

*С.Б. Борунова, Н.Н. Фурик, С.Л. Василенко, М.М. Акбулатова
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КРИОЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПОЛИВИДОВЫЕ КОНСОРЦИУМЫ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЙОГУРТА

(Поступила в редакцию 14.04.2011)

Исследование выживаемости биомассы термофильных молочно-кислых микроорганизмов в составе поливидового консорциума без и с защитными средами показало, что значимое влияние на выживаемость микроорганизмов оказывает способ замораживания: в среде жидкого азота при температуре минус 196 °С в присутствии защитной среды. Подобран состав защитной среды.

Введение. В настоящее время все большее применение в молочной промышленности находят бактериальные концентраты, замороженные при сверхнизких температурах. Широкое распространение технология получения замороженных бактериальных концентратов получила только в последнее время после развития криогенной техники и появления возможности транспортировать замороженные концентраты на большие расстояния при низких отрицательных температурах. Замороженные бактериальные концентраты могут использоваться для прямой инокуляции при получении производственной закваски или для внесения непосредственно в подготовленное сырье.

Исключение стадии сушки из технологического процесса получения бактериальных концентратов позволяет существенно увеличить выживаемость микроорганизмов при консервировании. Различные виды микроорганизмов более чувствительны к процессу сушки, чем к замораживанию, так как при замораживании сохраняется необходимое соотношение между микроорганизмами, которые входят в состав поливидовых бактериальных концентратов. Кроме того, сушка является энергозатратным процессом [1].

Таким образом, альтернативой сублимационного высушивания является криозамораживание биомассы в среде низкотемпературного газа, например, жидкого азота. При сверхбыстром охлаждении вода не успевает выйти из клетки, что уменьшает ее обезвоживание, структура льда

становится более мелкокристаллическая, уменьшается время действия гиперконцентрированных растворов солей. Повреждения, вызванные воздействием мелких кристаллов льда, являются реparable и не вызывают гибели клетки. При криоамораживании количество жизнеспособных молочнокислых микроорганизмов значительно выше, чем при медленном замораживании [2].

При медленном замораживании до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (из-за роста кристаллов льда) происходит увеличение концентрации растворенных во внеклеточной среде веществ, что приводит к возникновению на клеточной мембране градиента осмотического давления и способствует выходу воды из клетки во внешнюю среду. Гибель клетки происходит в результате интенсивного обезвоживания протоплазмы, дегидратации макромолекул, увеличения концентрации электролитов и других растворенных веществ, механического повреждения клетки внеклеточным льдом и т.д. [3].

Цель работы – изучение влияния криоамораживания на поливидовые консорциумы для изготовления йогурта, представляющие собой биомассу микроорганизмов с определенным соотношением культур болгарской палочки и термофильного стрептококка, подборе состава защитной среды для поливидового консорциума.

Материалы (объекты) и методы исследования. Объектами исследований являлись поливидовые консорциумы термофильного стрептококка и болгарской палочки (биомасса микроорганизмов с определенным соотношением культур).

Выживаемость молочнокислых микроорганизмов определяли по отношению количества сохранившихся жизнеспособных клеток в замороженном образце к первоначальному их количеству в образце до замораживания, принятому за 100%.

$$B = \frac{K_2}{K_1} \times 100, \quad (1)$$

где K_1 – концентрация жизнеспособных клеток микроорганизмов в фиксированном объеме перед замораживанием, КОЕ/г; K_2 – концентрация жизнеспособных клеток микроорганизмов в том же фиксированном объеме после замораживания, КОЕ/г.

Количество жизнеспособных клеток определяли путем подсчета числа колониеобразующих единиц в 1 г бактериальной массы до и после замораживания.

Влажность биомассы смешанной с защитной средой определяли по ГОСТ 3626–73.

Результаты и их обсуждение. Криозащитные свойства сахарозы на биомассу консорциума термофильных молочнокислых микроорганизмов изучали по следующим вариантам:

- 1) 5%-ный водный раствор сахарозы смешивали с бактериальной массой в соотношении 1:1;
- 2) 20%-ный водный раствор сахарозы смешивали с бактериальной массой в соотношении 1:1;
- 3) 10%-ный водный раствор сахарозы смешивали с бактериальной массой в соотношении 1:1;
- 4) 10%-ный водный раствор сахарозы смешивали с бактериальной массой в соотношении 1:2;
- 5) 10%-ный водный раствор сахарозы смешивали с бактериальной массой в соотношении 1:3.

Исследование криопротекторных свойств сахарозы проводили путем сравнения количества лактобактерий до и после замораживания биомассы с соответствующими растворами сахарозы.

Выживаемость молочнокислых микроорганизмов определяли по формуле (1). Полученные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Выживаемость термофильных молочнокислых микроорганизмов при замораживании с сахарозой

Номер варианта	КОЕ в 1 г биомассы до замораживания		Замораживание при (– 40) °С		Замораживание при (– 196) °С	
			КОЕ в 1 г биомассы после замораживания	Выживаемость клеток после замораживания, %	КОЕ в 1 г биомассы после замораживания	Выживаемость клеток после замораживания, %
1	St	$22,5 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	90,9	$8,5 \cdot 10^8$	95,5
	L.b	$5,5 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^7$	84,4	$3,3 \cdot 10^7$	86,0
2	St	$22,5 \cdot 10^8$	$7,4 \cdot 10^8$	94,8	$13,5 \cdot 10^8$	97,6
3	St	$22,5 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$	93,0	$7,0 \cdot 10^8$	94,6
	L.b	$5,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	80,0	$1,2 \cdot 10^8$	92,4
4	St	$30,0 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	90,8	$6,0 \cdot 10^8$	92,6
	L.b	$7,3 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^7$	82,4	$3,5 \cdot 10^7$	85,1
5	St	$34,0 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	92,9	$7,5 \cdot 10^8$	93,1
	L.b	$8,3 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	92,0	$2,4 \cdot 10^8$	94,0
Без защитной среды	St	$45,0 \cdot 10^8$	$10,6 \cdot 10^8$	93,5	$12,5 \cdot 10^8$	94,2
	L.b	$11,0 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^7$	83,3	$1,4 \cdot 10^8$	90,1

Обработка полученных результатов в Microsoft Office Excel представлена на рис. 1.

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторениями						
ИТОГИ	5% p-p сахарозы	10% p-p сахарозы	20% p-p сахарозы	Итого		
<i>замораживание при – 40</i>						
Счет	3	3	3	9		
Сумма	250,5	253,9	267,6	772		
Среднее	83,5	84,63333	89,2	85,77778		
Дисперсия	62,23	52,70333	33,13	43,84444		
<i>замораживание при – 196</i>						
Счет	3	3	3	9		
Сумма	264	275,4	274,4	813,8		
Среднее	88	91,8	91,46666	90,42222		
Дисперсия	45,25	9,88	54,22333	30,65944		
<i>Итого</i>						
Счет	6	6	6			
Сумма	514,5	529,3	542			
Среднее	85,75	88,21666	90,33333			
Дисперсия	49,067	40,44166	36,48266			
Дисперсионный анализ						
<i>Источник вариации</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Значение</i>	<i>F критическое</i>
Выборка	97,06888	1	97,06888	2,262532	0,158393	4,747225
Столбцы	63,14333	2	31,57166	0,735889	0,499503	3,885293
Взаимодействие	18,05444	2	9,027222	0,210411	0,81317	3,885293
Внутри	514,8333	12	42,90277			
Итого	693,1	17				

Рисунок 1 – Результаты исследования влияния криозащитных растворов сахарозы на выживаемость термофильных молочнокислых микроорганизмов

Используя показатели изменчивости исследуемой величины: дисперсию и коэффициент вариации (дисперсия – 9,88, коэффициент вариации (определяется как частное от деления дисперсии на среднее) – 0,1076), установили, что оптимальной является концентрация сахарозы в защитной среде – 10%.

Дальнейшие исследования были направлены на определение оптимальной концентрации глицерина в составе защитной среды. Использовали следующие защитные среды:

- 1) среда № 1 – 10%-ный водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия лимоннокислого, 10%-ный глицерина;
- 2) среда № 2 – 10%-ный водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия лимоннокислого, 20%-ный глицерина;
- 3) среда № 3 – 10%-ный водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия лимоннокислого, 30%-ный глицерина;
- 4) среда № 4 – 10%-ный водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия лимоннокислого, 40%-ный глицерина;
- 5) среда № 5 – 10% водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия лимоннокислого, 50%-ный глицерина;
- 6) среда № 6 – 10%-ный водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия уксуснокислого, 10%-ный глицерина;
- 7) среда № 7 – 10%-ный водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия уксуснокислого, 20%-ный глицерина.

Таблица 2 - Выживаемость термофильных молочнокислых микроорганизмов с разной концентрацией глицерина в составе защитной среды

Номер варианта	КОЕ в 1 г биомассы до замораживания		Замораживание при (- 40) °С		Замораживание при (- 196) °С		
	St	L.b	КОЕ в 1 г биомассы после замораживания	Выживаемость клеток после замораживания, %	КОЕ в 1 г биомассы после замораживания	Выживаемость клеток после замораживания, %	
Без защитной среды	$33 \cdot 10^8$	$60 \cdot 10^8$	St	$3,0 \cdot 10^7$	78,5	$4,5 \cdot 10^8$	90,9
			L.b	$22,0 \cdot 10^8$	95,5	$33,0 \cdot 10^8$	97,4
1	$16,5 \cdot 10^8$	$30 \cdot 10^8$	St	$4,6 \cdot 10^8$	94,0	$7,1 \cdot 10^8$	96,0
2			L.b	$10,0 \cdot 10^8$	95,0	$21,0 \cdot 10^8$	98,4
			St	$9,0 \cdot 10^8$	97,1	$16,5 \cdot 10^8$	100,0
3			L.b	$9,0 \cdot 10^8$	94,5	$19,5 \cdot 10^8$	98,0
			St	$7,2 \cdot 10^8$	96,1	$8,0 \cdot 10^8$	96,6
4			L.b	$22,3 \cdot 10^8$	98,6	$23,0 \cdot 10^8$	98,8
			St	$7,3 \cdot 10^8$	96,2	$16,2 \cdot 10^8$	99,9
5			L.b	$18,5 \cdot 10^8$	97,8	$28,3 \cdot 10^8$	99,7
			St	$2,2 \cdot 10^8$	90,5	$8,0 \cdot 10^8$	96,6
6			L.b	$13,0 \cdot 10^8$	96,5	$18,7 \cdot 10^8$	97,8
	St	$11,5 \cdot 10^8$	98,3	$12,5 \cdot 10^8$	98,7		
7	L.b	$27,0 \cdot 10^8$	99,5	$30,0 \cdot 10^8$	100,0		
	St	$5,5 \cdot 10^8$	94,8	$16,5 \cdot 10^8$	100,0		
			L.b	$24,0 \cdot 10^8$	99,0	$30,0 \cdot 10^8$	100,0

Используя метод дисперсионного анализа, выясняли, какая концентрация глицерина в составе защитной среды оказывает влияние на выживаемость исследуемых микроорганизмов. Обработка полученных результатов в Microsoft Office Excel представлена на рис. 2.

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторениями						
ИТОГИ	10% р-р глицерина	20% р-р глицерина	30% р-р глицерина	40% р-р глицерина	50% р-р глицерина	Итого
<i>замораживание -40</i>						
Счет	2	2	2	2	2	10
Сумма	189	191,6	194,7	194	187	956,3
Среднее	94,5	95,8	97,35	97	93,5	95,63
Дисперсия	0,5	3,38	3,125	1,28	18	5,293444
<i>замораживание -196</i>						
Счет	2	2	2	2	2	10
Сумма	194,4	198	195,4	199,6	194,4	981,8
Среднее	97,2	99	97,7	99,8	97,2	98,18
Дисперсия	2,88	2	2,42	0,02	0,72	2,104
<i>Итого</i>						
Счет	4	4	4	4	4	
Сумма	383,4	389,6	390,1	393,6	381,4	
Среднее	95,85	97,4	97,525	98,4	95,35	
Дисперсия	3,556666	5,206666	1,889166	3,046666	10,80333	
Дисперсионный анализ						
<i>Источник вариации</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Значение</i>	<i>F критическое</i>
Выборка	32,5125	1	32,5125	9,471959	0,011687	4,964590
Столбцы	25,582	4	6,3955	1,863219	0,19360	3,478049
Взаимодействие	6,67	4	1,6675	0,485797	0,746309	3,478049
Внутри	34,325	10	3,4325			
Итого	99,0895	19				

Рисунок 2 – Результаты исследования влияния концентрации глицерина в составе защитной среды на выживаемость исследуемых микроорганизмов

Как видно из полученных результатов, значимое влияние на выживаемость болгарской палочки и термофильного стрептококка оказывает способ замораживания.

Чтобы выяснить, какой именно способ замораживания оказывает влияние на выживаемость микроорганизмов, выполняется анализ на основе наименьшей существенной разности (НСР) в следующем порядке.

1. Для каждой пары групп вычисляется статистическая ошибка разности средних:

$$S_{dij} = \sqrt{S^2 \frac{n_i + n_j}{n_i n_j}}, \quad (2),$$

где i, j – номера сравниваемых групп; n_i, n_j – объемы сравниваемых групп; S^2 – средний квадрат ошибки (дисперсия ошибки). В результатах дисперсионного анализа (рис. 2) она обозначена как MS внутри групп. Для рассматриваемого примера $S^2=3,43$.

В данном примере объемы всех групп одинаковы (в каждой группе по 2 варианта), поэтому статистические ошибки разности всех пар групп также одинаковы.

2. Для каждой пары групп вычисляется НСР:

$$\text{НСР}_{\text{шо}} = t_{\alpha;k} S_{dij}. \quad (3),$$

Здесь $t_{\alpha;k}$ – квантиль распределения Стьюдента для заданного уровня значимости α и числа степеней свободы k . Число степеней свободы k определяется следующим образом:

$$k = (n - 1) - (m_1 - 1) - (m_2 - 1) - (m_1 - 1)(m_2 - 1), \quad (4),$$

где n – общий объем выборки (в данном примере $n=20$); m_1, m_2 – количество значений анализируемых факторов (в данном примере $m_1=2, m_2=5$).

Для определения $t_{\alpha;k}$ в Excel используется функция СТЬЮДРАСПОБР. Так как объемы всех групп в данном примере одинаковы, все значения НСР также одинаковы.

3. Для каждой пары групп вычисляется разность средних значений (средние значения каждой группы получены в результате дисперсионного анализа (рис. 2)). $Sd = 1,852025918, t = 2,085962478, \text{НСР} = 3,863256573$. Результаты расчета для рассматриваемого примера приведены в табл. 3.

Таблица 3 – Результаты вычисления разности средних значений для определения влияния способа замораживания на выживаемость микроорганизмов

Значение	Замораживание при (– 40) °С					Замораживание при (– 196) °С				
	10% глицерина	20% глицерина	30% глицерина	40% глицерина	50% глицерина	10% глицерина	20% глицерина	30% глицерина	40% глицерина	50% глицерина
Средние	94,5	95,8	97,35	97	93,5	97,2	99	97,7	99,8	97,2
94,5	0	-1,3	-2,85	-2,5	1,0	-2,7	-4,5	-3,2	-5,3	-2,7
95,8	1,3	0	-1,55	-1,2	2,3	-1,4	-3,2	-1,9	-4	-1,4
97,35	2,85	1,55	0	0,35	3,85	0,15	-1,65	-0,35	-2,45	0,15
97,0	2,5	1,2	-0,35	0	3,5	-0,2	-2	-0,7	-2,8	-0,2
93,5	-1,0	-2,3	-3,85	-3,5	0	-3,7	-5,5	-4,2	-6,3	-3,7
97,2	2,7	1,4	-0,15	0,2	3,7	0	-1,8	-0,5	-2,6	0
99,0	4,5	3,2	1,65	2,0	5,5	1,8	0	1,3	-0,8	1,8
97,7	3,2	1,9	0,35	0,7	4,2	0,5	-1,3	0	-2,1	0,5
99,8	5,3	4,0	2,45	2,8	6,3	2,6	0,8	2,1	0	2,6
97,2	2,7	1,4	-0,15	0,2	3,7	0	-1,8	-0,5	-2,6	0

Если разность средних значений (по абсолютной величине) превышает НСР, то средние значения в группах различаются значимо.

Таким образом, при использовании замораживания в среде жидкого азота при температуре (– 196) °С оптимальной является концентрация глицерина в защитной среде 20–40%.

Аналогичным образом определили, что предпочтительным является использование в составе защитной среды натрия уксуснокислого.

Исследовали выживаемость микроорганизмов в составе поливидового консорциума при двух способах замораживания при смешивании бактериальной массы с 10%-ным раствором сахарозы в соотношении БМ : ЗС = 1:1, 2:1, 3:1 (табл. 4). В процессе исследования определили влажность биомассы смешанной с защитной средой, которая составила 84,5; 82,2; 81,4% соответственно. Результаты исследования показывают, что выживаемость исследуемых микроорганизмов зависит от концентрации криозащитного компонента в замораживаемой смеси и не зависит от ее влажности.

Таблица 4 – Характеристики замораживаемой смеси (биомасса + защитная среда)

Соотношение БМ : ЗС	Влажность биомас- сы, смешанной с за- щитной средой	Содержание сахарозы в смеси, %	Выживаемость культур, %
1:1	84,5	5	St – 94,6±1,3
			L.b – 92,4±1,7
2:1	82,2	3	St – 92,6±0,9
			L.b – 85,1±0,8
3:1	81,4	2	St – 93,1±0,9
			L.b - 94±1,0

Таким образом, определен состав защитной среды для криозамороженного поливидового консорциума для изготовления йогурта: 10%-ный водный раствор сахарозы, 5%-ный натрия уксуснокислого, 20–40%-ный глицерина.

Заключение. Проведено исследование выживаемости микроорганизмов в составе поливидового консорциума при использовании в качестве защитной среды растворов, содержащих:

- 1) сахарозу в концентрации 5, 10, 20%;
- 2) 10% сахарозы, 5% лимоннокислого натрия и глицерин, концентрация которого в растворе составляла 10, 20, 30, 40 или 50%;
- 3) 10% сахарозы, 5% уксуснокислого натрия и глицерин, концентрация которого в растворе составляла 10 или 20%.

Влияние способа замораживания и концентрации криопротекторных растворов, содержащих сахарозу, глицерин, лимоннокислый и уксуснокислый натрий, на выживаемость культур в составе поливидового консорциума анализировали с использованием пакета для статистического анализа данных Excel. Определено, что значимое влияние на выживаемость микроорганизмов оказывает способ замораживания: в среде жидкого азота при температуре (– 196) °С, при этом оптимальными являются следующие концентрации исследуемых веществ в защитной среде: сахарозы – 10%, глицерина – 20–40%, предпочтительным является использование в составе защитной среды натрия уксуснокислого.

Исследована выживаемость микроорганизмов в составе поливидового консорциума при двух способах замораживания при смешивании бактериальной массы с 10%-ным раствором сахарозы в соотношении БМ : ЗС = 1:1, 2:1, 3:1. Определено, что наиболее эффективным является

замораживание биомассы, смешанной с 10%-ным раствором сахарозы в соотношении 1:1 в среде жидкого азота.

Подобрана защитная среда, состоящая из, 10%-ного водного раствора сахарозы, 5%-ного натрия уксуснокислого, 20%-ного глицерина, для замораживания поливидового консорциума для изготовления йогурта, а также соотношение смешивания биомассы с защитной средой, равное 1:1.

Литература

1. Камовников, Б.П. Вакуум-сублимационная сушка пищевых продуктов (Основы теории, расчет и оптимизация) / Б.П. Камовников, Л.С. Малков, В.А. Воскобойников. – М.: Агропромиздат, 1985. – 288 с.

2. Харитонов, Д.В. Изучение некоторых аспектов криозамораживания микробной биомассы / Д.В. Харитонов, Е.И. Райдна // Хранение и переработка сырья. – 2003. – № 9. – С. 64–66.

3. Криоконсервирование клеточной суспензии / под. ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наукова думка, 1983. – 240 с.

S. Barunova, N. Furik, S. Vasylenko, M. Akbulatava
**INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION TO MANY SPECIES
BACTERIAL CONSORTIUMS FOR YOGHURT**

Summary

Survival rate of thermophilic lactic acid bacterial consortiums was studied. Influence of different cryoprotective mediums was studied. We investigated different methods of freezing. Microorganisms survived better when we froze bacteria in liquid nitrogen with cryoprotective media. Composition of cryoprotective media was selected.