



ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДОВОЛЬСТВЕННЫХ ПРОДУКТОВ

Научная статья/Research Article

УДК 615.37.613.287

DOI: 10.36718/1819-4036-2022-11-165-170

Туяна Нимбуевна Занданова

Арктический государственный агротехнологический университет, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

tuyana35@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА

Цель исследования – изучение влияния условий замораживания на протеолитическую активность симбиотической закваски. Замораживание проводили в холодильнике LGPv 8420, Liebherr. В качестве криопротекторов использовали растворы глицерина, желатина и сахарозы, которыми суспендировали концентрированную бактериальную массу. В результате исследования данных термического анализа получена термограмма процесса замораживания симбиотической закваски. Установлена криоскопическая температура минус 2,8 °С, оптимальная температура замораживания минус 25 °С и продолжительность процесса 90 мин. Далее были проведены исследования протеолитической активности размороженных образцов на молочном агаре. Исследование влияния различных криопротекторов на сохранение протеолитической активности бактериального концентрата свидетельствует, что применение глицерина в качестве защитной среды положительно сказывается на его функциональных свойствах. Протеолитическая активность микрофлоры влияет на формирование аминокислотного состава продукта. Проведен анализ аминокислотного состава продукта, полученного сквашиванием молока размороженным бактериальным концентратом. Для контроля использовали курунгу на жидкой курунговой закваске на обезжиренном молоке. Аминокислотный анализ образцов проводился методом ионной хроматографии с постколоночной дериватизацией аминокислот нингидрином в кислотном гидролизате образца на аминокислотном анализаторе INGOSAAA-400. Определен уровень сбалансированности аминокислотного состава молока, заквашенного размороженным бактериальным концентратом с глицерином. Полученные данные позволили установить, что замораживание при минус 25 °С в течение 90 мин с глицерином позволяет сохранить высокую протеолитическую активность микробного консорциума и получать молочный продукт с полноценным белковым составом.

Ключевые слова: курунга, аминокислоты, автоселекция, биологическая ценность, молочно-кислые бактерии, бактериальный концентрат, аминокислотный скор, кисломолочные продукты смешанного брожения, микробный консорциум, естественная закваска

Для цитирования: Занданова Т.Н. Влияние замораживания на протеолитическую активность бактериального концентрата // Вестник КрасГАУ. 2022. № 11. С. 165–170. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-11-165-170.

Tuyana Nimbuevna Zandanova

Arctic State Agrotechnological University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia

tuyana35@mail.ru

FREEZING EFFECT ON BACTERIAL CONCENTRATE PROTEOLYTIC ACTIVITY

The purpose of research is to study the effect of freezing conditions on the proteolytic activity of symbiotic starter. Freezing was carried out in a refrigerator LGPv 8420, Liebherr. Solutions of glycerol, gelatin, and sucrose were used as cryoprotectants, with which the concentrated bacterial mass was suspended. As a result of the research of thermal analysis data, a thermogram of the process of freezing a symbiotic starter was obtained. A cryoscopic temperature of minus 2.8 °C, an optimal freezing temperature of minus 25 °C, and a process duration of 90 minutes were established. Further studies were carried out on the proteolytic activity of thawed samples on milk agar. The study of the effect of various cryoprotectants on the preservation of the proteolytic activity of the bacterial concentrate indicates that the use of glycerol as a protective medium has a positive effect on its functional properties. The proteolytic activity of the microflora affects the formation of the amino acid composition of the product. The paper analyzes the amino acid composition of the product obtained by fermenting milk with a thawed bacterial concentrate. For control, kurunga was used on liquid kurunga sourdough on skimmed milk. Amino acid analysis of the samples was carried out by ion chromatography with post-column derivatization of amino acids with ninhydrin in the acid hydrolyzate of the sample on an INGOSAAA-400 amino acid analyzer. The level of balance of the amino acid composition of milk fermented with thawed bacterial concentrate with glycerin was determined. The data obtained made it possible to establish that freezing at minus 25 °C for 90 minutes with glycerin allows maintaining the high proteolytic activity of the microbial consortium and obtaining a dairy product with a complete protein composition.

Keywords: kurunga, amino acids, autoselection, bioavailability, lactics, bacterial concentrate, amino acid score, mixed fermented dairy products, microbial consortium, natural starter

For citation: Zandanova T.N. Freezing effect on bacterial concentrate proteolytic activity // Bulliten KrasSAU. 2022;(11): 165–170. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-11-165-170.

Введение. Основным этапом в производстве бактериальных заквасок является консервирование. Замораживание является распространенным способом длительного сохранения жизнеспособности микробиологических препаратов. Воздействие низких температур может привести к повреждению плазматической мембраны, клеточной оболочки, денатурации белков, изменению ДНК микроорганизмов из-за внутри- и внеклеточного образования льда. Это ведет к денатурации белков и нарушению барьеров проницаемости [1]. На устойчивость микроорганизмов к замораживанию влияют условия и стадия развития, температура и скорость замораживания, среда замораживания. Повышают выживаемость клеток внесением различных защитных сред для замедления процессов внутриклеточного льдообразования [2–6].

Для сохранения высокой жизнеспособности микроорганизмов используют различные питательные среды: желатин, глицерин, обезжирен-

ное молоко, пептон, сахарозу, сорбит, поливинилпирролидон, глутамат натрия и их комбинации [7].

Цель исследования – изучение протеолитической активности замороженного бактериального концентрата (ЗБК) курунговой закваски.

Задачи: определение температуры и продолжительности замораживания бактериального концентрата; изучение влияния криопротекторов на протеолитическую активность размороженного бактериального концентрата; анализ аминокислотного состава курунги, полученной сквашиванием молока размороженным бактериальным концентратом.

Материалы и методы. Для исследования использовали общепринятые, стандартные и оригинальные методы биохимического, физико-химического и микробиологического анализа.

Для оценки протеолитической активности бактериального концентрата 1 мл исследуемого продукта вносили пипеткой в чашки Петри и за-

ливали 10–15 мл расплавленного и охлажденного до 40–45 °С молочного агара. Посевной материал тщательно перемешивали с молочным агаром. Пробы термостатировали при температуре 30 °С в течение 48 ч. Гидролиз казеина обнаруживали по зоне просветления среды вокруг колонии [8].

Аминокислотный анализ образцов проводился методом ионной хроматографии с постколоночной дериватизацией аминокислот нингидрином в кислотном гидролизате образца на аминокислотном анализаторе INGOSAAA-400.

Оценку биологической ценности проводили по методике И.А. Рогова и Н.Н. Липатова по ко-

эффициентам различий аминокислотного скора (КРАС) и биологической ценности (БЦ).

Результаты и их обсуждение. На этапе замораживания формируются кристаллы льда и определяется микроструктура бактериального концентрата. При разработке технологии замороженного бактериального концентрата необходимо определить криоскопическую температуру – температуру начала кристаллизации содержащейся в ней влаги. Динамика изменения температуры при замораживании бактериального концентрата представлена на таблице 1.

Таблица 1

Динамика температуры при замораживании бактериального концентрата

Показатель	Значение												
Продолжительность замораживания, мин	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Температура, °С	10	-2,8	-1,3	-1,5	-2,6	-9,5	-20	-23	-24	-25	-25	-25	-25

Из данных таблицы 1 видно, что полученный температурный профиль замораживания бактериального концентрата можно разделить на три участка. В течение 10 мин наблюдается резкое снижение температуры с постоянной скоростью до 2,8 °С. Затем наблюдается повышение температуры и равновесное состояние в течение 30 мин. В течение этого времени происходит кристаллизация влаги, снижение температуры замедляется. Известно, что при зарождении кристаллов происходит выделение скрытой теплоты [9]. Потом температура умеренно уменьшается и через 90 мин наступает полное замораживание льда при температуре минус 25 °С.

При замораживании необходимо обеспечить защиту микроорганизмов от криповреждений. В качестве криопротекторов использовали глицерин, сахарозу, желатин, широко применяемые для консервирования микроорганизмов и обеспечивающие их высокую выживаемость.

В таблице 2 представлены данные сравнительного анализа протеолитических свойств исследуемых образцов. В качестве контроля использовали исходный инокулят – жидкую кунгуровую симбиотическую закваску на обезжиренном молоке.

Таблица 2

Влияние криопротекторов на протеолитическую активность бактериального концентрата при замораживании

Образец	Диаметр зоны просветления вокруг колоний через 48 ч культивирования, мм
Контроль – исходный инокулят	32±5
Бактериальный концентрат + желатин	20±5
Бактериальный концентрат + глицерин	45±5
Бактериальный концентрат + сахароза	3±2

Из представленных в таблице 2 данных следует, что бактериальный концентрат, замороженный с глицерином, проявляет большую протеолитическую активность. Вероятно, это связано с высокой концентрацией микроорганизмов в бактериальном концентрате и смешанным эндо-экстрацеллюлярным действием глицерина на клетки при замораживании.

От протеолитической активности заквасочных культур зависит аминокислотный состав готового продукта [10, 11]. В таблице 3 представлены ре-

зультаты оценки аминокислотного состава молока, заквашенного бактериальным концентратом с глицерином. Для сравнения использовали образец, заквашенный исходной жидкой курунговой закваской на обезжиренном молоке.

Сквашивание молока проводили в течение 8–10 ч до достижения титруемой кислотности в образцах курунги 120 °Т. Результаты исследования аминокислотного состава образцов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Содержание незаменимых аминокислот

Аминокислота	Количество, мг/100 г продукта	
	Курунга на жидкой закваске	Курунга на ЗБК
Валин	126	129
Лейцин	218	227
Изолейцин	148	140
Фенилаланин + тирозин	179	168
Метионин + цистин	87	84
Лизин	218	216
Триптофан	22	22
Треонин	112	115
Общее количество незаменимых аминокислот	1110	1101

Из данных таблицы 3 видно, что количественное соотношение незаменимых аминокислот в курунге, заквашенной ЗБК и жидкой курунговой закваской, практически не отличается.

Результаты расчета аминокислотного сора исследуемых образцов представлены в таблице 4.

Таблица 4

Аминокислотный сора белков кисломолочных продуктов

Аминокислота	Рекомендуемое кол-во по FAO/ВОЗ, мг/г белка	Значение аминокислотного сора, %	
		Курунга на жидкой закваске	Курунга на ЗБК
Валин	39	115	117
Лейцин	59	132	137
Изолейцин	30	176	166
Фенилаланин + тирозин	38	168	157
Метионин + цистин	22	140	136
Лизин	45	173	171
Триптофан	6	133	133
Треонин	23	173	178

Из таблицы 4 видно, что белки исследуемых кисломолочных продуктов характеризуются полноценным аминокислотным составом. По всем незаменимым аминокислотам во всех образцах наблюдается избыток относительно физиологических потребностей организма человека.

Коэффициент различия аминокислотного сора (КРАС) и биологическая ценность белка (БЦ) указывают предельно возможный уровень использования азота белка на пластические цели (табл. 5).

Таблица 5

Показатели сбалансированности аминокислотного состава кисломолочных продуктов, %

Показатель	Курунга на жидкой закваске	Курунга на БКМК
КРАС	36,5	35,37
БЦ	63,5	64,6

Из таблицы 5 видно, что сбалансированность состава незаменимых аминокислот в обоих образцах курунги имеет почти одинаковые значения. Полученные данные свидетельствуют о соответствии биохимической активности бактериального концентрата микробного консорциума естественной курунговой закваске и возможности получения продукта с биологически ценным составом белка, характерным для традиционного напитка.

Заключение. В результате проведенного исследования установлено, что замораживание бактериального концентрата в течение 90 мин до температуры минус 25 °С с глицерином позволяет сохранить высокую протеолитическую активность закваски и производить курунгу с высокой биологической активностью.

Список источников

1. Математическое моделирование этапа замораживания в технологии лиофилизированных лекарственных форм / *Е.В. Блынская* [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. 2018. Т. 17, № 2. С. 15–21.
2. *Занданова Т.Н.* Выбор криопротекторов для замораживания бактериального концентрата симбиотической закваски // Вестник КрасГАУ. 2021. № 3 (168). С. 163–168.
3. *Короткая Е.В.* Влияние замораживания на активность некоторых видов молочнокислых бактерий // Инновации в биотехнологии: сб. тр. Междунар. симпозиума / под общ. ред. *А.Ю. Просекова*. Кемерово: Кемеров. гос. ун-т, 2018. С. 188–192.
4. Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation / *J. Meneghel* [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. 2017. Vol. 101. Issue 4. P. 1427–1441. DOI: 10.1007/s00253-016-7935-4.
5. *Buaynov O.N., Buaynova I.V.* The physical and chemical changes of water and the hydration of the protein complex in cheese during freezing // Foods and Raw Materials. 2016. Vol. 4, № 1. P. 13–18. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-1-13-18.
6. *Fonseca F., Béal C., Corrieu G.* Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage // Cryobiology. 2001. Vol. 43 (3). P. 189–198. DOI: 10.1006/cryo.2001.2343.
7. *Фролова М.Д.* Особенности разработки лиофилизированных заквасок // Молочная промышленность. 2008. № 6. С. 70–71.
8. *Банникова Л.А.* Микробиологические основы молочного производства. Москва: Рипол Классик, 1987.
9. *Kandil S., Soda E.* Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains // Advances in Microbiology. 2015. № 5. P. 371–382. DOI: 10.4236/aim.2015.56039.
10. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria / *J.E. Christensen* [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. Vol. 76. P. 217–246.

11. The proteolytic systems of lactic acid bacteria / *E.R.S. Kunji* [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996. Vol. 70. P. 187–221.

References

1. Matematicheskoe modelirovanie `etapa zamorazhivaniya v tehnologii liofilizirovannykh lekarstvennykh form / *E.V. Blynskaya* [i dr.] // *Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2018. T. 17, № 2. S. 15–21.
2. *Zandanova T.N.* Vybory krioprotektorov dlya zamorazhivaniya bakterial'nogo koncentrata simbioticheskoy zakvaski // *Vestnik KrasGAU*. 2021. № 3 (168). S. 163–168.
3. *Korotkaya E.V.* Vliyaniye zamorazhivaniya na aktivnost' nekotorykh vidov molochnokislykh bakterij // *Innovacii v biotekhnologii: sb. tr. Mezhdunar. simpoziuma / pod obsch. red. A.Yu. Prosekov*. Kemerovo: Kemerov. gos. un-t, 2018. S. 188–192.
4. Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation / *J. Meneghel* [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017. Vol. 101. Issue 4. P. 1427–1441. DOI: 10.1007/s00253-016-7935-4.
5. *Buaynov O.N., Buaynova I.V.* The physical and chemical changes of water and the hydration of the protein complex in cheese during freezing // *Foods and Raw Materials*. 2016. Vol. 4, № 1. P. 13–18. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-1-13-18.
6. *Fonseca F., Béal C., Corrieu G.* Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage // *Cryobiology*. 2001. Vol. 43 (3). P. 189–198. DOI: 10.1006/cryo.2001.2343.
7. *Frolova M.D.* Osobennosti razrabotki liofilizirovannykh zakvasok // *Molochnaya promyshlennost'*. 2008. № 6. S. 70–71.
8. *Bannikova L.A.* *Mikrobiologicheskie osnovy molochnogo proizvodstva*. Moskva: Ripol Klassik, 1987.
9. *Kandil S., Soda E.* Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains // *Advances in Microbiology*. 2015. № 5. P. 371–382. DOI: 10.4236/aim.2015.56039.
10. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria / *J.E. Christensen* [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999. Vol. 76. P. 217–246.
11. The proteolytic systems of lactic acid bacteria / *E.R.S. Kunji* [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996. Vol. 70. P. 187–221.

Статья принята к публикации 10.10.2022 / The article accepted for publication 10.10.2022.

Информация об авторах:

Туяна Нимбуйевна Занданова, доцент кафедры пищевых технологий и индустрии питания, кандидат технических наук, доцент

Information about the authors:

Tuyana Nimbuevna Zandanova, Associate Professor at the Department of Food Technologies and Food Industry, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor

