УДК 637.1

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА НА ОСНОВЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ЗАКВАСКИ

А.Н. Иркитова, И.А. Функ*, Р.В. Дорофеев

ФГБНУ «Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия», 656016, Россия, г. Барнаул, ул. Советской Армии, 66

**e-mail: altai.sibniis@mail.ru*

Дата поступления в редакцию: 25.03.2016
Дата принятия в печать: 10.06.2016

Актуальной на сегодняшний день проблемой является обеспечение полноценным и здоровым питанием населения различных возрастных групп. С этой целью необходимо введение дополнительных функциональных ингредиентов, в роли которых выступают пробиотические микроорганизмы. Проведены исследования по обоснованию использования комбинированной закваски, состоящей из культур бифидобактерий и лактобактерий при их совместном культивировании с целью получения пробиотического кисломолочного напитка. Для определения показателей технологически ценных свойств исследуемых объектов использовались общепринятые и стандартные методы. На основании некоторых свойств микроорганизмов: анализа скорости роста в молоке штаммов бифидобактерий из коллекции микроорганизмов лаборатории микробиологии ФГБНУ СибНИИС, а также антагонистических свойств лактобактерий по отношению к *E. coli* отобраны наиболее активные штаммы. Определены оптимальный процент внесения и соотношение пробиотических культур в составе закваски *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus plantarum* (5 %, 4:1 соответственно). Установлен оптимальный срок годности пробиотического кисломолочного напитка, составляющий 5 суток. По результатам исследований разработана биотехнология пробиотического кисломолочного напитка «Плабифин» на основе комбинированной закваски.

Пробиотические микроорганизмы, кисломолочный продукт, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus plantarum,* «Плабифин»

Введение

В настоящее время постоянное влияние стрессовых факторов, загрязнение окружающей среды, неконтролируемое использование лекарственных препаратов пагубно влияют на здоровье населения. В связи с этим практически во всех экономически развитых странах приняты национальные программы, направленные на улучшение здоровья населения за счет так называемого функционального питания [1]. Одна из важнейших групп продуктов функционального питания – пробиотические продукты. Они содержат в своем составе живые клетки селектированных штаммов бактерий с выраженным лечебно-профилактическим эффектом из числа полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Большую часть пробиотических продуктов представляют собой кисломолочные напитки с бифидобактериями и/или определенными видами лактобацилл [2].

Главная функция пробиотиков – профилактика развития кишечного дисбактериоза в результате антибиотикотерапии, хирургических вмешательств, острых и хронических заболеваний кишечника, стресса и других причин [3, 4, 5]. Их рекомендуют также применять в качестве одного из эффективных средств в комплексной терапии уже развившегося дисбактериоза [6].

В связи с этим разработка технологии пробиотических напитков с целью расширения ассортимента является актуальной задачей.

Целью данного исследования является научное обоснование технологии пробиотического кисломолочного напитка на основе комбинированной закваски.

Объекты и методы исследований

Для проведения исследований в качестве сырья для напитка использовали обезжиренное коровье молоко. Объектами исследования являлись штаммы микроорганизмов *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus plantarum* из коллекции лаборатории микробиологии ФГБНУ СибНИИС.

Для определения показателей технологически ценных свойств исследуемых объектов использовались общепринятые и стандартные методы: титруемая кислотность титриметрически по ГОСТ 3624-92; активная кислотность потенциометрически по ГОСТ 51455-99; количество молочнокислых микроорганизмов по ГОСТ 10444.11-89; предельное кислотообразование потенциометрически по ГОСТ 51455-99; активность кислотообразования потенциометрически по ГОСТ 51455-99; антагонистическая активность диффузионным методом по ТУ 9229-026-04610209-94.

Результаты и их обсуждение

Известно, что комбинированные закваски обладают более высокой биохимической активностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам среды по сравнению с заквасками, приготовленными на монокультурах. Таким образом, оптимальным ва-

риантом при производстве пробиотического кисломолочного продукта является создание комбинированной закваски с использованием культур *Lactobacillus plantarum* и бифидобактерий.

При подборе штамма бифидобактерий для включения в состав комбинированной закваски производился отбор из 9 штаммов *B. Longum* отраслевой коллекции ФГБНУ Сибирского НИИ сыроделия по скорости образования сгустка при культивировании на обезжиренном молоке. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Отбор штамма бифидобактерий для включения в комбинированную закваску по скорости образования сгустка на обезжиренном молоке

№	Индекс штамма	Образование сгустка на обезжиренном молоке, ч			
		15	16	17	18
Bifidobacterium longum					
1	СКМ-747 (К-3)	–	–	+	+
2	СКМ-748 (S-3)	+	+	+	+
3	СКМ-749 (KS-3)	–	–	–	–
4	СКМ-750 (Т 4)	+	+	+	+
5	СКМ-751 (КТ)	–	–	–	–
6	СКМ-752 (ST)	–	–	–	–
7	СКМ-753 (KST)	+	+	+	+
8	СКМ-754 (БАД)	–	–	–	–
9	СКМ-755 (БЮ)	–	–	–	–

Примечание: «+» – наличие сгустка; «–» – отсутствие сгустка.

Таким образом, за 15 часов культивирования при 37 °С, что немаловажно для технологического процесса, сгусток образовали 3 штамма (СКМ-748, СКМ-750 и СКМ-753). Сгусток, имеющий ровные края, колющую консистенцию и специфический привкус, свойственный бифидобактериям, дал штамм СКМ-750 (T_4), который и вошел в состав комбинированной закваски.

В молоке бифидобактерии развиваются медленно, так как коровье молоко не является естественной средой их обитания. Одной из причин плохого роста бифидобактерий в молоке служит растворенный в нем кислород. К тому же у них не обнаружено казеинолитической активности, т.е. они могут усваивать казеин только после частичного гидролиза. В результате расщепления казеина образуются полипептиды, гликопептиды, аминосахара, стимулирующие рост бифидобактерий. Другой причиной медленного роста бифидобактерий может быть и их низкая фосфатазная активность [7]. В связи с этим в ходе исследований проведен эксперимент по оценке влияния стимулятора роста ГМК 3 (гидролизат-молочно-кукурузная среда по ТУ 9229-357-00419785-04) на рост бифидобактерий. Результаты исследования показали, что фактор роста ГМК 3 оказывает стимулирующее влияние на жизнедеятельность бифидобактерий, о чем свидетельствует наличие значительного количества бифидобактерий в поле зрения микроскопа при микроскопировании (рис. 1, 2).

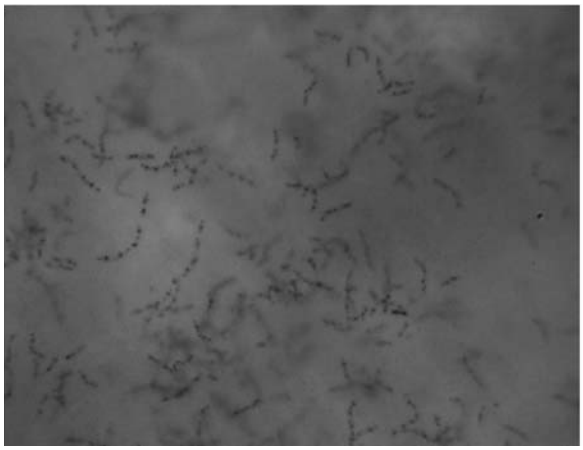

Рис. 1. Микроскопический препарат *B. longum* (T_4) без ГМК 3 (увел. 16х100) (24 ч культура)

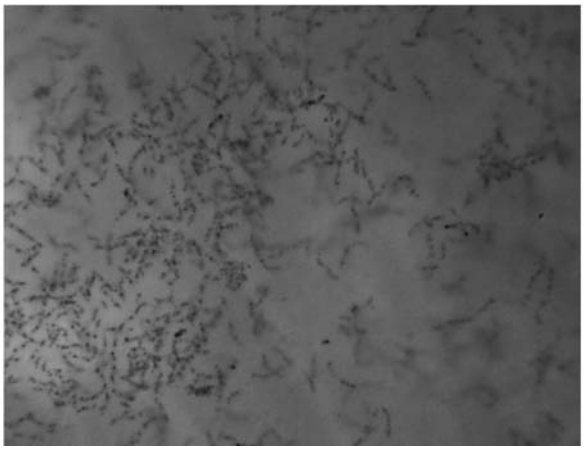

Рис. 2. Микроскопический препарат *B. longum* (T_4) с использованием ГМК 3 (увел. 16х100) (24 культура)

Немаловажно, чтобы пробиотические культуры, находящиеся в продукте, также обладали свойством антагонистической активности по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре. Известно, что выраженной антагонистической активностью обладают некоторые молочнокислые бактерии, например, мезофильные молочнокислые палочки *Lactobacillus plantarum* [8].

В качестве объектов исследования в работе были использованы 12 коллекционных штаммов *Lactobacillus plantarum*, в качестве тест-культур – 4 штамма *E. coli* из коллекции ФГБНУ СибНИИС.

Антагонистическую активность *L. Plantarum* по отношению к *E. coli* определяли в несколько этапов. На первом этапе все 12 коллекционных штаммов проверяли на активность кислотообразования и предельное кислотообразование. Для этого в агаризованную полужидкую питательную среду (обогащенную гидролизованным молоком, дрожжевым автолизатом и пептоном) и в обезжиренное молоко вносили по 1 % 18-часовой культуры каждого из исследуемых штаммов *L. Plantarum*, культивировали при 30 °С и измеряли активную кислотность (pH) ежедневно в течение 10 суток.

На втором этапе, отобрав наилучших кислотообразователей *L. Plantarum* (из 12 штаммов их оказалось 5), исследовали их антагонистическую активность к тест-штаммам *E. coli* с использованием диффузионного метода перпендикулярных штрихов на среде КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов по ТУ 9229-026-04610209-94) (рис. 3) [9].

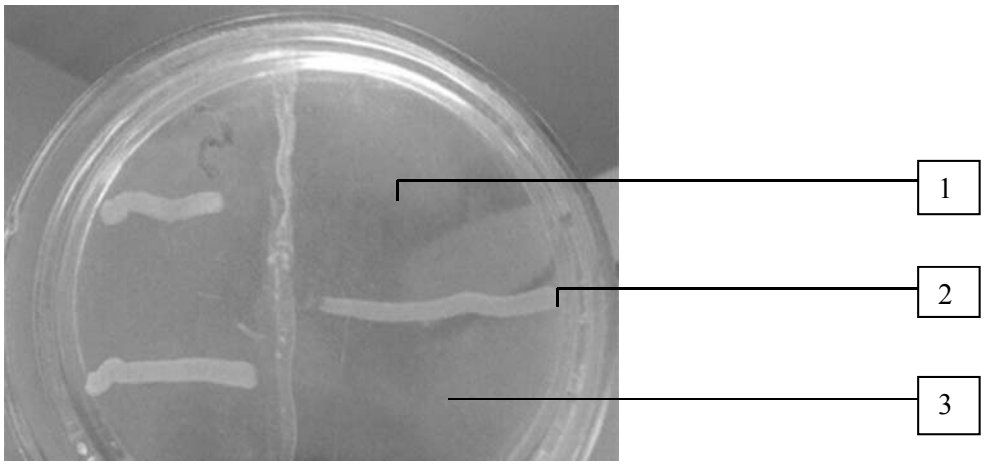

Рис. 3. Проявление антагонистической активности (метод перпендикулярных штрихов):
1 – зона ингибирования; 2 – тест-культура (*E. coli*); 3 – антагонист (*L. Plantarum*)

Таблица 2

Влияние дозы закваски и соотношение культур *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus plantarum* на органолептические показатели пробиотического кисломолочного напитка

Доза закваски и соотношение культур *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus plantarum* в напитке	Органолептические показатели
2 % в соотношении 1:1	Запах чистый, кисломолочный. Вкус кисломолочный. Специфического привкуса, свойственного бифидобактериям, нет. Цвет белый с кремовым оттенком, равномерный по всей массе. Сгустка нет. При микроскопии встречаются единичные клетки бифидобактерий
3 % в соотношении 2:1	Запах чистый, кисломолочный. Цвет белый с кремовым оттенком, равномерный по всей массе. Консистенция жидкого йогурта. Специфического вкуса, свойственного бифидобактериям, нет. На микроскопическом препарате клетки бифидобактерий встречаются в малом количестве
5 % в соотношении 3:2	Запах чистый, кисломолочный. Вкус кисломолочный, специфичный для бифидосодержащих продуктов. Цвет белый с кремовым оттенком, равномерный по всей массе. Консистенция жидкого йогурта. В поле зрения микроскопа десятки клеток бифидобактерий
5 % в соотношении 4:1	Запах чистый, кисломолочный. Вкус кисломолочный с привкусом, специфичным для бифидосодержащих продуктов (выражен сильнее, чем в предыдущем варианте). Цвет белый с кремовым оттенком, равномерный по всей массе. Консистенция жидкого йогурта. При микроскопии в поле зрения микроскопа обнаруживается много клеток бифидобактерий

Результаты эксперимента показали, что самой сильной антагонистической активностью обладал только один штамм из 5 – СКМ-694 (S42), который и вошел в состав комбинированной закваски, подавляя 3 из 4 штаммов тест-культур *E. coli* уже при соотношении 1:1.

Для подбора оптимального соотношения культур *B. longum* и *L. Plantarum* в состав закваски проводился ряд экспериментов по оценке влияния дозы закваски и соотношения культур *B. Longum* и *L. plantarum* на органолептические показатели пробиотического кисломолочного напитка (табл. 2).

В оптимальном варианте доза внесения комбинированной закваски составила 5 % при соотношении культур *B. Longum* и *L. Plantarum* 4:1 соответственно. Данный вариант отличается от других наилучшими органолептическими показателями и большим количеством клеток бифидобактерий при микроскопии.

В итоге, опираясь на результаты проведенных экспериментов, была разработана схема приготовления пробиотического кисломолочного напитка, представленная на рис. 4.

Готовый напиток исследовали по органолептическим и микробиологическим показателям при хранении в бытовом холодильнике (5 °С) в течение 10 суток для определения сроков его годности.

По результатам учета численности бифидобактерий в напитке установлено их содержание в первые сутки хранения 10^8 КОЕ/мл, на пятые сутки – 10^6 КОЕ/мл. Изменение органолептических показателей не наблюдалось в течение 5 суток хранения. Поэтому срок годности напитка ограничен 5 сутками, что при соблюдении условий хранения гарантирует высокую численность живых физиологически активных клеток пробиотических микроорганизмов и хорошие органолептические показатели.

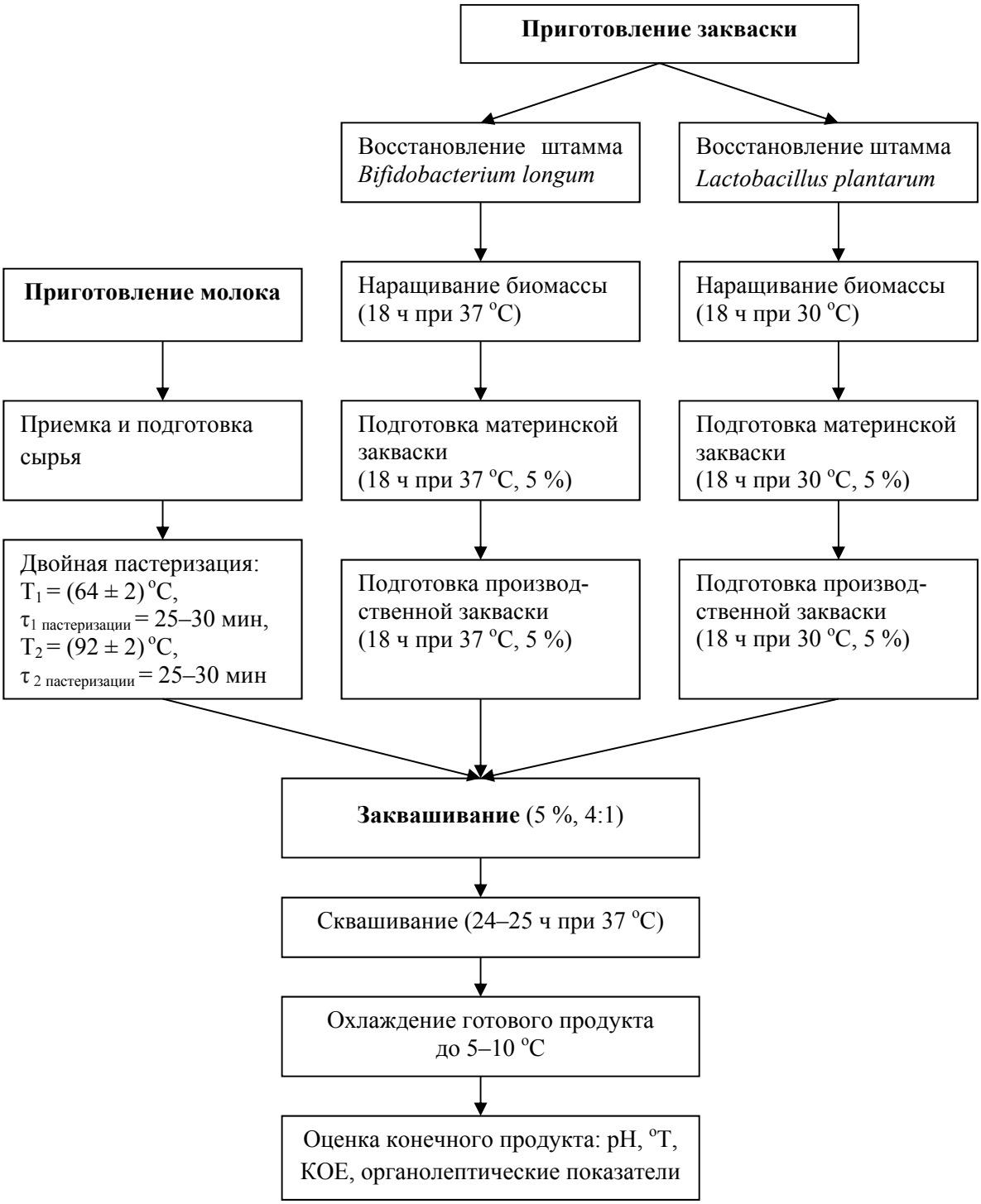

Рис. 4. Схема приготовления пробиотического кисломолочного напитка

Таким образом, напиток представляет собой нормализованное по массовой доле жира стерилизованное или пастеризованное молоко, ферментированное совместным действием заквасочных микроорганизмов в составе комбинированной закваски: *L. Plantarum* и *B. Longum*. Разработана нормативно-техническая документация на пробиотический кисломолочный напиток «Плабифин» (ТУ 9222-073-00419710-14). Предусмотрен выпуск напитка с массовой долей жира 3,2 %, 2,5 % и обезжиренного напитка.

Список литературы

1. Распоряжение Правительства РФ от 25 октября 2010 г. № 1873-р «Об утверждении основ государственной политики РФ в области здорового питания населения на период до 2020 г.».

2. Рожкова, Т.В. Российский рынок заквасочных культур / Т.В. Рожкова // Молочная промышленность. – 2006. – № 3. – С.23–24.

3. Барановский, А.Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / А.Ю. Барановский, Э.А. Кондрашина. – СПб.: Питер, 2000. – 224 с.

4. Guillemard E., Tondu F,.Lacoin F., Schrezenmeir J. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic Lactobacillus casei DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomized controlled trial // Br. J. Nutr. 2010; 103 (1): 58–68.

5. Martinez-Canavate A., Sierra S., Lara-Villoslada F. Romero J., Maldonado J., Boza J., Xaus J., Olivares M. A probiotic dairy product containing L. gasseri CECT5714 and L. coryniformis CECT5711 induces immunological changes in children suffering from allergi // Pediatr. Allergi Immunol. 2009; 20 (6): 592–600.

6. Артюхова, С.И. Пробиотический биопродукт для корпоративного питания / С.И. Артюхова, Т.Т. Толстогузова // Молочная промышленность. – 2014. – № 9. – С. 20.

7. Бурлакова, Е.В. Применение углеводных препаратов для активизации роста бифидобактерий b. Adolescentis MC 42 / Е.В. Бурлакова, Т.В. Бархатова // Известия вузов. Пищевая технология. – 2012. – № 2–3. – С. 119–120.

8. Иркитова, А.Н. Методы определения антагонистической активности молочнокислых бактерий / А.Н. Иркитова, Я.Р. Каган // Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока. – 2012. – № 9. – С. 226–236.

9. Функ, И.А. Оценка антагонистической активности коллекционных штаммов *Lactobacillus plantarum* / И.А. Функ, А.Н. Иркитова // *Acta Biologica Sibirica.* – 2015. – № 1 (1–2). – С. 85–93.

SOME ASPECTS OF BIOTECHNOLOGY OF PROBIOTIC FERMENTED MILK DRINK BASED ON COMBINED STARTER

A.N. Irkitova, I.A. Funk*, R.V. Dorofeev

Siberian Research Institute of Cheese Making,
66, Sovetskoy Armii Str., Barnaul, 656016, Russia

**e-mail: altai.sibniis@mail.ru*

Received: 25.03.2016
Accepted: 10.06.2016

To ensure a full and healthy nutrition of population of different age groups is an urgent problem today. This requires the introduction of additional functional ingredients including probiotics. Conducted are the researches on justification of the use of a combined starter culture consisting of cultures of bifidobacteria and lactobacilli in their joint cultivation to produce a probiotic fermented milk drink. Generally accepted standard methods were used to determine technologically valuable properties of the objects. The most active strains were selected on the basis of some properties of micro-organisms: the analysis of the rate of growth in milk of bifidobacteria strains from the microorganism collection of the microbiology laboratory of FSBSI SibNIA and antagonistic properties of lactobacilli against *E. colli*. The optimum percentage of introduction and the ratio of probiotics in the composition of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus plantarum* starter culture (5%, 4 : 1 respectively) has been determined. The optimum shelf life of probiotic fermented milk drink equal to 5 days has been established. A biotechnology of “plabifin” probiotic fermented milk drink based on a combined starter has been developed according to the results of studies.

Probiotics, fermented milk drink, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus plantarum*, "Plabifin"

References

1. *Rasporiazhenie Pravitel'stva Rossiiskoi Federatsii ot 25.10.10 goda. № 1873–r “Osnovy gosudarst-vennoi politiki Rossiiskoi Federatsii v oblasti zdorovogo pitaniia naseleniia na period do 2020 goda”* [Instruction of the Government of the Russian Federation “Fundamentals of public policy of the Russian Federation in the sphere of healthy nutrition of the population up to 2020”]. 2010, no. 1873–r. (In Russ.).

2. Rozhkova T.V. Rossiyskiy rynok zakvasochnykh kul'tur [Russian market of starter cultures]. *Molochnaya promyshlennost'* [Dairy industry], 2006, no. 3, pp. 23–24.

3. Baranovskiy A.Yu., Kondrashina E.A. *Disbakterioz i disbioz kishechnika* [Dibacteriosis and dysbiosis of intestines]. St. Petersburg, Piter Publ., 2000. 224 p.

4. Guillemard E., Tondu F., Lacoin F., Schrezenmeir J. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic Lactobacillus casei DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomized controlled trial. *Br. J. Nutr*., 2010, no. 103 (1), pp. 58–68.

5. Martinez-Canavate A., Sierra S., Lara-Villoslada F. Romero J., Maldonado J., Boza J., Xaus J., Olivares M. A probiotic dairy product containing L. gasseri CECT5714 and L. coryniformis CECT5711 induces immunological changes in children suffering from allergi. *Pediatr. Allergi Immunol*., 2009, no. 20 (6), pp. 592–600.

6. Artyukhova S.I., Tolstoguzova T.T. Probioticheskiy bioprodukt dlya korporativnogo pitaniya [Probiotechnology for corporate catering]. *Molochnaya promyshlennost'* [Dairy industry], 2014, no. 9, pp. 20.

7. Burlakova E.V., Barkhatova T.V. Primenenie uglevodnykh preparatov dlya aktivizatsii rosta bifidobakteriy b. Adolescentis MC 42 [The use of carbohydrate preparations for enhancing the growth of bifidobacteria b. Adolescentis MC 42]. *Izvestiya vysshikh*

uchebnykh zavedeniy. Pishchevaya tekhnologiya [Transactions of Higher Educational Institutions, Food Technology]. 2012, no. 2–3, pp. 119–120.

8. Irkitova A.N., Kagan Ya.R. Metody opredeleniya antagonisticheskoy aktivnosti molochnokislykh bakteriy [Methods for determination of antagonistic activity of lactic acid bacteria]. *Aktual'nye problemy tekhniki i tekhnologii pererabotki moloka* [Actual problems of technics and technologies of milk processing], 2012, no. 9, pp. 226–236.

9. Funk I.A., Irkitova A.N. Otsenka antagonisticheskoy aktivnosti kollektsionnykh shtammov *Lactobacillus plantarum* [Evaluation of the antagonistic activity of collection strains *Lactobacillus plantarum. Acta Biologica Sibirica*, 2015, no. 1 (1–2), pp. 85–93.

Дополнительная информация / Additional Information

Иркитова, А.Н. Некоторые аспекты биотехнологии пробиотического кисломолочного напитка на основе комбинированной закваски / А.Н. Иркитова, И.А. Функ, Р.В. Дорофеев // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 42. – № 3. – С. 19–24.

Irkitova A.N., Funk I.A., Dorofeev R.V. Some aspects of biotechnology of probiotic fermented milk drink based on combined starter. *Food Processing: Techniques and Technology,* 2016, vol. 42, no. 3, pp. 19–24. (in Russ.).

Иркитова Алена Николаевна
канд. биол. наук, заведующая лабораторией микробиологии, ФГБНУ «Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия», 656016, Россия, г. Барнаул, ул. Советской Армии, 66, тел.: +7 (3852) 56-45-26, e-mail: altai.sibniis@mail.ru

Функ Ирина Андреевна
младший научный сотрудник лаборатории микробиологии, ФГБНУ «Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия», 656016, Россия, г. Барнаул, ул. Советской Армии, 66, тел.: +7 (3852) 56-45-26, e-mail: altai.sibniis@mail.ru

Дорофеев Роман Викторович
канд. с.-х. наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии, ФГБНУ «Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия», 656016, Россия, г. Барнаул, ул. Советской Армии, 66, тел.: +7 (3852) 56-45-26, e-mail: altai.sibniis@mail.ru

Alena N. Irkitova
Cand.Sci.(Biol.), Head of the Laboratory of Microbiology, Siberian Research Institute of Cheese Making, 66, Sovetskoy Armii Str., Barnaul, 656016, Russia, phone: +7 (3852) 56-45-26, e-mail: altai.sibniis@mail.ru

Irina A. Funk
Junior Researcher of the Laboratory of Microbiology, Siberian Research Institute of Cheese Making, 66, Sovetskoy Armii Str., Barnaul, 656016, Russia, phone: +7 (3852) 56-45-26, e-mail: altai.sibniis@mail.ru

Roman V. Dorofeev
Cand.Sci.(Agr.), Senior Researcher of the Laboratory of Microbiology, Siberian Research Institute of Cheese Making, 66, Sovetskoy Armii Str., Barnaul, 656016, Russia,
phone: +7 (3852) 56-45-26, e-mail: altai.sibniis@mail.ru