

И.В. Бояринева, канд. техн. наук, докторант

И.С. Хамагаева, д-р техн. наук, проф.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ

E-mail: ttmp@eestu.ru

УДК 637.1

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ЗАКВАСКИ ДЛЯ ХЛЕБОПЕКАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Подобраны условия культивирования консорциума микроорганизмов для сбалансированного роста мезофильных лактобактерий и дрожжей, не сбраживающих лактозу. Выбрана оптимальная доза инокулята для наращивания биомассы симбиотической закваски. Установлено, что оптимизация питательной среды картофельным отваром стимулирует рост дрожжей и интенсифицирует процесс накопления и выход биомассы.

Ключевые слова: закваска, концентрат симбиотической закваски, консорциум.

I.V. Boyarineva, Cand. Sc. Engineering

I.S. Khamagaeva, Dr. Sc. Engineering, Prof.

THE STUDY OF THE CONDITIONS FOR MICROFLORA SYMBIOTIC YEAST CULTIVATION FOR BAKERIES

The conditions for the cultivation of microorganisms for the balanced growth of mesophilic lactic acid bacteria and yeast not fermenting lactose are chosen. The optimal dose of inoculum is selected to build biomass of symbiotic ferment. It is established that the optimization of the nutrient solution by potato broth stimulates the growth of yeast and intensifies the accumulation process and biomass yield.

Key words: ferment, the concentrate of symbiotic ferment, the consortium.

Введение

Эффективным средством стабилизации хлебопекарных свойств ржаной муки, регулирования процесса брожения, формирования определенных свойств полуфабрикатов, улучшения качества хлебобулочных изделий, в том числе удлинения сроков хранения, является оптимизация микробиологического состава заквасок и направленного культивирования в мучных средах [4].

К настоящему времени разработаны и используются в промышленности закваски на основе лактобактерий, витаминная ацидофильная, выделенная из пробиотических молочных продуктов, и др.

Следует отметить, что применение лактобактерий в виде монокультур, например, *L. plantarum* или *L. casei*, не оправдано, так как они не выдерживают конкуренции со спонтанной микрофлорой муки и не гарантируют устойчивых показателей заквасок.

Для повышения биохимической активности заквасок рекомендуется использовать смесь дрожжей *S. cerevisiae* и *S. minor* в сочетании с культурами *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermenti*, *L. breva* [1, 2].

Таким образом, бродильная микрофлора ржаных заквасок – это сложная биологическая система, состоящая из микробов разных классов прокариотов и эукариотов.

В настоящее время в молочной промышленности успешно внедряются технологии получения бактериальных концентратов для производства кисломолочных продуктов. Концентрат молочнокислой закваски успешно используется в хлебопечении.

Получение биомассы симбиотической закваски усложняется многокомпонентностью культур, так как в консорциум входят прокариоты и эукариоты, а для их развития необходимо поступление компонентов в доступной форме, в определенных количественных и качественных соотношениях [5].

В связи с этим актуальным является создание бактериального концентрата симбиотической закваски с высокими биотехнологическими свойствами.

Целью настоящего исследования является подбор состава питательной среды и условий культивирования симбиотической закваски.

Объекты и методы исследований

Экспериментальные исследования проводились на кафедре «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров», в проблемной научно-исследовательской лаборатории ВСГУТУ.

Объектом исследований служила кефирная грибковая закваска.

Морфологию микрофлоры закваски изучали путем приготовления препаратов, окрашенных метиленовым синим и по Граму с последующим микрокопированием в иммерсионной системе с объективом 90 с нанесением капель кедрового масла.

Количество лактозных дрожжей определяли на картофельно-лактозном агаре методом предельных разведений. Количество дрожжей, не сбрасывающих лактозу, определяли на картофельно-сахарозном агаре методом предельных разведений. Общее количество дрожжей в закваске определяли методом предельных разведений с последующим посевом в чашках Петри со средой Сабуро. Количественный учет термофильных и мезофильных лактобактерий проводили на среде «Бактофок».

Результаты и их обсуждение

Установлено, что микрофлора заквасок для хлебопекарного производства идентична микрофлоре кефирной закваски. Микробиологический состав кефирной грибковой закваски представлен различными видами мезофильных, термофильных лактобактерий, дрожжей, сбрасывающих и не сбрасывающих лактозу, ацетобактериями. Состав микрофлоры кефирной закваски обеспечивает в среде спиртовое и молочнокислое брожение.

В кефире микроорганизмы развиваются в тесной ассоциации друг с другом. Характер взаимоотношений в микробной ассоциации зависит от условий окружающей их среды.

Кефирные грибки обладают уникальной способностью к саморегулированию состава микрофлоры под действием различных внешних факторов (состав питательной среды, температура, режим аэрации, рН среды). Следовательно, путем изменения условий их культивирования можно провести избирательную селекцию микрофлоры

Для разработки концентрата симбиотической закваски (КСЗ) для хлебопечения особенно важно создать благоприятные условия для развития мезофильных лактобактерий и дрожжей, не сбрасывающих лактозу.

Литературные данные об особенностях питательной потребности молочнокислых бактерий и дрожжей показали, что наиболее сбалансированным и доступным источником углеродного и азотистого питания и различных ростовых факторов является молочная сыворотка.

Известно, что дрожжи обладают менее совершенной системой протеолитических ферментов и не способны усваивать пептиды сыворотки. Поэтому в качестве комплиментарного источника питания исследовалось введение в состав питательной среды различных доз картофельного отвара.

Натуральные питательные среды имеют существенный недостаток – непостоянство химического состава. Поэтому, учитывая, что набор жизненно необходимых микроэлементов и витаминов для микроорганизмов в сыворотке непостоянен, в нее входят и ионы Mg^{2+} , активизирующие целую группу ферментов, ответственных за процессы брожения и дыхания дрожжей. Ведущая роль магния принадлежит гликолитическому циклу, а именно переносу фосфатов. Ионы магния играют важную роль в процессе фосфорилирования. Довольно часто Mg^{2+} выступает как связующее звено между ферментом и субстратом. Он принимает участие в стабилизации двойной спирали ДНК. Оптимальный эффект действия магния зависит от концентрации источников углерода, образования организмом оксикислот, концентрации других ионов, в отношении которых магний является антагонистом [3].

Большое количество аскорбиновой кислоты сыворотки разлагается при стерилизации. Поэтому в питательную среду добавляется витамин С как редуцирующее вещество, снижающее окислительно-восстановительный потенциал среды.

При использовании сыворотки для культивирования микрофлоры симбиотической закваски одной из главных причин замедления роста является накопление молочной кислоты – основного продукта жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Она тормозит деятельность ферментов, участвующих в синтезе компонентов клеток. Для увеличения буферной емкости в сыворотку вводятся соли – натрий лимоннокислый и калий фосфорнокислый, а также проводится дополнительная нейтрализация среды путем раскисления до pH 6,0-6,5 40%-ным раствором NaOH после внесения закваски и через 12 и 24 ч культивирования. Известно, что наращивание биомассы кефирных грибов идет наиболее интенсивно при значении pH 6,5-7,0. Дрожжи лучше развиваются при более низких значениях pH, но известно, что при значениях, близких к 7, возрастает устойчивость дрожжей при хранении.

В разработанной симбиотической закваске дрожжи, не сбраживающие лактозу, преобладают над лактозосбраживающими дрожжами, поэтому для поддержания созданного симбиоза и улучшения углеводного питания дрожжевой микрофлоры, не сбраживающей лактозу, в питательную среду вводится сахароза.

Компонентный состав питательной среды для производства бактериального концентрата на начальном этапе исследований представлен в таблице 1.

Таблица 1

Состав питательной среды для получения биомассы симбиотической закваски

Наименование сырья	Расход
Сыворотка творожная	1000 мл
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	1,0 г/л
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,5 г/л
Магний сернокислый	0,1 г/л
Аскорбиновая кислота	0,1 г/л
Сахароза	0,5 г/л

После определения компонентов питательной среды необходимо уточнение механизмов подготовки инокулята и подбор различных соотношений компонентов, а также других условий культивирования симбиотической закваски.

Важную роль при культивировании микроорганизмов играет активность посевного материала. Инокулят должен обладать высокой биохимической активностью и содержать оптимальное соотношение молочнокислых бактерий и дрожжей.

В качестве инокулята использована симбиотическая закваска, полученная методом культивирования (автоселекции) кефирной грибковой закваски. Характеристика инокулята представлена в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика инокулята

Наименование показателя	Показатель
Кислотность: – титруемая, °Т; – активная, pH	120 4,45
Количество жизнеспособных клеток мезофильных лактобактерий, К.О.Е в см ³	5×10 ⁹
Количество дрожжей, не сбраживающих лактозу, К.О.Е в см ³	3×10 ⁹
Объем продукта (см ³), в котором не допускаются: – БГКП (колиформы); – <i>S. aureus</i> ; – патогенные микроорганизмы (в том числе сальмонеллы)	0,1 1,0 25
Плесени, К.О.Е. в см ³ , не более	50

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что в инокуляте содержится достаточно высокое количество дрожжей, не сбраживающих лактозу, и мезофильных лактобактерий, которые являются основой бродильной микрофлоры в хлебопечении.

Цикл развития микроорганизмов начинается с засева среды. Засев необходимо осуществлять в количестве, обеспечивающем рост микроорганизмов с минимальной лаг-фазой. Внесение необходимого количества инокулята в большой объем питательной среды может привести к диффузии из клетки витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов.

В следующей серии опытов определяли оптимальное количество инокулята для наращивания биомассы симбиотической закваски (рис. 1).

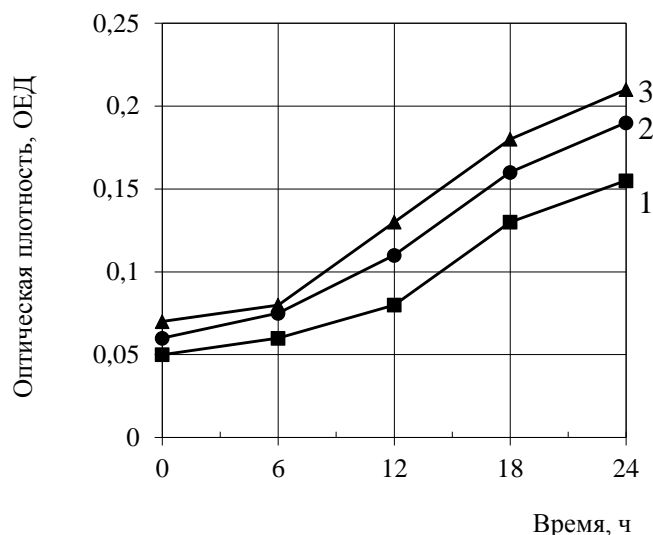


Рис. 1. Влияние дозы инокулята на рост биомассы: 1 – 3% инокулята; 2 – 5% инокулята; 3 – 7% инокулята

Результаты исследований, представленные на рисунке 1, показывают, что с увеличением дозы инокулята интенсивность нарастания биомассы увеличивается. Так, при увеличении дозы инокулята с 3 до 5% значение оптической плотности значительно возрастает, что свидетельствует об интенсивности нарастания биомассы. При дальнейшем повышении дозы до 7% скорость нарастания биомассы несколько снижается.

Накопление биомассы отождествляется с ростом микроорганизмов. В следующей серии опытов исследовали влияние дозы закваски на рост дрожжей, не сбраживающих лактозу, и мезофильных лактобактерий.

Результаты исследований представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Динамика роста дрожжей, не сбраживающих лактозу

Доза инокулята	Продолжительность культивирования, ч				
	3	9	12	18	24
3	3×10^4	9×10^4	4×10^7	5×10^7	3×10^7
5	7×10^5	1×10^6	2×10^7	3×10^8	2×10^9
7	4×10^6	2×10^7	1×10^8	7×10^8	5×10^9

Таблица 4

Динамика роста мезофильных лактобактерий

Доза инокулята	Продолжительность культивирования, ч			
	6	12	18	24
3	5×10^6	8×10^7	5×10^8	9×10^8
5	4×10^7	3×10^8	1×10^9	5×10^9
7	8×10^7	7×10^8	2×10^9	7×10^9

Из анализа данных таблиц видно, что доза инокулята влияет на рост микрофлоры симбиотической закваски. Наибольшее количество клеток 10^9 К.О.Е. в $см^3$ было отмечено при

дозах инокулята 5 и 7%. Для наращивания биомассы симбиотической закваски наиболее оптимальной дозой инокулята является 5% от объема питательной среды.

Следует отметить, что для получения концентрированной закваски необходимо повышение количества клеток в биомассе путем дальнейшей оптимизации питательной среды.

В связи с этим в дальнейших исследованиях изучали влияние картофельного отвара как комплиментарного источника азотистого и углеводного питания для дрожжей на рост биомассы. Результаты исследований влияния дозы картофельного отвара на рост дрожжей, не сбраживающих лактозу, представлены в таблице 5.

Таблица 5

Влияние дозы картофельного отвара на рост дрожжей, не сбраживающих лактозу

Доза картофельного отвара, %	Количество дрожжей, не сбраживающих лактозу, К.О.Е. в см ³		
	продолжительность культивирования		
	0 ч	12 ч	24 ч
5%	3×10^3	3×10^6	5×10^8
10	2×10^3	7×10^6	8×10^8
15	2×10^3	5×10^7	6×10^{10}
20	3×10^3	8×10^7	7×10^{10}

Анализ данных, представленных в таблице 5, свидетельствует о том, что картофельный отвар оказывает стимулирующее действие на рост дрожжей, не сбраживающих лактозу. Отмечено максимальное количество дрожжей через 24 ч культивирования, которое составило 10^{10} К.О.Е. в см³ при добавлении 15% картофельного отвара. При дальнейшем повышении дозы картофельного отвара количество дрожжей увеличивается незначительно. При этом интенсифицируется процесс накопления и выход биомассы (рис. 2).

При культивировании в жидких средах микроорганизмы используют растворенный кислород. Вместе с тем растворимость кислорода в воде невелика, поэтому, чтобы обеспечить рост аэробных микроорганизмов в толще среды, ее необходимо аэрировать на протяжении всего периода накопления биомассы [1].

Аэрирование питательной среды позволит увеличить скорость диффузии молочной кислоты от поверхности клетки в толщу среды, обеспечит равномерное распределение микроорганизмов и увеличит перенос питательных веществ к клеткам, определяющий скорость внутриклеточных процессов и, в конечном счете, скорость роста бактерий, что не может не сказаться на общем выходе биомассы.

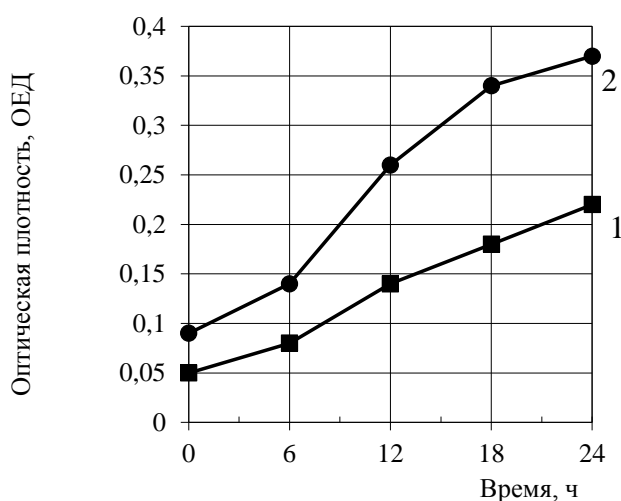


Рис. 2. Влияние картофельного отвара на выход биомассы: 1 – контроль; 2 – 15% картофельного отвара

Внесение картофельного отвара и двукратное аэрирование создают хорошие условия для поддержания развития дрожжевых микроорганизмов в среде. Для создания условий дальнейшего повышения количества мезофильной микрофлоры в бактериальном концентрате исследовалось введение различных доз микробиологического коллоида – агара, используя его уникальную способность к водосвязыванию и образованию гелей.

Для проведения исследования были выбраны дозы агара в количестве 0,5, 0,8 и 1,0 г/л питательной среды соответственно.

Результаты исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6

Влияние дозы агара на рост мезофильных лактобактерий и дрожжей, не сбраживающих лактозу

Доза агара, %	Продолжительность культивирования, ч					
	0		12		24	
	Мезофильные лактобактерии, К.О.Е. в см ³	Дрожжи, К.О.Е. в см ³	Мезофильные лактобактерии, К.О.Е. в см ³	Дрожжи, К.О.Е. в см ³	Мезофильные лактобактерии, К.О.Е. в см ³	Дрожжи, К.О.Е. в см ³
0,5	2×10^5	3×10^4	4×10^7	3×10^9	4×10^8	5×10^{10}
0,8	2×10^5	3×10^4	3×10^8	3×10^9	8×10^{10}	5×10^{10}
1,0	2×10^5	3×10^4	6×10^8	8×10^8	9×10^{10}	9×10^9

Из представленных данных видно, что с увеличением дозы агара интенсифицируется рост мезофильных лактобактерий. Но следует отметить, что при достижении дозы агара до 1,0% снижается количество дрожжей.

Приведенные исследования свидетельствуют о том, что при оптимальной дозе агара 0,8% интенсифицируется рост биомассы (рис. 3). При этом количество жизнеспособных клеток дрожжей и мезофильных лактобактерий составляет 10^{10} К.О.Е. в см³.

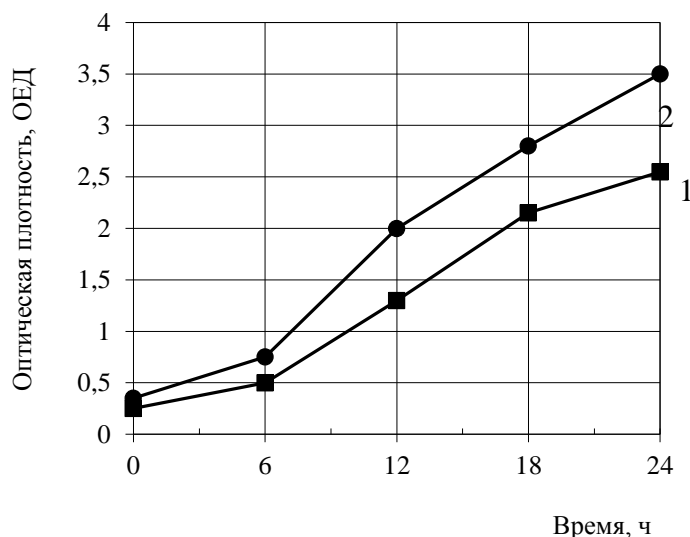


Рис. 3. Влияние агара на рост биомассы:
1 – контроль; 2 – 0,8% агара

В результате проведенных исследований оптимизирована питательная среда для получения бактериального концентрата симбиотической закваски.

Выводы

1. Оптимизирована питательная среда с учетом сбалансированного роста мезофильных лактобактерий и дрожжей, не сбраживающих лактозу.

2. Для наращивания биомассы симбиотической закваски определена оптимальная доза инокулята 5% от объема питательной среды.

3. Доказано, что внесение в питательную среду 15% картофельного отвара и 0,8% агара ускоряет рост дрожжей и обеспечивает высокий выход биомассы симбиотической закваски.

Библиография

1. Полякова С.П. Методы и средства повышения микробиологической безопасности хлебобулочных изделий // Хлебопечение России. – 2003. – № 6. – С. 3–5.

2. Пучкова Л., Кузьмина Е., Богатырева Т. Влияние способа приготовления закваски на свойства теста и качество хлеба // Хлебопродукты. – 1999. – № 5. – С. 14–15.

3. Павловская Е.Н., Синявская Н.Д., Кузнецова Л.И. и др. Сухая биологическая закваска длительного хранения для ржаных сортов хлеба // Хлебопечение России. – 2002. – № 2. – С. 18–19.

4. Пак О., Золотова О. Проблемы и перспективы применения биотехнологических разработок в хлебопекарном производстве // Хлебопечение России. – 2003. – № 1. – С. 28–29.

5. Хамагаева И.С., Занданова Т.Н., Хурхесова Т.Е. Исследование качественных показателей и сроков хранения бактериального концентрата микробного консорциума // Вестник ВСГУТУ. – 2013. – № 6 (45). – С. 129–132.

Bibliography

1. Polyakova S.P. Methods and means to improve the microbiological safety of bakery products // Baking in Russia. – 2003. – N 6. – P. 3–5.

2. Puchkova L., Kuzmina E., Bogatyreva T. The influence of the preparation method of the leaven on the dough properties and bread quality // Bakery. – 1999. – N 5. – P. 14–15.

3. Pavlovsky E.N., Syniavska N.D., Kuznetsova L.I. et al. Dry biological ferment for long-term storage of rye breads // Baking in Russia. – 2002. – N 2. – P. 18–19.

4. Pak O., Zolotova O. Problems and prospects of biotechnology development in baking production // Baking in Russia. – 2003. – N 1. – P. 28–29.

5. Khamagaeva I.S., Zandanova T.N., Hurhesova T.E. Qualitative research of indicators and the terms of storage of a bacterial concentrate // Vestnik of ESSUTM. – 2013. – N 6 (45). – P. 129–132.