

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ НАПРАВЛЕННОГО ФЕРМЕНТИРОВАНИЯ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ

THE USE OF LACTIC ACID BACTERIA IN THE PROCESS OF DIRECTED FERMENTATION OF A WHITE CABBAGE

Посокина Н.Е., зав. лаб. технологии консервирования, кандидат техн. наук
Лялина О.Ю., ведущий н.с.
Шишлова Е.С., с.н.с.
Захарова А.И., с.н.с., аспирант

Posokina N.E., Head of the laboratory, Candidate of Technical Sciences (Ph.D.)
Lyalina O.Yu., Leading Researcher
Shishlova E.S., Senior Researcher
Zakharova A.I., Senior Researcher, Graduate student

Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ВНИИТЭК – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН) 142703, Россия, Московская обл., г. Видное, ул. Школьная, 78
www.vniitek.ru, vniikoptok@yandex.ru

Russian Research Institute of Canning Technology – Branch of V.M. Gorbatoev Federal Research Center for Food Systems of RAS (VNIITEK – Branch of Gorbatoev Research Center for Food Systems) 78, Shkolnaya Street, Vidnoe, Moscow region, 142703, Russia
www.vniitek.ru, vniikoptok@yandex.ru

Ферментация является очень сложным динамичным процессом с многочисленными химическими, физическими, и микробиологическими изменениями, влияющими на качество готового продукта. В настоящее время в промышленности заквасочные культуры практически не используются, что приводит к большим потерям готовой продукции (до 40 %). Применение стартовых культур позволяет не только получить продукцию высокого качества, но и в значительной степени снизить производственные потери. Целью исследований являлось изучение процесса направленного ферментирования капусты белокочанной сорта «Слава» с использованием штаммов молочнокислых микроорганизмов и их консорциума с учётом степени их взаимного влияния. В качестве штаммов молочнокислых микроорганизмов использовали следующие лактобактерии – *Lactobacillus brevis* VKM B-1309, *Lactobacillus plantarum* VKM B-578. Эксперименты проводили на модельных средах для получения сравнительных данных. Впервые была изучена динамика изменения качественных показателей капусты белокочанной в процессе направленного ферментирования. Математические модели, разработанные в ходе исследований, адекватно описывают степень деструкции глюкозы и фруктозы в процессе ферментации. Из капусты белокочанной (исходного сырья) для проведения исследований изготавливали модельную среду, для этого ее подвергали гомогенизации и стерилизации с целью создания оптимальных условий для развития целевой микрофлоры и определения степени деструкции глюкозы и фруктозы различными штаммами молочнокислых микроорганизмов. В процессе исследований нами было установлено, что использование консорциума молочнокислых микроорганизмов (*L. brevis* + *L. plantarum*) для данной культуральной среды нецелесообразно, однако добавление фруктозы в количестве 0,5% от массы модельной среды позволяет значительно интенсифицировать процесс ферментирования капусты белокочанной.

Ключевые слова: направленное ферментирование, использование штаммов молочнокислых микроорганизмов, капуста белокочанная, лактокультуры, консорциум, модельная среда, деструкция глюкозы и фруктозы, математическая обработка данных.

Для цитирования: Посокина Н.Е., Лялина О.Ю., Шишлова Е.С., Захарова А.И. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ НАПРАВЛЕННОГО ФЕРМЕНТИРОВАНИЯ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ. Овощи России. 2018; (4): 81-85. DOI:10.18619/2072-9146-2018-4-81-85

Fermentation is a very complex dynamic process with numerous chemical, physical, and microbiological changes affecting the quality of the finished product. At present, in the industry starter cultures are practically not used, which leads to large losses of finished products (up to 40 %). The use of starter cultures allows not only to obtain high quality products, but also to significantly reduce production losses. The aim of the research was to study the process of directed fermentation of white cabbage variety "Slava" using strains of lactic acid bacteria and their consortium, taking into account the degree of their mutual influence. The following lactobacilli were used as strains of lactic acid bacteria – *Lactobacillus brevis* VKM V-1309, *Lactobacillus plantarum* VKM V-578. Experiments were carried out on model media to obtain comparative data. In the process of directional fermentation using strains of lactic acid microorganisms and their consortium for the first time studied the dynamics of changes in quality indicators. Mathematical models developed in the course of research adequately describe the degree of destruction of glucose and fructose during fermentation. The model medium was made of white cabbage (raw material) for research, for this purpose it was subjected to homogenization and sterilization in order to create optimal conditions for the development of the target microflora and to determine the degree of destruction of glucose and fructose by various strains of lactic acid microorganisms. In the process of research, we found that the use of a consortium of lactic acid bacteria (*L. brevis* + *L. plantarum*) for this culture medium is impractical, but the addition of fructose in the amount of 0,5% by weight of the model medium can significantly intensify the process of fermentation of white cabbage.

Keywords: directed fermentation, use of lactic acid bacteria (LAB), white cabbage, lactoculture, consortium, model environment, degradation of glucose and fructose, mathematical data processing.

For citation: Posokina N.E., Lyalina O.Yu., Shishlova E.S., Zakharova A.I. THE USE OF LACTIC ACID BACTERIA IN THE PROCESS OF DIRECTED FERMENTATION OF A WHITE CABBAGE. Vegetable crops of Russia. 2018;(4): 81-85 (In Russ.) DOI:10.18619/2072-9146-2018-4-81-85

Введение

Производство ферментированной (квашеной) капусты состоит из следующих этапов: сбор сырья, очистка, удаление кочерыги, мытье, измельчение, фасование в упаковку, где будет происходить процесс брожения. Способы к брожению углеводы – глюкоза, фруктоза и сахароза преобразовываются в молочную кислоту, этанол, маннит, уксусную кислоту и устанавливают благоприятные условия для развития микрофлоры молочнокислых бактерий. Глюкоза и фруктоза являются сахарами, которые способны к сбраживанию. Процесс ферментации продолжается пока весь способный к брожению сахар не используется или пока титруемая кислотность в продукте не достигнет значения 1,7-2 %, с pH 3,4-3,6, при этом рост молочнокислых бактерий практически прекращается. Для правильного протекания процесса ферментации рекомендуется использовать сорта капусты белокачанной с содержанием сахаров не ниже 4%. Однако добавление глюкозы и фруктозы позволяет значительно интенсифицировать процесс брожения и использовать сорта капусты белокачанной с низким содержанием сахаров [1, 2].

Кислотность является важным физико-химическим показателем качества квашеной капусты, также от уровня кислотности зависит вкус и аромат готового продукта. При этом, важными факторами для положительного протекания процесса является соблюдение температуры, анаэробных условий, а также качество исходного сырья, добавление соли и т.д. Все это играет решающую роль для получения готового продукта хорошего качества [3, 4].

Хорошей альтернативой непосредственному процессу ферментации является применение заквасок (штаммов молочнокислых микроорганизмов, лактокультур), это позволяет управлять процессом ферментации и контролировать его. При этом для успешного применения заквасок в ферментированных продуктах необходимо учитывать несколько факторов: вид сырья, исходное количество сахаров в сырье, органолептические особенности, безопасность, польза для здоровья, срок хранения [5].

Выбор надлежащих заквасок имеет огромное влияние на качество конечного продукта. При квашении капусты закваски могут быть внесены в сырье в виде одного штамма или в виде консорциума молочнокислых микроорганизмов, содержащего несколько штаммов. Использование заквасок ускоряет процесс брожения и квашеная капуста может быть произведена в более короткий период по сравнению с непосредственным брожением. При культивировании свежей капусты молочнокислыми микроорганизмами происходит быстрое накопление молочной и уксусной кислот, что приводит к быстрому снижению pH и тем самым гарантирует правильное продолжение процесса ферментации. Основными молочнокислыми бактериями при ферментации капусты белокачанной являются бактерии родов *Lactobacillus* и *Leuconostoc* [6].

Цели и задачи

Целью наших исследований является изучение процессов направленного ферментирования капусты белокачанной сорта Слава с использованием штаммов молочнокислых микроорганизмов и их консорциума с учётом степени их взаимного влияния.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить несколько задач:

- 1) провести математическую обработку полученных данных по деградации глюкозы и фруктозы;
- 2) найти зависимость нарастания количества молочнокислых микроорганизмов от времени ферментации;
- 3) рассчитать скорость сбраживания и удельную скорость ферментации для каждой культуры (штамма молочнокислых микроорганизмов);
- 4) для определения характера взаимодействия молочнокислых микроорганизмов разных видов в консорциуме при совместном культивировании необходимо рассчитать аддитивную скорость сбраживания;
- 5) рассчитать коэффициенты взаимодействия молочнокислых микроорганизмов (фактор взаимного влияния);
- 6) установить влияние изменения углеводной составляющей культуральной среды на процесс ферментации.

Материалы и методы

В работе использованы стандартные и новейшие методики исследований.

Модельная среда представляла собой предварительно вымытую, нашинкованную, гомогенизированную биомассу капусты белокачанной, с добавленной в нее поваренной солью в количестве 1,5% от массы продукта, расфасованную в стеклянные банки с винтовой укупоркой и стерилизованную в течение 20 мин при противодавлении 1 бар, затем охлажденную до комнатной температуры.

В качестве живых культур использовали штаммы молочнокислых микроорганизмов рода *Lactobacillus brevis* и *plantarum* – и их парный консорциум. В отдельные образцы модельных сред дополнительно вносили глюкозу или фруктозу в количестве 0,5%. Активную фазу ферментирования осуществляли в течение 3-х сут при температуре +23...+25°C, затем образцы выдерживали при температуре -1...+4°C. Отбор проб проводили в трех образцах с двумя повторностями для каждого образца по истечении 1-2-3-10-30-60-90 суток ферментирования. Количество молочнокислых микроорганизмов определяли по [7].

Исследование динамики изменения содержания сахаров проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе с рефрактометрическим детектором Perkin Elmer Series 200, колонка – Agilent Zorbax Carbohydrate 4,6 x 250 мм, подвижная фаза – «ацетонитрил:вода» 75:25, скорость потока 1 см³/мин в изократическом режиме. Идентификацию глюкозы, фруктозы и сахарозы проводили по абсолютному времени удерживания в образцах, сравнением со временем удерживания в градуировочных растворах. Расчёт концентрации – методом внешнего стандарта [8].

Математическую обработку полученных данных по деградации глюкозы и фруктозы в процессе направленной ферментации проводили с помощью Microsoft Excel и SYSTAT TableCurve 2D.

Результаты

Проведя математическую обработку полученных данных по деградации глюкозы и фруктозы в процессе направленной ферментации, мы установили, что изменение концентрации углеводов описывается уравнением:

$$y_{1s} = a_{1s} \cdot (1 - \exp(-b_{1s} \cdot x)), \quad (1)$$

где x – продолжительность ферментации, сут.;

a_{1s} , b_{1s} – расчетные коэффициенты для каждой культуры.

При этом скорость сбраживания является производной от (1) и описывается следующим уравнением:

$$y'_{1s} = a_{1s} \cdot b_{1s} \cdot \exp(-b_{1s} \cdot x), \quad (2)$$

где x – продолжительность ферментации, сут.;

a_{1s} , b_{1s} – расчетные коэффициенты для каждой культуры.

Зависимость нарастания количества молочнокислых микроорганизмов от времени ферментации описывается уравнением

$$y_{1k} = \exp\left(\frac{a_{1k} + c_{1k} \cdot x + e_{1k} \cdot x^2}{1 + b_{1k} \cdot x + d_{1k} \cdot x^2}\right), \quad (3)$$

где x – продолжительность ферментации, сут.;

a , b , c , d – расчетные коэффициенты для каждой культуры.

Таким образом, рассчитав скорость сбраживания для каждой культуры (2) и зависимость нарастания количества молочнокислых микроорганизмов от времени (3), мы можем рассчитать удельную скорость ферментации для каждого молочнокислого микроорганизма.

Удельная скорость ферментации является отношением скорости сбраживания углеводов к нарастанию количества молочнокислых микроорганизмов и описывается уравнением:

$$y_{ad1} = \frac{y_{1s}}{y_{1k}} = \frac{a_{1s} \cdot b_{1s} \cdot \exp(-b_{1s} \cdot x)}{\exp\left(\frac{a_{1k} + c_{1k} \cdot (x + f_{1k}) + e_{1k} \cdot (x + f_{1k})^2}{1 + b_{1k} \cdot (x + f_{1k}) + d_{1k} \cdot (x + f_{1k})^2}\right)} \quad (4)$$

где x – продолжительность ферментации, сут;
 a, b, c, d, f – коэффициенты для каждой культуры.

Поскольку целью нашего исследования было изучение взаимного влияния молочнокислых микроорганизмов в консорциуме в данной культуральной среде, нам необходимо определить степень их взаимодействия.

Для того, чтобы рассчитать взаимное влияние микроорганизмов в консорциуме, рассчитываем аддитивную скорость сбраживания, которая описывается уравнением:

$$V_{\text{адд}} = \frac{y_{1k} + y_{2k}}{\exp\left(\frac{a_{1k} + c_{1k} \cdot x + e_{1k} \cdot x^2}{1 + b_{1k} \cdot x + d_{1k} \cdot x^2}\right) + \exp\left(\frac{a_{2k} + c_{2k} \cdot x + e_{2k} \cdot x^2}{1 + b_{2k} \cdot x + d_{2k} \cdot x^2}\right)} \quad (5)$$

где x – продолжительность ферментации, сут;
 a, b, c, d – коэффициенты для каждой культуры.

На рисунке 1 представлены зависимости удельной скорости сбраживания от продолжительности ферментации. Для удобства восприятия данных удельная скорость сбраживания представлена в виде десятичного логарифма.

На левой части рисунка представлены зависимости удельной скорости сбраживания глюкозы молочнокислыми микроорганизмами; на правой части рисунка – фруктозы этими же микроорганизмами. Оценивая полученные данные по деградации глюкозы, мы можем сделать вывод о том, что в процессе ферментации капусты белокочанной с использованием данного консорциума молочнокислых микроорганизмов, основную роль играет *L. plantarum*. И в случае консорциума с *L. brevis*, последний выступает в качестве ингибитора процесса ферментации и не дает первой культуре в достаточной мере раскрыть свой потенциал. Активная фаза сбраживания глюкозы длится ~ 20 сут, затем идет плавное затухание процесса.

По данным деградации фруктозы мы можем сделать аналогичный вывод, с той лишь разницей, что после активной фазы сбраживания, продолжительность которой составляет ~ до 10-12 суток, процесс постепенно замедляется, при этом скорость сбраживания глюкозы значительно превышает скорость сбраживания фруктозы.

Отношение удельной скорости сбраживания к аддитивной рассчитываем по формуле:

$$k = \lg\left(\frac{Vud_k}{Vud_{\text{адд}}}\right) \quad (6)$$

где Vud_k – удельная скорость сбраживания консорциума;
 $Vud_{\text{адд}}$ – аддитивная скорость сбраживания.

По характеру отношения удельной скорости сбраживания углеводов данного вида консорциума микроорганизмов к удельной скорости сбраживания, рассчитанной из учёта аддитивного взаимодействия отдельных участников консорциума друг с другом, определяем характер взаимодействия молочнокислых микроорганизмов *L. brevis* и *L. plantarum* в консорциуме. Для удобства этот показатель удобнее представить в виде десятичного логарифма ($\lg$). При этом, положительные значения будут соответствовать синергизму; отрицательные – антагонизму; близкие к 0 – аддитивному взаимодействию, т.е. соседству без взаимного влияния.

По данным сбраживания глюкозы (а), представленным на рис. 2, можно сделать вывод об антагонизме процесса, причем с ~5 по ~12 сутки ферментации можно наблюдать некоторую попытку приближения к положительным значениям, но после ~12 суток процесс уходит в «глубокий» антагонизм.

В случае сбраживания фруктозы (б) мы наблюдаем несколько иную картину: в начале ферментирования – антагонизм между членами процесса, с 10 по ~20 сутки ферментации – синергизм процесса, после 20 суток ферментации – постепенное «затухание» положительного взаимного влияния участников консорциума, которое с течением времени приближается к нулевым значениям.

В рамках данной научно-исследовательской работы была предпринята попытка изменения состава культуральной среды с целью выявления зависимости влияния увеличения углеводной составляющей на интенсивность процесса ферментации, т.е. внесение глюкозы и фруктозы. С этой целью в модельные среды было добавлено 0,5% (по массе) глюкозы или 0,5% (по массе) фруктозы. Рассчитав отношение скорости сбраживания углеводов к удельной скорости сбраживания мы получили зависимости, представленные на рис.3.

Из данных, представленных на рис. 3 (а), видно, что добавление глюкозы негативно сказывается на основном участнике процесса ферментации – *L. plantarum*, в то время как ингибитор процесса *L. brevis* получает мощную «поддержку».

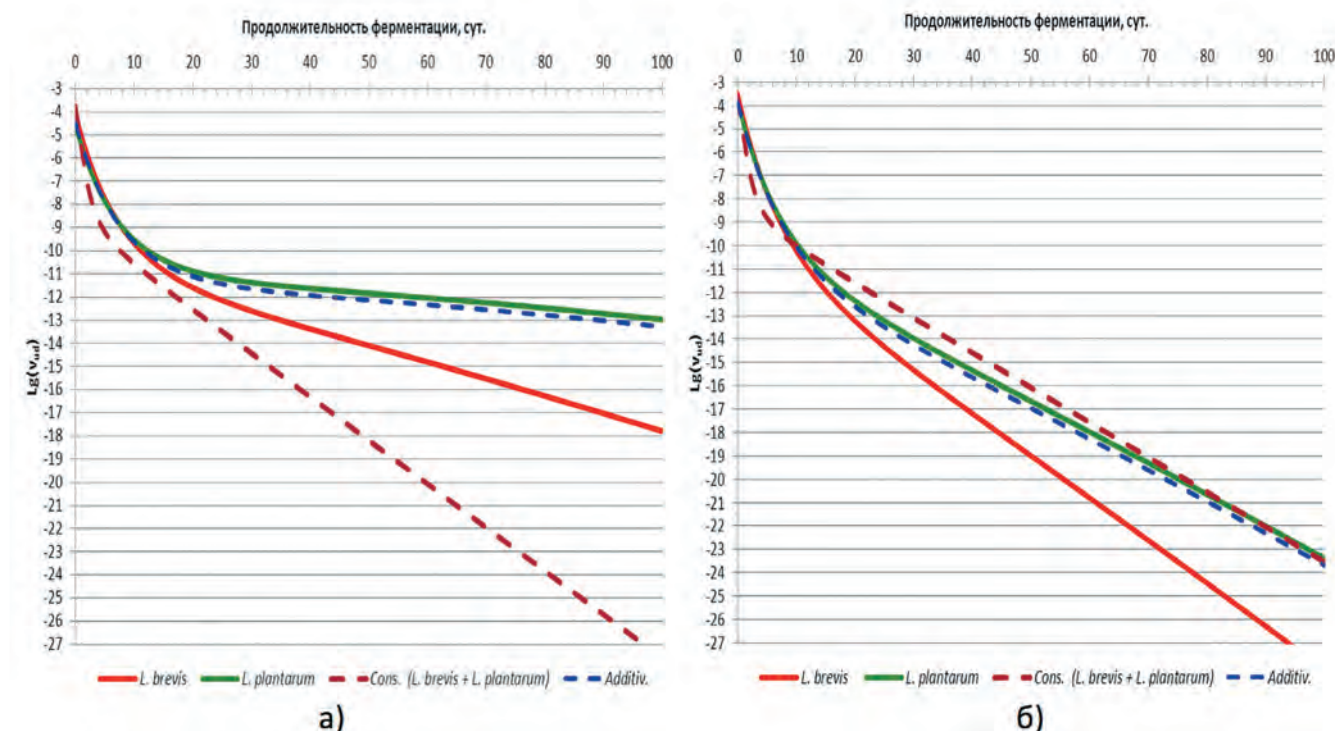


Рис. 1. Зависимость скорости сбраживания глюкозы (а) и фруктозы (б) от продолжительности ферментации.
 Fig.1. Dependence of the rate of fermentation of glucose (a) and fructose (b) of the duration of fermentation.

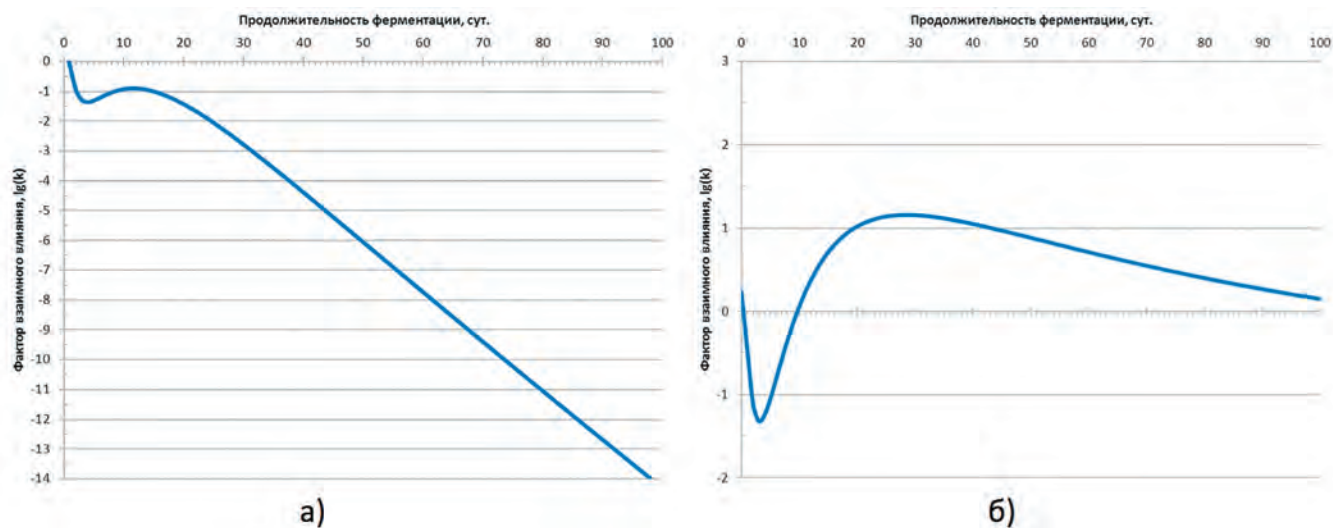


Рис. 2. Фактор взаимного влияния молочнокислых микроорганизмов в консорциуме при сбраживании глюкозы (а) и фруктозы (б).
Fig.2. The factor of mutual influence of lactic acid microorganisms in a consortium for the fermentation of glucose (a) and fructose (b).

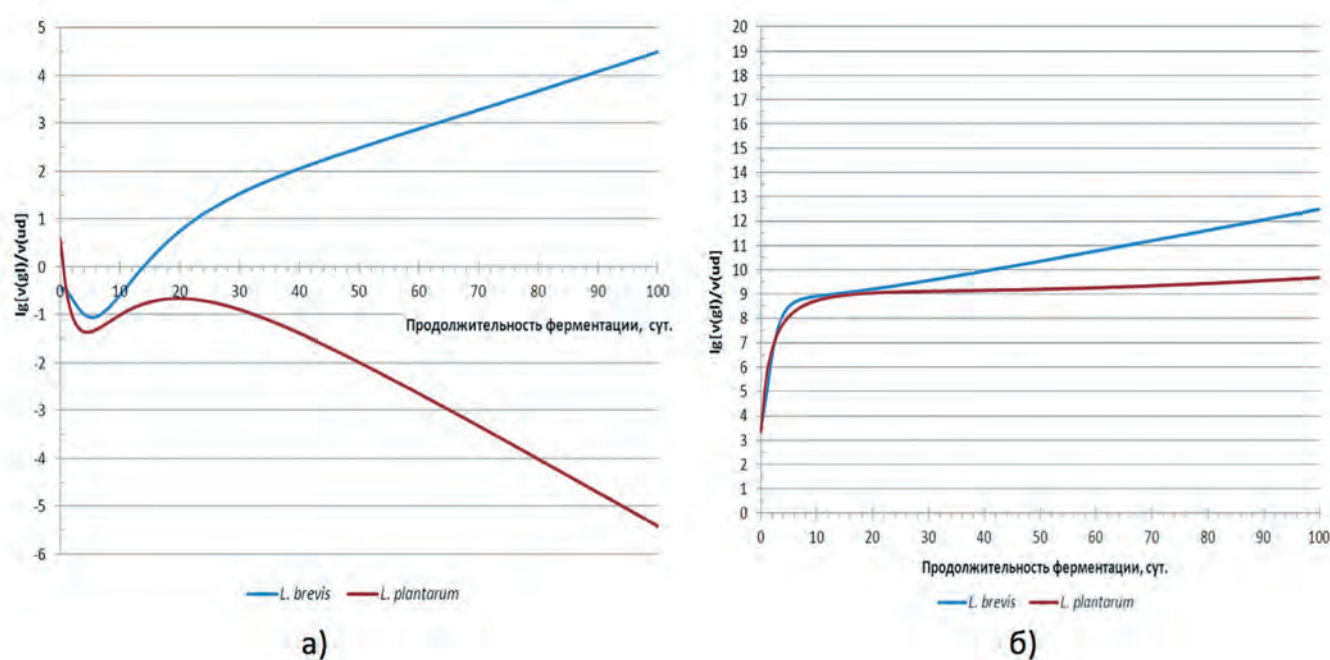


Рис. 3. Влияние изменения углеводного состава культуральной среды на процесс ферментации;
(а) – добавление 0,5% глюкозы; (б) – добавление 0,5% фруктозы
Fig.3. Influence of changes in the carbohydrate composition of the culture medium on the process of fermentation;
(a) - addition of 0.5% glucose; (b) - addition of 0.5% fructose

Внесение 0,5% фруктозы, наоборот, положительным образом сказывается и на развитие *L. brevis*, и на развитие *L. plantarum*, причем, внесение фруктозы дает больший потенциал для развития *L. brevis*, нежели *L. plantarum*.

Выводы

В ходе проведенных научных исследований выяснилась неоднозначная роль молочнокислых микроорганизмов *L. brevis* и *L. plantarum* в составе консорциума. Так, в случае использования консорциума молочнокислых микроорганизмов (*L. brevis* + *L. plantarum*) в процессе ферментирования основную роль играет *L. plantarum*, в то время как *L. brevis* проявил себя как ингибитор процесса ферментации. Таким образом, использование данного консорциума

молочнокислых микроорганизмов для данной культуральной среды нецелесообразно. Однако добавление 0,5% глюкозы положительным образом влияет на развитие *L. brevis*, который является ингибитором процесса, и негативно сказывается на основном участнике процесса ферментации – *L. plantarum*. Однако, добавление фруктозы в количестве 0,5% от массы модельной среды позволяет значительно интенсифицировать процесс ферментации капусты белокочанной сорта Слава, так как положительно влияет на развитие и *L. brevis*, и *L. plantarum*.

Проведенные исследования показали целесообразность использования консорциума молочнокислых микроорганизмов (*L. brevis* + *L. plantarum*) с добавлением в него фруктозы для управления и контроля процессом ферментации и

Литература

1. Dennis C. Microbiology of fruits and vegetables / C. Dennis // Essays in Agriculture and Food Microbiology. Norris R., Pettipher G.L. (eds). – NY: John Wiley and Sons Ltd. 1987. P.227.
2. Fleming, H.P. 1987. Considerations for the Controlled Fermentation and Storage of Sauerkraut. P.26-32.
3. Spiros Paramithiotis, George Papoutsis, Eleftherios H. Drosinos. Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables // Food biology series/ Paramithiotis S. (ed.). - Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2017. P.1-32.
4. Britta Wiander. Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables // Food biology series/ Paramithiotis S. (ed.). - Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2017. P.65-78.
5. Josephsen J., Jespersen L. Fermented foods and starter cultures // Handbook of Food Science, Technology and Engineering / Hui Y. H. (ed.). — Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. P.177-1-177-20.
6. Buckenhyeskes, H.J. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology Reviews 12: 253-272.
7. ГОСТ 10444.11-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов».
8. Лялина О.Ю., Глазков С.В., Тырина Е.С., Посокина Н.Е./ Исследование процессов деструкции фруктозы в процессе направленного ферментирования овощей с использованием штаммов молочнокислых микроорганизмов // Повышение качества, безопасности и конкурентоспособности продукции агропромышленного комплекса в современных условиях: Сборник научных трудов IX Международной конференции молодых ученых и специалистов, 22 октября 2015 г. – М.: ФГБНУ ВНИИПиВ, 2015. – С.191-195.

References

1. Dennis C. Microbiology of fruits and vegetables / C. Dennis // Essays in Agriculture and Food Microbiology. Norris R., Pettipher G. L. (eds). – NY: John Wiley and Sons Ltd. 1987. P.227.
2. Fleming, H.P. 1987. Considerations for the Controlled Fermentation and Storage of Sauerkraut. P.26-32.
3. Spiros Paramithiotis, George Papoutsis, Eleftherios H. Drosinos. Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables // Food biology series/ Paramithiotis S. (ed.). - Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2017. P.1-32.
4. Britta Wiander. Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables // Food biology series/ Paramithiotis S. (ed.). - Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2017. P.65-78.
5. Josephsen J., Jespersen L. Fermented foods and starter cultures // Handbook of Food Science, Technology and Engineering / Hui Y. H. (ed.). — Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. P.177-1-177-20.
6. Buckenhyeskes, H.J. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology Reviews 12: 253-272.
7. GOST 10444.11-2013 "Microbiology of food and animal feed. Methods for the detection and counting of the amount of mesophilic lactic acid microorganisms".
8. Lyalina O.Yu., Glazkov S.V., Tirina E.S., Posokina N.E. / Investigation of fructose destruction processes in the process of directed fermentation of vegetables using strains of lactic acid microorganisms // Improvement of quality, safety and competitiveness of agro-industrial complex products in modern conditions: Proceedings of the IX International Conference of Young Scientists and Specialists, October 22, 2015 - M.: FGBNU VNIIPBIVP, 2015. P.191-195.