Original researches

Study on optimal biotechnological parameters of cells immobilization in yoghurt ferment on modified gelatin

A. H. Vovkohon

Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, Ukraine

Received: 10 October 2018

Revised: 22 March 2019

Accepted: 18 April 2019

Bila Tserkva National Agrarian University,
Pl. Soborna 8/1, Bila Tserkva, 09117, Ukraine

Tel.: +38-044-635-12-88

E-mail: alinavovk1@ukr.net

Cite this article: Vovkohon, A. H. (2019). Study on optimal biotechnological parameters of cells immobilization in yoghurt ferment on modified gelatin. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(2), 107–110. doi: 10.32819/2019.71019

Abstract. The big demand for sour milk products, including yoghurt, requires use of raw materials of good quality. However, the factors in milk that have negative effect on microorganisms in yoghurt ferment, need application of biotechnological methods for their immobilization. For the study a modified gelatin was used, on which various doses of yoghurt ferment were immobilized (from 5 mg to 100 mg) being dissolved in different dissolvent volumes (0.2 cm³, 0.3 cm³ and 0.4 cm³) of distilled water. The carrier's mass remained constant: 1000 mg. The fresh preparations were immediately dried out by means of active ventilation and mixing. The humidity content in immobilized ferments was investigated after 15 min of drying as well as the time of drying out for reaching the humidity level of 7–9%. It was experimentally found out that the humidity of the yoghurt ferment immobilized on modified gelatin (with application of 0.2 cm³ dissolvent) was about 11.5–12.6% after 15 min drying. The humidity of the ferments immobilized by 0.3 and 0.4 cm³ distilled water after 15 min drying was correspondingly 17.2% – 18.3% and 22.4% – 24.8%. The increase of distilled water volume for dissolving different doses of ferment resulted, after 15 min drying, into increase of humidity in the preparations accordingly up to 22.4% – 24.8% of the total mass. During works on the immobilization technology of microorganisms' cells in yoghurt ferment on modified gelatin, it was found that the quickest drying of preparations (32.4–37.2 min) occurred with application of 0.2 cm³ dissolvent per 1 g of carrier. The augmentation of dissolvent volume to 0.3 cm³ resulted into increase of drying time up to 43.5–54.2 min. The drying of immobilized ferment samples to the humidity level of 7–9% with application of 0.4 cm³ distilled water lasted more than one hour. It was proved that the more ferment mass was immobilized on modified gelatin, the more was the drying time of preparations. Therefore, from technological point of view, the dissolving of 5–100 mg of yoghurt ferment in 0.2 cm³ distilled water is optimal.

Keywords: immobilization; ferment for yoghurt; carrier; modified gelatin; dissolvent; adsorption; microorganisms; drying of preparations.

Оптимальні біотехнологічні параметри іммобілізації клітин закваски йогурту на модифікованому желатині

А. Г. Вовкогон

Білоцерківський національний аграрний університет, Біла Церква, Україна

Анотація. Великий попит на кисломолочні продукти, зокрема йогурт, вимагає використання якісної сировини. Наявність у молоті факторів, які негативно впливають на мікроорганізми закваски йогурту, потребує використання біотехнологічних методів їх іммобілізації. Для дослідження використано модифікований желатин, на якому іммобілізували різні дози закваски для йогурту (від 5 мг до 100 мг), розчиняючи в різних об'ємах розчинника 0,2; 0,3 та 0,4 см³ дистильованої води. Маса носія залишалася сталою – 1000 мг. Свіжовиготовлені препарати відразу висушували, застосовуючи активне вентилування і перемішування. Встановлювали вміст вологи у іммобілізованих заквасках через 15 хвилин висушування, а також визначали час, протягом якого вологість іммобілізованих заквасок досягала 7–9%. Експериментально встановлено, що за 15-хвилинного висушування іммобілізована на модифікованому желатині закваска йогурту, де використовували 0,2 см³ розчинника, мала вологість на рівні 11,5–12,6%. Вологість заквасок, іммобілізацію яких проводили із застосуванням 0,3 та 0,4 см³ дистильованої води, після 15-хвилинного висушування становила, відповідно, 17,2–18,3% та 22,4–24,8%. Підвищення об'єму дистильованої води для розчинення різних доз заквасок супроводжувалося збільшенням вологи у препаратах за 15-хвилинного висушування, відповідно, до 22,4–24,8% від загальної маси. При відпрацюванні технології іммобілізації клітин мікроорганізмів закваски для йогурту на модифікованому желатині встановили, що найшвидше проходить висушування препаратів (32,4–37,2 хвилини), для створення яких використовували 0,2 см³ розчинника на 1 г носія. Підвищення об'єму розчинника до 0,3 см³ веде за собою збільшення часу висушування до 43,5–54,2 хвилини. Висушування іммобілізованих заквасок до вмісту в них вологи 7–9%, для конструювання яких застосовували 0,4 см³ дистильованої води, тривало більше однієї години. Доведено, чим більша маса закваски іммобілізована на модифікованому желатині, тим час висушування препаратів збільшується. Таким чином, з технологічної точки зору, розчинення 5–100 мг закваски для йогурту в 0,2 см³ дистильованої води є оптимальним.

Ключові слова: іммобілізація; закваска для йогурту; носій; модифікований желатин; розчинник; адсорбція; мікроорганізми; адсорбція; висушування препаратів.

Вступ

На даний час існує багато методів іммобілізації ензимів і клітин мікроорганізмів. За іммобілізації шляхом адсорбції на поверхню носія враховується низка факторів: пористість матриці, питома поверхня матриці, температура за якої протікає сорбція, співвідношення носія до ензимів чи мікроорганізмів, іонна сила розчину в якому знаходяться мікроорганізми та ензими. Адсорбовані на поверхні матриці ензими та мікроорганізми стійкі до токсичних хімічних сполук (Herasymenko et al., 2006; Suzana et al., 2013).

Сорбційні властивості носіїв можливо підвищити шляхом проведення їх модифікації. В НДІ харчових технологій та переробки продукції тваринництва Білоцерківського НАУ було модифіковано харчову добавку желатин для подальшого його використання як носія для іммобілізації клітин мікроорганізмів заквасок для кисломолочних напоїв. Проте біотехнологічні прийоми іммобілізації клітин мікроорганізмів закваски для йогурту на модифікованому желатині потребують подальших досліджень.

Іммобілізацію клітин мікроорганізмів в основному проводять фізичним методом, який передбачає приєднання клітини до носія або їх поміщення у носій без формування ковалентних зв'язків. Фізичні методи поділяються на: включення в основу матриці – у порожнисті волокна, мікрокапіляри чи ліпосоми; мікрокапсулювання (напівпроникні мембрани); розміщення в гелі та адсорбцію на нерозчинних носіях різної природи (Herasymenko et al., 2006).

Іммобілізація клітин за використання нерозчинних носіїв полягає у контакті мікроорганізмів з носіями неорганічної та органічної природи в середовищі розчинника (вода). Фіксація адсорбованих клітин на поверхні матриці здійснюється за рахунок гідрофобних взаємодій, неспецифічних ван-дер-Вальсових взаємодій, електростатичних взаємодій між поверхнями мікроорганізмів і носіями. Форма зв'язку залежить від функціональних груп на поверхні носія і його пористості та функціональних груп на поверхні клітин мікроорганізмів. Максимальна адсорбція та включення у гель мікроорганізмів перебігають за оптимальних умов іммобілізації (Herasymenko et al., 2006).

Желатин є продуктом переробки колагену. Це розчинна суміш поліпептидів, отриманих шляхом тривалої обробки колагену окропом. У ході такого процесу гідролізуються деякі ковалентні зв'язки колагену, в результаті чого, його волокниста нерозчинна форма трансформується на розчинну суміш поліпептидів, яку і називають желатиною, вона має гелеву структуру (Vejs, 1971; Xie & Valleton, 1991; Vaynberg et al., 2000; Ren et al., 2001; Dowling et al., 2009; Curcio et al., 2013).

Цінність такого роду носія полягає в його нетоксичності, а також легкій біодеградації, яка дозволяє застосовувати желатин не лише у фармацевтичній, але й харчовій промисловості (Busol et al., 1979; Pietras et al., 2013; Mariod & Fadul, 2014).

Сировина для виробництва желатину є постійно відновлюваною, доступною, оскільки у багатьох технологіях є відходами (кістки тварин, шкіра, луска риби тощо) (Karim & Bhat, 2009; Rbii et al., 2011; Ma et al., 2019).

Таким чином, використання желатину як носія для іммобілізації заквасок для кисломолочних напоїв розширює сферу його використання (Lim & Mohammad, 2009; Karim & Bhat, 2008; Nam & Antipova, 2012; Mariod, & Adam, 2013).

Метою роботи було встановлення біотехнологічних параметрів стабілізації мікроорганізмів закваски для йогурту шляхом їх іммобілізації на модифікованому желатині, зокрема впливу співвідношення маси закваски, розчинника та носія на час висушування іммобілізованих препаратів.

Матеріал і методи досліджень

Для відпрацювання ряду біотехнологічних параметрів іммобілізації клітин мікроорганізмів закваски для йогуртів використовували модифікований желатин. Кількість матриці у всіх варіантах не змінювали – маса становила 1000,0 мг. У 0,2; 0,3 та 0,4 см³ дистильованої води розчиняли від 5 до 100 мг висушеної закваски для йогурту (табл. 1).

Іммобілізацію мікроорганізмів закваски для йогурту на модифікованому желатині проводили фізичними способами. За таких умов використовували динамічний підхід, де під час постійного перемішування механічною мішалкою у носій вилили розчин закваски для йогурту.

Висушування одержаних іммобілізованих заквасок проводили за активного вентилявання та перемішування. Експериментально встановлювали вміст вологи у іммобілізованих препаратах через 15 хвилин висушування та час висушування протягом якого препарати будуть мати вологість 7–9%.

Визначення вологи у іммобілізованих препаратах проводили згідно нормативних документів (ГОСТ 15113.4-77).

Цифровий матеріал піддавали біометричній обробці за Мондевічюте-Ерингене. Вірогідність різниці між показниками оцінювали за критеріями Стюдента (Merkur'eva, 1970).

Результати

Після проведення іммобілізації клітин мікроорганізмів закваски для йогурту одержані препарати висушували протягом 15 хвилин і визначали вміст вологи у відібраних зразках. Після 15 хвилинного висушування у препараті, для виготовлення якого застосовували 0,2 см³ розчинника та 5 мг закваски, вологість становила 11,1%. У препаратах проби, де вміст закваски становив 10 мг, вологість була вищою лише на 0,4% (табл. 2).

Виявлено підвищення вмісту вологи у препаратах, де для іммобілізації застосовували 20, 30 та 40 мг закваски у 0,2 см³ розчинника, відповідно, на 0,6 та 0,9% відносно показника у пробі із вмістом закваски 5 мг. На 15 хвилину активного висушування 50–90 мг іммобілізованих на модифікованому желатині заквасок для йогурту вологість препаратів поступово збільшувалася. Найвища вологість була у препаратах для виготовлення яких використовували 100 мг закваски.

Препарати, одержані із застосуванням 5 мг закваски та 0,3 см³ розчинника, на 15 хвилину висушування мали вологість 17,2%. Препарати із вмістом 10–40 мг іммобілізованої заква-

Таблиця 1. Співвідношення складових для іммобілізації клітин мікроорганізмів за використання 0,2; 0,3 та 0,4 см³ розчинника, n = 4

Маса носія, мг	Маса закваски, мг
1000,0	5
1000,0	10
1000,0	20
1000,0	30
1000,0	40
1000,0	50
1000,0	60
1000,0	70
1000,0	80
1000,0	90
1000,0	100

Таблиця 2. Уміст води в препаратах за 15 хв сушіння, $M \pm m$, $n = 4$

Маса закваски за 0,2 см ³ розчинника, мг	Вологість препарату, %	Маса закваски за 0,3 см ³ розчинника, мг	Вологість препарату, %	Маса закваски за 0,4 см ³ розчинника, мг	Вологість препарату, %
5	11,1 ± 0,38	5	17,2 ± 0,53	5	22,4 ± 0,57***
10	11,5 ± 0,23	10	17,4 ± 0,42	10	22,7 ± 0,67***
20	11,7 ± 0,43	20	17,4 ± 0,36	20	23,0 ± 0,83***
30	11,7 ± 0,25	30	17,6 ± 0,38	30	23,4 ± 0,46***
40	11,9 ± 0,61	40	17,7 ± 0,41	40	23,4 ± 0,49***
50	12,0 ± 0,23	50	18,0 ± 0,44	50	23,9 ± 0,37***
60	12,0 ± 0,43	60	18,0 ± 0,39	60	24,0 ± 0,29***
70	12,2 ± 0,31	70	18,1 ± 0,36	70	24,3 ± 0,38***
80	12,3 ± 0,29	80	18,0 ± 0,27	80	24,4 ± 0,76***
90	12,5 ± 0,27	90	18,2 ± 0,24	90	24,7 ± 0,68***
100	12,6 ± 0,42	100	18,3 ± 0,53	100	24,8 ± 0,77***

Примітка: *** – $p < 0,001$, порівняно із препаратами, які виготовляли з використанням 0,2 см³ розчинника

ски мали вищий уміст води, порівняно з пробєю, яка містила 5 мг закваски, відповідно, на 0,2, 0,4 та 0,5%. Зі збільшенням маси закваски від 50 до 90 мг на один грам носія вологість препаратів зростала від 17,7 до 18,2%. Препарати, одержані зі застосуванням 100 мг закваски, мали вищу на 1,1%, порівняно з препаратами, де використовувалась найменша доза закваски.

Висушування препаратів на виготовлення яких витрачали 5 мг закваски для йогурту та 0,4 см³ розчинника дозволило отримати вологість вищу в 2 рази ($p < 0,001$) та на 30,2%, порівняно з препаратами, де використовували 0,2 см³ та 0,3 см³ розчинника. Зі збільшенням умісту закваски в препаратах кількість води в них на 15 хвилину висушування підвищується. Вологість препаратів, які містили 100 мг закваски була на 2,4% вищою, ніж препаратів з умістом 5 мг іммобілізованої закваски.

Отже, вміст води в заквасках, іммобілізованих на модифікованому желатині, на 15 хвилину сушіння методом активного перемішування та вентиляції в першу чергу залежить

від об'єму розчинника та вмісту нативної закваски. Збільшення вмісту закваски в іммобілізованих препаратах сприяє підвищенню механізму утримання (зв'язування) води.

За вологості 7–9% час зберігання препаратів іммобілізованої закваски для йогурту пролонгується. Тому, нами були проведені дослідження щодо визначення часу висушування препаратів до вологості 7–9 % (табл. 3).

На висушування іммобілізованих клітин мікроорганізмів для виготовлення яких застосовували 5 мг закваски та 0,2 см³ розчинника було витрачено 32,4 хвилини. Препарати з умістом 30 мг закваски висушували на 3,2 хвилини довше, ніж препарати з умістом 5 мг закваски. Найдовше висушували іммобілізовану закваску з нативним препаратом 100 мг на 1 г носія.

Підвищення використання об'єму розчинника до 0,3 см³ на 1 г модифікованого желатину супроводжувалось збільшенням на 34,2–45,6% часу висушування іммобілізованої закваски, порівняно з препаратами, на виготовлення яких використовуву-

Таблиця 3. Час досягнення води препаратів 7–9%, $M \pm m$, $n = 4$

Маса закваски за 0,2 см ³ розчинника, мг	Час висушування, хв	Маса закваски за 0,3 см ³ розчинника, мг	Час висушування, хв	Маса закваски за 0,4 см ³ розчинника, мг	Час висушування, хв
5	32,4 ± 2,56	5	43,5 ± 5,12	5	69,3 ± 4,32
10	34,5 ± 1,89	10	47,3 ± 3,65	10	70,4 ± 6,12
20	34,4 ± 2,07	20	47,9 ± 2,89	20	71,5 ± 5,65
30	35,6 ± 2,33	30	47,8 ± 3,87	30	71,3 ± 4,33
40	35,9 ± 1,45	40	49,3 ± 3,62	40	72,9 ± 4,32
50	36,1 ± 2,65	50	49,9 ± 4,06	50	74,3 ± 6,97
60	36,5 ± 1,44	60	51,2 ± 6,11	60	74,8 ± 2,55
70	36,4 ± 0,97	70	51,0 ± 2,87	70	75,2 ± 3,78
80	36,9 ± 4,15	80	53,4 ± 0,88	80	76,2 ± 3,32
90	37,0 ± 0,77	90	53,8 ± 2,77	90	79,3 ± 4,12
100	37,2 ± 3,76	100	54,2 ± 4,87	100	84,1 ± 5,65

вали 0,2 см³ розчинника. Застосування 0,4 см³ розчинника на 1 г носія пролонгувало час висушування препаратів до вологості 7–9% на 55,1–59,3% довше, відносно препаратів із найменшим об'ємом розчинника.

Обговорення

У технології іммобілізації клітин мікроорганізмів та ензимів шляхом адсорбції використання розчинників і сушіння готових препаратів є обов'язковими елементами. Тому встановлення оптимального об'єму розчинника за якого висушування проходить найшвидше є важливим показником. За короткочасного сушіння (15 хвилин активного перемішування і вентилявання) вологість іммобілізованої закваски (5–100 мг на 1 г носія) була в межах від 11,1 до 24,8%. За найменшого об'єму розчинника короткочасне сушіння дозволяє отримати препарати із вологістю меншою на 13,7%, порівняно із варіантами, де закваски розчиняли у 0,4 см³ дистильованої води.

Таким чином, висушування іммобілізованих заквасок для йогурту до вологості 7–9% найшвидше можна провести використовуючи об'єм розчинника 0,2 см³.

Висновок

Іммобілізовані закваски для йогуртів, одержані за використання 1 г модифікованого желатину, 5–100 мг сухої маси з умістом клітин мікроорганізмів та 0,2 см³ розчинника, можливо висушити за активного вентилявання та перемішування до вологості 7–9% за 32,4–37,2 хвилини. Збільшення об'єму розчинника до 0,3 та 0,4 см³ приводить до збільшення часу сушіння, відповідно, до 43,5–54,2 та 69,3–84,1 хвилини. Зі збільшенням маси закваски на одиницю маси носія час висушування препаратів збільшується за рахунок підвищення вологості утримуючої здатності одержаних комплексів.

Перспективним дослідженням є встановлення здатності одержаних іммобілізованих на модифікованому желатині заквасок для йогурту згортати молоко.

References

- Busol, T. F., Pis'mennaja, G. M., Zhiglecova, S. K., Tarasevich, B. N., & Izmajlova, V. N. (1979). Adsorbciya zhelatiny na zhidkih granicah razdela faz [Gelatin adsorption on liquid phase boundaries]. *Kolloidnyj Zhurnal*, 41(6), 1055–1060 (in Russian).
- Curcio, M., Altamari, I., Spizzirri, U. G., Cirillo, G., Vittorio, O., Puoci, F., Picci, N., & Iemma, F. (2013). Biodegradable gelatin-based nanospheres as pH-responsive drug delivery systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4).
- Dowling, M. B., Lee, J.-H., & Raghavan, S. R. (2009). pH-responsive jello: gelatin gels containing fatty acid vesicles. *Langmuir*, 25(15), 8519–8525.
- Herasymenko, V. H., Herasymenko, M. O., Tsvilikhovskiy, M. I., Kotsiumbas, I. Ya., Zakharenko, M. O., Obrazhei, A. F., & Holovko, A. M. (2006). *Biotechnologhiia* [Biotechnology]. Firma "INKOS", Kyiv (in Ukrainian).
- Karim, A. A., & Bhat, R. (2008). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 644–656.
- Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563–576.
- Lim, Y. P., & Mohammad, A. W. (2009). Physicochemical properties of mammalian gelatin in relation to membrane process requirement. *Food and Bioprocess Technology*, 4(2), 304–311.
- Mariod, A. A., & Fadul, H. (2014). Extraction and characterization of gelatin from two edible Sudanese insects and its applications in ice cream making. *Food Science and Technology International*, 21(5), 380–391.
- Mariod, A. A., & Adam, H. F. (2013). Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12 (2), 135–147.
- Ma, Y., Zeng, X., Ma, X., Yang, R., & Zhao, W. (2019). A simple and eco-friendly method of gelatin production from bone: One-step biocatalysis. *Journal of Cleaner Production*, 209, 916–926.
- Merkur'eva, E. K. (1970). *Biometrija v selekcii i genetike sel'skhozajstvennyh zhivotnyh* [Biometrics in breeding and genetics of farm animals]. Kolos, Moscow (in Russian).
- Nam, D. L. H., & Antipova, L. V. (2012). Technology of gelatin production from products of pound. Proceedings of Scientific Conference "Actual Problems of Farming and Processing of Pond Fish" (pp. 100–103). KGTU, Krasnodar (in Russian).
- Pietras, P., Przekop, R., & Maciejewski, H. (2013). New approach to preparation of gelatine/SiO₂ hybrid systems by the sol-gel process. *Ceramics-Silikáty*, 57(1), 58–65.
- Rbii, K., Surel, O., Brambati, N., Buchert, A.-M., & Violleau, F. (2011). Study of gelatin renaturation in aqueous solution by AFIFFF-MALS: Influence of a thermal pre-treatment applied on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 511–514.
- Ren, L., Tsuru, K., Hayakawa, S., & Osaka, A. (2001). Synthesis and characterization of gelatin-siloxane hybrids derived through sol-gel procedure. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 21(1/2), 115–121.
- Suzana, C. S. M., Claudia, M., Martins, A., Larissa, G. F., & Teacute, S. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12(28), 4412–4418.
- Vaynberg, K. A., Wagner, N. J., & Sharma, R. (2000). Polyampholyte gelatin Adsorption to colloidal latex: pH and electrolyte effects on acrylic and polystyrene latices. *Biomacromolecules*, 1(3), 466–472.
- Vejs, A. M. (1971). *Makromolekuljarnaja himija zhelatina* [Macromolecular chemistry of gelatin]. Pishhepromizdat, Mosow (in Russian).
- Xie, W., & Valletton, J.-M. (1991). Swelling properties of partially hydrolyzed polyacrylamide gels and gelatin gels in aqueous media. *Journal of Membrane Science*, 64(1-2), 113–120.