

Е.В. Короткая, И.А. Короткий, Е.А. Ибрагимова**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ ТЕРМОФИЛЬНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ ЗАКВАСОК**

В работе представлены результаты исследований влияния режимов замораживания и низкотемпературного хранения на термофильные молочнокислые заквасочные культуры *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. Закваски исследовали по физико-химическим и микробиологическим показателям. Были определены оптимальные режимы замораживания и температуры хранения термофильных молочнокислых бактериальных заквасок в замороженном состоянии. На основании проведенных исследований была разработана технология низкотемпературного консервирования термофильных молочнокислых заквасочных культур *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*.

Низкотемпературное консервирование, режимы и условия замораживания, термофильные молочнокислые закваски.

Введение

На сегодняшний день в молочной промышленности широко используют низкотемпературное воздействие при производстве сухих и замороженных бактериальных заквасок и концентратов. Однако процессы замораживания и сублимационной сушки могут привести к гибели или повреждению клеток заквасочной микрофлоры [1]. Устойчивость микроорганизмов к низкотемпературным воздействиям зависит от температуры и скорости замораживания, состава среды, вида микроорганизмов и их физиологического состояния, а также от ряда других факторов [2, 3]. Низкотемпературное воздействие оказывает различное влияние не только на таксономически различные микроорганизмы, но даже различные штаммы одного и того же вида бактерий могут существенно отличаться по криоустойчивости, несмотря на то что организмы одного вида обладают близкими морфофункциональными, культуральными свойствами, уровнем метаболизма [4–6]. При хранении микроорганизмов, помимо потери жизнеспособности клеток, наблюдаются также процессы популяционной изменчивости. При этом происходит потеря штаммами приоритетных свойств. Это обусловило необходимость проведения работ по созданию надежных технологий долгосрочного хранения различных родов, видов и штаммов микроорганизмов [5].

Эффективным способом долгосрочного хранения различных микроорганизмов является низкотемпературное консервирование – перевод биологических объектов в состояние криоанабиоза с последующим возвратом их к метаболической активности в физиологически оптимальных условиях культивирования [4, 5, 7]. Эффективность сохранения микроорганизмами жизнеспособности и продуктивных свойств зависит от способов перевода и вывода их из состояния глубокого холодого анабиоза [5]. Поэтому для представителей различных родов, видов и штаммов бактерий необходимы индивидуальные эффективные технологии низкотемпературного консервирования, предусматривающие сохранение максимального количества жизнеспособных клеток микроорганизмов без изменения их исходных свойств [1, 4, 8, 9].

Целью данной работы являлась разработка технологии низкотемпературного консервирования термофильных кисломолочных бактериальных заквасок.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: приготовление бактериальных молочнокислых заквасок, замораживание заквасок при различных режимах низкотемпературной обработки и хранение замороженных заквасок при различных температурах, исследование свежеприготовленных и замороженных заквасок по органолептическим, микробиологическим, физико-химическим показателям, выбор оптимальных параметров для разработки технологии низкотемпературного консервирования термофильных кисломолочных бактериальных заквасок.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований являлись четыре вида бактериальных лиофилизированных заквасок (производитель ООО «Барнаульская биофабрика») с заквасочными культурами *Lactobacillus acidophilus* вязкая (БЗ-АВ) и невязкая (БЗ-АНВ) и *Lactobacillus bulgaricus* вязкая (БЗ-БВ) и невязкая (БЗ-БНВ).

Приготовление лабораторных заквасок для исследования осуществлялось в стерильных условиях в специальном помещении – боксе БАВ-ПЦР-«Ламинар-С».

Стерилизацию обезжиренного молока проводили в автоклаве (стерилизатор паровой DGM-500) в течение 10–15 минут при давлении 0,1 МПа и температуре 121 ± 2 °С.

Заквашивание молока до образования сгустка проводилось в термостате ТСО-1/80 СПУ. Полученные лабораторные закваски разливали в пробирки по 15 мл с герметично завинчивающимися крышками.

Замораживание заквасок проводили в низкотемпературных холодильных камерах при температурах замораживания –10, –25 и –45 °С в хладоносителе (тосол А-40) и на воздухе.

Размораживание и реактивацию (деконсервацию) заквасочных культур проводили следующим образом: закваски, замороженные при –10 °С, размораживали в холодильной камере при температуре 4–8 °С, а закваски, замороженные при –25 и –45 °С, размораживали в водяной бане при 20 °С.

Хранение замороженных заквасок осуществляли в термоизолированных контейнерах при температурах, соответствующих температурам замораживания, в течение 6 месяцев.

Активность микроорганизмов заквасочных культур, хранившихся в замороженном состоянии, оценивали при помощи микробиологических и физико-химических показателей, сравнивая их с показателями свежеприготовленных заквасок.

Титруемую кислотность заквасок определяли титриметрическим методом по ГОСТ 3624-92 и выражали в градусах Тернера. Активную кислотность (рН) заквасок определяли потенциометрическим методом по ГОСТ 26781-85.

Количество термофильных молочнокислых микроорганизмов (лактобактерий) определяли на MRS-среде для заквасок молочнокислых бактерий по ГОСТ 10444.11-89.

Контаминацию посторонними бактериями (бактерии группы кишечной палочки, сальмонеллы, *S. aureus*) – по ГОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».

Количество дрожжей и плесневых грибов определяли на среде Сабуро по ГОСТ 10444.12-88.

Относительную вязкость заквасок определяли по скорости истечения на капиллярном вискозиметре Освальда.

Изменение температуры замораживания заквасок определяли с помощью измерительного комплекса, включающего хромель-копелевые термоэлектрические преобразователи, аналогового модуля ввода МВА8, преобразователя интерфейса АС4, персонального компьютера. Измерительный комплекс был отградуирован по эталонному ртутному термометру с ценой деления 0,05 °С в термостабильных условиях в диапазоне температур от –30 до 0 °С. Данные, поступающие на персональный компьютер, использовали для построения термограмм замораживания, при помощи которых были определены криоскопические температуры исследуемых заквасок.

Результаты и их обсуждение

Основными показателями, характеризующими производственную пригодность заквасок, являются предел кислотообразования, активность сквашивания, органолептические свойства полученного сгустка и содержание жизнеспособной микрофлоры.

Качественные показатели лабораторных заквасок представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатель	Наименование бактериальной закваски			
	БЗ-АВ	БЗ-АНВ	БЗ-БВ	БЗ-БНВ
Время сквашивания, ч: нормативное фактическое	16			
	8	14	8	16
Кислотность закваски, °Т: нормативное фактическое	110–140		135–140	
	127	111	138	136

Количество микроорганизмов, КОЕ/см ³ , не менее: нормативное фактическое	1,1·10 ⁹			
	1,1·10 ⁹	2,5·10 ⁹	6,0·10 ⁹	3,0·10 ⁹
Наличие БГКП (колиформы) в 10 см ³ закваски: нормативное фактическое	Не допускается			
	Не обнаружено			
Дрожжи и плесени, КОЕ/см ³ , не более: нормативное фактическое	5 в сумме			
	Не обнаружено			
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы) в 10 см ³ закваски: нормативное фактическое	Не допускается			
	Не обнаружено			
S. aureus в 10 см ³ закваски: нормативное фактическое	Не допускается			
	Не обнаружено			
Относительная вязкость	6,95	2,43	4,31	1,75

Свежеприготовленные закваски имеют белый, нежный и ровный сгусток с небольшим отделением сыворотки. У вязких заквасок БЗ-АВ и БЗ-БВ количество отделившейся сыворотки было немного больше, чем у невязких. Полученные кисломолочные сгустки легко разбиваются при перемешивании, приобретает однородную консистенцию. У БЗ-АВ и БЗ-БВ консистенция вязкая. Все четыре вида заквасок обладают приятным ароматом, имеют кисломолочный вкус, без посторонних привкусов и запахов.

Согласно данным, представленным в табл. 1, полученные лабораторные закваски имеют необходимую кислотность и время сквашивания. Время сквашивания для лабораторных заквасок БЗ-АВ и БЗ-БВ в 2 раза меньше, чем для БЗ-АНВ и БЗ-БНВ. По микробиологическим показателям, характеризующим качество и безопасность заквасок, полученные лабораторные закваски соответствовали нормативным документам (Технический регламент на молоко и молочную продукцию с изменениями от 22 июля 2010 г.). Полученные закваски содержали высокое количество лактобактерий – 10⁹ в 1 см³. Относительная вязкость у лабораторных заквасок БЗ-АВ и БЗ-БВ в среднем была выше в 2,6 раза, чем у БЗ-АНВ и БЗ-БНВ.

При замораживании заквасок для каждого вида заквасочной культуры были определены криоскопические температуры (t_{кр}) и скорости замораживания (v_з), значения которых представлены в табл. 2.

Таблица 2

Криоскопические температуры и скорости замораживания лабораторных заквасок

Показатель	Наименование бактериальной закваски
------------	-------------------------------------

	БЗ-АВ	БЗ-АНВ	БЗ-БВ	БЗ-БНВ
$t_{кр}, ^\circ\text{C}$	-1,6	-1,8	-1,35	-1,65
$v_3, \text{см/ч}$: при $t = -10^\circ\text{C}$:				
воздух	0,17	0,19	0,18	0,17
тосол	0,23	0,25	0,27	0,22
при $t = -25^\circ\text{C}$:				
воздух	0,79	0,78	0,71	0,72
тосол	9,42	9,38	9,33	9,34
при $t = -45^\circ\text{C}$:				
воздух	1,48	1,38	1,39	1,45
тосол	18,93	18,79	19,14	19,35

Как видно из представленных данных, более высокие скорости замораживания имеют место при низкотемпературной обработке заквасочных микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* в хладоносителе при -25 и -45°C , а также на воздухе при -45°C . Самая высокая скорость замораживания (около 19 см/ч) была получена при замораживании заквасок в хладоносителе при -45°C . При высоких скоростях замораживания кристаллизация влаги сопровождается образованием мелких вне- и внутриклеточных кристаллических структур, что практически не оказывает разрушающего воздействия на бактериальные клетки заквасочных микроорганизмов [3, 4].

После размораживания закваски имели белый ровный цвет, приятный аромат и кисломолочный вкус, без посторонних привкусов и запахов.

Количество жизнеспособных микроорганизмов в лабораторных заквасках после замораживания в зависимости от способов замораживания после 6 месяцев хранения представлено в табл. 3.

Таблица 3

Количество жизнеспособных микроорганизмов в заквасках после замораживания и 6 месяцев хранения

Показатель	Наименование бактериальной закваски			
	БЗ-АВ	БЗ-АНВ	БЗ-БВ	БЗ-БНВ
Количество микроорганизмов, КОЕ/г $\cdot 10^{-9}$: при $t = -10^\circ\text{C}$:				
	воздух	0,009	0,007	0,009
тосол	0,009	0,010	0,009	0,005
при $t = -25^\circ\text{C}$:				
	воздух	0,09	0,20	0,30
тосол	0,13	0,20	0,50	0,20
при $t = -45^\circ\text{C}$:				
	воздух	0,13	0,30	0,50
тосол	0,20	0,50	1,10	0,50

В образцах, замороженных и хранящихся при температуре -10°C , наблюдалось наибольшее снижение количества микроорганизмов с $1,1 \cdot 10^9$ – $6,0 \cdot 10^9$ до $3,0 \cdot 10^6$ – $9,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Максимальная сохранность молочнокислых микроорганизмов $2,0 \cdot 10^8$ – $1,1 \cdot 10^9$ КОЕ/г отмечена в бактериальных заквасках, замороженных при температуре -45°C в хладоносителе.

Продолжительность сквашивания замороженных заквасок после 6 месяцев хранения в зависимости от

способов и режимов замораживания представлена в табл. 4.

Таблица 4

Изменение активности сквашивания замороженных заквасок после 6 месяцев хранения

Показатель	Наименование бактериальной закваски			
	БЗ-АВ	БЗ-АНВ	БЗ-БВ	БЗ-БНВ
Активность сквашивания, часов: при $t = -10^\circ\text{C}$:				
	воздух	10	16	10
тосол	10	16	10	18
при $t = -25^\circ\text{C}$:				
	воздух	9	15	9
тосол	8	14	8	16
при $t = -45^\circ\text{C}$:				
	воздух	8	14	8
тосол	7	13	7	15

Как видно из представленных в табл. 4 данных, у заквасок, замороженных при температуре -10°C в хладоносителе и на воздухе, отмечалось увеличение продолжительности сквашивания, а замороженные закваски при температуре -25°C в хладоносителе и при температуре -45°C на воздухе обладают такой же активностью, что и сухие закваски. Закваски, замороженные при температуре -45°C в хладоносителе, имеют значительно лучшую активность по сравнению с сухими заквасками. Продолжительность сквашивания молока с использованием замороженных заквасок была меньше на 10–15 % по сравнению с продолжительностью сквашивания молока с использованием сухих заквасочных препаратов.

Важным качественным показателем закваски является вязкость. Динамика изменения относительной вязкости БЗ-АВ в зависимости от условий замораживания и продолжительности хранения представлена на рис. 1.

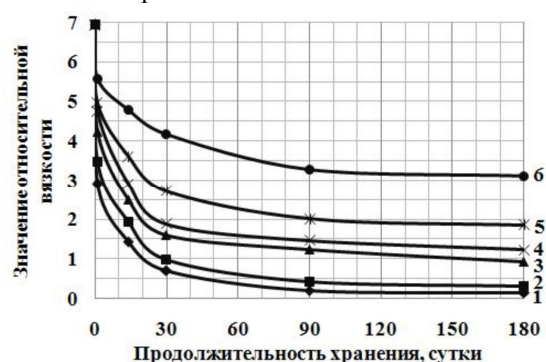


Рис. 1. Изменение относительной вязкости БЗ-АВ в процессе хранения: замораживание на воздухе (1 – минус 10°C ; 3 – минус 25°C ; 5 – минус 45°C); замораживание в хладоносителе (2 – минус 10°C ; 4 – минус 25°C ; 6 – минус 45°C)

Для остальных заквасок зависимость относительной вязкости от условий замораживания и продолжительности хранения имеет аналогичный вид.

Значительные изменения относительной вязкости заквасок отмечаются сразу после замораживания, в момент кристаллообразования, относительная вязкость при этом уменьшается в 1,2–2,6 раза в за-

висимости от вида заквасочной культуры и способа замораживания. Относительная вязкость бактериальных заквасок, замороженных в воздушной среде, через 14 суток хранения уменьшилась в 1,8–3,2 раза, а в хладоносителе – в 1,4–3 раза. Через 6 месяцев хранения относительная вязкость уменьшилась: у заквасок, замороженных при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в хладоносителе и на воздухе, в среднем в 11 и 23 раза; у заквасок, замороженных при температуре $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в хладоносителе и на воздухе, в среднем в 4,4 и 11 раз; у заквасок, замороженных при температуре $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ на воздухе, в среднем в 3,7 раза. Минимальные изменения относительной вязкости, уменьшение в 2,2–2,4 раза, наблюдали у заквасок, замороженных при $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ в хладоносителе; это можно объяснить тем, что образующиеся при быстром замораживании мелкие кристаллы льда оказывают значительно меньшее влияние на структуру сгустка.

Таким образом, в результате проведенных исследований заквасок по микробиологическим, физико-химическим свойствам и активности сквашивания был определен оптимальный режим низкотемпературного консервирования и хранения. Низкотемпературное консервирование и хранение при температуре $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ в хладоносителе позволяет обеспечить сохранность максимального количества жизнеспособных клеток без изменения их исходных свойств.

На молочных предприятиях в основном используется холодильное оборудование с температурой хранения $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Поэтому важным этапом исследования было определение активности сквашивания заквасок, замороженных при температуре $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ в хладоносителе, в процессе хранения при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Изменение активности сквашивания замороженных заквасок в процессе хранения при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

Продолжительность хранения, суток	Активность сквашивания заквасок, часов			
	БЗ-АВ	БЗ-АНВ	БЗ-БВ	БЗ-БНВ
0	7	13	7	15
7	7	13	7	15
14	8	14	8	16
21	9	15	9	17

Анализ полученных данных показал, что после 21 суток хранения отмечалось увеличение продолжительности сквашивания, а до 14 суток хранения при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ закваски сохраняют необходимую активность сквашивания.

На основании проведенных исследований была разработана технология низкотемпературного консервирования и хранения термофильных кислomолочных бактериальных заквасок с заквасочными культурами *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. Блок-схема технологического процесса низкотемпературного консервирования бактериальных заквасок представлена на рис. 2. Технологический процесс производства замороженной закваски состоит из следующих стадий:

- тепловая обработка питательной среды;

- охлаждение до температуры заквашивания;
- заквашивание;
- сквашивание;
- охлаждение готовой закваски;
- фасовка и упаковка;
- замораживание;
- хранение замороженной закваски.

Питательной средой для термофильных молочнокислых микроорганизмов служит обезжиренное молоко (наиболее часто используемая для производства заквасок питательная среда) или восстановленное обезжиренное молоко с содержанием сухих веществ 9–12 % (СВ), полученное из высококачественного сухого обезжиренного молока, соответствующие требованиям ГОСТ Р 52090-2003, без посторонних привкусов и запахов, не содержащие ингибирующих веществ.

Тепловая обработка питательной среды. Первым этапом производства заквасок является тепловая обработка питательной среды. Эта обработка улучшает свойства питательной среды посредством уничтожения бактериофагов, присутствующих микроорганизмов, удаления растворенного кислорода, устранения ингибирующих веществ и некоторого расщепления белков.

Охлаждение до температуры заквашивания. После тепловой обработки питательную среду охлаждают до температуры заквашивания $38\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

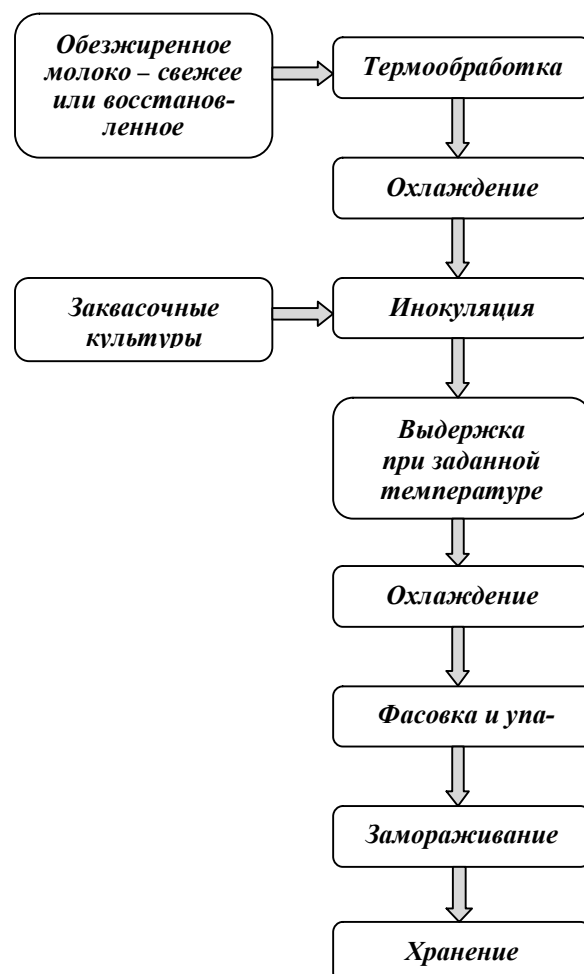


Рис. 2. Блок-схема производства закваски

Заквашивание. При заквашивании определенное количество бактериальной культуры переносят в термообработанную, охлажденную питательную среду и тщательно перемешивают.

Сквашивание. После заквашивания, когда заквасочные культуры смешаны с питательной средой, бактерии начинают размножаться – начинается сквашивание. Сквашивание проводят при температуре 40–41 °С до образования сгустка. Продолжительность сквашивания зависит от вида бактерий закваски, дозы вносимой закваски и т.д.

Охлаждение готовой закваски. Полученный сгусток тщательно перемешивают и охлаждают до 0–5 °С. Охлаждение проводят при достижении кислотности определенного значения для каждого вида закваски. Далее закваску фасуют и упаковывают для замораживания, ее можно использовать в производстве.

Замораживание и хранение заквасок. Подготовленные закваски замораживают в холодильной установке с температурой замораживания –45 °С в хладоносителе. Хранение замороженных заквасок термофильных кисломолочных микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* осуществляют в термоизолированных контейнерах, установленных в низкотемпературных холодильных камерах, при температуре –45 °С. Поставляются на молочные предприятия в изотермических контейнерах. На молочном предприятии замороженный бактериальный препарат может быть использован в производстве в течение 14 суток. Хранение замороженной закваски на молочном предприятии должно осуществляться в холодильной камере при температуре не выше –18 °С в изотермическом контейнере. Хранение в изотермическом контейнере минимизирует колебания температуры замороженной закваски в процессе хранения.

Список литературы

1. Рябцева, С.А. Повышение выживаемости заквасочной микрофлоры при замораживании / С.А. Рябцева, М.А. Брацихина // Переработка молока. – 2010. – № 8. – С. 46–47.
2. Алмаши, Э. Быстрое замораживание пищевых продуктов / Э. Алмаши, Л. Эрдели, Т. Шарой; пер. с венг. О.А. Воронова; под ред. Э. Алмаши, А.Ф. Наместникова. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 407 с.
3. Моисеева, Е.Л. Микробиология мясных и молочных продуктов при холодильном хранении. – М.: Агропромиздат, 1988. – 223 с.
4. Рахуба, Д.В. Криоконсервация пробиотических микроорганизмов: научные основы практического использования / Д.В. Рахуба, Г.И. Новик // Микробные технологии: фундаментальные прикладные аспекты: сб. науч. работ / Институт микробиологии НАН Беларуси. – Вып. 1. – Минск: Изд. И.П. Логвинов, 2007. – С. 268–276.
5. Цуцаева, А.А. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов / А.А. Цуцаева, А.Е. Ананьина, Л.М. Балыбердина, Л.В. Степанюк, Н.В. Павленко // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 5. – С. 696–700.
6. Ананьина, А.Е. Свойства промышленного штамма *Streptomyces fradiae* в зависимости от условий хранения // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 3. – С. 69.
7. Perry, S.F. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria / S.F. Perry // Mol. Biotechnol. – 1998. – V. 9. – № 1. – P. 59–64.
8. Pasarell, I. Viability of fungal cultures maintained at –70 degrees C / I. Pasarell, M.R. McGinnis // J. Clin. Microbiol. – 1992. – V. 30. – № 4. – P. 1000–1004.
9. Sakurada, M. Simple method for cryopreservation of an anaerobic rumen fungus using ethylene glycol and rumen fluid / M. Sakurada, Y. Tsuzuki, D.P. Morgavi, Y. Tomina, R. Onodera // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – V. 127. – № 3. – P. 171–174.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

E.V. Korotkaya, I.A. Korotkiy, E.A. Ibragimova

Development of the technology of low temperature preservation of thermophilic lactic acid starters

The article deals with the results of researches on the influence of freezing regimes and low temperature storages on the thermophilic lactic acid starter cultures *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. The starters' physico-chemical and microbiological characteristics have been investigated. Optimum regimes of freezing and storage temperatures of thermophilic lactic acid bacterial starter cultures in a frozen state were defined. On the basis of these studies the technology of low temperature preservation of thermophilic lactic acid starter cultures *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* has been developed.

Low temperature preservation, regimes and conditions of freezing, thermophilic lactic acid starters.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru