

## PHYSICO-CHEMICAL AND BACTERIAL-MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION OF DAIRY PRODUCTS

**Viktoria Grozdanova, Polina Velichkova**

University of Mining and Geology “St. Ivan Rilski”, 1700 Sofia; E-mail: viktoria.grozdanova7@gmail.com

**ABSTRACT.** Lactic acid bacteria possess the ability to efficiently convert lactose into lactic acid. This leads to an increase in acidity, coagulation of proteins, and prevents the growth of unwanted microorganisms. The most consumed fermented milk product worldwide is yoghurt, followed by ayran, kefir, koumiss, and others. Unlike Bulgarian yoghurt, which is obtained by adding starter cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*, kefir and koumiss are obtained by a mixed starter culture of lactic acid bacteria and yeast. To determine the physicochemical and morphological differences between fermented dairy products (homemade yoghurt, purchased yoghurt with 2 % fat as per the Bulgarian State Standard, ayran with 1.8 % fat, and kefir with 3 % fat), active (pH) and titratable acidity (°T), lactic acid (%), and dry matter (%) were determined. The morphology of the microorganisms was established through the Loeffler method and observation of the microscopic preparations with an immersion objective (x100). The results were close and similar for both types of yoghurt: 13.4-13.5 % dry matter, 1.5-1.7 % lactic acid, and active acidity around 4.00. In the case of the drinking products, large differences were found related to the technological process of their production and the starter cultures used.

**Key words:** dairy products, lactic acid, titratable acidity, lactic acid bacteria, lactic acid fermentation.

### ФИЗИКОХИМИЧНО И БАКТЕРИАЛНО-МОРФОЛОГИЧНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ ПРОДУКТИ

**Виктория Грозданова, Полина Величкова**

Минно-геоложки университет „Св. Иван Рилски“, 1700 София

**РЕЗЮМЕ.** Млечнокиселите бактерии притежават способността ефективно да превръщат лактозата в млечна. Това води до повишаване на киселинността, коагулацията на белтъчините и предотвратява растежа на нежелани микроорганизми. Най-употребяваният ферментирал млечен продукт в световен мащаб е киселото мляко, следвано от айряна, кефира, кумиса и други. За разлика от българското кисело мляко, което се получава чрез добавяне на закваска от *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*, кефирът и кумисът се получават чрез смесена закваска от млечнокисели бактерии и дрожди. За да се установят физикохимичните и морфологични разлики между ферментирани млечни продукти (домашно кисело мляко, кисело мляко с 2 % масленост по БДС от търговската мрежа, айрян с 1,8 % масленост и кефир с 3 % масленост), бяха измерени и сравнени активна (pH) и титруема киселинност (°T), млечна киселина (%) и сухо вещество (%). Чрез метода на Льофлер и наблюдение на микроскопските препарати с имерсионен обектив (x100), бе установена морфологията на микроорганизмите. Резултатите бяха близки и сходни за двата вида кисело мляко: 13,4-13,5 % сухо вещество, 1,5-1,7 % млечна киселина, активна киселинност около 4,00. При продуктите за пиене се установиха големи разлики, свързани с технологичния процес на тяхното производство и използваната закваска.

**Ключови думи:** млечнокисели продукти, млечна киселина, титруема киселинност, млечнокисели бактерии, млечнокисела ферментация.

### Въведение

Пробиотиците са живи непатогенни микроорганизми, прилагани за подобряване на микробния баланс, особено в стомашно-чревния тракт. Състоят от дрожди (например *Saccharomyces boulardii*) или млечнокисели бактерии (например *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Bifidobacterium*). Пробиотиците упражняват своите благоприятни ефекти чрез различни механизми, включително понижаване на pH на червата, намаляване на колонизацията и инвазията от патогенни организми (Williams, 2010).

Киселото мляко е сред най-разпространените ферментирани млечни продукти в световен мащаб. За производството му се използват бактерии, известни като „стартерни култури за кисело мляко“ – *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. *bulgaricus*. Те превръщат млечната захар (лактоза) в млечна киселина (Kim and Oh, 2013).

Айрянът е хранително балансиран ферментирал млечен продукт, който съдържа въглехидрати, белтъчини, мазнини, витамини и минерали. Промислено се получава чрез ферментация на разрежено мляко с вода с помощта на бактериите от киселото мляко (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) при 42 - 45 °C, докато pH достигне около 4,4 – 4,6. След това се добавя солта и следва охлаждане до 4 °C при непрекъснато разбъркване. Стандартно се описва като течен млечен продукт, претърпял млечнокисела ферментация, с добавка на вода под 50 % и съдържание на сол около 0,8 % (Koksoy and Kiliç, 2003; Ozdemir and Kiliç, 2004).

В България под „кефир“ се разбира млечен продукт, получен от краве мляко в резултат на развитие на

млечнокисела и алкохолна ферментация. За закваска се използват стартерни култури на *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* и *Acetobacter* в определено съотношение и дрожди *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces exiguus* в определени съотношения, както и кефирни зърна (Наредба за специфичните изисквания към млечните продукти). Съставът му варира в зависимост от вида на млякото и микробиологичния състав на закваската. В зависимост от средата, в която протичат ферментационните процеси, може да се говори за два вида кефир – воден и млечен (Azizi et al., 2021). Най-често се използват кефирни зърна или майчини култури, приготвени от кефирни зърна (малки, твърди, с неправилна форма, жълтеникаво-бели гранули с различен диаметър от 3 до 35 мм). Те съдържат млечнокисели бактерии (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*), дрожди (*Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Zygosaccharomyces* sp.) и понякога оцетнокисели бактерии (*Acetobacter* sp.), свързани с казеин и въглехидрати в полизахаридна матрица. Основният полизахарид е кефиранът, включващ равни количества глюкоза и галактоза. Микроорганизмите в кефира произвеждат витамини, разграждат белтъчини и хидролизират лактозата, което води до получаването на високо питателна и лесно смилаема храна. (Beshkova et al., 2002; Guzel-Seydim et al., 2005; Otles and Cagindi, 2003; Arslan, 2015).

Целта на настоящата работа е да се сравнят физикохимичните и бактериално-морфологични параметри между различни ферментирани млечни продукти – домашно кисело мляко, кисело мляко с 2 % масленост по БДС 12:2010, айрян с 1,8 % масленост и кефир с 3 % масленост, закупени от търговската мрежа.

## Материали и методи

### Физикохимични и аналитични методи

Сухото вещество (%) беше измерено с електронен анализатор на влага (Kern DAB, Германия). Активната киселинност (pH) беше определена с pH-метър (HANNA HI-8424, USA). Титруемата киселинност (°T) беше определена по метода на Тьорнер (БДС 1111-80) и след това беше изчислено количеството млечна киселина (%). Чрез йодна реакция беше изследвано дали млечнокиселите продукти са състени изкуствено чрез добавяне на нишесте.

### Бактериално-морфологични анализи

Морфологията на млечнокиселите бактерии в анализирания продукт беше изследвана чрез прост метод на оцветяване на бактериите (с метиленово синьо на Льофлер) и наблюдение с имерсионен обектив при увеличение 100 пъти (Misra et al., 1994). Снимките бяха направени с 5 MP камера за окуляр.

## Резултати и дискусия

В табл. 1 са дадени основните физикохимични показатели, по които е направено сравнение между различните проби - домашно кисело мляко, кисело мляко по БДС, айрян и кефир.

Табл. 1. Физикохимични показатели на изследваните млечнокисели продукти

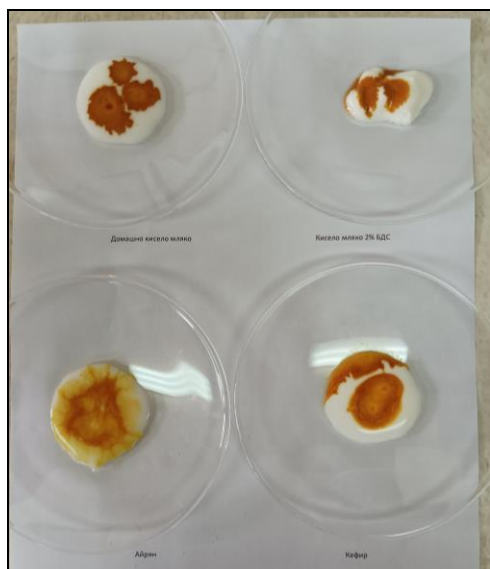
Параметър	Домашно кисело мляко	Кисело мляко по БДС	Айрян	Кефир
Сухо вещество, %	13.43	13.53	7.54	13.76
Активна киселинност (pH)	4.06	3.99	3.88	4.45
Титруема киселинност, °T	164	187	68	132
Млечна киселина, %	1.476	1.683	0.612	1.188

Сравнявайки двата вида кисело мляко - домашно заквасено и от търговската мрежа, се забелязва, че няма съществени разлики във физикохимичните показатели. Активната киселинност е около 4,00 и при двата продукта, сухото вещество е 13,43 % при първото и 13,53 % при второто. Според БДС 12:2010 съдържанието на сухо вещество в пълномаслено българско краве кисело мляко трябва да е не по-малко от 11,8 %, което кореспондира с получените резултати. Съдържанието на млечна киселина е съответно 1,476 % и 1,683 %, а титруемата киселинност - 164 и 187 °T. След добавяне на закваската разфасованото мляко започва да се охлажда до достигане на температура 2 °C - 6 °C и 90 °T - 110 °T киселинност с цел прекратяване на ферментацията, след което престоява в хладилни камери за „узряване“ (БДС 12:2010). Киселинността на готовия продукт трябва да е от 90 °T до 150 °T. И при двете изследвани кисели млека киселинността е малко висока, което може да се дължи на забавяне в стъпката с охлаждането на продукта.

Напълно очаквано, резултатите за айряна показват по-малко сухо вещество (7,54 %), по-ниска титруема киселинност (68 °T) и съдържание на млечна киселина (0,612 %) в сравнение с киселото мляко. Активната киселинност е малко по-ниска - 3,88.

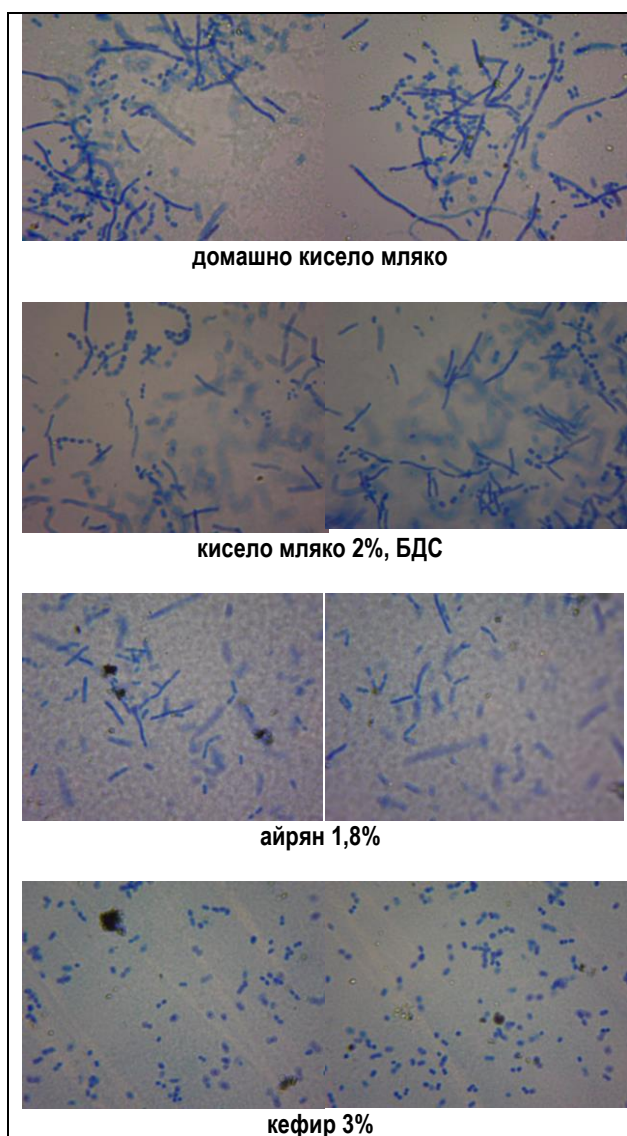
Кефирът се характеризира с pH стойности в диапазона 4,2 - 4,7, съдържа 0,8 - 1,2 % млечна киселина, 0,5 - 0,7 % етанол, 0,20% CO<sub>2</sub>, 0,2 % липиди, 3,0% протеин, 6,0 % захар, 0,7 % пепел, 89 – 90 % влага (Sarkar, 2007; Wszolek et al., 2006). Получените данни за анализирания кефир, кореспондират с литературните. Сухото вещество е 13,76 %, активната киселинност - 4,45, титруемата - 132 °T, а съдържанието на млечна киселина е 1,188 %.

Гъстата консистенция на млечнокиселите продукти може да се дължи на добавено нишесте към тях. Това компроментира реалния процес на ферментация и заблуждава купувача, че купува качествен продукт. На фиг. 1 е показана снимка от анализа с йодна проба за установяване наличието на скорбяла с пробите. Резултатите показват, че в нито един от изследваните млечнокисели продукта няма положителна реакция за наличие на нишесте, тъй като пробите остават оцветени в кафяво, а не в синьо-виолетово.



Фиг. 1. Проверка на млечнокиселите продукти за добавено нишесте с йодна проба

На фиг. 2 са показани микроскопските снимки на направените цветни препарати от анализиранияте проби.



Фиг. 2. Снимки на оцветените микроскопски препарати на млечнокиселите продукти

При двата вида кисело мляко и айряна (първите 3 реда на фиг. 2) се наблюдават типичните пръчковидни бактерии *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и коковидни бактерии *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Наличието на множество клетки на *Str. thermophilus* в двете кисели млека и установената сравнително по-високата титруема киселинност доказва, че в асоциация с *L. bulgaricus*, стрептококът издържа на киселинност 180 °Т - 190 °Т. Също така впечатление прави и наличието на повече пръчки при киселото мляко от търговската мрежа в сравнение с домашното, но и при двете *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* има голям превес пред *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Тъй като айрянът представлява разрежено с вода кисело мляко, броят на микроорганизмите в него е по-малко от този в останалите млечнокисели продукти. На фиг. 2 ясно се различават двете характерни за киселото мляко бактерии - *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, като съотношението им е около 1:2.

Съставът на стартерната култура за кефир варира и може да включва *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и subsp. *cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Candida kefyr* (Kim and Oh, 2013). От морфологичното охарактеризиране на анализирания кефир, се вижда, че преобладават коковидни бактерии - може би лактококи *Lactococcus lactis* и стрептококи *Streptococcus thermophilus*, докато пръчковидните бактерии се ограничават до 1-2 броя в натривката.

## Заклучение

От проведеня сравнителен анализ на различните ферментирани млечни продукти се установи, че има високо сходство във физикохимичните параметри между киселите млека. Съдържанието на млечна киселина при киселите млека е 1,476-1,683 %, в кефира – 1,188 %, а в айряна – 0,612 %. Резултатите напълно кореспондират с литературните данни за изследваните ферментирани продукти. Не беше установена външна намеса чрез добавяне на нишесте с цел подправено съгъстване. При двата вида кисело мляко и айряна бяха открити типичните бактерии *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* с преобладаващи стрептококи пред пръчките, докато при кефира бяха открити основно коковидни бактерии с минимално наличие на пръчковидни. Обект за бъдещи сравнителни анализи биха били микробиологичните методи за определяне броя на млечнокиселите бактерии, както и диференциално оцветяване по Грам.

## Литература

- БДС 1111-80. Мляко и млечни продукти. Метод за определяне на титруемата киселинност. <https://www.bds-bg.org>
- БДС 12:2010. Български стандарт за Българско кисело мляко. <https://www.bds-bg.org>
- Наредба за специфичните изисквания към млечните продукти в сила от 04.11.2021. Глава втора- Специфични изисквания към млечните продукти, Министерство на земеделието. <https://www.mzh.gov.bg>

- government.bg/media/filer\_public/2021/08/04/naredba\_za\_spetsifichnite\_iziskvaniia\_km\_mlechnite\_produkti.pdf
- Arslan, S. 2015. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. – *CyTA-Journal of Food*, 13, 3, 340-345, DOI:10.1080/19476337.2014.981588.
- Azizi, N. F., M. R. Kumar, S. K. Yeap, J. O. Abdullah, M. Khalid, A. R. Omar, M. A. Osman, S. A. S. Mortadza, N. B. Alitheen. 2021. Kefir and Its Biological Activities. - *Foods*, 10, 1210-1235.
- Beshkova, D. M., E. D. Simova, Z. I. Simov, G. I. Frengova, Z. N. Spasov. 2002. Pure cultures for making kefir. - *Food Microbiology*, 19, 537–544. doi:10.1006/fmic.2002.0499.
- Guzel-Seydim, Z., J. T. Wyffels, A. C. Seydim, A. K. Greene. 2005. Turkish kefir and kefir grains: Microbial enumeration and electron microscopic observation. - *International Journal of Dairy Technology*, 58, 25–29. doi:10.1111/j.1471-0307.2005.00177.x.
- Kim, S.-H., S. Oh. 2013. *Fermented Milk and Yogurt*. Milk and Dairy Products in Human Nutrition, 338–356. doi:10.1002/9781118534168.ch16.
- Misra, V., S. P. Misra, M. Dwivedi, S. C. Gupta. 1994. The Loeffler's methylene blue stain: An inexpensive and rapid method for detection of *Helicobacter pylori*. – *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 9, 5, 512–513. doi:10.1111/j.1440-1746.1994.tb01283.x.
- Otles, S., O. Cagindi. 2003. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. - *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 54–59. doi:10.3923/pjn.2003.54.59.
- Sarkar, S. 2008. Biotechnological innovations in kefir production: A review. - *British Food Journal*, 110, 283–295. doi:10.1108/00070700810858691.
- Williams, N. T. 2010. Probiotics. - *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67, 6, 449–458. doi:10.2146/ajhp090168.
- Wszolek, M., B. Kupiec-Teahan, H. Skov Guldager, A.Y. Tamime. 2006. *Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products*. Fermented Milks, edited by A.Y. Tamime, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 174-216.