

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема до молочної промисловості та призначається для виробництва кефіру.

Відомо спосіб приготування сухих кефірних грибків, які є природним симбіозом молочнокислих бактерій, дріжджів та оцтовокислих бактерій, що використовуються для виробництва кефіру [ОСТ 10-02-02-4-87 Грибки кефирные. Технические условия]. Проте, технологічний процес виробництва кефіру на основі сухих кефірних грибків досить трудомісткий, оскільки потребує тривалого культивування кефірних грибків в умовах кожного окремого підприємства та приготування значних об'ємів закваски.

Більш перспективним є використання концентрованих закваскових препаратів. Застосування концентрату грибкової кефірної закваски дозволяє позбутися трудомісткого процесу культивування кефірних грибків на кожному підприємстві, значно знизити вірогідність контамінації сторонньою мікрофлорою і, як наслідок, виробити ферментований продукт гарантованої якості.

Відомо спосіб виробництва бактеріального концентрату К-2 на основі грибкової культури "Київська К-1" [ТУ У 577/49-1-92 Концентрат сухой бактериальный К-2 на основе грибковой культуры «Киевская К-1». Технические условия]. Спосіб дозволяє одержувати препарат, в 1 г якого міститься 300 млрд. КУО молочнокислих бактерій, від 5 тисяч до 1 мільйону дріжджів і від 100 до 100 тисяч оцтовокислих бактерій. Однак такий діапазон варіації чисельності мікроорганізмів не є гарантом стабільних властивостей продукту.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання концентрату на основі кефірної грибкової закваски, який передбачає культивування кефірної грибкової закваски в живильному середовищі, відокремлення біомаси, змішування її з захисним і середовищем, заморожування та сушіння методом сублімації [Авт. св. СРСР № 1037442, А 23 С 9/12, 1983 – прототип].

Недоліком цього способу є те, що основою живильного середовища для накопичення біомаси є молочна сироватка, склад якої не стабільний і коливається в широких межах. Це суттєво впливає на розвиток бактеріальних компонентів кефірної мікрофлори в кожній окремій ферментації, в результаті чого порушується кількісний та якісний склад її в готовій заквасковій культурі. Крім того, накопичення біомаси є

тривалим (24 години) та ведеться в двостадійному температурному режимі: спочатку 12 годин при 26-28 °С і 12 годин при 18-22 °С з розкисленням двічі - через 6 та 9 годин після інокуляції. Захисне середовище, яке використовується в цьому способі, більш сприятливе для виживання бактерій, ніж дріжджів. В результаті кефір, виготовлений з використанням цього препарату, має не характерний для продукту смак, а смак простокваші.

Завдання винаходу - вдосконалення способу одержання концентрату грибкової кефірної закваски для виробництва кефіру шляхом зміни складу закваскової мікрофлори та технологічних параметрів, які забезпечать виробництво кінцевого продукту зі стабільними мікробіологічними та органолептичними показниками. Це досягається тим, що додатково використовуються чисті культури здатних до ферментації лактози дріжджів *Candida kefyr*. Завдяки вдосконаленню технологічних операцій скорочується тривалість та стабілізується температурний та кислотний режими накопичення біомаси закваскової культури, а модифікація складу захисного середовища забезпечує високий ступінь виживання при сублімації.

Кефір є продуктом комбінованого бродіння - молочнокислого та спиртового. Молочнокислий процес здійснюється молочнокислими бактеріями, а збудниками спиртового бродіння є дріжджі. Вуглекислота та спирт, які виділяються при спиртовому бродінні, надають продукту характерний специфічний смак. З фізіологічної точки зору наявність дріжджів в продукті - явище позитивне. Дріжджі синтезують багато вітамінів, пригнічують розвиток патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів (протей, холерного вібриона, стафілокока), мають лікувально-профілактичні властивості по відношенню до шлунково-кишкових захворювань. На жаль, ці мікроорганізми чутливі до змін технологічних параметрів і елімінуються в процесі виробництва препарату. Як наслідок, змінюються співвідношення між його бактеріальними компонентами, що призводить до суттєвих зрушень перебігу ферментаційного процесу при виробництві кефіру та погіршення його органолептичних показників. Запобігти цим небажаним явищам можна шляхом додавання чистих культур кефірних дріжджів до інокуляту грибкової кефірної закваски.

Особливістю способу, який заявляється, є корекція складу кефірної мікрофлори шляхом додаткового використання чистих культур дріжджів виду *Candida kefyr* шт. ТІММ 5100. Клітини цих мікроорганізмів овальні та продовгуваті шириною від 2,5 до 9,0 мкм, довжиною - від 5,0 до 14 мкм. Штам не утворює спор, псевдоміцелій слабо виражений. Він зброджує лактозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, рафінозу та інулін, не росте в середовищі при відсутності вітамінів, не асимілює азотнокислий калій. Здатний до розвитку при 37°С.

Стабільність процесу накопичення біомаси визначається складом живильного середовища, температурним режимом та режимом розкислення. Відповідно до способу, що заявляється, для приготування живильного середовища використовують знежирене молоко, білки якого гідролізовані протосубтіліном, з додаванням вуглеводів, мінеральних компонентів та стимуляторів росту. Культивування ведуть при температурі 26-28°С протягом 16-18 годин, підтримуючи активну кислотність на рівні рН (6,5±0,1). Накопичення мікрофлори грибкової кефірної закваски протягом 16 годин в залежності від кількості інокуляту показано в таблиці 1.

Спосіб передбачає використання спеціального захисного середовища, яке забезпечує високий рівень виживання кефірної мікрофлори при заморожуванні та сушінні.

Спосіб здійснюється таким чином.

У пастеризованому знежиреному молоці культують кефірні грибки в співвідношенні: 1 частка грибків на 40-60 часток молока при температурі 18-22 °С протягом 16-18 годин. Одержану закваску відокремлюють від грибків та вносять в живильне середовище в кількості 3-4 %. Додатково вводять інокулят дріжджів, які ферментують лактозу (3-4%), накопичених на рідкому глюкозо-пептоному середовищі при температурі 30°С протягом 24 годин.

Живильним середовищем для накопичення біомаси є знежирене молоко, гідролізоване протосубтіліном, в яке додають 2 % лимоннокислого натрію, 0,2% оцтовокислого натрію, 2% кукурудзяного екстракту (розведеного водопровідною водою 1:1), 160 мг/л сірчанокислого марганцю, 1% глюкози та 0,05% аскорбінової кислоти. Глюкозу і аскорбінову кислоту вводять в стерильне живильне середовище у вигляді 30-40%-них стерильних розчинів перед внесенням інокуляту.

Накопичення біомаси проводять при 26±2°С протягом 16±2 годин. При цьому здійснюють розкислення культуральної рідини 25 %-ним розчином аміаку через кожні 2-3 години до рН 6,4-6,5.

Одержану біомасу відокремлюють від культуральної рідини шляхом центрифугування та змішують її в співвідношенні 1:1-2 із захисним середовищем, до складу якого входять водний розчин желатину (1%), автолізат

дріжджів (1%), глюкоза (0,5%), аскорбінова кислота (0,25%). Суспензію клітин розливають у стерильні кювети шаром 5-6 мм, заморожують при температурі мінус 18°C протягом 18-20 годин та сушать методом сублімації при температурі від мінус 18°C до плюс 26°C протягом 18-24 годин.

Сухий концентрат роздіблюють в порошок, фасують у стерильні флакони або пакети по 1, 5, 10 г та закупорюють.

1 г сухого концентрату містить не менше $3 \cdot 10^{10}$ клітин молочнокислих бактерій, $1 \cdot 10^6$ дріжджів та $1 \cdot 10^5$ - оцтовокислих бактерій. Термін зберігання сухого концентрату при температурі $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ - не більше 4 місяців.

Застосування концентрату грибової кефірної закваски дозволить спростити технологію виробництва кефіру та забезпечити стабільні мікробіологічні і органолептичні показники, характерні для цього виду продукту.

Приклади здійснення способу.

Приклад 1. Беруть 40 г кефірних грибків і заливають їх пастеризованим та охолодженим до 22°C знежиреним молоком в кількості 2 л. Молоко з грибами видержують при цій температурі протягом 16 годин. Одержану закваску відокремлюють від кефірних грибків. Інокулянт дріжджів готують на глюкозо-пептонному середовищі такого складу: на 1 дм^3 водопровідної води додають 20 г глюкози, 10 г пептону, 5 г автолізу дріжджів. Середовище стерилізують при температурі 121°C протягом 15 хвилин. Дріжджі культивують при температурі 30°C протягом 24 годин.

Для приготування живильного середовища сухе знежирене молоко в кількості 3 кг на 100 л розчиняють в водопровідній воді з температурою 43°C , установлюють рН 6,8. Одержане молоко підігривають до температури 55°C та вносять ферментний препарат протосубтілін ГЗХ в кількості 20 г на 100 л. Фермент завчасно активізують у водопровідній воді, так щоб масова частка його в розчині складала 5%, при температурі 25°C протягом 30 хвилин. Гідроліз молока проводять при температурі 55°C протягом 2,5 годин. В гідролізоване молоко вносять із розрахунку на 100 л: 2 кг тризаміщеного лимоннокислого натрію, 200 г оцтовокислого натрію, 2 л кукурудзяного екстракту (розведеного водою 1:1), 16 г сірчанокислого марганцю. В середовищі встановлюють рН 7,6 та стерилізують його при температурі 121°C протягом 30 хвилин, охолоджують до температури 28°C . Активна кислотність середовища після стерилізації - рН 6,8. В стерильне середовище вносять 3 л стерильного 30%-ного розчину глюкози та 250 мл стерильного 30%-ного розчину аскорбінової кислоти.

В живильне середовище вносять з розрахунку на 100 л: 3 л грибової кефірної закваски і 3 л інокуляту дріжджів. Накопичення біомаси проводять при 26°C протягом 16 годин з нейтралізацією культуральної рідини 25%-ним водним розчином аміаку до активної кислотності рН 6,5, через кожні 2 години. Після закінчення процесу культуральну рідину охолоджують до температури 12°C . Відокремлення біомаси від культуральної рідини проводять на суперцентрифузі.

Біомасу змішують у співвідношенні 1:1 із стерильним захисним середовищем, що містить в 1 л 10 г желатину, 10 г автолізу дріжджів, 5 г глюкози та 2,5 г аскорбінової кислоти. Суспензію клітин розливають в стерильні кювети шаром 6 мм, заморожують при температурі мінус 18°C протягом 16 годин та висушують в сублімаційній сушарці при температурі від -18°C до $+26^\circ\text{C}$ протягом 20 годин.

Приклад 2. Спосіб здійснюють аналогічно прикладу 1 за винятком того, що кефірні грибки культивують в молоті при 20°C протягом 18 годин.

На 100 л живильного середовища вносять 4 л грибової кефірної закваски і 4 л інокуляту дріжджів. Культивують при 26°C протягом 14 годин.

Сухий концентрат грибової кефірної закваски в 1 г містить 510^{11} КУО молочнокислих бактерій та $1,1 \cdot 10^7$ КУО дріжджів, його активність складає 8 годин.

Приклад 3. Спосіб здійснюють аналогічно прикладу 1 за винятком того, що замість ферментуючих лактозу дріжджів в поживне середовище вносять інокулянт дріжджів, які не здатні до ферментації лактози. Чисельність молочнокислих бактерій та дріжджів в 1 г готового концентрату складає $7,7 \cdot 10^{11}$ та $4 \cdot 10^6$ КУО, активність - 7,5 год.

Порівняльну характеристику концентратів, виготовлених за прикладами 1-3, та за прототипом, викладено в таблиці 2.

Чисельність молочнокислих та оцтовокислих бактерій у варіантах концентрату грибової кефірної закваски, виготовлених за прикладами 1 -3 вища, ніж в прототипі, а варіанти 1 і 2 також містять більше дріжджів. Кефір, виготовлений на концентраті за прикладами 1-2, має характерний специфічний смак. Зразки кефіру, виготовлені на концентратах, одержаних за прикладом 3 та прототипом, напроти, мають простоквашний смак, що свідчить про правомірність додаткового використання дріжджів, які зброджують лактозу.

Таким чином, спосіб, який заявляється, дозволяє одержувати концентрат грибової кефірної закваски, з високою чисельністю мікроорганізмів та певним співвідношенням між їх окремими групами, що забезпечує типові дії кефіру органолептичні ознаки.

Таблиця 1

Накопичення мікрофлори кефірної грибової закваски за 16 год при інокуляції різною кількістю закваски

Чисельність мікроорганізмів, КУО/г	Кількість інокуляту кефірної грибової закваски, %		
	4	3	2
Молочнокислих бактерій	$1,2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$
мезофільних лактококів	10^6	10^9	10^9
термофільних паличок	10^6	10^6	10^5
Дріжджів	$3,5 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$
Оцтовокислих бактерій	10^6	10^6	10^5

Таблиця 2

Характеристика концентратів грибової кефірної закваски, виготовлених за прикладами 1-3 в порівнянні з прототипом

Показник	Вид концентрату кефірної грибової закваски			
	приклад 1	приклад 2	приклад 3	прототип
Чисельність мікроорганізмів, КУО/г:				
молочнокислих бактерій	$11,2 \cdot 10^{11}$	$5 \cdot 10^{11}$	$7,7 \cdot 10^{11}$	$6,2 \cdot 10^{10}$
мезофільних лактококів	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{10}
термофільних паличок	10^8	10^7	10^6	10^5
дріжджів	$2,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$
оцтовокислих бактерій	10^8	10^7	10^7	10^4
Активність, час сквашування 1л молока 1 г концентрату, год	7,0	8,0	7,5	8,0