

УДК 637.136.5 (047.31)
https://doi.org/10.47612/2220-8755-2019-14-50-57

Поступила в редакцию 8 мая 2020 года

*О.А. Титова, О.С. Головач, М.Ю. Прошкина, И.А. Спиридонова,
Н.К. Жабанос, к.т.н., Н.Н. Фурик, к.т.н., Т.А. Савельева, к.в.н., доцент
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ОЦЕНКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОНСОРЦИУМОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ В ЖИДКОМ АЗОТЕ И ХРАНЕНИИ

*O. Titova, O. Golovach, M. Proshkina, I. Spiridonova,
N. Zhabanos, N. Furik, T. Savelyeva
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

ASSESSMENT OF TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CONSORTIA OF LACTIC ACID MICROORGANISMS DURING FREEZING IN LIQUID NITROGEN AND STORAGE

*e-mail: 12x@tut.by, GOS_82@tut.by, mawamog@mail.ru, spir_ira@tut.by,
nzhabanos@tut.by, furik_nn@tut.by, t.savelyeva@tut.by*

В статье приведена сравнительная оценка основных технологических характеристик консорциумов молочнокислых микроорганизмов, используемых для изготовления заквасок для творожных изделий, до и после замораживания в жидком азоте, при хранении в течение 6 месяцев. Установлено, что при хранении в течение 6 месяцев с соблюдением температурного режима минус (40±2)°С и ниже основные технологически значимые характеристики консорциумов молочнокислых микроорганизмов для изготовления заквасок, применяемых в молочной промышленности, сохраняются.

The article provides a comparative assessment of the main technological characteristics of consortia of lactic acid microorganisms used to make starter cultures for cottage cheese products, before and after freezing in liquid nitrogen, during storage for 6 months. It was found that when stored for 6 months with a temperature regime of minus (40 ± 2) °C and below, the main technologically significant characteristics of consortia of lactic acid microorganisms for the manufacture of starter cultures used in the dairy industry are preserved.

Ключевые слова: молочнокислые микроорганизмы; хранение; замораживание; технологические характеристики.

Keywords: lactic acid microorganisms; storage; freezing; technological characteristics.

Введение. Кисломолочные продукты получают сквашиванием молочного сырья заквасками, которые представляют собой специально отобранные по таксономическим, физиолого-биохимическим и биотехнологическим свойствам и подобранные в соответствии с особенностями технологии производимой продукции и назначением, соответствующим образом подготовленные непатогенные и нетоксигенные микроорганизмы и/или их комбинации [1]. Созданные комбинации, имеющие необходимый спектр характеристик и свойств, являются живым симбиотическим консорциумом очень чувствительным к изменению условий его поддержания. Актуальной задачей является разработка эффективных технологий консервирования микроорганизмов, обеспечивающих полное сохранение основных технологических свойств заквасочных культур в процессе длительного хранения [2]. По данным исследователей [3–5] криочувствительность клеток в большой степени зависит не только от физических, но и от физиологических, биохимических и других свойств культур и на практике для сохранения полезных свойств необходим подбор режимов криоконсервации для каждого конкретного объекта. В связи с этим

исследования технологических характеристик консорциумов молочнокислых микроорганизмов при замораживании в жидком азоте являются актуальными.

Материалы и методы исследований. Исследованы технологические характеристики консорциума молочнокислых микроорганизмов для производства закваски, применяемой для изготовления творожных изделий, в виде полного состава из штаммов двух подвидов К - *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, так и неполного - из одного подвида микроорганизмов: L - *Lactococcus lactis subsp. lactis* либо D - *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*.

Образцы полного и неполного состава, полученные культивированием в 2 видах питательных сред: восстановленном обезжиренном молоке (*Лм*, *Дм*, *Км*) и среде на основе сыворотки (*Лс*, *Дс*, *Кс*), смешивали с защитной средой и замораживали в жидком азоте.

Для определения свертывающей активности (АС) в пастеризованное молоко вносили 16-часовую культуру и выдерживали его до момента образования сгустка при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. Отмечали время в часах.

Кислотообразующую активность (АК) определяли путем вычисления прироста титруемой кислотности в пастеризованном восстановленном обезжиренном молоке, при ферментации 16-часовой культурой при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 4 ч.

Для определения газообразующей способности (ГОС) в пробирку диаметром 15–20 мм вносили $(20 \pm 1) \text{ см}^3$ сквашенного молочного сырья, отмеряли маркером или стеклографом исходный уровень. В другую пробирку аналогичного диаметра наливали 20–25 см^3 воды и опускали термометр. Пробирки нагревали на водяной бане до $(90 \pm 1)^\circ\text{C}$. Линейкой измеряли уровень поднятия сгустка относительно метки (в мм).

Для определения ароматообразующей активности (АОС) консорциумов, содержащих штаммы *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, на предметное стекло с лункой наносили 1 каплю 40-ного % водного раствора КОН и 1 каплю сыворотки сквашенного молочного сырья, отмечали время начала реакции, выдерживали при комнатной температуре и отмечали время окрашивания смеси в розовый цвет (в минутах).

Оптическую плотность определяли в пластиковых кюветах толщиной 1 см^3 при длине волны 540 нм на спектрофотометре SOLAR.

Определение значения активной кислотности с помощью системы для контроля ферментации iCinas (АМС, France) осуществляли в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Результаты и их обсуждение. Проведена сравнительная оценка основных технологических характеристик исходных консорциумов и восстановленных после замораживания в жидком азоте. Данные, полученные в ходе экспериментов, представлены в таблицах 1–2.

Таблица 1 – Технологические характеристики консорциумов при ферментации молочного сырья

Обозначение консорциума	Значения показателей							
	до замораживания				после замораживания			
	АК, °Т	АС, ч	ГОС, мм	АОС, мин	АК, °Т	АС, ч	ГОС, мм	АОС, мин
<i>Лм</i>	14	5,5	н/о	н/о	14	5,5	н/о	н/о
<i>Дм</i>	13	5,5	12	7	14	5,5	10	6
<i>Км</i>	13	5,5	12	7	13	5,5	14	6

Обозначение консорциума	Значения показателей							
	до замораживания				после замораживания			
	АК, °Т	АС, ч	ГОС, мм	АОС, мин	АК, °Т	АС, ч	ГОС, мм	АОС, мин
<i>Lc</i>	13	5,5	н/о	н/о	13	5,5	н/о	н/о
<i>Dc</i>	13	5,8	12	7	14	5,5	10	6
<i>Kc</i>	14	5,8	12	7	16	5,5	10	6

Примечание: н/о – определение не проводилось

Источник данных: собственная разработка.

На основании экспериментальных данных установлено, что восстановленные консорциумы и консорциумы до замораживания в жидком азоте обладают близкими характеристиками: кислотообразующая активность – 13–16°Т, длительность сквашивания молочного сырья – 5,5–5,8 ч с образованием плотных колющихся сгустков, высокая ароматобразующая способность – 6–7 мин, газообразующая способность соответствует нормируемым значениям (не ниже 10 мм). Установлено, что вид среды культивирования, используемой для получения консорциумов для замораживания в жидком азоте, не влияет на их технологические характеристики.

Особый интерес представляют технологические характеристики полных консорциумов *Km*, *Kc* и консорциумов *Lm+ Dm*, *Lc+ Dc*, полученных из образцов неполного состава после их восстановления. При исследовании консорциумов *L+D* отмечены значительные отличия значений технологических характеристик по сравнению с полными консорциумами *Km*, *Kc*: кислотообразующая активность ниже на $(8\pm 3)^\circ\text{T}$, отсутствие свертывающей активности (таблица 2). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что консорциумы, созданные из неполных по штаммовому составу образцов, при ферментации молочного сырья, не воспроизводят исходные технологические характеристики.

Таблица 2 – Технологические характеристики консорциумов

Обозначение консорциума	АК, °Т	АС, ч	ГОС, мм	АОС, мин
<i>Km</i>	13	5,5	14	6
<i>Lm+ Dm</i>	7	отсутствие сгустка	н/о	н/о
<i>Kc</i>	16	5,5	10	6
<i>Lc+ Dc</i>	5	отсутствие сгустка	н/о	н/о

Примечание: н/о – определение не проводилось

Источник данных: собственная разработка.

С целью определения способности образцов консорциума к развитию в производственной питательной среде, для получения заквасок, проведены измерения активной кислотности и оптической плотности культуральной жидкости через 16 ч культивирования (рисунки 1–2).

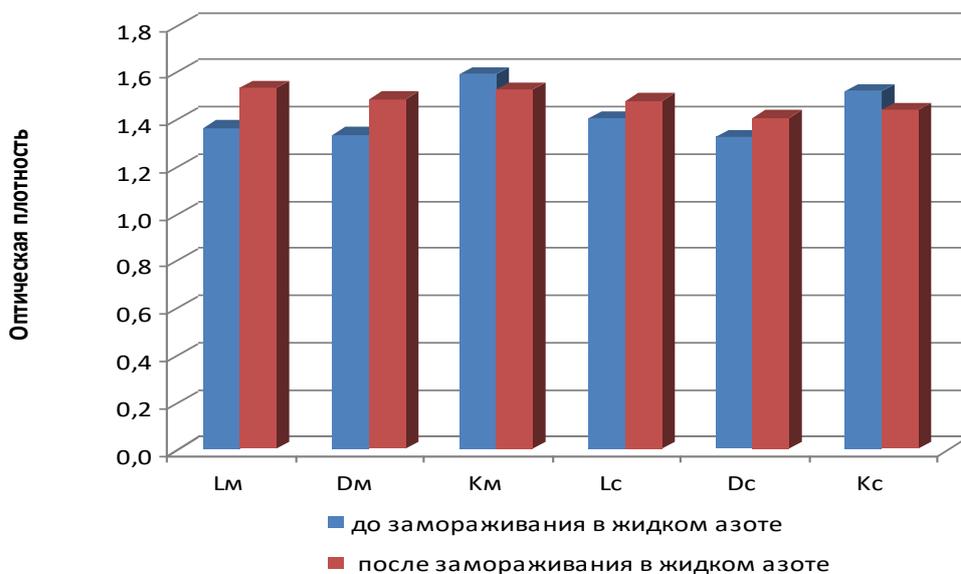


Рисунок 1 – Оптическая плотность культуральной жидкости через 16 ч культивирования консорциумов лактококков в питательной среде
Источник данных: собственная разработка.

Оптическая плотность культуральной жидкости через 16 ч культивирования в питательной среде восстановленных после замораживания в жидком азоте консорциумов L и D, содержащих штаммы только одного подвида, составила 1,40–1,53 ед., что на 0,08–0,17 ед. выше данной величины, полученной до замораживания консорциумов. При культивировании восстановленных консорциумов K, содержащих штаммы двух подвигов, отмечено снижение уровня оптической плотности на 0,06 ед. по сравнению с данной величиной, полученной до замораживания консорциумов.

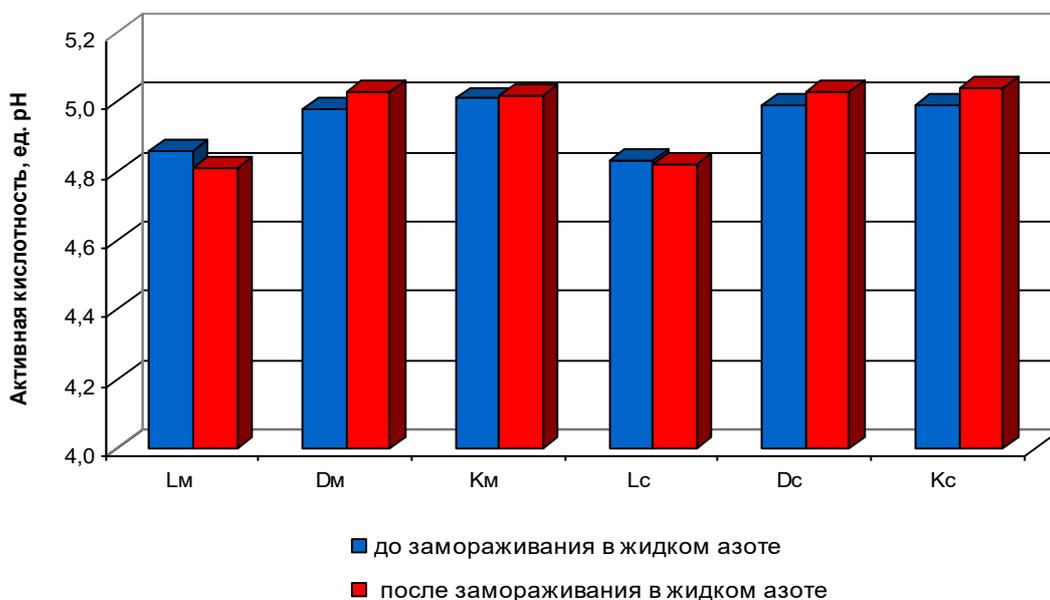


Рисунок 2 – Активная кислотность культуральной жидкости через 16 ч культивирования консорциумов лактококков в питательной среде
Источник данных: собственная разработка.

Как видно из графических данных, представленных на рисунке 2, при культивировании в производственной питательной среде восстановленные после замораживания в жидком азоте кислотообразующие консорциумы (L), содержащие только штаммы *Lactococcus lactis subsp. lactis*, обеспечивают более низкий уровень активной кислотности (на 0,2 ед. рН) по сравнению с ароматобразующими (D), включающими только штаммы *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, и полными (K) консорциумами, состоящими из штаммов двух подвидов.

Активная кислотность культуральной жидкости через 16 ч культивирования в питательной среде восстановленных консорциумов D и K, содержащих штаммы подвида *Lactococcus lactis subsp. diacetilactis*, составила 5,02–5,04 ед. рН, что выше уровня активной кислотности питательной среды до замораживания консорциумов на 0,04–0,05 ед. рН (рисунок 2). При культивировании восстановленных консорциумов L, содержащих только штаммы *Lactococcus lactis subsp. lactis*, отмечено снижение уровня активной кислотности на 0,05 ед. рН по сравнению с величиной, полученной до замораживания консорциумов.

Таким образом, при анализе экспериментальных данных, установлено, что показатели, характеризующие способность восстановленных консорциумов к развитию в промышленной питательной среде, близки к таковым до замораживания в жидком азоте. Следовательно, данный метод является перспективным для сохранения промышленно-ценных консорциумов микроорганизмов с целью дальнейшего использования их в производстве заквасок.

На следующем этапе проведена сравнительная оценка основных технологических характеристик полных консорциумов (K) после замораживания в жидком азоте, через 3 и 6 месяцев хранения с учетом температурного режима хранения: минус (40±2)°С, минус (60±2)°С. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Технологически значимые характеристики полных консорциумов лактококков при хранении

Наименование показателя	до замораживания в жидком азоте	Км						Кс					
		после замораживания в жидком азоте		через 3 месяца хранения		через 6 месяцев хранения		после замораживания в жидком азоте		через 3 месяца хранения		через 6 месяцев хранения	
			при минус 40°С	при минус 60°С	при минус 40°С	при минус 60°С	при минус 60°С	при минус 40°С	при минус 60°С		при минус 40°С	при минус 60°С	при минус 40°С
Кислообразующая активность, °Т	13	13	14	14	10	11	16	16	16	17	10	11	11
Свертывающая активность, ч	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,7	5,5	5,5	5,5	5,3	5,7	5,5	5,5
Газообразующая способность, мм	12	14	3	6	25	20	10	10	6	8	20	20	20
Ароматобразующая способность, мин	7	6	8	7	5	5	6	6	7	7	5	5	5

Источник данных: собственная разработка.

Отмечена стабильность технологических характеристик замороженных в жидком азоте полных консорциумов для заквасок Км и Кс, используемых при производстве творожных изделий через 3 месяца хранения: кислотообразующая активность – $(15 \pm 2)^\circ\text{T}$, длительность сквашивания молочного сыра – $(5,4 \pm 0,1)$ ч с образованием плотных колющихся сгустков, ароматобразующая способность – 5–7 мин (таблица 3). Через 6 месяцев хранения отмечено снижение кислотообразующей активности консорциумов на $(5 \pm 2)^\circ\text{T}$ при сохранении свертывающей активности $(5,4 \pm 0,1)$ ч. Способность консорциумов к ароматобразованию при хранении не изменилась. Влияния температурных режимов хранения (минус 40°C , минус 60°C) на технологические характеристики консорциумов не выявлено.

Отмечено, что способность к развитию в производственной среде консорциумов Км и Кс, полученных культивированием на различных средах, через 3 месяца хранения снижается: оптическая плотность культуральной жидкости через 16 ч культивирования на 0,21–0,33 ед. ниже, чем в начале хранения. В последующие 3 месяца хранения исследуемые показатели изменяются в пределах погрешности измерения. Зависимости от температуры хранения не выявлено (рисунок 3).

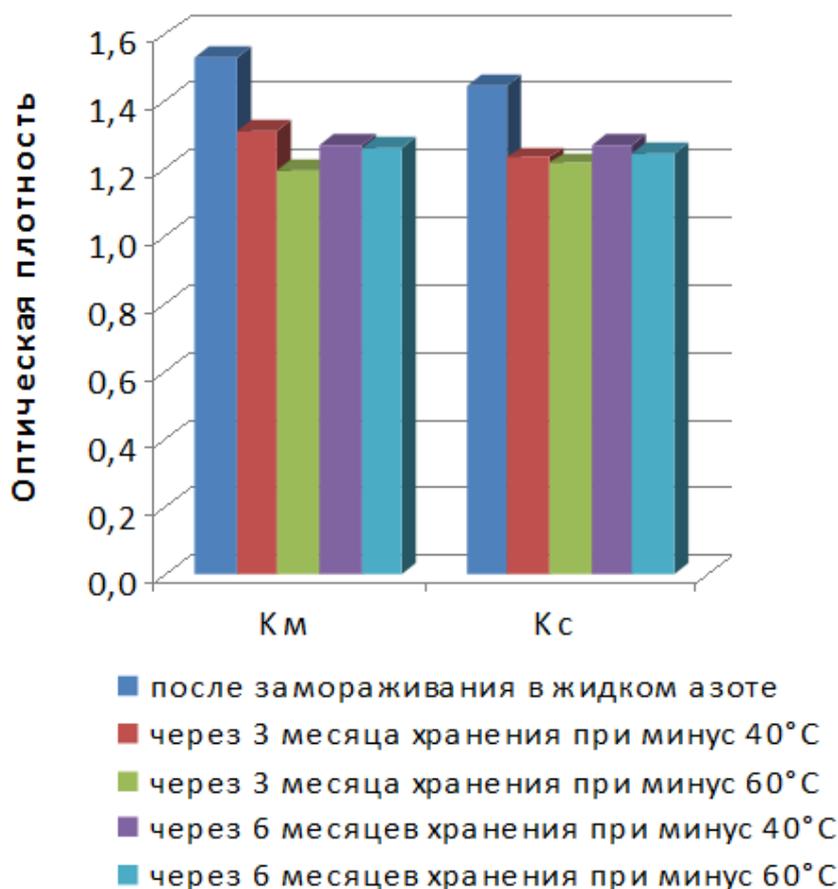


Рисунок 3 – Оптическая плотность культуральной жидкости через 16 ч культивирования в питательной среде консорциумов лактококков в процессе хранения
Источник данных: собственная разработка.

Заключение. Установлено, что восстановленные после замораживания в жидком азоте консорциумы молочнокислых бактерий для изготовления заквасок, применяемых в производстве творожных изделий, при ферментации молочного сыра обладают характеристиками, близкими к таковым до замораживания: кислотообразующая активность – $(15 \pm 2)^\circ\text{T}$, длительность сквашивания молочного

сырья – $(5,4 \pm 0,1)$ ч с образованием плотных колющихся сгустков, ароматобразующая способность образцов – 6 мин, газообразующая способность – от 10 до 14 мм. При хранении в течение 3 месяцев с соблюдением температурных режимов минус $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ и минус $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ основные технологически значимые характеристики консорциумов существенно не изменяются. Через 6 месяцев хранения кислотообразующая активность консорциумов снижается на $(5 \pm 2)^\circ\text{T}$, что не влияет на свертывающую активность: длительность сквашивания близка к исходной, способность к газо- и ароматобразованию сохраняется.

Хранение заквасочных культур в виде замороженных в жидком азоте консорциумов, содержащих один подви́д микроорганизмов, нецелесообразно, поскольку составление полных консорциумов из восстановленных образцов, содержащих один подви́д микроорганизмов, не обеспечивает необходимые технологические характеристики у полных консорциумов.

Развитие замороженных консорциумов в промышленной питательной среде позволяет обеспечить необходимую скорость накопления биомассы при производстве заквасок, и таким образом, подтверждает возможность их использования в технологическом процессе.

Список использованных источников

1. Свириденко, Г.М. Принципы подбора и входной контроль бактериальных заквасок / Г.М. Свириденко // Переработка молока. – 2015. – № 1. – С. 22–25.
2. Перфильев, Г.Д. Бактериальные и биологические средства в биотехнологии ферментированных молочных продуктов / Г.Д. Перфильев // Переработка молока. – 2005. – № 10. – С. 24–25.
3. Охупкина, В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Часть I. Криоконсервация / В.Ю. Охупкина, Б.А. Шабалин // Теоретическая и прикладная экология. 2009. – №1. – С. 18–27.
4. Кузьмина, О.М. Конструирование защитных сред для криозамораживания молочнокислых бактерий / О.М. Кузьмина // Научное обеспечение молочной промышленности: сб. науч. трудов М.: ГНУ ВНИМИ, 2009. – С. 228–232.
5. Способ длительного хранения прихотливых микроорганизмов: пат. 2661117, РФ, МКИ С12N 1/04, С12N 1/20, С12N 1/21, С12N 1/46/ Шмыленко В.А., Бондаренко А.П.; № 2017119140, заявл. 31.05.2017, опубл. 11.07.2018.
1. Sviridenko, G. M. Principy podbora i vhodnoj kontrol' bakterial'nyh zakvasok [Principles of selection and incoming control of bacterial starter cultures] / G. M. Sviridenko // Pererabotka moloka. – 2015. – № 1. – S. 22–25.
2. Perfilev, G.D. Bakterialnyie i biolo-gicheskie sredstva v biotehnologii fermentirovannyih molochnyih produktov [Bacterial and biological agents in the biotechnology of fermented dairy products] / G.D. Perfilev // Pererabotka moloka. – 2005. – № 10. – S. 24–25.
3. Ohapkina, V.Yu. Metodyi podderzhaniya mikrobnyih kultur. Chast I. Kriokonservatsiya [Methods for maintaining microbial cultures. Part I. Cryopreservation] / V.Yu. Ohapkina, B.A. Shabalin // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2009. – №1. – S. 18–27.
4. Kuzmina, O.M. Konstruirovaniye zaschitnyih sred dlya kriozamorazhivaniya molochnokislyih bakteriy [Construction of protective environments for cryogenic freezing of lactic acid bacteria] / O.M. Kuzmina // Nauchnoe obespechenie molochnoy promyishlennosti: sb. nauch. trudov M.: GNU VNIMI, 2009. – S. 228–232.
5. Sposob dlitel'nogo hraneniya prihotlivyih mikroorganizmov [The method of long-term storage of whimsical microorganisms]: pat. 2661117, RF, MKI S12N 1/04, S12N 1/20, S12N 1/21, S12N 1/46/ Shmyilenko V.A., Bondarenko A.P.; № 2017119140, zayavl. 31.05.2017, opubl. 11.07.2018.