

О СПОСОБАХ ХРАНЕНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Л.Г. АКОПЯН, Л.М. ЧАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Исследования по культивированию, замораживанию, высушиванию, хранению в замороженном состоянии, восстановлению сухих культур молочнокислых бактерий при различных температурных режимах показали, что они сохраняют жизнеспособность в замороженном состоянии при температуре - 12-18° в течение 6-12 месяцев, при 4-6° - в течение 5 мес., при 18-20° - 10 дней, при 37° - 6 дней; лиофилизация обеспечивает повышенное содержание бактериальных клеток, стойкость хранения, гарантирует восстановление из длительно хранившихся сухих заквасок.

Կաթնաթթվային բակտերիաների կուլտիվացման, սառեցման, չորացման, սառեցված վիճակում պահպանման, չոր կուլտուրաների տարրեր ջերմային ռեժիմներում վերականգնման հետազոտությունները ցույց են տվել, որ կաթնաթթվային բակտերիաները պահպանում են իրենց կենսունակությունը - 12-18° 6-12 ամիս, 4-6°-ում 150 օր, 18-20°-ում - 10 օր, 37°-ում - 6 օր, լիոֆիլիզացիան ապահովում է բակտերիալ բջիջների բանակի ավելացումը, նրանց կայունությունը, երկարատև պահպանման ժամանակ երաշխավորում է չոր մակարիդների վերականգնումը:

Studies on cultivation, freezing, drying, preservation in frozen state, restoration of dry cultures of the lactic acid bacteria have been carried out. The lactic acid bacteria retain their viability in frozen state at 12-18° for 6-12 months, at 4-6° - 150 days, at 18-20° - 10 days, at 37° - 6 days. Lyophilization provides decrease of bacterial cells, their stability at long-term preservation, guarantees restoration of dry starters.

Молочнокислые бактерии - способы хранения

Одним из способов сохранения молочнокислых бактерий (мкб) являются периодические их перевивки в стерильное обезжиренное молоко. Однако исследования в этой области показали, что при периодических перевивках в стерильное обезжиренное молоко мкб постепенно утрачивают производственноценные свойства, активность кислотообразования, способность образовывать четырехуглеродные соединения, протеолитическую активность и т.д. Замечено, что стойкость во многом зависит от режима культивирования [3].

Лучшим способом сохранения производственноценных штаммов мкб является их высушивание лиофилизацией в ампулах и дальнейшее хранение в холодильнике. Данный метод сушки в настоящее время находит все большее применение для приготовления сухих заквасок. Хотя замораживание и последующее высушивание не может гарантировать сохранение всех свойств молочнокислых бактерий, данный метод дает возможность длительно сохранять жизнеспособность и все важнейшие физиолого-биохимические свойства микроорганизмов. Большое влияние на выживаемость клеток при сушке и последующем хранении сухих культур оказывает состав среды.

Для лучшего сохранения клеток при сушке и повышения стойкости сухих мкб при хранении многие авторы рекомендуют добавлять к среде

различные вещества [1, 4]. Однако при этом не устранялось полностью, а лишь несколько смягчалось губительное действие продуктов жизнедеятельности мкб. Дальнейшее совершенствование способа сохранения мкб лиофилизационной сушкой шло в направлении применения при сушке культур защитной среды. Многие из авторов как в бывшем СССР, так и зарубежом рекомендовали различные по составу и свойствам защитные среды. При высушивании данных культур в качестве защитной среды широко применяли обезжиренное молоко с повышенным содержанием сухих веществ (16-18% и более) и различными дополнительными компонентами [7, 8].

Главными факторами, определяющими выживаемость микроорганизмов при лиофилизационной сушке, являются температура, скорость замораживания и температура хранения. Чем выше температура хранения, тем больше гибнет клеток в сухих культурах (заквасках). Из изложенного следует, что качество и стойкость сухих заквасок зависит не только от биологических особенностей микроорганизмов, но и от параметров технологического процесса и условий их хранения [9].

Целью настоящих исследований являлось изучение влияния режима культивирования, различных методов хранения, замораживания и условий восстановления сухих заквасок мкб на жизнеспособность и свойства культур.

Материал и методика. Сухие и жидкие мкб получены в лаборатории бродильных микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении и депонированы в Центре депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки Армении и в лаборатории заквасок Научно-исследовательского института молочной промышленности (Россия-ВНИМИ). Испытаны штаммы мкб следующих видов: *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ер.317/402 "Наринэ" - ИНМИА-9602 (*L. acidophilus*) [5, 6], *Lactobacterium mazuni* №2 "Каринэ" - ИНМИА-9604 (*Lbm. mazuni*) [6], *L. acidophilus* ЕН₁, ЕН₂ (автор штаммов *L. acidophilus* ЕН₁, ЕН₂ Л.А.Ерзинкян.). Титруемую кислотность определяли в градусах Тернера (°Т), количество мкб определяли методом предельных разведений по Мак-Креди [11].

Для приготовления сухой закваски в стерилизованное (1 атм, 15 мин) остуженное молоко жирностью 2,7-3,0% добавляли дрожжевой автолизат - 1,5-2,0%, гидролизованное молоко - 5 г/л и пепсин - 0,00015%. Эти добавки стимулируют развитие клеток. Затем молоко заквашивали мкб и выдерживали в термостате при 37-38° в течение 7-8 ч. Через 3, 5 ч проводили нейтрализацию среды (рН 6,6-6,8) 25%-ным водным раствором NaHCO₃. Скващенное молоко выдерживали 2-3 ч в холодильнике при 5-8°. Для приготовления сухой закваски жидкую закваску перемешивали в стерильных условиях, у горячей спиртовой горелки разливали в стерильные (2 атм, 5 мин) склянки, которые закрывали стерильными резиновыми пробками и металлическими колпачками и замораживали при - 50-55° в течение 2-2,5 ч. После замораживания, убрав металлические колпачки и резиновые пробки, склянки закрывали стерильными (2 атм) ватными пробками и высушивали в течение 22-24 ч при начальной температуре сушки 30° и конечной - 37-39° [2]. Антагонистическое свойство мкб определяли методом диффузии в агар [11].

Результаты и обсуждение. Влияние сроков культивирования на развитие мкб. Опыты проводили в два этапа.

Первый этап - мкб культивировали в стерильном молоке в течение 7, 20 и 30 дней при 37°. Из табл. 1 видно, что при перевивке культур через 20-30 суток не наблюдалось существенной разницы в энергии кислотообразования.

Второй этап - культивирование на стерилизованном обезжиренном молоке в течение 60, 90, 120 и 150 дней. По данным той же таблицы,

культуры лучше сохраняются при перевивке через 7-30 суток. Указанные сроки являются наиболее оптимальными для перевивок.

Таблица 1. Выживаемость и кислотообразование мкб при периодических перевивках

Мкб и штаммы	Энергия кислотообразования, °Т						
	перевивки через, сут						
	7	20	30	60	90	120	150
<i>Lactobacillus acidophilus</i> n.v. Ер.317/402 "Наринэ"	180	172	168	150	130	100	90
<i>L. acidophilus</i> 4 ар/8	160	152	150	130	125	105	85
<i>L. acidophilus</i> ЕН ₁	150	145	140	112	100	85	70
<i>L. acidophilus</i> ЕН ₂	150	140	138	110	90	82	68
<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринэ"	150	145	150	120	100	90	75

Примечание: температура культивирования 37°.

Замораживание и хранение в замороженном состоянии. Изучение влияния хранения различных видов мкб в замороженном состоянии на их жизнеспособность, биологическую активность (кислотообразование, титр клеток) показало (табл. 2), что жизнеспособность испытуемых штаммов в замороженном состоянии, при температуре от -12 до -18° сохраняется без изменений свойств в течение 6-12 месяцев. Кроме того видно, что концентрация сухих веществ в молоке также влияет на сохранение жизнеспособности замороженных культур: она должна составлять не менее 16%.

Таблица 2. Сохранение жизнеспособности мкб в замороженном состоянии

Наименование микроорганизмов	Сроки замораживания, мес.			
	6		12	
	предельная кислотность в °Т* на стерильном обезжиренном молоке			
	11% сухого вещества	16% с.в.	11% с.в.	16% с.в.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 317/402 “Наринэ”	450	500	350	400
<i>L. acidophilus</i> 4 ар/8	350	400	300	350
<i>Lbm. mazuni</i> №2 “Каринэ”	300	350	250	300

Примечание: * кислотность после 3-кратных перевивок.

Хранение при разных температурных режимах. Опыты показали, что при низкой температуре (+4°) жидкие закваски остаются активными в течение 15 сут. При температуре 18-20° жидкие закваски сохраняют жизнеспособность в течение 150 дней, за исключением *Lbm. mazuni* №2 "Каринэ".

При 18-20° уже на 10 сут отмечалось значительное изменение этих показателей. При добавлении к среде дрожжевого автолизата, гидролизованного молока выживаемость мкб продлевается (табл. 3).

Высушивание и хранение сухих культур. Молочная кислота, являясь продуктом жизнедеятельности мкб, в определенных количествах сама же подавляет их развитие, снижает титр клеток. Установлено, что чем выше

титр мкб в сухой закваске, тем больше продолжительность ее хранения и тем лучше ее производственные свойства.

Таблица 3. Хранение мкб при разных температурных режимах

Наименование микроорганизма	Выживаемость, дни														
	30	60	90	120	150	180	5	10	15	20	1-3	4	5	6	7
	4°						18-20°				37°				
<i>L. acidophilus</i> п.в. Ер.317/402“Наринэ”	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> 4 аг/8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Lbm. mazuni</i> №2 “Каринэ” (с добавлением 2,5-2% дрожжевого автолизата и 5% гидролизованного молока	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>L. acidophilus</i> п.в. Ер.317/402 (дрож. авт., гид. мол.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. acidophilus</i> 4 аг/8 (дрож. гид.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

С целью повышения активности роста мкб использовали 1,5-2,0%-ный дрожжевой автолизат. В процессе культивирования в среде накапливаются стимуляторы роста мкб, в частности, витамины группы В. Кроме того, внесение в молоко естественных биологических субстратов - гидролизата обезжиренного молока (5 г/л), содержащего продукты распада белков молока (полипептиды, аминокислоты), микроэлементов и других веществ, положительно влияет на сохранение микрофлоры и обеспечивает повышение активного выхода готового продукта. В среду вносили также пепсин, который предварительно растворяли в 100 мл стерильного физиологического раствора. Пепсин, являясь протеолитическим ферментом животного происхождения, проводит гидролиз белков молока до аминокислот, которые хорошо усваиваются мкб и стимулируют их рост. Установлено, что дрожжевой автолизат, гидролизованное молоко и пепсин способствуют увеличению титра клеток (табл. 4). Последний увеличивается также благодаря активному снижению величины рН путем периодической нейтрализации среды 25%-ным водным раствором NaHCO_3 .

Исследования показали также, что бактериальная чистота сухой закваски (по микроскопическому препарату), продолжительность свертывания молока, сроки ее хранения, характер сгустка, титр клеток, органолептические свойства выше и лучше, чем в контроле (табл. 5).

В табл. 6 приведены технологические параметры для получения сухой закваски. Установлено, что для сохранения активности мкб наиболее благоприятной при сушке начальной температурой является 38-39°.

Сравнительное изучение всех основных признаков известного лактобактерина и сухой закваски показало, что количество живых клеток в лактобактерине значительно ниже (3,2 млн/г), чем в сухой закваске (5-6 млрд/г).

Таблица 4. Количество живых клеток в сухой закваске, млрд/г

Показатели	Без раскисления		Раскисление после 3 ч культивирования		Раскисление после 5 ч культивирования	
	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринз"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринз"	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринз"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринз"	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринз"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринз"
Заквашенное стерильное молоко - контроль	3,2	2,8	3,4	3,0	3,6	3,2
Заквашенное стерильное молоко с добавлением в отдельности: - гидролизованного молока 5 г/л	3,6	3,0	3,8	3,2	4,2	4,0
- дрожжевого автолизата 1,5-02%	3,8	3,2	4,0	3,4	4,6	4,2
- пепсина - 0,00015%	4,0	3,4	4,2	3,6	4,8	4,6
Заквашенное стерильное молоко с добавлением вместе: гидролизованного молока 5 г/л, дрожжевого автолизата 1,5-2% и пепсина - 0,00015%	4,6	3,6	4,8	4,0	5,6	5,0

Антимикробная активность сухой закваски по отношению к тест-культурам весьма высокая. Лактобактерин не проявляет антимикробных свойств к *Staphylococcus aureus*, а по отношению к *Escherichia coli* и другим тест - микробам значительно менее активен, чем предложенная сухая закваска (табл. 7)[2].

Таблица 5. Некоторые свойства сухой закваски *L. acidophilus* 317/402 "Наринз" при хранении

Показатели	Хранение, мес.					
	0	4	8	12	24	36
Количество живых клеток, млрд/г	5,6	5,0	4,8	4,0	3,0	2,1-2,0
Консистенция и внешний вид	с однородной консистенцией, очень тягучая, плотный сгусток			тягучесть восстанавливается через 2-3 пересева		тягучесть восстанавливается через 4-5 пересевов
Вкус и запах	после восстановления приятный, характерный кисломолочный вкус, хороший аромат			после восстановления через 2-3 пересева характерный кисломолочный вкус, хороший аромат		

Таким образом, этот способ хранения мкб обеспечивает повышение содержания бактериальных клеток мкб, повышение стойкости при хранении, гарантирует получение восстановленных заквасок высокого качества и их стойкость при пересевах.

Хранение сухих заквасок. Практическая ценность сухих заквасок определяется их качеством не только в свежем состоянии, но и в течение установленного срока действия.

Таблица 6. Влияние технологических параметров на получение сухой закваски

Показатели	Количество живых клеток в 1 г сухой закваски, млрд.		
	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринэ"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринэ"	лактобактерин прототип
Температура замораживания, °С, по прототипу	-40 3,0	3,2	3,2 млн
	-50 5,0	3,6	нет данных
	-55 5,6	4,2	" "
	-60 4,0	3,8	" "
Продолжительность замораживания, ч	1,0 2,2	2,0	нет данных
	1,5 2,6	2,4	" "
	2,0 4,8	4,0	" "
	2,5 5,6	4,8	" "
	3,0 5,2	5,0	" "
Продолжительность высушивания, ч	20 3,2	3,0	нет данных
	22 3,6	3,2	" "
	23 4,8	4,0	" "
	24 5,6	4,8	" "
	25 5,2	5,0	" "
Начальная температура высушивания, °С	25 4,0	4,0	нет данных
	30 5,6	4,8	" "
	35 5,2	4,2	" "
Окончательная температура высушивания, °С	35 3,2	3,0	-
	36 3,6	3,2	-
	37 4,8	4,0	-
	38 5,2	4,8	-
	39 5,6	5	60
	40 4,8	4,0	-

Таблица 7. Антагонистические свойства мкб при хранении

Наименование микроорганизмов	Зона угнетения (подавления) роста, мм в мес.								
	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринэ"						Лактобактерин		
	0	3	6	12	24	36	3	6	12
<i>Escherichia coli</i>	24-28	22-26	19-22	16-20	14-18	12-24	6-7	5-6	3-4
<i>Staphylococcus aureus</i>	24-26	20-24	18-20	16-18	14-16	12-14	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	24-26	20-24	16-20	15-18	13-15	11-13	6-8	5-6	6-7
<i>Klebsiella sp.</i>	23-26	21-22	19-20	17-18	15-17	13-15	7-8	6-7	4-5
<i>Mycobacterium phlei</i>	26-28	20-23	17-20	15-18	13-15	10-15	нет данных		
<i>Citrobacter sp.</i>	24-28	20-22	16-18	13-15	12-13	10-11	нет данных		
<i>Bacillus subtilis</i>	25-27	20-24	18-20	15-20	13-18	11-15	нет данных		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25-29	20-24	17-20	15-19	13-18	9-12	нет данных		
<i>Serratia marcescens</i>	26-28	20-25	19-21	17-18	15-17	12-15	нет данных		
<i>Mycobacterium luteum</i>	26-30	22-25	18-22	18-20	18-20	12-15	нет данных		

Для установления стойкости сухих заквасок последние хранились в помещении с нерегулируемой температурой при 18-25°, в холодильнике при 4°-6° и в холодильной камере при -12-18° (табл. 8).

В помещении с нерегулируемой температурой наступала быстрая гибель клеток; уже в течение первых 3 месяцев вымерло 40-48% клеток. При более длительном хранении сухих заквасок в данных температурных условиях наблюдалось заметное снижение их качеств (свертываемость, консистенция, внешний вид, вкус, запах).

Таблица 8. Выживаемость сухих заквасок мкб при разных температурных режимах хранения

Сухие мкб	Интервал исследования, мес.	Хранение сухих заквасок при разных температурах		
		количество клеток, млрд/г		
		4-6°	18-25°	-12-18°
<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринэ"	0	5,6	5,6	5,6
	3	5,6	5,0	5,6
	6	5,4	3,2	5,4
	9	5,0	2,8	5,0
	12	4,8	0,5	4,8
	24	4,0	-	4,6
	36	3,0	-	4,5
<i>Lbm. mazuni</i> № 2 "Каринэ"	0	5,0	5,0	5,0
	3	5,0	5,0	5,0
	6	4,8	4,0	4,8
	9	3,8	2,6	4,6
	12	3,6	2,0	4,4
	24	2,0	-	4,2
	36	1,2	-	4,0
Лактобактерин	0	3,2	3,2	3,2
	3	3,0	2,6	3,0
	6	2,2	2,0	2,8
	9	2,0	1,0	2,4
	12	1,0	-	2,0
	24	0,6	-	1,8
	36	-	-	1,0

Хранение сухих заквасок при 4-6° в течение 6 мес не выявило изменений в их качественных показателях, за исключением незначительного снижения количества живых клеток. При последующем хранении процент погибших клеток увеличивался и снижалась активность.

Таблица 9. Восстановление сухих мкб

Показатели	Сухие мкб <i>L. acidophilus</i>		
	ЕН ₁	ЕН ₃	317/402
	свертывание молока		
Контроль - заквашенное стерильное молоко	-	-	-
Заквашивание стерильного молока с добавлением в отдельности			
- гидролизованного молока - 5-10 г/л	-	-	-
- дрожжевого автолизата - 2,5 %	-	-	-
- обезжиренное молока (16% сухих веществ)	-	-	-
Заквашивание стерильного молока (16% сухих веществ) с добавлением вместе гидролизованного молока и дрожжевого автолизата	+	+	+

Наилучшие показатели стойкости сухих заквасок были получены при температуре хранения 18° в течение 2-3 лет, а именно замедление вымирания клеток, сохранение качественных показателей без особых изменений.

Восстановление сухих заквасок мкб. Как известно, сухие закваски мкб пригодны для использования от 6 месяцев до 2-3 лет.

Однако добавлением в обезжиренное молоко (при содержании сухих веществ до 16%) дрожжевого автолизата, гидролизованного молока, пепсина удалось восстановить долголетие сухих заквасок с сохранением их производственноценных свойств (табл. 9).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абызова Л.Ф., Полонская М.С., Монович В.В. Докл. ВАСХНИЛ, 2, 20-24, М., 1965.
2. Акопян Л.Г., Чарян Л.М. и др. Патент РФ, N2077214, 1994, 33 шрифтшқір, N 27, 1995.
3. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. Пищевая промышленность, М., 1975.
4. Гриневич А.Г. Основные направления селекции молочнокислых бактерий в молочной промышленности, 13-26, М., 1970.
5. Ерзинкян Л.А. Авт. свид. СССР, N 163573, 1964.
6. Ерзинкян Л.А., Чарян Л.М., Акопян Л.Г. и др. Авт. свид. СССР, N590335, 1978.
7. Ерзинкян Л.А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Изд. АН Арм.ССР, Ереван, 1971.
8. Королева Н.С. Техническая микробиология кисломолочных продуктов. Пищевая промышленность, М., 1966.
9. Лагода И.В., Банникова Л.А. Молочная промышленность, 2, 1970.
10. Лагода И.В., Банникова Л.А. Молочная промышленность, 3, 1973.
11. Скородумова А.М. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов. М., Пищепромиздат, 1963.

Поступила 01.X.1999