

Съдържание и жизнеспособност на пробиотични микроорганизми в заквасени млечни продукти

Доц. Росица Еникова,¹ д-р Константин Траев²

¹ НЦООЗ; ² Данон-Сердика АД

Резюме

Добре известно е, че пробиотичните ефекти на млечнокиселите микроорганизми се реализират само при постоянно перорално постъпване в организма на човека. Общоприето е мнението, че необходимите дози пробиотични бактерии следва да бъдат не по-малко от 10^9 , т. е. милиард и повече дневно. Ако се касае за храна, то следва да съдържа не по-малко от 10^7 жизнеспособни клетки ($\log=7$) при положение, че дневната им консумация е не по-малко от 100 g. Тези съображения поставят пред производителите на пробиотични храна сериозни изисквания, т. е. продуктите да съдържат достатъчни количества жизнеспособни клетки на прокламираните пробиотични щамове. Освен това, тези количества трябва да бъдат достатъчно устойчиви по време на целия срок на трайност на продуктите.

Основната цел на настоящата разработка е да представи данни за количествата млечнокисели микроорганизми в заквасени млечни продукти, произведени в България, и да проследи тяхната жизнеспособност при различни по продължителност срокове на съхранение.

Ключови думи: пробиотици, дози, жизнеспособност, заквасени млечни продукти, срок на трайност, бифидобактерии, смесена култура.

Content and viability of probiotic microorganisms in fermented dairy products

Ass. Prof. Rositzka Enikova, SRA II deg, M.D.,¹ Konstantin Traev, M.D.²

¹ NCPHC

² Danone Serdika Co.

Abstract

It is well known that the probiotic effects of yoghurt strains are shown in humans only when constant peroral intake is ensured. It is generally accepted that the necessary dosage of probiotic bacteria should be no less than 10^9 i.e. a billion or more daily. When food is considered, the consumed product should contain no less than 10^7 viable cells ($\log=7$) and daily consumption should be no less than 100 g of the product. Due to these restraints the producers of probiotic food are facing considerable challenges and they need to create products containing enough viable cells of the strains declared as probiotics. Also the probiotic microorganisms should be viable throughout the entire shelf life of the products.

The main task of this article is to present data about the quantity of yoghurt strains, contained in fermented dairy products, which are produced in Bulgaria and to follow up their viability throughout different lengths of shelf life.

Key words: probiotics, doses, viability, fermented dairy products, shelf life, bifidobacterium, mixed ferments.

Аксиоматична истина е, че пробиотичните ефекти на млечнокиселите микроорганизми се реализират само при постоянно перорално постъпване в организма на човека. Това е необходимо на първо място, за да се осигури успешното им преминаване

през стомашната „бариера“, където високо киселата реакция на средата и агресивните спрямо микроорганизмите секрети обичайно водят до рязко намаляване на броя на постъпващите микробни клетки. С други думи, изследователите продължават основателно да наблюдават проблема за дозите пробиотични бактерии, постъпващи с ежедневната доза функционални храна и необходими за реализацията на желаните профилактични и клинично доказани ефекти. Проф. Ph. Marteau² например, анализирайки многобройни клинични проучвания, интонира върху потребността от определени дози от продукта, респ. млечнокиселите бактерии, за изява на позитивни ефекти при констипация и иритативен чревен синдром или тежки ентероколити (*B. lactis* DN 173–010) наред с по-изявения ефект на комбинативното приложение на два или повече пробиотика, например *B. bifidum* и *L. acidophilus* и т. н.

Общоприето е мнението, че необходимите дози пробиотични бактерии следва да бъдат не по-малко от 10^9 , т. е. милиард и повече дневно. Това означава, че техните източници трябва да съдържат посочената доза, независимо от формата, в която се предлагат на потребителя (пациента). Не е случайно, че Codex

alimentarius в стандарта за заквасените млечни продукти – йогурт, кефир, кумис и други „ферментирани“ млека, нормира млечнокиселите бактерии в тях до $\log=7$.¹

И така, ако се касае за храни, то те следва да съдържат не по-малко от 10^7 жизнеспособни клетки ($\log=7$) при положение, че дневната им консумация е не по-малко от 100 g. Ако пробиотиците се предлагат в таблетирани или друг тип фармацевтична форма (напр. в капсули), то съдържанието на жизнеспособни клетки на пробиотичния щам трябва да бъде не по-малко от 10^9 ($\log=9$) в 1 g препарат.

Гореизложените съображения поставят пред производителите на пробиотични храни и препарати сериозни изисквания, т. е. те да съдържат достатъчни количества жизнеспособни клетки на прокламираните пробиотични щамове. Освен това, тези количества трябва да бъдат достатъчно устойчиви по време на целия срок на трайност на продуктите или препаратите.

Основната цел на настоящата разработка е да представим данни за количествата на млечнокисели микроорганизми в заквасени млечни продукти, произведени в България, и да проследим тяхната жизнеспособност при различни по продължителност срокове на съхранение.

Материали и методи

Наблюдението е проведено върху материал от 174 партиди заквасени продукти, главно със симбиотични култури на *Lactobacillus delbrueckii*, ssp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*. Обхванати са асортименти българско кисело мляко с различна масленост, като е изследвана дори и заквасена с горните микроорганизми сметана, както и някои асортименти с плодове под формата на млечни десерти.

Отделно са наблюдавани 33 партиди продукти, заквасени със симбиотична култура за йогурт и *Bifidobacteria* (*B. animalis*, ssp. *lactis* DN 116–010).

Изброяването на *Lactobacillus delbrueckii*, ssp. *bulgaricus* е осъществено след посеви на десетократни степенни разреждания в стерилно обезмаслено мляко, култивиране при 43°C в продължение на 5 дни и отчитане на двата симбионта поотделно под микроскопски контрол с последващо определяне на най-вероятния брой по таблиците на Mc-

Crady.⁴ В част от изследванията резултатите бяха съпоставяни с тези, получени по метода от стандарта на ISO 7889.⁵ В настоящата работа представяме данните, получени по първия метод поради съображението, че култивирането е осъществено при оптималната за симбиотичната култура температура, съпадаща с технологичната температура на заквасване, а също поради приложението на неселективна хранителна среда.

Изброяването на *Bifidobacteria* се осъществи по метода на групата Данон, еквивалентен на описания в стандарта ISO 29981:2010 (IDF 220:2010) Milk products – Enumeration of presumptive *bifidobacteria* – Colony count technique at 37 degrees C.³

Заквасените млечни продукти бяха изследвани веднага след производството и през различни интервали от време до крайния или малко след крайния срок на трайност, проектиран от специалистите (24, 72 часа, 5, 7, 9, 10, 14–18–20–25 дни). Това е особено важен проблем, изясняващ преживяемостта на популациите пробиотични микроорганизми във времето и мотивиращ автентичните срокове, в които продуктите запазват качествата си и съответните здравословни ефекти. Проследяването обхваща не само броя на микроорганизмите на закваската, но и титруемата и активната киселинност, органолептиката и задължително – контролни изследвания за типичните замърсители – дрожди и плесени.

Резултати и обсъждания

От всеки вид заквасено мляко са

изследвани по минимум 6 партиди. Най-закономерно повтарящите се резултати за количествата и динамиката на преживяване на *L. delbrueckii*, ssp. *bulgaricus* и на *B. animalis*, ssp. *lactis* DN 116–010 в заквасените млечни продукти по хода на съхранението представяме в графики. Този огромен по същество фактически материал не може да бъде отразен изцяло, поради което подбрахме отделни характерни асортименти от наблюдаваните обекти, данните за които представяме в табличен вид.

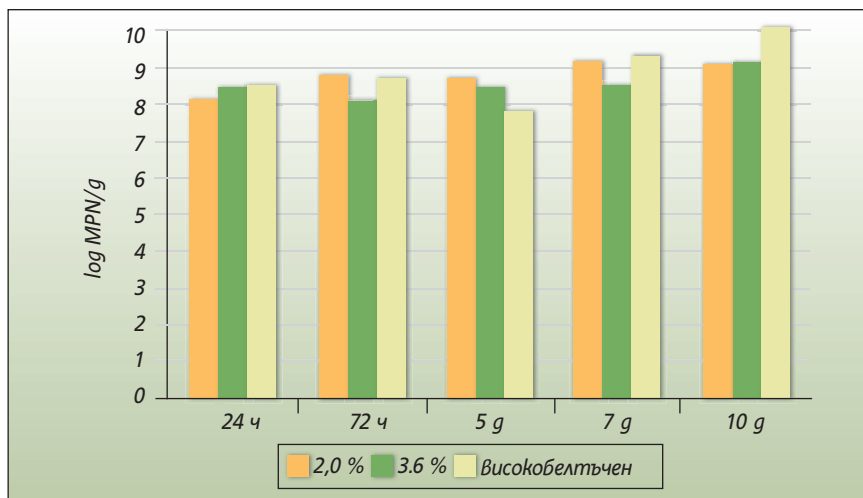
На фиг. 1 са представени данните за преживяемостта на *L. bulgaricus* в три вида класическо българско кисело мляко с различно маслено и белтъчно съдържание.

На фиг. 2 представяме данните за по-дълго съхраняван млечнокисел продукт със стартерна култура от същите микроорганизми.

На фиг. 3 представяме данните за млечнокисел десерт със стартерна култура от същите микроорганизми.

На фиг. 4 са представени данните от изброяването в динамика на бифидобактериите в продукт от серията „Активиа“, която представлява смесена култура на бифидобактерии с микроорганизмите на българското кисело мляко (йогурт) и е типичен пример за комбинативно приложение на различни пробиотични микроорганизми в един функционален продукт за оптимизиране и обогатяване на неговите профилактични ефекти.

В таблици 1 и 2 представяме подробни данни за динамиката на развитие на млечнокиселите култури на харак-



Фиг. 1. Динамика на *L. bulgaricus* в проби от продукти с масленост 2%, 3.6% и продукт с високо белтъчно съдържание (24 час – 10 ден)

терната за българското кисело мляко и йогурта микрофлора – *L. delbrueckii*, *ssp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* в съпоставка с промените в киселинността в процеса на по-продължително съхранение за два характерни асортимента българско кисело мляко.

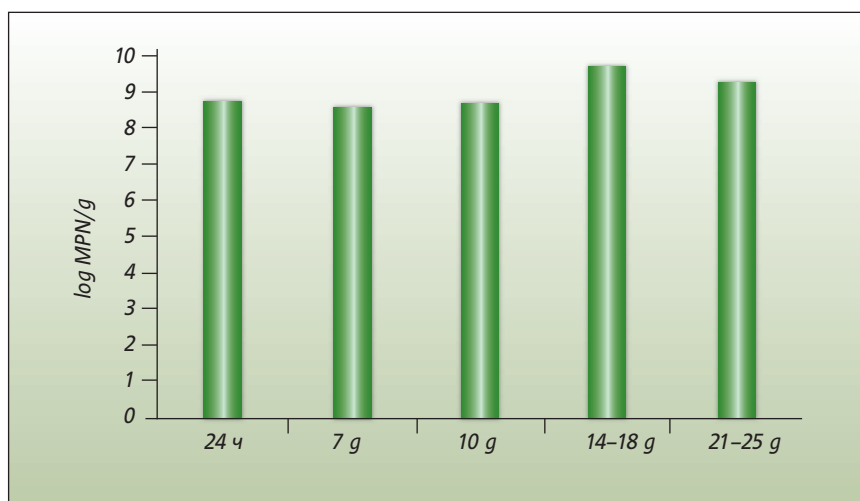
Изложените онагледени материали показват няколко важни елемента.

На първо място следва да отбележим, че непосредствено след заквасването, още на 24-ия час пробиотичните микроорганизми на стартерите достигат до високи нива на развитие, над $\log=8$, което е сериозен аргумент срещу опасенията, че с тези храни потребителят (пациентът) няма да получава необходимите дози жизнеспособни полезни млечнокисели бактерии.

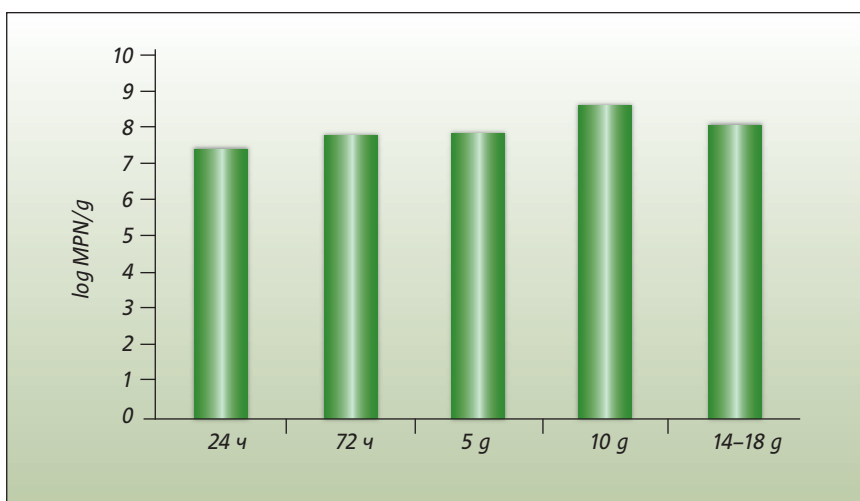
В допълнение към така представените в графичен вид данни отбелязваме, че общата тенденция в жизнеспособността на млечнокиселите микроорганизми на закваската за българско кисело мляко (йогурт) не се влияе от маслеността на продукта. Малко по-ниско е съдържанието им в млечните асортименти с плодове, но в рамките на изискванията на Codex alimentarius.²

На второ място, данните ясно илюстрират закономерността, че и при по-продължителни срокове на съхранение микробните популации остават в значителни количества в продукта, т. е. в периода, определен от производителите като срок на трайност, заквасените млечни продукти осигуряват необходимите на организма „инфекциозни“ дози, гарантиращи пробиотичния ефект. При някои от изследваните продукти в късните периоди на съхранение дори са изброени повече жизнеспособни клетки, отколкото в началния период. Във всички случаи наблюдаваните от нас заквасени млечни продукти по този показател надхвърлят изискванията на Codex alimentarius (CODEX STAN 243–2003).²

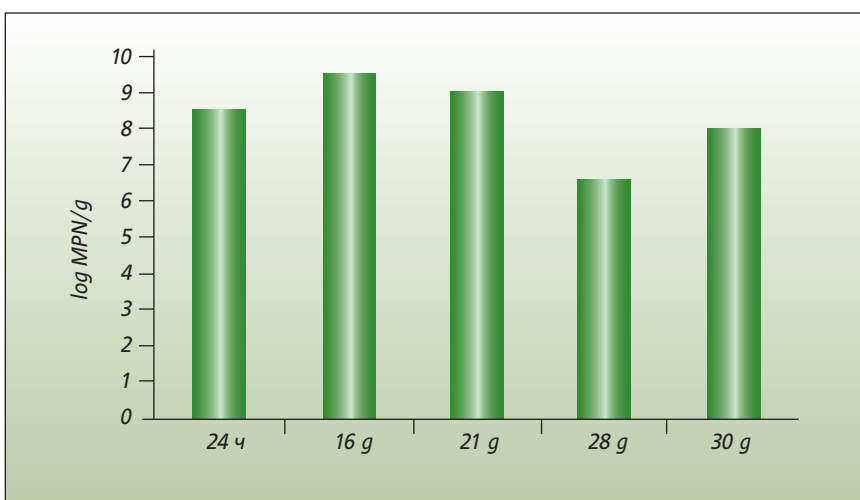
Тези изследвания промениха основния принцип на някогашния лимитиращ трайността на киселото мляко фактор за България – вместо генерационното време на дрождите (в рамките на 3 дни) лимитиращо трайността условие станаха количествата и съотношенията на пробиотичните микроорганизми на закваската, които са решаващи за нейните



Фиг. 2. Динамика на *L. bulgaricus* в проби от натурален кисело-млечен продукт (24 час – 25 ден)



Фиг. 3. Динамика на *L. bulgaricus* в проби от кисело-млечен продукт с мюсли (24 ч – 25 ден)



Фиг. 4. Динамика на *Bifidobacterium lactis* *ssp. animalis* DN 173–010 в проби от кисело-млечен продукт с плодове (1 ден – 30 ден)

доказани или предполагаеми благоприятни ефекти върху организма на човека.

И лактобацилите, и стрептококите проявяват стабилност в развитието си до 18–21–25 ден, което освобождава възможностите за производство на трай-

ни заквасени млечни продукти, напълно отговарящи на изискванията към функционалните пробиотични храни – да осигуряват достатъчно постъпление на жизнеспособни клетки на съответните пробиотични микроорганизми.

Микроорганизми на закваската	Партуга	24 час	7 ген	10 ген	14 ген	18 ген	21 ген	25 ген
Lactobacillus bulgaricus (log MPN)	01.11	9.04	9.04	10.04	8.40	8.65	10.15	8.88
	02.13	8.65	8.40	8.40	8.40	7.98	8.18	8.65
	03.15	9.15	10.04	8.65	8.65	9.04	7.40	8.04
	04.17	8.65	8.65	8.88	8.40	8.65	8.18	7.65
	05.19	8.65	8.40	8.60	9.40	8.98	7.15	8.98
	06.21	9.15	8.65	8.30		9.18	7.98	8.18
Streptococcus thermophilus (log MPN)	01.11	8.40	9.04	10.15	9.15	8.60	9.15	7.40
	02.13	8.30	9.04	9.04	8.65	7.98	8.40	7.40
	03.15	9.15	9.30	8.65	8.40	9.04	7.65	4.60
	04.17	9.18	9.04	8.88	8.40	8.40	8.40	7.40
	05.19	8.65	10.15	8.88	9.40	8.40	5.65	7.04
	06.21	9.15	8.65	8.88	8.65	8.40	4.40	4.40
Средни стойности на титруемата киселинност (°T)	Δ	121.0	133.5	146.9	152.8	159.5	164.3	165.3
	m	2.6	4.2	3.5	2.8	2.8	4.4	3.5
	σ	5.57	8.90	7.35	5.84	5.94	9.33	7.51

Табл. 1. Динамика на развитието на *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* в българско кисело мляко – натурално с масленост 3.6 %

Микроорганизми на закваската	Партуга	24 час	7 ген	10 ген	14 ген	18 ген	21 ген	25 ген
Lactobacillus bulgaricus (log MPN)	01.11	8.65	8.65	8.98	8.65	8.98	10.15	8.65
	02.13	9.04	9.18	8.88	9.40	7.98	8.18	8.40
	03.15	9.15	9.15	8.65	9.04	8.65	8.40	8.18
	04.17	9.04	9.40	7.98	8.40	9.18	8.18	7.98
	05.19	8.40	10.15	8.40	9.65	8.98	7.98	9.40
	06.21	9.15	8.40	7.45	8.88	8.98	8.40	8.60
Streptococcus thermophilus (log MPN)	01.11	9.15	9.15	9.18	9.04	8.98	10.15	8.30
	02.13	8.65	9.40	8.98	9.18	7.98	7.65	8.40
	03.15	9.15	8.65	8.40	9.04	8.65	8.40	7.40
	04.17	9.04	9.18	8.18	8.60	9.18	8.18	7.18
	05.19	8.65	10.04	9.40	9.65	9.30	9.04	10.04
	06.21	8.65	8.65	8.65	8.40	8.40	8.65	8.98
Средни стойности на титруемата киселинност (°T)	Δ	119.5	136.3	149.4	154.6	162.6	168.4	168.6
	m	4.0	2.8	3.8	3.0	3.7	3.6	4.2
	σ	8.57	5.99	8.15	6.44	7.93	7.57	9.01

Табл. 2. Динамика на развитието на *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* в българско кисело мляко – смес краве и биволско 50:50

Друго много интересно явление е, че използваният за производството на млечнокисели храни от серията „Активиа“ щам бифидобактерии прекрасно се развива в смесена култура с микроорганизмите на българското кисело мляко до 21–30 ден, което е постижение на съвре-

менната технология.

Такъв вид продукти с комбинативно пробиотично въздействие е много желана форма на приложение на функционалните храни, обогатяващи организма на човека с повече от един пробиотичен щам, всеки от които има

своите специфични здравословни ефекти.

Заклучение

■ Мит е твърдението, че заквасените млечни продукти в България не съдържат жизнеспособни клетки на симбиотичните закваски.

■ В преобладаващата част от млеката количествата на нормалните симбионти са от порядъка на 10^8 CFU/g (жизнеспособни клетки в 1 g продукт).

■ Пробиотичните млечнокисели бактерии преживяват в автентичните заквасени храни продължително време, не по-малко от 3–4 седмици след заквасването.

■ По време на срока на трайност заквасените продукти са надежден източник на достатъчно големи дози полезни микроорганизми, за да бъдат прокламирани като пробиотични храни.

■ Благоприятно и неизтъквано досега качество на щама *Bifidobacteria*, използван в производството на продуктите от серията „Активиа“, е свойството му безпрепятствено да се развива в комбинация с млечнокиселите бактерии на българското кисело мляко и с това да обогатява приема на сравнително екзотични пробиотични бактерии в достъпна за населението форма. Това допълва и „надгражда“ пробиотичния ефект на продукта като цяло с благоприятните физиологични въздействия на бифидобактериите.

Книзони

1. CODEX STAN 243-2003. Codex Standards for Fermented Milks.
2. Marteau Ph. Probiotics. The science Watch Reports, Issue N° 17, dec. 2008; Expert Analysis, 1–14.
3. ISO 29981:2010 (IDF 220:2010) Milk products – Enumeration of presumptive *bifidobacteria* – Colony count technique at 37 degrees C.
4. БДС 10945-91. Закваски за българско кисело мляко.
5. ISO 7889-2003 Yogurt – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37 degrees C.