

Туяна Нимбуевна Занданова

Арктический государственный агротехнологический университет, доцент кафедры пищевых технологий и индустрии питания, кандидат технических наук, доцент, Якутск, Россия
E-mail: tuyana35@mail.ru

ВЫБОР КРИОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА СИМБИОТИЧЕСКОЙ ЗАКВАСКИ

Цель исследования – изучение влияния криопротекторов различного состава на сохранение микрофлоры бактериального концентрата симбиотической закваски при замораживании. Задачи исследования: выбор вида и дозы криопротектора для замораживания симбиотического бактериального концентрата; оценка уровня выживаемости жизнеспособных клеток; исследование ферментативной активности замороженного бактериального концентрата. Микрофлора бактериального концентрата идентична естественной закваске для производства курунги. Объектом исследования были криопротекторы глицерин, сахароза, желатин – вещества, препятствующие кристаллизации воды; бактериальный концентрат симбиотической курунговой закваски. В качестве базовой смеси использовали питательную среду с буферными солями. Применяли стандартные и общепринятые методы исследования. Титруемая кислотность – по ГОСТ 3624 титрованием 0,1 н. раствором едкого натра с фенолфталеином. Величина активной кислотности – по ГОСТ Р 53359-2009 потенциометрическим методом на приборе Анион-7000. Влияние криопротекторов на сохранение жизнеспособности микроорганизмов бактериального концентрата симбиотической закваски исследовали замораживанием в морозильной камере до –25 °С со скоростью охлаждения 100 °С в минуту. Эффективность криопротекторов оценивали по количеству жизнеспособных клеток основных групп микроорганизмов закваски и ферментативной активности размороженного бактериального концентрата. Полученные результаты показали, что применение 5 % глицерина и желатина свыше 5 % в составе защитной среды сохраняет исходные свойства бактериального концентрата, способствует выживанию дрожжевых клеток. Применение сахарозы обеспечивало сохранение только лактобактерий. Исследование ферментативной активности показало, что бактериальный концентрат, замороженный в защитной среде с 5 % глицерина, сквашивает молоко в течение 10–12 ч. Высокий уровень восстановления активности закваски связана с эндо- и экстрацеллюлярными свойствами глицерина.

Ключевые слова: симбиотическая закваска, курунга, защитная среда, глицерин, желатин, сахароза, бактериальный концентрат, консервирование, замораживание, выживаемость клеток.

Tuyana N. Zandanova

Cand. Tech. Sci., Assoc. Prof., Chair of Food Technologies and Food Industry, Arctic State Agrotechnological University, Yakutsk, Russia
E-mail: tuyana35@mail.ru

CRYOPROTECTORS SELECTION TO FREEZE BACTERIAL CONCENTRATE OF SYMBIOTIC STARTER

The aim of the research is to study the effect of cryoprotectors of various compositions on the preservation of the microflora of the bacterial concentrate of the symbiotic starter culture in the course of freezing. Research objectives are: selection of the type and dose of cryoprotectant for freezing the symbiotic bacterial concentrate; assessment of the level of survival of viable cells; study of the enzymatic activity of frozen bacterial concentrate. The bacterial concentrate microflora is identical to the natural ferment for the production of kurunga. The object of the research was the cryoprotectors glycerin, sucrose, gelatin - substances that prevent water crystallization; bacterial concentrate of symbiotic kurung starter culture. A nutrient medium with buffer salts was used as a base mixture. Standard and generally accepted research methods were used. Titratable acidity was according to GOST 3624 by titration with 0.1 n. sodium hydroxide solution with phe-

nolphthalein. The value of active acidity was according to GOST P 53359-2009 by potentiometric method on an Anion-7000 device. The effect of cryoprotectants on the preservation of the viability of microorganisms of the bacterial concentrate of the symbiotic starter culture was examined by freezing in a freezer to -25°C at a cooling rate of 100°C per minute. The effectiveness of cryoprotectants was assessed by the number of viable cells of the main groups of microorganisms in the starter culture and the enzymatic activity of the thawed bacterial concentrate. The results obtained showed that the use of 5 % glycerol and gelatin over 5% in the composition of the protective medium retains the original properties of the bacterial concentrate and promotes the survival of yeast cells. The use of sucrose ensures the preservation of only lactobacilli. The study of the enzymatic activity reveals that the bacterial concentrate, frozen in a protective environment with 5 % glycerin, ferments milk within 10–12 hours. The high level of restoration of the starter culture activity is associated with the endo – and extracellular properties of glycerin.

Keywords: *symbiotic starter culture, kurunga, protective environment, glycerin, gelatin, sucrose, bacterial concentrate, conservation, freezing, cell survival.*

Введение. При производстве бактериальных концентратов важнейшей задачей является сохранение качественных показателей в течение длительного времени. Наиболее распространенным способом консервирования бактериальных концентратов является замораживание и лиофилизация [4, 6, 9, 12]. Для защиты микроорганизмов от криповреждений применяют защитные среды [6, 9]. Растворы «истинных» криопротекторов при замораживании способствуют формированию так называемого стекловидного льда, в то время как соединения, неспособные к протекторному эффекту, образуют гексагональные кристаллы [6, 10]. Скорость образования льда, как известно, во многом зависит от способности того или иного вещества образовывать водородные связи – чем выше это свойство, тем быстрее снижается скорость роста кристаллов льда. Соединения, обладающие способностью образовывать большое количество водородных связей с жидкой фазой, проявляют защитные свойства. Такое свойство этих соединений способствует уменьшению количества способной к кристаллизации воды в клетке и изменению характера самой кристаллизации. Защитные вещества, связывающие водород до определенной степени, могут стабилизировать поверхностную гидратацию клетки за счет упрочнения гидратационных решеток, окружающих клетки, что уменьшает возможность их повреждения при замораживании [8, 9]. Эффективный криопротектор должен быть нетоксичным, при этом он должен поддерживать в растворенном состоянии соли и белки вплоть до эвтектического перехода в аморфное состояние, то есть его растворы должны иметь низкую эвтектическую температуру, чтобы сократить температурный интервал воздействия твердой фазы на структуру вещества в процессе замораживания и отогрева. Для низкотемпературной консервации бактерий чаще всего используют

глицерин в концентрациях 5–25 % в составе водных растворов, жидких питательных сред, в сочетании с другими криозащитными веществами [1]. Лучшей средой для консервации бактерий, имеющих медицинское значение, по сообщению R.K.A. Feltham с соавторами, является бульон Oxoid с 10 % глицерина. Выживаемость бактерий составляет 67–100 % [1, 11].

Из углеводов для хранения бактерий при низких температурах используют глюкозу, сахарозу, лактозу, трегалозу в концентрациях 5–15 %. Считается, что углеводы обладают менее выраженными криозащитными свойствами, чем глицерин, поэтому их рекомендуют применять в сочетании с другими протекторами. Однако было установлено, что протекторное действие сахарозы сопоставимо с глицерином для криоконсервации *P. putida*, *E. coli* и *B. Thuringiensis* [1]. Сахара, проникая в клетку и создавая там осмотическое давление, препятствуют образованию кристаллов льда и разрушению клетки в процессе замораживания [1, 5].

Среды, в которых в качестве коллоида вводятся желатин и агар-агар, нашли широкое применение при производстве сухих живых вакцин, так как они лишены антигенных свойств. Наиболее часто применяемая доза желатина в защитных средах составляет 1–2 % [6, 7, 12]. Желатин увеличивает стабилизирующее действие среды и позволяет хранить высушенные культуры без создания вакуума, не проникает в клетку, но заставляет клеточную оболочку плотнее прилегать к цитоплазме, что важно при размораживании [5, 7].

Цель исследования: изучение влияния криопротекторов различного состава на сохранение микрофлоры бактериального концентрата симбиотической закваски при замораживании.

В связи с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

– выбор вида и дозы криопротектора для замораживания симбиотического бактериального концентрата;

– оценка уровня выживаемости жизнеспособных клеток;

– исследование ферментативной активности замороженного бактериального концентрата.

Объект и методы исследования. Объектом исследования были крипротекторы глицерин, сахароза, желатин; бактериальный концентрат симбиотической курунговой закваски [2, 3].

Использовали стандартные и общепринятые методы исследования. Титруемая кислотность – по ГОСТ 3624 титрованием 0,1 н. раствором едкого натра с фенолфталеином, выражается в градусах Тернера. Величина активной кислотности – по ГОСТ Р 53359-2009 потенциометрическим методом на приборе Анион-7000.

Исследовали влияние криопротекторов на сохранение жизнеспособности микроорганизмов бактериального концентрата симбиотической закваски замораживанием в морозильной камере до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью охлаждения $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту. В качестве базовой смеси использовали свежую питательную среду с буферными солями. Выживаемость клеток после замораживания оценивали по количеству жизнеспособных бакте-

рий относительно количества микроорганизмов в бактериальном концентрате до замораживания. Количество микроорганизмов оценивали методом предельных разведений на среде MRS культивированием: термофильные лактобактерии – при $42\text{ }^{\circ}\text{C}$; мезофильные лактобактерии – при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для определения количества жизнеспособных клеток дрожжей использовали следующие среды:

– дрожжи, сбраживающие лактозу, на картофельно-лактозной среде культивированием при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;

– дрожжи, не сбраживающие лактозу, на картофельно-глюкозной среде культивированием при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Результаты исследования и их обсуждение. При замораживании большое внимание уделяется составу защитных сред, обеспечивающих внутри- и внеклеточную защиту при замораживании. В качестве криопротекторов были использованы следующие вещества: глицерин, сахароза, желатин, – широко применяемые для консервирования микроорганизмов и обеспечивающие их высокую выживаемость [1, 4, 5, 7, 11]. В таблице 1 представлены характеристики образцов, использованных для исследования.

Таблица 1

Содержание криопротекторов в защитной среде

Номер образца	Количество криопротектора, %		
	Глицерин	Желатин	Сахароза
1	2	–	–
2	5		
3	7		
4		2	
5		5	
6		7	
7			2
8			5
9			7

Для выбора криопротекторов одинаковое количество бактериального концентрата симбиотической закваски вносили в стеклянные флаконы, в которые затем вносили криопротекторы в разных концентрациях. Замораживание проводили при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью охлаждения $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. После 24-часовой выдержки при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ флаконы

размораживали в водяной бане при $37\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Из размороженных заквасок делали посеvy методом предельного разведения в питательные среды для количественного учета термофильных, мезофильных лактобактерий, дрожжей, сбраживающих и не сбраживающих лактозу. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Выживаемость клеток после замораживания

Номер образца	Количество микроорганизмов симбиотической закваски, КОЕ/см ³			
	Лактобактерии		Дрожжи	
	термофильные	мезофильные	сбраживающие лактозу	не сбраживающие лактозу
Бакконцентрат до замораживания	$8 \cdot 10^{11}$	$6 \cdot 10^{10}$	$7 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^{10}$
1	$4 \cdot 10^{10}$	$7 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$
2	$2 \cdot 10^{11}$	$5 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^{10}$
3	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$
4	$4 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^9$
5	$5 \cdot 10^{11}$	$5 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^{10}$
6	$3 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^{10}$
7	$7 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$
8	$3 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$
9	$2 \cdot 10^{11}$	$5 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^9$

Из таблицы 2 видно, что присутствие 5 % глицерина и более 5 % желатина в защитной среде благотворно влияет на выживаемость дрожжей, наиболее уязвимых к замораживанию, и молочнокислых бактерий. Кроме этого, в указанных образцах сохраняется исходное количественное соотношение основных групп микроорганизмов симбиотической закваски.

Для оценки ферментативной активности образцов 2 и 5 проводили культивирование на пасте-

ризованном охлажденном до 30 °С обезжиренном молоке. Для сквашивания вносили 1 ед. закваски (из расчета 25 мл на 100 кг молока). В качестве контроля использовали кисломолочный продукт курунга, полученный сквашиванием обезжиренного молока жидкой пересадочной закваской. Результаты оценки качественных показателей образцов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Качественная оценка ферментативной активности образцов

Показатель	Контроль	Образец 2	Образец 5
Органолептические показатели	Вкус кисломолочный, с дрожжевым привкусом, консистенция жидкая, хлопьевидная, слегка газированная		
Активная кислотность, pH	$3,6 \pm 0,1$	3,6	3,6
Титруемая кислотность, °Т	200–220	202	204
Продолжительность, ч	14–15	12	14
Количество жизнеспособных микроорганизмов, КОЕ/см ³ :			
термофильные лактобактерии	10^6	10^8	10^8
мезофильные лактобактерии	10^9	10^9	10^9
дрожжи, сбраживающие лактозу	10^7	10^5	10^4
дрожжи, не сбраживающие лактозу	10^5	10^5	10^5

Из таблицы 3 видно, что наибольшей ферментативной активностью обладает образец, где в качестве криопротектора использовали глицерин. Вероятно, это связано с тем, что глицерин обладает смешанным эффектом действия – эндо-экстрацеллюлярным [6]. Применение замороженного концентрата на 2 часа ускоряет продолжительность сквашивания молока до pH 3,6 в сравнении с контролем.

Выводы. Установлено, что защитная среда, содержащая 5 % глицерина, обеспечивает высокий уровень выживаемости микроорганизмов закваски при замораживании и обеспечивает сохранение исходного количественного соотношения основных групп микроорганизмов бактериального концентрата.

Ферментативная активность бактериального концентрата, замороженного в защитной среде с 5 % глицерина, превосходит пересадочную жидкую курунговую закваску на 2–3 ч.

Литература

1. Грачева И.В. и др. Традиционные и новые защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. Вып. 110. С. 36–40.
2. Занданова Т.Н., Гоголева П.А. Исследование биотехнологического потенциала микробного консорциума // Вестник ВСГУТУ. 2017. № 3 (66). С. 71–77.
3. Занданова Т.Н., Лосорова Ю.Е., Мыр'янова Т.П. Исследование возможности получения ассоциативной закваски для производства курунги // Вестник КрасГАУ. 2020. № 9. С. 185–192.
4. Королева Н.С., Пятницына И.Н., Банникова Л.А. Способ приготовления сухих заквасок // Молочная промышленность. 1984. № 5. С. 27–29.
5. Котлов С.А. Оптимизация криопротекторов для лиофилизации вакцинных штаммов Salmonella // Биологический журнал. 2019. № 5. URL: <https://bio-j.ru/journal/bio-j/2019/06/articles/124.pdf>.
6. Кригер О.В., Носкова С.Ю. Разработка приемов длительного сохранения свойств молочнокислых микроорганизмов // Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 49, № 4. С. 30–37.
7. Куплетская М.Б., Нетроусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения // Микробиология. 2011. Т. 80, № 6. С. 842–846.

8. Перфильева Г.Д., Гудкова А.В., Шергин Н.А., Сорокина Н.П. Производство и применение бактериальных заквасок и препаратов в сыроделии. М.: Изд-во ЦНИИТЭИмясомолпром, 1985. 36 с.
9. Фролова М.Д. Особенности разработки лиофилизированных заквасок // Молочная промышленность. 2008. № 6. С. 70–71.
10. Харитонов Д.В. Некоторые особенности замораживания микроорганизмов в среде жидкого азота // Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ–80): сб. науч. тр. М.: Изд-во ВНИМИ, 2009. С. 393–397.
11. Feltham R.K.A., Power A.K., Pell P.A., Sneath P.H.A. A simple method for the storage of bacteria at -70°C . J. Appl. Bacteriol. 1978; 44:313–6.
12. Sukhikh S. A., Krumlikov V.Y., Evsukova A.O. et al. Formation and study of symbiotic consortium of lactobacilli to receive a direct application starter // Foods and Raw Materials. 2017. Vol. 5, № 1. P. 51–62. DOI: 10.21179/2308-4057-2017-1-51-62.

Literatura

1. Gracheva I.V. i dr. Tradicionnye i novye zaschitnye sredy dlya nizkotemperaturnoj konservacii bakterij // Problemy osobo opasnyh infekcij. 2011. Vyp. 110. S. 36–40.
2. Zandanova T.N., Gogoleva P.A. Issledovanie bioteknologicheskogo potenciala mikrobnogo konsorciuma // Vestnik VSGUTU. 2017. № 3 (66). S. 71–77.
3. Zandanova T.N., Losorova Yu.E., Myr'yanova T.P. Issledovanie vozmozhnosti polucheniya associativnoj zakvaski dlya proizvodstva kurungi // Vestnik KrasGAU. 2020. № 9. S. 185–192.
4. Koroleva N.S., Pyatnitsyna I.N., Bannikova L.A. Sposob prigotovleniya suhih zakvasok // Molochnaya promyshlennost'. 1984. № 5. S. 27–29.
5. Kotlov S.A. Optimizaciya krioprotektorov dlya liofilizacii vakcinnyh shtammov Salmonella // Biologicheskij zhurnal. 2019. № 5. URL: <https://bio-j.ru/journal/bio-j/2019/06/articles/124.pdf>.
6. Kriger O.V., Noskova S.Yu. Razrabotka priemov dlitel'nogo sohraneniya svojstv molochnokislyh mikroorganizmov // Tehnika i tehnologiya pischevyh proizvodstv. 2018. T. 49, № 4. S. 30–37.
7. Kupletskaya M.B., Netrousov A.I. Zhiznesposobnost' liofilizirovannyh mikroorganizmov posle 50 let hraneniya // Mikrobiologiya. 2011. T. 80, № 6. S. 842–846.
8. Perfil'eva G.D., Gudkova A.V., Shergin N.A., Sorokina N.P. Proizvodstvo i primenenie bakteriálnykh zakvasok i preparatov v syrodellii. M.: Izd-vo CNIIТЭImyasomolprom, 1985. 36 s.

9. *Frolova M.D.* Osobennosti razrabotki liofilizirovannyh zakvasok // *Molochnaya promyshlennost'*. 2008. № 6. S. 70–71.
10. *Haritonov D.V.* Nekotorye osobennosti zamorazhivaniya mikroorganizmov v srede zhidkogo azota // *Nauchnoe obespechenie molochnoj promyshlennosti (VNIMI-80): sb. nauch. tr. M.: Izd-vo VNIMI, 2009. S. 393–397.*
11. *Feltham R.K.A., Power A.K., Pell P.A., Sneath P.H.A.* A simple method for the storage of bacteria at –70 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 1978; 44:313–6.
12. *Sukhikh S. A., Krumlikov V.Y., Evsukova A.O. et al.* Formation and study of symbiotic consortium of lactobacilli to receive a direct application starter // *Foods and Raw Materials*. 2017. Vol. 5, № 1. P. 51–62. DOI: 10.21179/2308-4057-2017-1-51-62.

