

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА КИСЛОТООБРАЗОВАНИЕ, СЛИЗЕОБРАЗОВАНИЕ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* "НАРИНЭ"

Л.Г. АКОПЯН*, Л.М. ЧАРЯН*, О.А. ДАДИВАНЯН*,
А.О. МАРТИРОСЯН**, М.Л. МНДЖОЯН**

*Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

**Институт тонкой органической химии
им. А.Л. Мнджояна НАН Армении, 375014, Ереван

Lactobacillus acidophilus n.v. Ep. 317/402 культивировали при 27-45° в течение 1-7 дней. Установлено высокое кислотообразование при 36-40°, выживаемость при разных температурных режимах 27, 32° - до 8 дней, 36-40° - до 4-5 дней, 42-45° - до 3 дней. Чем ниже температура культивирования, тем сильнее слизиобразование. При температуре 27-32° с массовой долей сухих веществ 18% активное слизиобразование наблюдали до 6 дней, при 36-40° - до 4 дней, при 42-45° - до 3 дней. Слизеобразование сохраняется при температуре 27-32° в течение 6 дней, при 36-40° - 3-4 дней, при 42-45° - до 2 дней.

Lactobacillus acidophilus n.v. Ep. 317/402 շտամը կուլտիվացվել է 27-45° 1-7 օրերի ընթացքում: Բարձր թթուառաջացումը լինում է 36-40°, կենսունակությունը տարբեր ջերմային ռեժիմների 27, 32° 8 օր է, 36-40° 4-5 օր է, 42-45° մինչև 3 օր է: Ինչքան ցածր է զարգացման ջերմաստիճանը, այնքան բարձր է լորձառաջացումը: Չոր նյութերի 18% խտության դեպքում 27-32° լորձառաջացումը նկատվում է մինչև 6 օր, 36-40° մինչև 4 օր, իսկ 42-45° մինչև 3 օր: Լորձառաջացումը պահպանվում է 27-32° մինչև 6 օր, 36-40° մինչև 3-4 օր, իսկ 42-45° մինչև 2 օր:

The cultivation of *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ep. 317/402 at 27-45° during 1-7 days has been carried out. The high production of acid at 36-40° was observed. The viability under different temperature conditions: at 27, 32° to 8 days, 36-40° to 4-5 days, 42-45° to 3 days. The highest production of mucus was at lowest temperature of cultivation. At 27-32° with the content of dry substances 18% active production of mucus is observed to 6 days, at 36-40° - to 4 days, at 42 to 45° - to 3 days. The production of mucus is preserved at 27-32° during 6, at 36-40° - 3-4 days, and at 42-45° - 2 days.

Lactobacillus acidophilus n.v. Ep. 317/402 - режимы культивирования - жизнеспособность - кислотообразование - слизиобразование

При кисло-молочном брожении молочная кислота переводит основной белок молока - казеин из растворенного состояния в нерастворимое, вследствие чего образуется сгусток (коагулят), определяющий консистенцию продукта [1].

Сгусток кисло-молочных продуктов имеет различный характер. В одних случаях он ровный и нежный, в других плотный или рыхлый и хлопьевидный, причем хлопья могут быть такие мелкие, что практически наличие коагулята незаметно (например, в кумысе), и продукт по своим физическим свойствам мало отличается от молока [9].

Некоторые кисло-молочные продукты имеют вязкую и тягучую консистенцию. Физические свойства сгустка во многом зависят от вида микроорганизмов, применяемых при выработке продукта. При производстве обыкновенной простокваши образуется плотный сгусток, причем молоко при

сбраживании должно находиться в спокойном состоянии, чтобы казеиновые частицы, агрегируясь, образовали нити, а затем сетку, способную удерживать воду и растворенные в ней основные части молока. Однако такая консистенция характерна для кисло-молочных продуктов так называемых южных типов, в состав заквасок которых входят термофильные палочки. Что касается северных типов кисло-молочных продуктов, то характерной особенностью их является слизистая, тягучая консистенция (скандинавская тэтта, финское тягучее молоко и др.) [1].

Все кисло-молочные продукты в той или иной степени обладают тягучестью, которая у болгарской простокваши, ацидофилина, ацидофильно-дрожжевого молока и некоторых других видов бывает резко выражена. Тягучесть продуктов объясняется образованием в них сложных химических соединений, называемых декстранами [2].

В кисло-молочных продуктах образуются от 0,5 до 2,5% декстранов [12]. Они, по-видимому, соединяются с белками молока, образуя декстрано-белковый комплекс, который обладает большой гидрофильностью и оказывает положительное влияние на консистенцию продукта, удлиняя срок его хранения.

По данным Ерзинкяна [3], у слизистых штаммов молочно-кислых бактерий не отмечается фаголизис, который имеет важное практическое значение.

Железы слизистой оболочки желудка кроме желудочного сока выделяют еще и слизь, которая предохраняет желудок от механических и химических повреждений, а ферменты, находящиеся в слизи, способствуют расщеплению компонентов пищи [15].

Есть мнение, что слизь появляется при сбраживании арабинозы или ксилозы, а также сахарозы, пентозы.

Мнение авторов по вопросу стабильности признака образования декстрана при использовании сахарозы расходятся. Так, некоторые авторы считают, что образование декстрана не стабильный признак [7, 9]. Другие считают признак декстранообразования стабильным и потому имеющим таксономическое значение.

Лактобациллы, изолированные из пива и сидра, могут продуцировать слизистый гетерополисахарид иной природы [15]. Молоко тоже имеет вязкость. По вопросу, в какой степени составные части молока оказывают влияние на вязкость, единого мнения еще нет. Одни исследователи считают, что вязкость молока обуславливается главным образом белковыми веществами и в меньшей степени жиром и лактозой, а другие, наоборот, приписывают большую роль жировой эмульсии [6, 11]. Хотя в настоящее время нет достаточно полных материалов о зависимости вязкости молока от его химического состава, тем не менее по имеющимся данным можно судить, что она обуславливается прежде всего белками и солевым составом, поскольку последний оказывает влияние на гидрофильность белков. Лактоза, по-видимому, не влияет на вязкость молока, а жир может оказывать влияние на нее при повышенном его содержании. На вязкость молока оказывает влияние степень дисперсности жира, гомогенизация, температура, концентрация сухих веществ и др. [12, 14].

При изготовлении "Наринэ" используют как жидкие, так и сухие

закваски. Применение сухих заквасок связано с удобством их пересылки на места и возможностью их длительного хранения.

Целью настоящей работы является изучение кислотообразования, выживаемости, слизееобразования *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ер. 317/402 при разных температурных режимах роста, а также сбраживание лактозы и образование молочной кислоты.

Материал и методика. В работе использовали молочно-кислую палочку *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ер. 317/402 "Наринэ", депонированную в РЦДМ под номером ИНМИА В-9602 [5]. В целях изучения кислотообразования, выживаемости, слизееобразования при различных температурных режимах роста вначале молоко сквашивали испытуемой молочно-кислой палочкой *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ер. 317/402 "Наринэ", титруемую кислотность определяли в градусах (°Т) [8].

Для исследования лактозы, молочной кислоты использовали метод колоночной хроматографии.

Температуру плавления выделенных соединений определяли на приборе "Бозтинус 72". Оптическое вращение измеряли на поляриметре Polamat-A, UV-спектры - на спектрофотометре Specord UV-Vis, спектры ядерно-магнитного резонанса (NMR) - на приборе Mercury-100 Varian, масс-спектры высокого разрешения - на приборе MX-132/A.

Идентификация сахаров. К 5 мл водного раствора лактозы или глюкозы (1:20) прибавляли 5 мл реактива Фелинга и смесь нагревали до кипения, вследствие чего выпадал желтый осадок, свидетельствующий о наличии сахаров.

Выделение L-молочной кислоты, лактатов натрия и кальция. После отделения лактозы водно-метанольный раствор упаривали, остаток (4,5 г) наносили на колонку с диаметром 2,5 см и 60 г силикагеля, фракционировали хлороформом, далее смесью флороформ-метанол (50:1, 30:1, 20:1, 10:1) и метанолом (по 400 мл). Контроль разделения - ТСХ (система 1, проявитель - а-желтые пятна). Таким образом, были выделены: L-молочная кислота в виде вязкой жидкости с $[\alpha]_D^{25} +2,5$ (20%-ный водный раствор), R_f -0,60; Спектр NMR в D_2O : 5,1 (2H, singlet, -OH and -COOH), 4,4 (1H, quartet $J=6,8$ Hz, -CH-), 1,4 p.p.m. (3H, doublet $J=6,8$ Hz, $-CH_3$). Найдено M^+ - 90 (масс-спектрометрически). ТСХ со свидетелем R_f 0,58 (система 3) голубовато-зеленая окраска с реагентом - в.

Лактат натрия с т. пл. 166-167°, R_f -0,57 (система-1), ГМ спектр в метаноле λ_{max} -215 nm. Na^+ идентифицировали NMR спектроскопией с использованием в качестве стандарта ацетата натрия.

Лактат кальция с т. пл. >230° (разложением), R_f -0,56 (система-1), Ca^{2+} идентифицировали NMR спектроскопией с использованием в качестве стандарта ацетата кальция. В спектрах NMR солей присутствуют также характерные сигналы протонов L-молочной кислоты.

Идентификация L-молочной кислоты в сыворотке. Каплю испытуемого раствора помещали в пробирку с концентрированной серной кислотой и нагревали на водяной бане при 85°. Затем смесь охлаждали до 28°, добавляли несколько кристаллов п-фенилфенола и встряхивали. Через 10-20 мин появлялась постепенно темнеющая фиолетовая окраска.

Результаты и обсуждение. Температурный режим имеет важное значение для получения продукта с заданными свойствами [10].

Опыты по изучению влияния температурных режимов на кислотообразование и слизееобразование проводили в три этапа.

Первый этап. - культивировали *L. acidophilus* 317/402 "Наринэ" в стерильном обезжиренном молоке (сух. вещ. 13-18%) в течение 1-7 дней при 27 и 32°, 36-40°, 42-45°. Полученные данные показывают, что максимальное кислотообразование, разложение лактозы и образование молочной кислоты наблюдается при температуре 36-40° (табл. 1, 2).

С целью интенсификации технологических процессов часто повышают температуру сквашивания. Нами исследовано влияние повышенной

температуры сквашивания *L. acidophilus* 317/402 “Наринэ” 42-45° в динамике развития (табл. 1). При этом резко возрастала кислотность продукта “Наринэ”, в то время как продолжительность сквашивания сокращалась.

Таблица 1. Динамика кислотообразования *L. acidophilus* 317/402 “Наринэ” при различных температурных режимах инкубации

Температура, °С	Сухие вещества в молоке, %	Кислотность, °Т						
		Дни развития						
		1	2	3	4	5	6	7
27	13	-	102	150	152	154	210	220
	18	-	130	152	152	156	224	220
32	13	110	200	230	234	230	256	249
	18	112	206	219	238	242	258	248
36	13	110	200	230	234	230	256	249
	18	150	228	232	244	264	258	298
40	13	140	204	244	250	254	258	252
	18	160	236	248	258	270	258	290
42	13	140	204	248	256	256	260	265
	18	160	236	258	258	250	280	260
45	13	160	204	256	260	254	260	260
	18	170	210	260	260	256	268	248

Примечание: при культивировании *L. acidophilus* 317/402 при температуре 27° молоко не свернулось.

Кроме того, производство “Наринэ” в летнее время неизбежно приводит к возникновению таких пороков, как излишнее возрастание кислотности и “вспучивание”. Поэтому при повышенных температурах необходимо исключительно внимательно следить за точным соблюдением технологического режима (температуры и продолжительности сквашивания, созревания, охлаждения готового продукта).

Обладая высоким температурным оптимумом развития культуры, *L. acidophilus* 317/402 способна развиваться и при сравнительно низких температурах 27 и 32°. При этом по мере повышения температуры наблюдается четкая закономерность интенсификации роста. При выработке “Наринэ” при низких температурах сквашивания (27, 32°) ацидофильная палочка развивается плохо. При температуре 27° молоко заквашивалось на вторые сутки.

Важное значение при заквашивании и созревании продукта имеет количество вносимой закваски. При внесении 0,5-1% (можно 2%) закваски, “Наринэ” заквашивается через 6-7 ч. Увеличивая количество закваски, можно сократить длительность сквашивания, но при этом возникает опасность образования более слабого сгустка с неоднородной консистенцией.

При внесении большого количества закваски “Наринэ” (5-10%) сгусток нижних слоев молока коагулирует и всплывает на поверхность. Внесение 10% закваски “Наринэ” сразу поднимает кислотность до 50-60°Т. Создается впечатление, что закваска вспучилась, хотя при микробиологических исследованиях не обнаруживается интенсификация жизнедеятельности посторонних микроорганизмов.

Таблица 2. Разложение лактозы и образование молочной кислоты
L.acidophilus 317/402 “Наринэ”

Температура, °С	Сухие вещества в молоке, %	Дни развития	Образование веществ при брожении		
			кислотность, °Т	разложение сахаров, %	биосинтез молочной кислоты, %
27	13	2	82	0,738	0,701
		7	195	1,755	1,667
	18	1	110	0,990	0,940
		7	195	1,755	1,667
32	13	1	90	0,810	0,769
		7	224	2,016	1,915
	18	1	92	0,828	0,786
		7	223	2,007	1,906
36	13	1	90	0,810	0,769
		7	224	2,016	1,915
	18	1	130	1,170	1,111
		7	273	2,457	2,334
40	13	1	120	1,080	1,026
		7	227	2,457	2,334
	18	1	140	1,260	1,197
		7	265	2,385	2,265
42	13	1	120	1,080	1,026
		7	240	2,160	1,915
	18	1	140	1,260	1,197
		7	235	2,115	2,009
45	13	1	140	1,260	1,197
		7	235	2,115	2,009
	18	1	150	1,350	1,282
		7	223	2,007	1,906

Примечание: из цифры градуса нарастания кислотности молока вычислена величина градуса кислотности молока: - при 13% сухих веществ в молоке 20°Т, а при 18% - 25°Т.

Важное значение имеет содержание сухих веществ в молоке. При содержании их до 13% *L. acidophilus* 317/402 “Наринэ” в динамике развития образует кислотность 102-265°Т, тогда как при 18% - 130-298°Т.

Для развития *L. acidophilus* 317/402 “Наринэ” важным фактором является температура инкубации. Так, при 27° инкубации *L. acidophilus* 317/402 в динамике образует кислотность 102-220°Т, при 32° - 110-258°Т, при 36° - 110-298°Т, при 40° - 140-290°Т, при 42° - 140-280°Т, при 45° - 160-268°Т (табл. 1).

Второй этап. Исследования по выживаемости *L. acidophilus* 317/402 “Наринэ” при разных температурных режимах заквашивания показали, что выживаемость при 42-45° сохраняется в течение 3 суток, при 36-40° - до 4-5 сут, а при 27, 32° - в течение 12 сут (рис. 1).

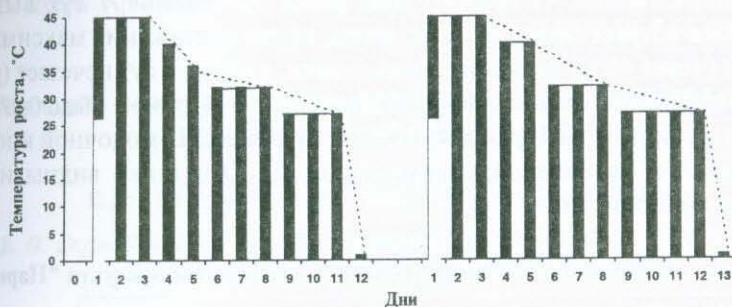


Рис. 1. Дни выживаемости *L. acidophilus* 317/402 "Наринэ". Сухие вещества в молоке: I вариант - 13%, II - 18%. В обоих вариантах в 1-й день культивирования при 27°C молоко не заквашивалось.

Третий этап. Характерно, что *L. acidophilus* 317/402 "Наринэ" образует слизь. Чем больше слизи, тем "Наринэ" лучшего качества и с высокими лечебными свойствами. Изучение химического состава слизи, образуемой *L. acidophilus* 317/402 "Наринэ", связано с образованием декстранов.

Декстраны относятся к сложным полисахаридам, которые, подобно крахмалу, состоят из гликозных остатков и имеют эмпирическую формулу $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Водные растворы декстранов обладают вязкостью, устойчивы к действию щелочей и кислот. Синтезируются декстраны из лактозы. Образование декстранов, вероятно, происходит путем реакции трансгликозилирования с участием соответствующей фосфорилазы:

пЛактоза - пГалактоза - Декстран [4].

Слизеобразование сухой закваски *L. acidophilus* 317/402 "Наринэ" восстанавливается после 2-3-кратных пересевов.

Нами было определено слизиобразование при разных температурах от 27 до 45° культивирования. Опыты показали, что чем ниже температура культивирования (27, 32°), тем больше слизиобразование.

Вязкость определяли при разных значениях массовой доли сухих веществ в молоке. Установлена зависимость вязкости от массовой доли сухих веществ 13-18% (рис. 2). При нагревании "Наринэ" до 60° вязкость исчезает.

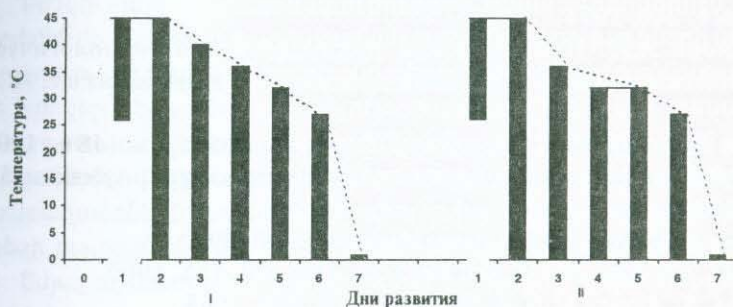


Рис. 2. Слизеобразование *L. acidophilus* 317/402 "Наринэ". Содержание сухих веществ в молоке в I варианте - 13%, во II - 18%.

Выдерживание “Наринэ” при 27-45° в течение 7 сут вызывало постепенное возрастание вязкости, затем, после достижения максимальной величины (через 48 ч), вязкость уменьшается, а после 6 сут исчезает (рис. 2).

На хроматограммах сывороток продукта “Наринэ” выделяются две основные фракции, это фракция сахаров и фракция L-молочной кислоты с ее натриевой и кальциевой солями (табл. 3). Отчетливо видны и следы свободных аминокислот.

Таблица 3. Содержание некоторых веществ в сыворотке продукта “Наринэ”

Компоненты	Содержание веществ, мг/мл
L-молочная кислота	23-24
Лактат кальция	10-11
Лактат натрия	5-6
D-лактоза	45-50
D-глюкоза	-

Таким образом, чтобы получить “Наринэ” с высокими свойствами слизеобразования лучше заквашивать молоко при относительно низкой температуре, а для получения “Наринэ” с высокими лечебными свойствами - молоко заквашивать при 36-39°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов В.М. Микробиология молока и молочных продуктов. “Пищевая промышленность: М., 1969.
2. Войтукс В.В. Молочная промышленность, 9, 1964.
3. Ерзинкян Л.А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Изд. АН АрмССР, Ереван, 235 с., 1971.
4. Инихов Г.С. Биохимия молока и молочных продуктов. Пищепромиздат, М., 370 с., 1970.
5. Каталог культур микроорганизмов. Ред. Э.Африкян, А.Хачатурян. Изд. “Гитутюн” НАН РА, Ереван, 260, 1996.
6. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. Изд. “Наука”, М., 389 с., 1975.
7. Овчинников А.И. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов, Алма-Ата, с. 240, 1974.
8. Скородумова А.И. Практическое руководство по технологической микробиологии молока и молочных продуктов. Пищепромиздат, М., 307 с., 1963.
9. Хачатрян А.П. С дисбактериозом в XX век, Новосибирск, 148 с., 1998.
10. Читчян К.В., Адамян М.О., Африкян Э.К. Биол. журн. Армении, 51, 3, 177-180, 1980.
11. Dunican L.K., Seeley H.W. J. Gen. Microbiol., 40, 297.
12. Kandler O., Abo-Elanga I.G. Zbl. Bakt. II, Abt, 120, 755, 1960.
13. Pederson C.S., Albury M.N. J. Bacteriol., 70, 702, 1955.
14. Puts W.D., Whitnah C.H. J. Dairy Sci., 40, 6, 599, 1957.
15. Whittenbury R. J. Gen. Microbiol., 32, 375, 1963.

Поступила 16.XI.1999