здатність до адгезії бактерій досліджували у модельній системі на клітинній культурі аденокарциноми гортані людини Нер-2. Ступінь адгезивності виражали за індексом адгезивності (ІА) – середньою кількістю бактерій, що закріпилися на 1 клітині Нер-2 [7]. Кислоторезистентність штамів оцінювали за кількістю життєздатних клітин за експозиції у середовищі, підкисленому соляною кислотою до рН (2,0–3,5) [8]. Антагоністичну активність мікроорганізмів – методом лунок за Єгоровим [9]. Результати досліджень представлено у вигляді середньоарифметичних значень показників з похибкою не більше 5%. Схему проведення досліджень подано на рис. 1.

Результати досліджень та їх обговорення. Було узагальнено світовий досвід та визначено стратегію та методологію пошуку мікроорганізмів з високою біологічною активністю. Проведено селекцію штамів заквашувальних мікроорганізмів за критеріями згідно з табл. 1.



Рис. 1. Схема проведення досліджень

Таблиця 1

Критерії відбору біологічно активних штамів до колекції

Технологічні	Функціональні
Здатність до розвитку у молоці	Джерело походження
Аеротолерантність	Стійкість до метаболітів травної системи: - HCl, NaCl, фенолу
Вид ферментації	
Стабільність кислотності за зберігання продукту	Адгезія до епітеліальних клітин
Рівень ферментативної активності	Колонізація шлунково-кишкового тракту
Забезпечення смаку та ароматичного букету під час виробництва та зберігання продукту	Утворення антибіотичних сполук
Конкурентоздатність зі сторонньою мікрофлорою	Антагонізм щодо патогенних та умовно патогенних бактерій
Ростові характеристики бактерій та здатність до спільного росту у композиціях	Холестеразна активність
Стійкість до технологічних операцій	Безпека при використанні
	Клінічно підтверджений вплив на здоров'я

Застосування таких біотехнологічних підходів дозволило виділити виключно з природних джерел, без застосування методів генної модифікації, високоактивні штами молочнокислих бактерій (насамперед *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. thermophilus*), пропіоновокислих та біфідобактерій, які мали властивості класичних пробіотиків. Відібрані культури характеризувались жовчо- та кислоторезистентністю, високою антагоністичною та адгезивною активностями, здатністю знижувати вміст лактози та холестерину під час ферментації молока (табл. 2).

Найактивніші із штамів склали основу різноманітних ЗП високої біологічної активності для виробництва функціональних продуктів. На рис. 2 представлено деякі з розроблених функціонально активних ЗП. Умовно їх можна поділити на дві групи:

- 1) з використанням тільки лактобактерій;
- 2) комплекс біфідо- та лактобактерій.

Таблиця 2

Основні показники біологічної активності культур

Показник	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium ssp.</i>	<i>S. thermophilus</i>
Зниження вмісту лактози, % ^{*)}	25,6-26,7	28,6-31,1	5,0-7,9	26,3-25,5
Жовчостійкість, К _{інт} , %	0,89-0,92	0,75-0,88	0,78-0,97	0,60-0,66
Кислоторезистентність, %	78-81	65-70	20-40	52-56
Адгезія до НЕР-2, ІА	1,43±0,24	0,36±0,18	2,19±0,24	0,99±0,14
Зниження рівня холестерину, % ^{*)}	58,6-64,0	21,2-25,8	10,5-15,0	28,9-35,4
Антагоністична активність, зона відсутності росту тест-культур у мм				
<i>Escherichia coli</i> 0113	28±1	18±1	10±1	12±1
<i>Proteus vulgaris</i> 2029	30±1	20±2	10±1	10±1
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	30±1	12±1	12±2	7±1
<i>Enterococcus cloaceae</i>	30±1	19±1	9±1	10±1
<i>Shigella sonnei</i> 12S	30±1	10±1	11±1	9±1

Примітки: ^{*)} – від вихідного вмісту. Результати достовірні при $p=0,05$

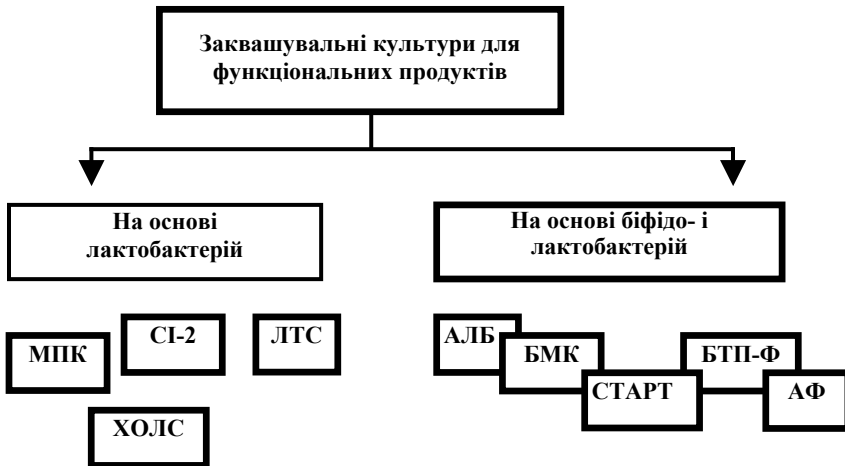


Рис. 2. Біорізноманіття створених заквашувальних препаратів

Основною вимогою до цих ЗП було те, що вони повинні забезпечувати не тільки необхідні технологічні властивості кисломолочного продукту, а й містити таку кількість пробіотичної мікрофлори, яка буде гарантувати позитивний вплив на організм людини. Також велику увагу було приділено прогнозуванню функціональної активності ЗП, що обумовлювало спрямованість селекційних критеріїв при пошуку та конструюванні бактеріальних композицій. Так, при формуванні складу ЗП «ХОЛС» за основний критерій відбору лактобактерій було взято здатність мікроорганізмів знижувати рівень холестерину; при розробці ЗП «БТП-Ф», «АФ» і «ЛТС» – антагоністичну активність щодо широкого спектру умовно-патогенної та патогенної мікрофлори. Нині такі ЗП і ферментовані ними молочні продукти лікарі розглядають як альтернативу деяким фармацевтичним засобам і використовують для оздоровлення та лікування людей [10–11].

Основним завданням, яке вирішували при створенні всіх ЗК було те, що пробіотичні бактерії виділяли з кишечника (їхньої природної екоїши), і тому вони були, як правило, нетехнологічними. Це потребувало проведення спрямованої селекційної роботи з їхньої адаптації до розвитку у молоці.

Іншим підходом до інтенсифікації росту “кишкових” штамів було застосування стимуляторів їхнього росту як при виробництві препарату, так і у виробництві готових кисломолочних продуктів. Наприклад, введення до молочної основи біфідогенного фактора – ячмінно-солодового екстракту, дало можливість використовувати ЗП Старт шляхом прямого внесення без попередньої активізації, що значно інтенсифікувало технологічний процес.

Взагалі ЗП створювали двома способами. Перший спосіб – модифікація бактеріальних композицій уведенням до їх складу штамів-пробіотиків. Таким чином підвищували їхню функціональну активність. Так, за цією методологією було створено ЗП для йогурту СІ-2 (додатково ввели пробіотичні штами виду *L. acidophilus*), ЗП МПК для біопростокваші (введено штам-пробіотик *L. casei*), ЗП Старт створено на основі препарату для рязанки з додаванням біфідобактерій *B. longum*.

Другий спосіб – створення композицій на основі пробіотичних штамів, доповнюючи їх молочними культурами для забезпечення крім високої функціональної активності й необхідних органолептичних та реологічних характеристик ферментованого ними молока. За другою методологією створено більшість із розроблених нами ЗП, а саме, наприклад, ЗП ЛТС. До його складу введено “кишкові” штами *L. casei* та *L. acidophilus* з високим біологічним потенціалом, які було доповнено молочним стрептококом *S. thermophilus* на основі сумісності між ними та синергізму біологічної активності.

При створенні біфідовмісних ЗП реалізували підхід, який базується на відтворенні природних асоціативних зв’язків біфідобактерій. Відомо, що основним симбіонтом біфідобактерій в кишечнику є лактобактерії, які постачають необхідні для їхнього росту амінокислоти. Водночас біфідобактерії потребують для свого росту вітамін В₁₂, продуцентом якого в кишечнику є пропіоновокислі бактерії [12]. Враховуючи вищевикладене, нові ЗП БТП-Ф і БАТП-Ф розробляли на основі комплексної композиції з біфідобактерій, молочнокислих та пропіоновокислих бактерій.

Створені ЗП можуть бути використані у різний спосіб – ферментацією молочної суміші або як збагачувачі сухих молочних продуктів. Продукти, в технологічному процесі яких присутній етап ферментації за допомогою створених ЗП, відповідають вимогам ДСТУ 2212:2003 щодо активної мікрофлори (згідно з ДСТУ 2212:2003 *біопродуктом є “молочний продукт, який містить пробіотики в кінці терміну придатності кількістю не менше 10⁷ КУО/г”*). У таблиці 2 наведено характеристику деяких із розроблених технологій функціональних молочних продуктів із використанням створених ЗП.

Як видно з даних таблиці 2, ЗП застосовують прямим внесенням у підготовлену молочну основу з розрахунку 5–10 г/т. Кількість штамів-пробіотиків у 1 грамі продуктів, вироблених із використанням зазначених ЗП, становить від 10⁶ до 10⁸ КУО упродовж всього терміну придатності. Ферментовані молочні продукти характеризувались зниженим рівнем лактози та холе-

стерину, підвищеним рівнем вільних амінокислот і високою антимікробною активністю щодо широкого кола збудників кишкових інфекцій.

Таблиця 2

Характеристика функціональних молочних продуктів

Показник	Даринка	Мілсніум	Біовіт
Заквашувальний препарат	БТП	ЛТС	СТАРТ
Доза ЗП, г/т	5-10	5	5
Асортимент	нежирний, 2% жирності 3,2% жирності фруктовий (н/ж, 2,5% ж., 3,2% ж.)	нежирний, 2,5% жирності 3,2% жирності фруктовий (н/ж, 2,5% ж., 3,2% ж)	натуральний, солодкий, фруктовий
Інгредієнти	молоко незбиране, знежирене, фрук- тові наповнювачі, сахароза	молоко незбиране, знежирене, фруктові наповнювачі, сахаро- за	молоко незбиране, знежирене, рос- линне масло, ячмінно-солодовий екстракт, альгінат натрію, фруктові наповнювачі
Масова частка, %: жиру	нежирний; 2,5; 3,2	нежирний; 2,5; 3,2	2,5
сахарози	7 (для фруктового)	6 (для фруктового)	6 (для фруктового)
Кислотність, оТ	80-120	80-120	80-120
Чисельність, КУО/г: біфідобактерій молочнокислих пропіоновокис- лих	1×10^6 1×10^8 1×10^6	1×10^8	1×10^6 1×10^7
Енергетична цінність, ккал	28-83	28-80	58-82
Термін зберігання, дів	5	5	5

Нами створено також універсальні функціональні ЗП. Їх можна використовувати і для ферментації, і, як збагачувачі для виробництва сухих молочних продуктів. Наприклад, для застосування ЗП СІ-2 розроблено дві технічні документації – одна для виробництва йогурту підвищеної біологічної активності, і друга – на суху біологічну активна добавку “Йогурт сухий в капсулах”.

Необхідно зазначити, що практично всі з розроблених ЗП мають підтвердження своєї функціональної активності не тільки у лабораторних дослідках, а й у доклінічних та клінічних випробуваннях.

Висновки:

1. Вилучено із природних джерел штами молочнокислих, пропіоновокислих та біфідобактерій з високим рівнем біологічної активності та перспективних до промислового застосування.
2. Створено низку оригінальних вітчизняних ЗП з залученням біологічно активної мікрофлори, що характеризувались високим технологічним та функціональним потенціалом.
3. Розроблено способи застосування нових ЗП: ферментацією молочної основи, збагачуванням рідких та сухих молочних продуктів, як біологічно активні добавки.

Література

1. Богач О.Н. Лиофилизированные закваски прямого внесения компании "Христиан Хансен" / О.Н. Богач, О.Г. Кручек // Молочна промисловість. – 2002. – № 1. – С. 31.
2. Kahala M. Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili / M. Kahala, M. Maki, A. Lehtovaara, J.-M. Tapanainen, R. Katiska, M. Juuruskorpi, J. Juholaand V. Joutsjoki // Journal of Applied Microbiology. – 2008. – Vol. 105, № 6. – P. 1929–1938.
3. Ильяшенко Т.И. Культуры прямого внесения PRODOLACT и D1–PROX – лучший выбор на сегодняшний день / Т.И. Ильяшенко, О.В. Вознюк // Молочна промисловість. – 2006. – № 7. – С. 22–24.
4. Сборник инструкций по селекции молочнокислых бактерий и бифидобактерий и подбору заквасок для кисломолочных продуктов. – М., 1985. – 101 с.

5. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М.: «Мир». – 1975. – С. 84–85.
6. Klaver F.A.M. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity / F.A.M. Klaver, R. van der Meer // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – Vol. 59 (№ 4). – P. 1120–1124.
7. Науменко О.В. Метод визначення адгезивності лакто- та біфідобактерій / О.В. Науменко, Н.Л. Зубкова, Н.Ф. Кігель // 69-та наук. конференція молодих вчених, аспірантів та студентів “Розроблення, дослідження і створення продуктів функціонального харчування, обладнання та нових технологій для харчової і переробної промисловості”, м. Київ, 22–24 квітня, 2003 р. – К. : НУХТ, 2003, Ч. 2. – С. 40.
8. Єресько Г.О. Кислоторезистентність промислових штамів молочнокислих бактерій / Г.О. Єресько, Н.Ф. Кігель, Г.В. Жоган // Вісник аграрної науки. – 2003. – № 5. – С. 66–68.
9. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. – М. : Высш. шк., 1979. – 455 с.
10. Gueimonde M. Safety of probiotics / M. Gueimonde, A.C. Ouwehand, S. Salminen // Scand. J. Nutrition. – 2004. – Vol. 48 (№ 1). – P. 42–48.
11. Lantinen S. Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Fourth edition / S. Lantinen, A. Ouwehand, S. Salminen, A. Wtigh // CRC Press New RC Press New York. – 2012. – P. 2–13.
12. Holo H. Bacteriocins of propionic acid bacteria / H. Holo, T. Faye, D.A. Brade, T. Nilsen at el // Le Lait. – 2002. – Vol. 82 (№ 1). – P. 59–68.