ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Китаевская Светлана Владимировна

БИОТЕХНОЛОГИЯ КРИОРЕЗИСТЕНТНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

1.5.6. Биотехнология

Диссертация
на соискание ученой степени доктора технических наук

Научный консультант:
доктор технических наук, профессор
Решетник Ольга Алексеевна

Казань – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 6
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР 15
1.1 Характеристика молочнокислых бактерий и особенности их метаболизма 15
1.2 Биотехнологический потенциал молочнокислых бактерий как биологически активных компонентов пищи 23
1.3 Роль молочнокислых бактерий в формировании качества тестовых полуфабрикатов и хлебобулочных изделий 29
1.4 Перспективы развития криотехнологий в хлебопечении 39
1.5 Теоретические и практические основы выживаемости микроорганизмов при реализации криогенных технологий 45
1.6 Заключение к первой главе 55
ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 59
2.1 Организация работы и схема проведения эксперимента 59
2.2 Объекты исследования 59
2.3 Методы исследований 61
2.3.1 Методы выделения молочнокислых бактерий и исследование их биотехнологического потенциала 61
2.3.2 Методы исследования сырья, полуфабрикатов и хлебобулочных изделий 67
2.4 Способы приготовления замороженных полуфабрикатов и хлебобулочных изделий на их основе 69
2.5 Математические методы планирования эксперимента, обработки результатов исследований и оптимизации 71
ГЛАВА 3. СЕЛЕКЦИЯ КРИОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ОЦЕНКА ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА 72
3.1 Направленный отбор изолятов молочнокислых бактерий, устойчивых к низкотемпературному воздействию 72
3.2 Оценка функционально-технологических свойств новых штаммов молочнокислых бактерий 77
3.2.1 Изучение кислотообразующей активности молочнокислых бактерий 77
3.2.2 Исследование степени устойчивости молочнокислых бактерий к неблагоприятным факторам внешней среды 82
3.2.3 Исследование антагонистической активности молочнокислых бактерий 89

3.2.4 Изучение чувствительности штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам 92
3.3 Изучение ферментативной активности новых штаммов молочнокислых бактерий 94
3.3.1 Исследование способности штаммов молочнокислых бактерий синтезировать протеолитические ферменты 95
3.3.2 Исследование амилолитической активности штаммов молочнокислых бактерий 99
3.3.3 Исследование способности штаммов молочнокислых бактерий синтезировать липолитические ферменты 102
3.4 Исследование генопротекторных и антимутагенных свойств молочнокислых бактерий 103
3.4.1 Генопротекторная активность метаболитов криорезистентных лактобактерий в ДНК-повреждающем тесте 104
3.4.2 Изучение антимутагенной активности продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий 109
3.5 Оценка антиоксидантной активности криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий 111
3.5.1 Изучение антиоксидантной активности молочнокислых бактерий *in vitro* 112
3.5.2 Изучение антиоксидантной активности штамма *L. casei 32 in vivo* 116
3.6 Генотипирование перспективных штаммов лактобактерий 121
3.7 Заключение к третьей главе 122
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ КРИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ 127
4.1 Разработка способа повышения криорезистентности лактобактерий 127
4.1.1 Исследование влияния янтарной кислоты и ее солей на криорезистентность молочнокислых бактерий 127
4.1.2 Изучение влияния янтарной кислоты и сукцинатов на биотехнологические свойства лактобактерий 135
4.2 Влияние янтарной кислоты и сукцинатов на выживаемость и биотехнологические свойства клеток дрожжей при криообработке 141
4.3 Оптимизация питательной среды для повышения криорезистентности лактобактерий с использованием полного факторного эксперимента 146

4.4 Разработка криорезистентной закваски лактобактерий для пищевой промышленности 150
4.5 Экономическая эффективность разработанной криорезистентной закваски молочнокислых бактерий 153
4.6 Заключение к четвертой главе 156
ГЛАВА 5. РЕАЛИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КРИОРЕЗИСТЕНТНЫХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ РЖАНО-ПШЕНИЧНОГО ХЛЕБА НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ 159
5.1 Влияние низкотемпературной обработки на биотехнологические процессы в тестовых полуфабрикатах 159
5.1.1 Изучение выживаемости дрожжей и молочнокислых бактерий 159
5.1.2 Влияние криообработки на активность ферментов в тесте 174
5.2 Влияние низкотемпературной обработки на процессы созревания тестовых полуфабрикатов и качество готовых изделий 184
5.3 Разработка технологических параметров процесса приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов 193
5.4 Подбор эффективных заквасок молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами 200
5.5 Поиск эффективных пищевых криопротектов и моделирование рецептур ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов 211
5.5.1 Разработка рецептуры ржано-пшеничного хлеба с сухими молочными продуктами на основе замороженных полуфабрикатов 211
5.5.2 Биотехнологические основы применения модифицированных крахмалов в криотехнологии хлебобулочных изделий 214
5.5.3 Разработка технологических решений применения янтарной кислоты и ее солей в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба 219
5.5.4 Влияние ферментных препаратов на качество ржано-пшеничного хлеба, вырабатываемого по криотехнологии 236
5.5.5 Разработка технологии и рецептур ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением солодовых препаратов 248
5.6 Расчет экономического эффекта производства новых видов ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов 258
5.7 Заключение к пятой главе 261

ГЛАВА 6. НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ЦЕЛЬНОЗЕРНОВОГО ХЛЕБА 266
6.1 Разработка технологии зернового хлеба на ферментированной молочнокислыми бактериями диспергированной массе 266
6.1.1 Изучение роста молочнокислых бактерий на диспергированной зерновой массе 267
6.1.2 Исследование влияния молочнокислых заквасок на качество зернового хлеба 272
6.1.3 Определение антиоксидантной активности, перевариваемости белков и гликемического индекса зернового хлеба 277
6.1.4 Исследование сроков и условий хранения ферментированной зерновой массы 283
6.2 Разработка криотехнологии хлеба на основе ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы 292
6.2.1 Исследование влияния продолжительности низкотемпературной обработки на процессы созревания полуфабрикатов из ферментированной зерновой массы и качественные характеристики зернового хлеба 293
6.2.2 Разработка технологических решений применения янтарной кислоты и ее солей в криотехнологии зернового хлеба 300
6.2.3 Определение антиоксидантной активности, перевариваемости белков и гликемического индекса зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов 309
6.3 Расчет экономического эффекта производства новых видов зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов 316
6.4 Заключение к шестой главе 318
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 322
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 325
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 327
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Устойчивость к низкотемпературной обработке изолятов молочнокислых бактерий 359
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Последовательности 16S рРНК 362
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Матрицы планирования экспериментальных исследований 363
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Разработанная техническая документация 370
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Акты производственных испытаний 391
ПРИЛОЖЕНИЕ Е. Справка о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс ФГБОУ ВО «КНИТУ» 419

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. За последние годы расширились знания о свойствах молочнокислых бактерий, их функциях в различных биотехнологических системах. В настоящее время установлено, что молочнокислые бактерии играют ключевую роль в процессах брожения различных видов сельскохозяйственного сырья и являются продуцентами таких биологически активных веществ, как ферменты, витамины, антибиотики.

В силу неограниченности источников и широкого спектра действия молочнокислых бактерий особое значение приобретает углубленное изучение различных аспектов жизнедеятельности данной группы микроорганизмов. Промышленно-ценными культурами микроорганизмов, применяемыми в составе большинства заквасок для пищевых продуктов являются молочнокислые бактерии, относящиеся к роду *Lactobacillus,* и проявляющие высокую биохимическую активность.

Интенсивное внедрение в пищевой промышленности криогенных технологий требует новых подходов к разработке заквасочных культур, что обусловлено снижением жизнеспособности клеток и изменением функционально-технологических свойств заквасок при низкотемпературном воздействии. Существенной проблемой, сдерживающей реализацию криотехнологий продуктов питания, является ограниченный ассортимент криорезистентных заквасок на мировом рынке. Поиск и сравнительное изучение новых штаммов молочнокислых бактерий, обладающих криорезистентными свойствами, имеют важное теоретическое и практическое значение для совершенствования пищевой биотехнологии.

В настоящее время во многих странах мира, в том числе и России, востребованы криотехнологии по производству широкого ассортимента хлебопекарной продукции, так как они гарантируют сохранность качества изделий в необходимые для производства сроки, позволяют гибко реагировать на запросы рынка. С этих позиций разработка и внедрение криогенных технологий является важнейшей научно-практической задачей для пищевой промышленности, решение которой позволит удовлетворить растущий спрос рынка на замороженные полуфабрикаты и хлебопекарную продукцию, а также расширить ассортимент хлебобулочных изделий с высокими потребительскими характеристиками.

Замораживание полуфабрикатов хлебопекарного производства приводит к изменению их биохимических, реологических и теплофизических свойств. Ключевой проблемой при реализации криогенных технологий в хлебопечении является ухудшение качественных характеристик готовой продукции, связанное, в первую очередь, с гибелью

микрофлоры и нарушениями процесса брожения полуфабрикатов после их низкотемпературного хранения в замороженном виде.

Во всем мире выпускается широкий ассортимент замороженных полуфабрикатов из пшеничной муки, проводятся исследования по разработке и совершенствованию криотехнологии ржаных и ржано-пшеничных изделий, зернового хлеба.

Одним из перспективных направлений решения имеющихся проблем является селекция криорезистентных молочнокислых бактерий, сохраняющих свою биологическую активность на различных этапах процесса приготовления хлебобулочных изделий с применением криотехнологии, и разработка на их основе заквасок с криорезистентными свойствами.

Обеспечение высокого качества хлебопекарной продукции на основе замороженных полуфабрикатов может быть достигнуто биотехнологическими методами, в связи с чем работа, направленная на поиск, селекцию, изучение свойств новых заквасок молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами и разработку научно-практических аспектов их применения для усовершенствования и оптимизации технологии хлебобулочных изделий с применением криотехнологии является актуальной.

Степень разработанности темы. Фундаментальные основы промышленной биотехнологии микроорганизмов, направленной на получение продуктов питания нового поколения, заложены в трудах Ганиной В.И., Костенко Ю.Г., Липатова Н.Н., Рогова И.А., Семенихиной В.Ф., Соловьева В.И., Титова Е.И., Токаева Э.С., Хорольского В.В., De Vuyst L., Eerola S., Klaenhammer T.R., Liong M.T., Madsen S.M., Niinivaara F., Tanous C., Vandamme E.J. и др.

Исследованиям отдельных аспектов проблемы производства хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов посвящены работы многих отечественных и зарубежных исследователей: Лабутиной Н.В., Матвеевой И.В., Поландовой Р.Д., Пономаревой Е.И., Сокол Н.В., Суворова О.А., Тешитель О.В., Hsu K., Kline L. W., Lorenz K., Neureneuf O., Ribotta P.D. и др.

Развитие научно-практических основ биотехнологии молочнокислых бактерий позволит решить актуальные проблемы по разработке нового ассортимента и импортозамещению заквасок для пищевой промышленности, совершенствованию криотехнологий хлебопекарного производства и получению продуктов питания с высокими потребительскими характеристиками и биологической ценностью.

Цель диссертационной работы – разработка научно-практических основ биотехнологии криорезистентных молочнокислых бактерий, разработка на их основе новых технологий и рецептур хлебопекарной продукции с высокими показателями качества и биологической ценности.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- теоретически и экспериментально обосновать способы стабилизации процессов брожения и биотехнологических свойств полуфабрикатов хлебопекарного производства в условиях криотехнологии;

- провести селекционные исследования по направленному отбору криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий;

- провести оценку биотехнологического потенциала выделенных изолятов молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами и идентификацию перспективных штаммов с применением классических фенотипических методов в сочетании с генетическими методами;

- разработать состав оптимизированной питательной среды для повышения криорезистентности лактобактерий;

- экспериментально обосновать параметры и режимы приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов, сохраняющие высокую жизнеспособность молочнокислых бактерий и дрожжей, для увеличения сроков хранения полуфабрикатов и обеспечения стабильного качества готовой продукции;

- экспериментально обосновать внедрение стадии молочнокислой ферментации диспергированной зерновой массы из пшеницы в технологии зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов, позволяющей повысить потребительские свойства и биологическую ценность зернового хлеба;

- провести поиск эффективных пищевых криопротекторов в отношении молочнокислых бактерий и хлебопекарных дрожжей, моделирование рецептур и разработку технологических решений для производства хлебопекарной продукции на основе замороженных полуфабрикатов;

- разработать нормативно-техническую документацию на полуфабрикаты и новый ассортимент ржано-пшеничного и пшеничного зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов, апробировать технологии в производственных условиях; рассчитать экономический эффект практической реализации новых видов хлебобулочных изделий.

Научная концепция исследования заключается в разработке научно-практических основ биотехнологии криорезистентных заквасок молочнокислых бактерий, разработке на их основе новых технологий и рецептур хлебобулочных изделий с высокими показателями качества и биологической ценности.

Научная новизна. Сформулирована научная концепция стабилизации биотехнологических свойств тестовых полуфабрикатов после низкотемпературной обработки за счет применения криорезистентных лактобактерий, пищевых добавок и

ингредиентов с криопротекторными свойствами, обоснованы принципы разработки новых технологий и рецептур ржано-пшеничного и зернового хлеба из пшеницы на основе замороженных полуфабрикатов.

Из различных пищевых источников выделено 15 перспективных штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus,* обладающих высокой устойчивостью к низкотемпературному воздействию. Установлено, что штаммы *L. casei 32, L. plantarum 24* и *L. fermentum 10* обладают устойчивостью к различным стрессовым воздействиям – замораживанию, изменению pH среды, наличию в среде желчи, NaCl, фенола, антибиотикам и окислительному стрессу. Выявлено, что клетки и метаболиты лактобактерий *L. casei 32, L. fermentum10, L. plantarum 21, L. acidophilum 9* и *L. plantarum 24* обладают антиоксидантными свойствами. При помощи различных лабораторных анализов *in vitro* и *in vivo* установлено, что штамм *L. casei 32* проявляет высокую генопротекторную, антимутагенную и антиоксидантную активность на уровне 60-80 %, 75-85 % и 70-80 % соответственно.

Отобраны перспективные для пищевой промышленности штаммы *L. casei 32* и *L. plantarum 24* с криорезистентными свойствами в результате оценки комплекса функционально-технологических свойств новых штаммов молочнокислых бактерий (кислотообразующей и ферментативной способности, антагонистической активности, устойчивости к различным стрессовым воздействиям, антимутагенной и антиоксидантной активности); геномные последовательности данных штаммов зарегистрированы в базе данных Genbank с присвоением учетных номеров.

Разработан состав питательной среды для молочнокислых бактерий, оптимизированной по содержанию глюкозы, дрожжевого экстракта, сукцината аммония, ионов Mn^{2+} и Mg^{2+}, применение которой позволяет увеличить выживаемость лактобактерий после низкотемпературной обработки в 2,5 раза, повысить удельную скорость роста клеток на 16,3 %.

Установлено, что в результате длительной низкотемпературной обработки в ржано-пшеничных полуфабрикатах происходит существенное изменение соотношения клеток дрожжей и молочнокислых бактерий: гибель клеток молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus* составляет 53 %, дрожжей *p. Saccharomyces* – 41 %. Выявлено, что из молочнокислых бактерий ржано-пшеничного теста наиболее устойчивыми к низкотемпературному воздействию являются клетки *L. plantarum* и *L. fermentum*.

Впервые показано, что при применении криогенных технологий снижается активность собственных ферментов ржаной и пшеничной муки: активность протеаз в среднем уменьшается на 75 %, амилаз на 41 %.

Установлено, что применение криорезистентных молочнокислых бактерий *L. casei TMB-D* и *L. casei 32* в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба позволяет интенсифицировать процесс брожения полуфабрикатов, а также улучшить органолептические, физико-химические и структурно-механические характеристики хлебопекарной продукции.

Впервые показано, что внедрение стадии ферментации разработанными молочнокислыми заквасками диспергированной зерновой массы при производстве хлеба из целого зерна пшеницы позволяет увеличить сроки хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде с 3 до 5 месяцев, повысить качественные характеристики и антиоксидантную емкость зернового хлеба на 24,5 %.

Выявлены корреляционные зависимости выживаемости молочнокислых бактерий и дрожжей, биотехнологических свойств полуфабрикатов и показателей качества хлебобулочных изделий от концентраций ингредиентов и биологически активных добавок в разработанных рецептурах ржано-пшеничного хлеба: молока сухого обезжиренного, сыворотки молочной сухой, янтарной кислоты, сукцинатов калия и аммония, пшеничного солода, модифицированных кукурузных крахмалов и ферментной композиции (содержащей Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG в соотношении 6:2,5:1); расширены представления о технологических функциях данных компонентов для производства хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в разработке научных основ биотехнологий в повышении качества ржано-пшеничного и зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов за счет применения криорезистентных заквасок молочнокислых бактерий и пищевых добавок и ингредиентов с криопротекторными свойствами, а также в развитии основ создания новых видов хлебобулочных изделий с применением криотехнологии.

Селекционированы криорезистентные штаммы молочнокислых бактерий *L. casei 32* и *L. plantarum 24*, обладающие широким спектром функционально-технологических свойств для пищевой промышленности, в том числе хлебопекарной отрасли. Данные штаммы обладают высокими антиоксидантными, антимутагенными и генопротекторными свойствами и могут быть использованы при разработке пищевых продуктов с применением криогенных технологий, а также биологически активных добавок для пищевой, фармацевтической, косметической промышленности и ветеринарии.

Разработана нормативно-техническая документация на криорезистентную закваску лактобактерий для пищевой промышленности (ТУ 10.89.19.300–007–02069639–2023).

Разработан состав оптимизированной питательной среды для лактобактерий, позволяющий увеличить их выживаемость после низкотемпературной обработки.

Разработаны режимы тестоприготовления, замораживания, хранения и дефростации полуфабрикатов хлебопекарного производства (ржано-пшеничного теста и полуфабрикатов из ферментированной зерновой массы), позволяющие сохранить высокую бродильную активность микроорганизмов и улучшить качественные характеристики хлебобулочных изделий.

Усовершенствована технология ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов за счет использования криорезистентной закваски молочнокислых бактерий и пищевых ингредиентов и добавок с криопротекторным действием, позволяющая интенсифицировать процесс брожения теста, увеличить продолжительность хранения полуфабрикатов в замороженном виде до 5 мес., получить хлебопекарную продукцию с высокими потребительскими характеристиками, а также расширить ассортимент хлебобулочных изделий, увеличить конкурентоспособность продукции.

Разработана технология производства зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов, предусматривающая внедрение стадии молочнокислой ферментации диспергированной зерновой массы и применение янтарной кислоты и ее солей, что позволит улучшить качественные характеристики готовой продукции, увеличить антиоксидантную емкость зернового хлеба на 24,5 %.

Разработаны технологические схемы производства, рецептуры и нормативно-техническая документация на полуфабрикаты и новый ассортимент ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением криорезистентных лактобактерий: хлеб «Морозко» с сухими молочными продуктами (ТУ 001–13981212–2004), «Морозко новый» с набухающим кукурузным крахмалом (ТУ 10.72.19–011–2003968806–2022), «Элита» с ферментной композицией (ТУ 10.72.19–016–2003968806–2022), «Злата» с солодовыми препаратами (ТУ 10.72.19–017–2003968806–2022), «Янтарный» с янтарной кислотой или ее солями (ТУ 10.72.19–014–2003968806–2022), а также на новые виды зернового хлеба на основе ферментированной зерновой массы: хлеб «Биозлак» (ТУ 10.71.11–009–2005989134–2021), «Биозлаковый» (ТУ 10.71.11–002–2005989134–2022) и «Янтарь» (ТУ 10.72.19–004–2005989134–2022).

Проведена промышленная апробация разработанных технологий на хлебопекарных предприятиях АО «Татхлеб» (г. Казань) и предприятиях малой мощности (ИП «Саляхетдинова Э.Ф.» (г. Казань), ИП «Рамеев Р.Р.» (г. Набережные Челны), обеспечивающих выпуск готовой продукции с высокими технологическими и потребительскими свойствами. Установлено, что экономический эффект от реализации

разработанных видов замороженных полуфабрикатов ржано-пшеничного и зернового хлеба составит 5,4 тыс. руб./т и 6,06 тыс. руб./т соответственно.

Основные результаты исследований используются в учебном процессе в ФГБОУ ВО «КНИТУ» при реализации основных образовательных программ подготовки бакалавров и магистров по направлениям 19.03.02, 19.04.02 – «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.04, 19.04.04 – «Технология и организация продукции общественного питания».

Предлагаемые технологии позволят рационально использовать сырьевую базу агропромышленного комплекса, повысить эффективность технологического процесса, увеличить срок хранения полуфабрикатов в замороженном виде и продлить сроки свежести хлебобулочных изделий.

Методология и методы исследований. Исследования проводили согласно методологии, основой которой является комплекс методов познания: теоретических, эмпирических, практических, базирующихся на естественно-научных закономерностях. В работе применяли общепринятые и специальные современные микробиологические, физические, химические, биохимические, органолептические и математические методы анализа. Обработка экспериментальных данных проводилась при помощи настроек «Анализ данных» и «Поиск решений» стандартной программы Microsoft Office Excel 2013 и программы Statistica 10.

Научные положения, выносимые на защиту:

- результаты селекционных исследований криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий и оценки их биотехнологического потенциала для производства пищевых продуктов, в том числе хлебобулочных изделий;

- состав оптимизированной питательной среды для лактобактерий, позволяющий увеличить их выживаемость после низкотемпературной обработки;

- условия получения и стабилизации качества хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов за счет применения криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий с высоким биопотенциалом и пищевых добавок и ингредиентов криопротекторного действия;

- технологические решения по определению условий производства ржано-пшеничного хлеба с применением криотехнологии, сохраняющих высокую жизнеспособность молочнокислых бактерий и дрожжей, увеличивающих сроки хранения полуфабрикатов и обеспечивающих высокую конкурентоспособность и стабильное качество готовой продукции;

- экспериментальное обоснование применения молочнокислой ферментации зерновой диспергированной массы из пшеницы для улучшения биотехнологических

свойств полуфабрикатов. повышения качественных характеристик и биологической ценности зернового хлеба.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается проработкой научно-литературных и информационно-патентных данных в соответствии с тематикой диссертационной работы, применением современных методов анализа, математической обработкой результатов исследований, апробацией результатов исследований в промышленности, публикацией основных положений работы в научных изданиях.

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на международных научных, научно-практических, научно-технических мероприятиях разного уровня: ежегодных научных сессиях Казанского национального исследовательского технологического университета (2002-2023 гг.); Всероссийской научной конференции с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2002-2015, 2017, 2019, 2021, 2023 гг.); III межрегиональной научной конференции молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2003, 2014 г.); XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003 г.); XI международной конференции «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений» (Казань, 2005 г.); X международном форуме «Высокие технологии XXI века» (Москва, 2009 г.); X научно-практической конференции с международным участием «Технологии и продукты здорового питания. Функциональные пищевые продукты» (Москва, 2012 г.); Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015 г.); Региональной конференции молодых ученых «Молодежь и инновации Татарстана» (Казань, 2015, 2016 гг.); V Международном Балтийском морском форуме в рамках VI Международной научно-практической конференции «Пищевая и морская биотехнология» (Калининград, 2017 г.); 2-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биохимия - основа наук о жизни» (Казань, 2019 г.); International Conference on Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies - AGRITECH (2019, 2020 г.г.); Enhancing Livelihood through Sustainable Agriculture in the Post-Pandemic Phase - ICARD (Индонезия, 2021 г.), Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020, 2021 гг., Алушта 2022 г.).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с основными направлениями исследований ФГБОУ ВО «КНИТУ» по приоритетным направлениям развития «Исследование механизма интенсификации процессов получения продуктов биосинтеза на базе использования ряда химических и биологических добавок» №01840017294 и

«Разработка научных и практических основ технологии производства и комплексной переработки сырья растительного и животного происхождения для выработки конкурентно способных пищевых продуктов» № 01200305357. Исследования были поддержаны грантом РФФИ 20-016-00025 «Новые штаммы *Lactobacillus* с пробиотическим, антиоксидантным и генопротекторным действием для биотехнологических производств, основанных на молочнокислом брожении».

Личное участие автора состоит в выборе направления исследований, проведении анализа литературных и патентных источников по проблеме диссертационного исследования, в постановке задач и выполнении теоретических и экспериментальных исследований, апробации результатов исследований. Диссертационная работа является обобщением научных исследований, проведенных в 2000-2022 гг. лично автором и при его непосредственном участии в качестве руководителя научно-исследовательских работ бакалавров и магистров.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 74 научные работы, в т.ч. 17 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований; 5 статей в журналах, индексированных в международных базах цитирования Scopus/WoS; 3 статьи в российских журналах (РИНЦ/RSCI); 48 публикаций по материалам докладов на всероссийских и международных конференциях; монография.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, списка использованных источников и 6 приложений. Работа изложена на 419 страницах машинописного текста и содержит 169 рисунков и 89 таблиц. Список литературы включает 387 наименований, в том числе 233 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

1.1 Характеристика молочнокислых бактерий и особенности их метаболизма

Молочнокислые бактерии – специфическая группа микроорганизмов, обусловливающих преобразование углеводов до молочной кислоты [10, 23, 43, 52, 53, 104]. С первых научных исследований, проведенных Луи Пастером в 1857 г., до сегодняшних дней, молочнокислые бактерии привлекают к себе пристальное внимание специалистов из-за их широкого применения в пищевой промышленности, медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Молочнокислые бактерии по основанной на филогенетических принципах классификации принадлежат к грамположительным микроорганизмам, не образующих спор, не использующих O_2 для получения энергии, но способных жить в его присутствии, то есть являются аэротолерантными бактериями, в подавляющем случае не образующих каталазу [10, 31, 85, 126, 132, 167, 178, 201, 386].

Согласно современной классификации данная филогенетическая группа насчитывает около 500 достоверно описанных видов, относящихся к следующим семействам [386]:

1) *Aerococcaceae* (*p. Abiotrophia, Aerococcus, Dolosicoccus, Eremococcus, Facklamia, Globicatella, Ignavigranum*);

2) *Carnobacteriaceae* (*p. Alkalibacterium, Allofustis, Alloiococcus, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Carnobacterium, Desemzia, Dolosigranulum, Granulicatella, Isobaculum, Lacticigenium, Marinilactibacillus, Pisciglobus, Trichococcus*);

3) *Enterococcaceae* (*p. Bavariicoccus, Catellicoccus, Enterococcus, Melissococcus, Pilibacter, Tetragenococcus Vagococcus*);

4) *Lactobacillaceae* (*p. Lactobacillus* и *Pediococcus*);

5) *Leuconostocaceae* (*p. Leuconostoc, Fructobacillus, Oenococcus Weissella*);

6) *Streptococcaceae* (*p. Lactococcus, Lactovum, Streptococcus*).

С прикладной точки зрения семейства *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae* представляют собой две наиболее важные линии, поскольку они охватывают наибольшее количество коммерческих препаратов молочнокислых бактерий.

Семейство *Lactobacillaceae* включает наибольшее количество видов, признанных безопасными и имеющими статус GRAS, многие штаммы находят широкое применение в пищевой микробиологии и биотехнологии, благодаря их вкладу в производство ферментированных продуктов питания или использованию в качестве пробиотиков [386].

Главным конечным продуктом метаболизма лактобацилл является D- и L- молочная кислота. У представителей гетероферментативных видов в качестве конечных продуктов, кроме того, образуется уксусная кислота, углекислый газ и др. Некоторые штаммы лактобацилл обладают необычайной метаболической активностью: продуцируют α-амилазы, гидролизуют мочевину, синтезируют экзополисахариды, разрушают щавелевую кислоту и холестерин, декарбоксилируют аминокислоты или разрушают амины, нейтрализуют энтеротоксины и т.д. [24, 34, 44, 73, 100, 101, 178, 201].

Благодаря продукции органических кислот, перекисей, антибиотиков и бактериоцинов, многие штаммы лактобацилл проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении патогенных микроорганизмов [34, 114, 135, 142, 346].

Молочнокислое брожение, метаболизм лактозы.

Молочнокислые бактерии получают энергию за счёт сбраживания углеводов с образованием в качестве основного продукта молочной кислоты. Гомоферментативные молочнокислые бактерии при оптимальных температурах и pH в средах с содержанием не менее 2 % глюкозы сбраживают глюкозу с образованием от 85 до 95 % молочной кислоты; гетероферментативные 50-65 % глюкозы переводят в молочную кислоту, остальная же часть трансформируется ими в уксусную кислоту, этанол, углекислый газ, ацетоин, диацетил и другие ароматические вещества [10, 11,132].

Большинство молочнокислых бактерий активно сбраживают лактозу, что имеет большое значение с точки зрения использования молочнокислых бактерий в молочной промышленности. Пути ферментации лактозы молочнокислыми бактериями, по Cogan и Daly, показаны на рис. 1.1 [199].

У гомоферментативных мезофильных молочнокислых бактерий (лактококки *Lac. lactis*, термофильные и мезофильные бактерии *L. bulgaricum, L. acidophilum, L. casei* и др.) лактоза транспортируется через клеточную мембрану с помощью фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы (PEP/PTS-система), в которой фосфоенолпируват является поставщиком фосфатов и обеспечивает энергией процесс переноса [199]. Лактоза в процессе переноса в клетку фосфорилируется, где при участии внутриклеточной фосфо-β-галактозидазы сразу же гидролизуется до глюкозо-6-фосфата и галактозо-6-фосфата. Затем глюкозо-6-фосфат сбраживается до лактатов гликолитическим путем (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса) [85].

Таким образом, при гомоферментативном молочнокислом брожении из одного моля лактозы образуются четыре моля молочной кислоты с одновременным синтезом четырех молей аденозинтрифосфата (АТФ).

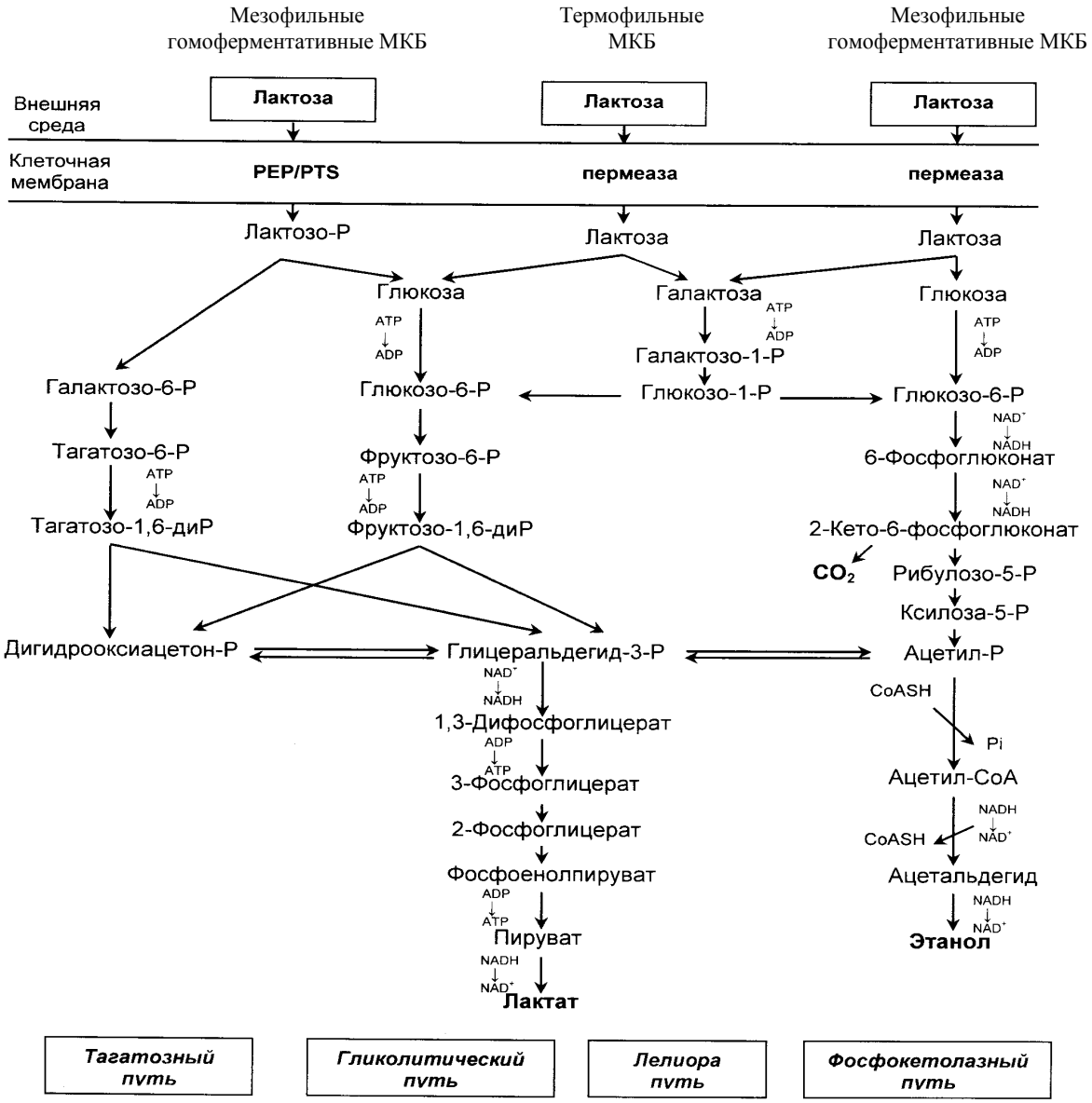


Рисунок 1.1 – Метаболизм лактозы у молочнокислых бактерий [199]

Примечание: PEP/PTS - фосфоенолпируват-зависимая фосфотрансферазная система; МКБ – молочнокислые бактерии.

Ключевыми энзимами гликолиза являются пируваткиназа и лактатдегидрогеназа, активаторами которых являются фруктозо-1,6-дифосфат, ингибитором – неорганический фосфор [85].

Галактозо-6-фосфат, образующийся в результате гидролиза лактозы, сбраживается в клетках стрептококков D-тагатозо-6-фосфатным путем, который соединяется с гликолитическим путем на уровне триозо-фосфатов, так что конечным продуктом ферментации галактозы, как и глюкозы, является молочная кислота. Таким образом, в среду клеткой выделяется только молочная кислота и минорные продукты ферментации лактозы [39,40].

В результате молочнокислого брожения накапливаются оптические изомеры L(+)- и D(-)-молочной кислоты, соотношение двух форм молочной кислоты может быть различным для отдельных штаммов одного вида бактерий [34,126].

У термофильных гомоферментативных (*Str. thermophilus, L. bulgaricum, L. acidophilum, L. helveticus* и др.) и гетероферментативных молочнокислых бактерий (лейконостоки, *L. brevis* и др.) имеется пермеазная система для транспортировки лактозы внутрь клетки, требующая эндогенного источника энергии. Предполагается, что PEP/PTS система обеспечивает быстрое, пермеазная – медленное сбраживание лактозы [199].

У термофильных лактобацилл (*L. bulgaricum* и *L. helveticus)* обнаружена фосфогалактозидаза и не обнаружена фосфо-3-галактозидаза [199]. Все они переносят лактозу в клетки пермеазной системой. Лейконостоки также, по-видимому, транспортируют лактозу при помощи пермеазной системы, поскольку они не обладают гликолитической системой, сопряженной с PEP/PTS системой [40]. Ключевым энзимом пути Лелиора является галактокиназа. Большинство штаммов термофильного стрептококка образует очень мало этого энзима, что ведет к неспособности их сбраживать галактозу [40]. Несброженная галактоза выходит из клетки и накапливается в среде [39, 40].

Бактерии *p. Leuconostoc* и гетероферментативные молочнокислые бактерии для сбраживания глюкозы, образующуюся при гидролизе лактозы, используют фосфокетолазный (пентозофосфатный) путь, что объясняется отсутствием у них ключевого фермента альдолазы, необходимого для расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две молекулы триозофосфата [10, 199].

Суммарные уравнения сбраживания лактозы гликолитическим (гомоферментативным) путем (1.1) и фосфокетолазным (гетероферментативным) путем (1.2) имеет следующий вид:

$$1\ \text{Лактоза} + 4\ \text{АДФ} \longrightarrow 4\ \text{Лактат} + 4\ \text{АТФ} \qquad (1.1)$$

$$1\ \text{Лактоза} + 2\ \text{АДФ} \longrightarrow 2\ \text{Лактат} + 2\ \text{Этанол} + 2\ CO_2 + 2\ \text{АТФ} \qquad (1.2)$$

Из уравнений следует, что гликолитический путь ферментации лактозы энергетически в два раза более выгоден, чем гетероферментативный. Следует отметить, что гомо- и гетероферментативные пути характерны для сбраживания глюкозы и лактозы соответствующими микроорганизмами при оптимальных для их жизнедеятельности условиях. Отклонение от этих условий может изменить характер брожения. Так, например, лактококки в средах с галактозой или низким содержанием глюкозы сбраживают сахара с образованием лактатов, формиатов, ацетатов, этанола и ацетоина из пируватов [40, 386].

Таким образом, при размножении термофильных стрептококка и лактобактерий, неспособных сбраживать галактозу, в среде накапливается свободная галактоза. Мезафильные стрептококки сбраживают свободную, не входящую в состав лактозы или других углеводов галактозу, но только при отсутствии лактозы и глюкозы в среде [39, 40].

Способность сбраживать лактозу у многих молочнокислых бактерий закодировано не на хромосомах, а на плазмидах, которые могут быть утрачены клетками [40]. В природе лактоза встречается практически только в молоке. Адаптация молочнокислых бактерий к молоку сопровождалась потерей ими способности синтезировать многие жизненно важные вещества, поскольку они их получают из молока в готовом виде. Поэтому питательные потребности молочнокислых бактерий очень сложны.

Метаболизм цитратов молочнокислыми бактериями.

Продукты метаболизма цитрата играют важную роль в формировании органолептических характеристик ферментируемых пищевых продуктов. В молоке в среднем содержится 0,16 % лимонной кислоты, что примерно в 30 раз ниже содержания лактозы [31]. Цитраты сбраживают лейконостоки, *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis, Str. thermophilus*. *L. plantarum, L. casei, L. fermentum* [72, 167, 217, 251, 288].

Катабализм цитратов молочнокислыми бактериями наиболее изучен у *Lac. lactis subsp. diacetylactis* и *Leu. mesenteroides,* где его рассматривают как дополнительный метаболический путь для получения энергии [167, 252, 289]. Цитратпермиаза у данных микроорганизмов являются вторичными транспортерами, которые переносят цитрат с протоном в клетку, и эффективно обменивают дивалентный цитрат на моновалентный D-лактат [167, 288]. Цитратпермиазе *Leu. mesenteroides* необходимо, чтобы глюкоза, как ко-метаболит произвела протонную двигательную силу [289].

Цитраты не являются прямым источником энергии для молочнокислых бактерий, за исключением энтерококков, поэтому они ферментируются только в присутствии сбраживаемых молочнокислыми бактериями углеводов. Катаболизм цитратов наблюдается после сбраживания около 70 % углеводного субстрата [217]. При культивировании *Str. thermophilus* в присутсвии 2,5 % глюкозы и 1,8 % цитрата, потребление цитрата начинается через 6-8 ч культивирования [72].

Центральное место в метаболизме цитрата занимает пируват. Цитратсбраживающие молочнокислые бактерии под действием фермента цитратлиазы расщепляют цитрат на уксусную и щавелевоуксусную кислоты, последняя под действием соответствующей декарбоксилазы превращается в пируват. Дальнейшее метаболизирование пирувата осуществляется по трем различным путям: часть молекул восстанавливается до молочной кислоты; другая часть подвергается декарбоксилированию, приводящему к возникновению

разных C_2-интермедиатов (ацетил-КоА и ацетальдегид) и взаимодействию между ними, заканчивающемуся синтезом молекулы диацетила [200].

Ацетоин, диацетил и бутиленгликоль представляют собой три стадии окисления одного и тогоже соединения. Восстановление диацетила в ацетоин необратимо, тогда как последующее восстановление ацетоина в 2,3-булитенгликоль является обратимой реакцией равновесия. Данный путь катабализма цитрата представлен на рисунке 1.2.

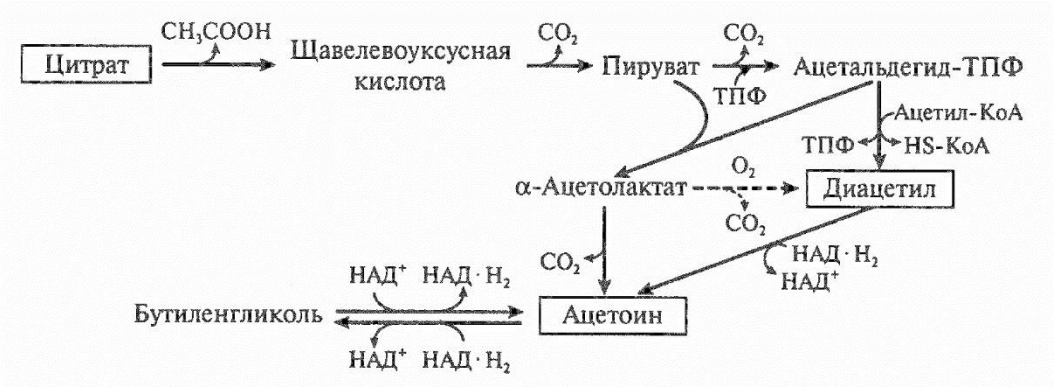


Рисунок 1.2 – Один из путей катаболизма цитрата ароматобразующими молочнокислыми бактериями – синтез диацетила и ацетоина [200]

Как правило, ароматобразующие молочнокислые лактококки синтезируют диацетил в меньших количествах по сравнению с ацетоином. Так, *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis* образует 12 мг/кг диацетила (некоторые штаммы – до 50 мг/кг), лейконостоки – 5 мг/кг, а ацетоина – в 2-10 раз больше [29, 251]. Это объясняется дефицитом в среде необходимого для синтеза диацетила ацетил-СоА, а также его восстановлением в ацетоин под действием диацетилредуктазы. Диацетилредуктазу выделяют как молочнокислые стрептококки, так и лактобактерии. Активность фермента возрастает при повышении температуры, pH и падении редокспотенциала [15, 60].

У штамма *L. casei* ATCC334 выявлен дополнительный путь катабализма цитрата, который включает удваивание цикла трикарбоновых кислот и заключается в преобразовании цитрата в сукцинат. Наличие фумаразы является уникальным для *L. casei* ATCC334 [217].

Конечными продуктами метаболизма цитратов молочнокислыми бактериями могут быть - диоксид углерода, L-аланин, L/D-лактат, диацетил, уксусная кислота, этанол, сукцинат и 2,3-бутандиол [217, 251]. На образование того или иного продукта в результате катаболизма цитрата влияют ряд факторов, например, концентрация углеводного субстрата, температура и pH [15, 72, 251]. Так при лимите лактозы или галактозы в среде главным конечным продуктом у *L. casei* является уксусная кислота, а при избытке – преимущественно молочная кислота [217], что объясняется тем, что фермент лактатдегидрогеназа ингибируется высокими концентрациями фруктозо-1,6-дифосфата.

При лимите по углеводу внутриклеточный уровень фруктозо-1,6-дифосвата восстановлен, тем самым препятствует деятельности фермента. В этих условиях внутриклеточный пул пировиноградной кислоты может быть превращен в уксусную кислоту [217].

Изучению путей метаболизма цитратов молочнокислыми бактериями, в особенности лактобактерий, посвящен широкий ряд современных исследований, как зарубежной, так и отечественной научной литературы, данный интерес вызван перспективой использования лактобактерий в качестве продуцентов ценных метаболитов.

Протеолиз белков молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии относятся к микроорганизмам, характеризующимся зависимостью от многих элементов питания, в том числе аминокислот и пептидов [52]. Внеклеточные (включая ассоциированные с клеткой) протеиназы являются основными ферментами, осуществляющими превращение белков среды обитания в форму, доступную для этих бактерий [273].

За последние десятилетия протеолитическая система молочнокислых бактерий изучена достаточно хорошо, особенно у стрептококков [46, 151, 180, 284, 362]. Знания о протеолитической активности лактобактерий не столь полны, но в настоящее время активно проводятся исследования в данном направлении [129, 192, 269, 376]. Показано, что лактобактерии гидролизуют 25-30 % казеина, тогда как кокки 15-17 %, при этом в молоке накапливается различное количество свободных аминокислот. Наибольшую протеолитическую активность среди лактобактерий проявляют *L. bulgaricum, L. acidophilum, L. helveticum* [129, 192, 269]. Среди стрептококков более высокую протеолитическую активность имеют *Lac. lactis* subsp. *lactis* и *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, меньшую – *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis, Str. thermophilus* и незначительную - *Leu. dextranicum* [180, 273, 284, 362].

Протеолиз казеина активно протекает в первые часы и сутки культивирования молочнокислых бактерий, у большинства штаммов максимум протеолитической активности приходится на экспоненциальную фазу роста [60, 151].

Для расщепления белков и крупных пептидов молочнокислые стрептококки имеют четыре протеиназы и две пептидазы с узким и широким спектрами действия, локализованные на клеточной стенке или мембране [40, 273]. Протеиназы стрептококков - металлоэнзимы, активируются в присутствии ионов кальция [217]. Только одна из четырех протеиназ присутствует у всех штаммов стрептококков. Неодинаковый набор протеиназ определяет неодинаковые протеолитические свойства штаммов молочнокислых бактерий [46].

Для синтеза собственных протеолитических ферментов молочнокислым стрептококкам нужны экзогенные аминокислоты, поэтому они начинают синтез спустя 2-3

генерации после внесения в молоко, когда численность популяции достигнет 8-16 % от максимально возможного уровня в молоке при неконтролируемом pH [192, 273].

Представители рода *Lactobacillus* (*L. bulgaricum, L. helveticum, L. casei, L. plantarum* и др.) способны продуцировать ассоциированные с клеточной поверхностью протеолитические ферменты, активные в широком диапазоне pH и способные к гидролизу казеина, в частности его α- и β-форм, альбумина и некоторых иммуноглобулинов [101, 129].

Оптимум действия протеаз молочнокислых стрептококков находится при pH 6,0-7,5, протеаз лактобактерий – от pH 5,7 до 8,5 в зависимости штамма, при pH 5 интенсивность протеолиза снижается в среднем на 50 % [27]. Выявлено, что ассоциированные протеиназы штамма *L. plantarum* ИМ-9/138 активны в диапазоне pH 7,2-8,5, при этом большая активность наблюдается при более щелочном значении pH субстрата [129].

Протеиназы непрочно связаны с клеточной стенкой и могут выделяться в среду, вследствие чего молочнокислые бактерии могут расщеплять белки вне клетки. Для молочнокислых бактерий характерно образование различных типов экзопротеаз, обладающих аминопептидазной, дипептидазной, трипептидазной и карбоксипептидазной активностью, а также продукция широкого спектра внеклеточных гидролаз, что позволяет включить их в состав биопрепаратов нового поколения [101, 269]. У лейконостоков протеиназная активность клеточных стенок очень низкая, возможно, у них вообще отсутствуют протеиназы, ассоциированные с клеточной стенкой [40].

Таким образом, протеолитическая активность - один из наиболее важных биохимических признаков молочнокислых бактерий, которым необходимо пользоваться для оценки преимущества одних штаммов организмов перед другими в отношении использования их в пищевом производстве. Это объясняется тем, что продукты гидролиза белковых соединений либо входят в состав вкусовых веществ ферментируемых продуктов, либо являются предшественниками для их возникновения [46, 151, 356].

Липолиз молочного жира.

Молочнокислые бактерии обладают некоторой липолитической активностью, которая заключается в расщеплении триацилглицеринов на глицерин и жирные кислоты под действием липаз [40].

Продуктами ферментативного расщепления жиров являются ди-, моноацилглицерины и свободные жирные кислоты, преимущественно масляная, капроновая, каприловая, каприновая и лауриновая [39, 183].

Липолитическая активность молочнокислых бактерий очень низка, но продукты липолиза играют важную роль в формировании вкуса и аромата ферментируемых пищевых продуктов, потому что они обладают низким вкусовым порогом [256].

Липолитическую активность бактерий обычно оценивают по приросту содержания свободных жирных кислот в цельном стерильном молоке после семидневного культивирования при оптимальной температуре для роста изучаемого штамма: увеличение содержания свободных жирных кислот на 4 % и выше свидетельствовало о высокой, на 2,0-2,5 % – о средней и на 1,5 % – о низкой липолитической активности штамма [40].

Высокая и средняя липолитическая активность отмечена у *L. helveticum, L. lactis*, *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis, Lac. lactis* subsp. *cremoris,* низкая – у *Lac. lactis* subsp. *lactis* и *Str. thermophilus.* Высокой липолитической активностью обладают также представители *p. Leuconostoc* [20, 40, 183]. Штаммы молочнокислых бактерий отличаются не только по скорости гидролиза липидов, но и по спектру высвобождаемых жирных кислот [20].

Уманским М.С. изучена фосфолипазная активность мезофильных молочнокислых стрептококков и лейконостоков. Высокая фосфолипазная активность отмечена у штаммов *Leu. cremoris,* средняя у *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis,* низкая у *Lac. lactis* subsp. *cremoris* [20]. Закваски с высокой фосфолипазной активностью в отличие от заквасок с высокой липолитической активностью, ухудшают качество молочнокислых продуктов [40].

Установлена зависимость гидролитического действия на молочный жир некоторых штаммов *Lac. lactis* от уровня протеолитической активности. Чем выше способность штамма накапливать в среде низкомолекулярные продукты азотистого обмена, тем выше концентрация в среде моно-1,2-диацилглицерина и свободных жирных кислот [103]. Справедливо говорить о выраженной гетерогенности липолитической активности у штаммов молочнокислых бактерий, что необходимо учитывать при подборе культур в состав заквасок.

Анализ литературных источников свидетельствует о том, что молочнокислые бактерии продолжают интенсивно изучаться в настоящее время, что связано с их широким применением в пищевой промышленности, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и др. Изучению свойств лактобактерий посвящено подавляющее число исследований, в сравнении с молочнокислыми стрептококками, что обусловлено многообразием их биологических свойств.

1.2 Биотехнологический потенциал молочнокислых бактерий как биологически активных компонентов пищи

Молочнокислые бактерии обладают разнообразными биотехнологическими свойствами и представляют интерес как объект изучения для разработки продуктов

лечебно-профилактического и функционального питания, пробиотических биопрепаратов и способов восстановления микроэкологических нарушений.

Под воздействием молочнокислой ферментации происходят биохимические изменения соединений исходного сырья, что приводит к накоплению эссенциальных веществ, которые поддерживают функциональную активность тканей и органов, способны корректировать состав полезной микрофлоры кишечного биоценоза. Молочнокислая ферментация сырья лежит в основе производства многих ферментированных продуктов питания - хлебобулочных изделий, молочных, мясных, рыбных продуктов, плодовых и овощных напитков [7, 32, 51, 136, 147, 149]. С изучением таких свойств микроорганизмов, как способность регулировать микробную экологию человека, стала развиваться функциональная направленность применения молочнокислых микроорганизмов в производстве пищевых продуктов и биопрепаратов.

Молочнокислые бактерии являются одними из общепринятых компонентов, определяющих отношение продукта к разряду функциональных продуктов питания. В настоящее время широко используется понятие «пробиотик» для обозначения живых микроорганизмов (в первую очередь, молочнокислых бактерий), употребление которых с пищей в достаточных количествах оказывает благоприятное действие на здоровье. К пробиотическим микроорганизмам относятся в основном представители *р. Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также отдельные штаммы некоторых видов *Bacillus, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus* и *Saccharomyces* [51, 149].

Во всем мире растет интерес к изучению механизмов проявления положительных терапевтических эффектов микроорганизмов – пробиотиков, в первую очередь, молочнокислых бактерий. В настоящее время накоплено достаточное количество сообщений о полезном влиянии на организм человека пищевых продуктов, содержащих пробиотические микроорганизмы: иммуностимулирующее действие, усиление секреции пищеварительных ферментов, выведение продуктов азотистого обмена и токсичных веществ, снижение уровня холестерина в крови и др.

Молочнокислые бактерии входят в состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и принимают активное участие в процессе метаболизма, сбраживают различные субстраты, такие как лактоза, биогенные амины, органические кислоты и др. Лактобактерии участвуют в синтезе ферментов, витаминов и антиоксидантов [7, 64, 128].

Результаты исследований последних десятилетий указывают на то, что пробиотические бактерии главным образом активируют иммунитет, вызывая быструю реакцию на введение патогенных микроорганизмов [22, 35, 37, 48, 99, 133, 141, 357]. Некоторые пробиотические бактерии оказывают положительное влияние на барьерные

функции слизистой кишечника и способствуют восстановлению повреждений слизистой оболочки [35, 357]. Результаты исследований свидетельствуют о том, что пробиотики могут вызывать увеличение защиты от окислительного стресса, оказывать влияние на синтез белков теплового шока и регуляцию апоптоза [357].

Молочнокислые бактерии оказывают влияние на иммунитет человека посредством стимуляции или супрессии продукции цитокинов или экспрессии рецепторов для восприятия цитокинов и антигенов, которые участвуют в иммунных реакциях [22, 99].

Специалисты считают, что основные направления действия пробиотиков на организм хозяина связаны, во-первых, с подавлением численности нежелательной микрофлоры в результате пищевой конкуренции и/или конкуренции за место прикрепления к кишечному эпителию; во-вторых, с изменением метаболизма патогенной микрофлоры в результате антагонистических свойств ряда метаболитов молочнокислых бактерий; в-третьих, за счет стимуляции иммунитета организма – хозяина; и наконец, за счет детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов [35].

Молочнокислые бактерии синтезируют широкий спектр антимикробных метаболитов, относящихся к различным классам химических соединений (органические кислоты, перекись водорода, диацетил, бактериоцины и др.), за счет чего оказывают выраженную антагонистическую активность в отношении патогенных микроорганизмов и играют важную роль в поддержании колонизационной резистентности. В настоящее время имеются сведения об антимикробных свойствах бактерий рода *Lactobacillaceae*, тогда как работ по антимикробной активности лактококков не так много.

Антагонизм молочнокислых бактерий обусловлен способностью продуцировать ряд термостабильных специфических антибиотических веществ: *S. lactis* – низина, *S. cremoris* – диплококкцина, *L. acidophilus* – ацидофилина и лактоцидина, *L. plantarum* – лактолина, *L. brevis* – бревина и др., проявляющих активность преимущественно в кислой среде [133].

В настоящее время растет интерес к бактериоцинам, продуцируемым молочнокислыми бактериями, как к группе безопасных антибиотических препаратов нового поколения абсолютно безвредных для организма человека [82, 89, 94, 148, 319]. Многие бактериоцины, производимые данной группой бактерий, успешно зарекомендовали себя в качестве биоконсервантов для мясных, рыбных, молочных продуктов, квашенных овощей и фруктов [89, 205, 319].

В исследованиях российских и зарубежных ученых отмечается, что важным аспектом оценки биотехнологического потенциала молочнокислых бактерий является изучение их способности противостоять неблагоприятным условиям окружающей среды и выживать в пищеварительном тракте человека [36, 42]. Результаты исследования

способности молочнокислых бактерий расти в присутствии фенола, желчи, хлорида натрия и этанола показывают, что в основном представители данной группы микроорганизмов способны противостоять агрессивным факторам [36].

Важным свойством молочнокислых бактерий является устойчивость к желчи, так как оно позволяет прогнозировать возможность адгезии к эпителиальным клеткам кишечника [35-37]. Ученые отмечают [42], что к важнейшим механизмам защиты молочнокислых бактерий от высоких концентраций желчи следует отнести способность синтезировать экзополисахариды и ферменты, гидролизуещие желчные кислоты.

Активная кислотность среды является одним наиболее важных параметров при культивировании молочнокислых бактерий. Изменение pH питательной среды влияет на активность ферментов микроорганизмов, состояние и число промежуточных продуктов биосинтеза, их диссоциацию, растворимость и другие свойства [37, 64].

Установлено, что низкая кислотность среды также способна оказывать влияние на молекулярные изменения на поверхности клеток бактерий. Молочнокислые бактерии способны изменять липидный слой своей мембраны в ответ на воздействующие негативные факторы, что обеспечивает толерантность бактерий к низкой кислотности среды и неблагоприятным температурам [82].

Молочнокислые бактерии способны гидролизовать сульфаматы, амиды, нитраты; редуцировать альдегиды; алкоголи; восстанавливать нитрозамин, инактивировать бактериальные токсины, афлатоксины и другие микотоксины [357]. Интерес к данной группе микроорганизмов вызывает также их способность синтезировать витамины (фолат, витамин B_{12}, витамин K_2, рибофлавин и тиамин) [27, 176, 274], которые в совокупности с основными продуктами метаболизма оказывают биологически активное действие на организм хозяина и способствуют повышению его естественной резистентности.

Имеются многочисленные сведения о способности молочнокислых бактерий к влиянию на систему иммунитета, которое проявляется в стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов, макрофагов, синтеза иммуноглобулинов, образования интерферонов, а также фактора некроза опухолей [28].

Представители рода *Lactobacillus* способны активировать клетки и структуры, связанные с морфологическим субстратом клеточного иммунитета, влиять на выработку иммуноглобулинов, особенно секреторного иммуноглобулина А, обусловливающего местный иммунитет слизистой оболочки кишечника [22, 28, 37].

Установлено, что наряду со способностью нормализовать функции микрофлоры кишечника, молочнокислые бактерии могут оказывать антимутагенное [29, 30, 38, 154, 169,

216, 272, 291, 327], гепатопротекторное [173, 327], антиканцерогенное [25, 28, 88, 96, 164, 239, 292] и гипохолестеринемическое действие [82-99].

В настоящее время приоритетное значение приобретают исследования противоопухолевой активности молочнокислых бактерий, которую связывают со способностью ингибировать образование канцерогенов и инактивировать фекальные бактериальные энзимы, конвертирующие проканцерогены, β-гиалуронидазы, азоредуктазы, нитроредуктазы, β-глюкозидазы, β-глюкуронидазы [25, 88, 96, 164, 239, 292]. Механизм противоопухолевой активности связывают с их способностью продуцировать гликопептиды, ферменты, бактериоцины, которые повышают функциональную активность мононуклеарных фагоцитов, стимулируют иммунную систему макроорганизма [22]. Возможно, это обусловлено полисахаридами клеточной стенки лактобацилл и выделяемыми ими во внешнюю среду полисахаридами [220, 267, 278, 282].

Антиканцерогенный эффект пробиотиков может объясняться сочетанием таких механизмов, как индукция про- или противовоспалительных и секреторных реакций, которые могут ингибировать канцерогенез [25, 88, 96]. Исследования с использованием штаммов лактобацилл показали их способность проявлять генопротекторные свойства и антимутагенную активность в отношении мутагенов широкого спектра действия [82, 94, 148].

Молочнокислые бактерии способны связывать токсины, продуцируемых распространёнными видами плесневых грибов – *Aspergillus flavus* и *Aspergillus nomius*, которые являются потенциально канцерогенными для здоровья человека [37, 173, 380].

Молочнокислые бактерии снижают активность гидролитических ферментов (глюкуронидазы, гидролазы гликохолевой кислоты, нитроредуктазы), которые продуцируют потенциальные проканцерогены, что в свою очередь снижает риски развития рака толстой кишки [25, 28, 164, 301]. Употребления продуктов питания, имеющих повышенное содержание молочнокислых бактерий, способствуют стимулированию иммунной системы и подавлению роста опухолей молочной железы, снижают основные факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [28].

Молочнокислые бактерии и ферментированные продукты питания обладают способностью снижать холестерин в среде и сыворотке крови, что было подтверждено большим количеством экспериментов *in vivo* и экспериментами *in vitro* [13, 38, 257, 280, 366]. Результаты исследований демонстрируют, что бактерии могут снижать уровень холестерина путем ускорения синтеза желчной кислоты и увеличения экскреции фекальной желчной кислоты, тем самым защищая функцию печени [257, 363].

Внимание исследователей привлекает антиоксидантная активность молочнокислых бактерий. Синтезируемые ими ферменты супероксиддисмутаза, каталаза глютатионпероксидаза,

глютатион-S-трансфераза, глютатионредуктаза и др. являются эффективными компонентами антиоксидантной системы, обеспечивающей высокую резистентность клеток к действию активных форм кислорода [143, 165, 195, 279, 326]. Антиоксидантные свойства могут проявлять также витамины, белки, аминокислоты [102,105] и экзополисахариды, продуцируемые молочнокислыми бактериями [143, 165, 220, 267, 282, 326].

Среди биологически активных веществ, продуцируемых молочнокислыми бактериями, особый интерес представляют гидролитические ферменты, которые в основном формируют текстуру, специфический вкус и аромат пищевых продуктов [3, 5, 7, 92, 93]. Амилазы молочнокислых бактерий имеют важное значение в технологии хлебобулочных изделий, липазам принадлежит ведущая роль в образовании органолептических свойств ферментированных мясных и сырных продуктов, под действием протеолитических ферментов формируются вкусо-ароматические характеристики и текстура мясной и молочной продукции.

На основе анализа биотехнологических свойств микроорганизмов во всем мире создаются различные варианты заквасок прямого внесения, состоящих из монокультур или же их сочетаний; комплексных заквасок бифидобактерий и молочнокислых бактерий с другими группами микроорганизмов, позволяющие в максимальной степени реализовать физиолого-биохимический и технологический потенциал микроорганизмов. Закваски (стартовые культуры), в состав которых входят молочнокислые бактерии, традиционно применяются в молочной промышленности (для производства сыров, сметаны, йогурта, кисломолочных напитков и др.), в хлебопечении (для производства ржаных и ржано-пшеничных сортов хлеба), в мясной промышленности (для производства сырокопченых и сыровяленых мясных продуктов), для производства квашенных овощей, фруктов, ферментированных соков, соусов и др.

Таким образом, ферментированные молочнокислыми бактериями продукты питания могут удовлетворить растущий спрос потребителей на натуральные продукты и функциональные продукты питания. Кроме того, молочнокислые бактерии могут служить источниками получения новых функциональных веществ, таких как экзополисахариды и низкокалорийные подсластители [357].

Ряд молочнокислых бактерий может синтезировать различные длинноцепочечные гомо- или гетерополисахариды, называемые экзополисахаридами, которые в настоящее время в основном применяются для производства кисломолочных продуктов, что определяется их способностью связывать воду, взаимодействовать с белками и повышать вязкость продукта. В связи с чем экзополисахариды рассматриваются как перспективные натуральные биозагустители, эмульгаторы, желирующие вещества [221] с целью

улучшения реологических характеристик ферментированных пищевых продуктов. Кроме того, имеются сведения, что некоторые экзополисахариды имеют пребиотические и антиоксидантные свойства, могут проявлять противоопухолевое и иммуномодулирующее действие [282, 326].

В последнее время возрос интерес к низкокалорийным сахарам, синтезируемым молочнокислыми бактериями, таким как манит, сорбит, ксилит, тагатоза и тегалоза, являющихся полиолами. Данные вещества обладают рядом функциональных свойств - имеют низкий гликемический индекс, проявляют пребиотические свойства, способствуют нормализации веса тела, препятствуют образованию зубного налета. Наиболее перспективными продуцентами низкокалорийных сахаров специалисты считают представителей родов *Leuconostoc* и *Lactobacillus* [321].

Таким образом, молочнокислые бактерии рассматриваются как биологически активные компоненты пищи. Данная группа микроорганизмов проявляет широкий спектр биологических эффектов на организм человека, а также имеет уникальные биотехнологические свойства для производства функциональных продуктов питания. Наибольший интерес ученых всего мира привлекают антибиотические, генопротекторные, антимутагенные, антиоксидантные свойства данной группы микроорганизмов, а также способность синтезировать витамины, ферменты, экзополисахариды, бактериоцины и другие биологически активные вещества.

Вместе с тем следует отметить необходимость фундаментальных исследований, направленных на изучение сохранности биотехнологических свойств промышленно-ценных культур молочнокислых бактерий.

1.3 Роль молочнокислых бактерий в формировании качества тестовых полуфабрикатов и хлебобулочных изделий

Основной микрофлорой полуфабрикатов из ржаной муки являются дрожжи и кислотообразующие бактерии [8, 75, 90, 321]. Наиболее часто встречающимися видами в зрелой спонтанной закваске являются *Saccharomyces cerevisiae, Candida humilis, Pichia kudriavzevii, Torulaspora delbrueckii и Wickerhamomyces anomalus* [8, 75, 90, 253].

Наряду с дрожжами *S. cerevisiae* и некоторым количеством отдельных разновидностей диких дрожжей в ржаных заквасках встречаются также дрожжи *Saccharomyces minor* [8,75,90]. Некоторые исследователи рассматривают вид *S. minor* как специфический для ржаного теста, ставший таким в результате длительного естественного отбора, однако по распространенности, скорости брожения и интенсивности брожения в

ржаных заквасках и тесте основную роль играют крупноклеточные овальные дрожжи *S. cerevisiae*, адаптированные к повышенной кислотности теста и развитию совместно с его кислотообразующими микроорганизмами [8, 75, 90].

Традиционно закваска готовится из смеси муки, обычно из пшеницы или ржи, воды и соли, которая самопроизвольно ферментируется молочнокислыми бактериями и дрожжами, при этом молочная кислота, уксусная кислота, этанол и CO_2 являются основными конечными продуктами брожения в смеси, которые придают характерный кислый вкус, аромат и объем. Помимо пшеницы и ржи для производства хлебобулочных изделий, используются такие зерновые культуры, как кукуруза, спельта, ячмень и овес [212]. В настоящее время проводятся исследования по изучению возможности приготовления заквасок муки из амаранта [287], киноа [255, 339], гречихи [361], чиа [206] и т.п.

Исходя из применяемой технологии применяют в хлебопекарной промышленности различные виды заквасок [75, 90, 351]. Из древне применяется спонтанная селекция кислотообразующих микроорганизмов, для чего закваска готовится из муки и воды и ферментируется автохтонными молочнокислыми бактериями и дрожжами, присутствующими в муке [75, 90, 210]. Эта первая закваска впоследствии используется в качестве инокулята для инициирования ферментации новой партии муки и воды. Традиционно процесс получения закваски проводится при температуре окружающей среды (20-30 ^{0}C), при времени ферментации 6-24 ч и повторяется 5-10 раз. Это необходимо для отбора штаммов, наиболее приспособленных к экосистеме закваски, а также для развития разрыхляющей и подкисляющей способности закваски [90, 294, 126, 129, 138, 213, 224, 334, 375].

Факторами, влияющими на доминирующую микрофлору закваски, являются вид используемой муки, время и температура ферментации. Состав данной закваски демонстрирует большое видовое разнообразие, в закваске идентифицированы представители *p. Lactobacillus, Leuconostoc, Weissella*, *Pediococcus* и *Enterococcus* [213, 224].

Наиболее распространенными видами, выделенными из спонтанных заквасок, являются *L. sanfranciscensis* [230], *L. brevis, L. fermentum, L. reuteri, L. pontis, L. rossiae, L. alimentarius, L. plantarum, L. amylovorus, L. delbrueckii* [90, 253, 294]. В заквасках обнаружены также уксуснокислые бактерии [90, 334, 297], которые, вероятно, способствуют более быстрому закислению теста.

При изучении продуктов брожения спонтанно забродившей ржаной закваски и ее микрофлоры было показано, что последняя вначале представлена бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, сбраживающими углеводы с образованием газообразных продуктов: углекислого газа, водорода, некоторых органических кислот – молочной, уксусной, муравьиной янтарной. Характерным для этого типа брожения является накопление 2,3-

булиленгликоля. На первой стадии подъем закваски происходит за счет углекислого газа и водорода [8, 90].

При последующем освежении спонтанно забродившей закваски происходит постепенная смена видового состава микроорганизмов, количество бактерий группы *Enterobacteriaceae* снижается, а бактерий молочнокислого брожения повышается. В соответствие с этим в бродящей среде начинают накапливаться продукты гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения. Одновременно начинают проявлять свою жизнедеятельность и дрожжи, появляется и спиртовое брожение, промежуточный продукт которого – пировиноградная кислота – используется как дрожжами, так и молочнокислыми бактериями [8, 213, 334].

Наряду со спиртовым и молочнокислым брожениями, возбудителями которых являются дрожжи и молочнокислые бактерии соответственно, в полуфабрикатах хлебопекарного производства в большей или меньшей степени осуществляются пропионовокислое, бутиленгликолевое, маслянокислое, ацетонобутиловое, ацетоноэтиловое типы брожения, вызываемые посторонними микроорганизмами, присутствующими в муке и дополнительном сырье [75, 90, 213, 230, 334].

Посторонняя микрофлора создает жесткую конкуренцию дрожжам в борьбе за доступные компоненты питания, ухудшая их активную деятельность, а также, развиваясь в тесте, накапливает ряд продуктов, неблагоприятно сказывающихся, прежде всего, на органолептических показателях качества готового хлеба.

Возбудителями пропионовокислого брожения являются бактерии семейства *Propionibacteriaceae*, рода *Propionibacterium*, они ферментируют углеводы с образованием главных продуктов брожения – пропионовой кислоты и ее солей (пропионатов). В меньшей степени накапливаются изовалериановая, муравьиная, янтарная, молочная кислоты и диоксид углерода [90, 224].

В муке иногда встречаются бактерии вида *Aerobacterium aerogenes*, которые являются возбудителями бутиленгликолевого брожения. В результате их метаболизма образуются молочная, муравьиная, янтарная и уксусная кислоты, этиловый спирт, 2,3-бутиленгликоль в иных количествах и соотношениях, чем при гетероферментативном молочнокислом брожении [90].

Маслянокислое и ацетонобутиловое виды брожения вызываются многими микроорганизмами, распространенными в природе и встречающимися в пищевом сырье. Они способны сбраживать разнообразные вещества – углеводы (в том числе высокомолекулярные – крахмал, гликоген, декстрины), спирты и кислоты. В процессе маслянокислого брожения эти микроорганизмы осуществляют расщепление молочного

сахара и солей молочной кислоты (лактатов) с образованием масляной, уксусной, пропионовой, муравьиной кислот, этилового, бутилового, пропилового спиртов [224].

Возбудителями как маслянокислого, так и ацетонобутилового брожения являются бактерии вида *Clostridium asetobutylicum* [90].

Ацетоноэтиловое брожение является причиной деятельности микроорганизмов *Bacteriumacetoacetilym*, в результате которого образуются ацетон, этиловый спирт, диоксид углерода и водород.

Кроме того, в готовом хлебе могут развиваться гнилостные (протеолитические) бактерии, имеющие широкое распространение в природе. Это спорообразующие аэробные и анаэробные палочки, пигментирующие и факультативно-анаэробные бесспоровые бактерии. Они вызывают распад белков, в результате чего могут возникать различные пороки (тягучий, слизистый мякиш хлеба, специфический неприятный вкус и запах), зависящие от глубины протеолиза белковых веществ [210, 213, 224, 334, 375].

К гнилостным бактериям, развивающимся в готовом хлебе, прежде всего, относятся *Bacillus subtilis* – сенная палочка и *Bacillus masentericus* – картофельная палочка. Сенная палочка обладает комплексом активных протеолитических и амилолитических ферментов, действие которых вызывает специфические изменения мякиша хлеба при поражении его картофельной болезнью [90, 213, 224, 253].

Исследования микрофлоры ржаных полуфабрикатов – заквасок и теста – показывают, что видовой состав и биологические свойства молочнокислых бактерий довольно разнообразны [8, 75, 90, 224].

Кислотообразующая микрофлора густых спонтанных заквасок разнообразна, доминирующими видами являются *L. plantarum* и *L. brevis*, довольно часто встречаются *L. fermentum*, в меньшем количестве – *L. casei*, *L. buchneri*. Термофильный вид *L. leichmannii* найден в единичных случаях [75, 90, 224].

Жидкие закваски по видовому составу молочнокислых бактерий мало отличаются от густых, и применение чистых культур для их выведения отражается на соотношении этих видов [75, 90]. Так, по Ленинградской схеме жидкую закваску выводят на чистых культурах *L. brevis* и *L. plantarum*, и именно эти виды преобладают в производственной закваске. В закваске по Ивановской схеме преобладают вид *L. plantarum*, также в ней развиваются спонтанно и другие виды. В закваски по Саратовской схеме в разводочный цикл вносятся бактерии *L. casei*, что и обуславливает высокое содержание этого вида в производственных заквасках [90]. Каждый из перечисленных видов молочнокислых бактерий отличается характерными свойствами, обуславливающими различную кислотность и величину pH в тесте при различных температурах.

При брожении заквасок с участием дрожжей и молочнокислых бактерий происходит образование весьма разнообразных по своим свойствам веществ. В связи с большим разнообразием видов молочнокислых бактерий, их физиологических особенностей и биохимических свойств реологические показатели теста и качество готового продукта могут варьировать в широких пределах. Из этого следует, что определение видового состава микрофлоры полуфабрикатов недостаточно для прогнозирования направленности процесса брожения и его конечных результатов [8, 75, 90, 210, 213, 224, 253].

В хлебопекарной промышленности для приготовления производственных заквасок широко применяют заквасочные культуры, которые добавляются в мучную смесь в соотношении молочнокислых бактерий и дрожжей 100:1. При этом ферментация проводится при более высокой температуре 30 ^{0}C для ускорения процесса [203], в течение 15-24 ч [232]. В качестве заквасочных культур используются кислотоустойчивые штаммы молочнокислых бактерий, например, *L. plantarum, L. fermentum, L. reuteri* или *L. sanfranciscensis,* отобранные на основе их способности быстро подкислять мучную смесь и производить вкусовые соединения [232]. Использование стартовых культур при повышенной температуре приводит к быстрому подкислению теста, что может подавить рост спонтанно возникающих естественных дрожжей. Следовательно, хлебопекарные дрожжи *(S. cerevisiae)* следует добавлять в конце процесса брожения для разрыхления готового теста [208].

В настоящее время популярностью пользуются сухие формы заквасок, имеющие ряд преимуществ, таких как стабильное качество, более длительный срок хранения, легкость дозирования, меньший объем и, следовательно, удобство в обработке, транспортировке и хранении [203, 215, 350].

Для производства сухих заквасок отбираются культуры молочнокислых и пропионовокислых бактерий на основе оценки их кислотообразующей активности, способности продуцировать ароматические соединения, антагонистической активности, а также их устойчивости к воздействию высоких концентраций сахара и поваренной соли [75, 209, 295, 354].

С точки зрения микробиологии, закваска считается специфической и стрессовой экосистемой [75, 90, 214]. Независимо от типа муки, выведение производственной закваски включает три фазы [75, 90, 294]:

1) раннее доминирование молочнокислых бактерий, принадлежащих к *р. Enterococcus, Lactococcus и Leuconostoc;*

2) растущее присутствие специфических для закваски видов молочнокислых бактерий, принадлежащих к *р. Lactobacillus, Pediococcus и Weisella;*

3) доминирование хорошо адаптированных штаммов, принадлежащих к *р. Lactobacillus.*

В закваскaх обнаружено более 60 различных видов лактобактерий [211], наиболее распространенными видами являются *L. brevis, L. fermentum, L. reuteri, L. rossiae, L. sanfranciscensis; L. alimentarius, L. paralimentarius, L. plantarum; L. amylovorus* и *L. delbrueckii* [253, 294]. Кроме того, в закваскaх встречаются виды бактерий, особенно хорошо приспособленные к выживанию на растительном сырье - *Weissella cibaria* и *Weissella confusa*, *Pediococcus acidilactici* и *Pediococcus pentosaceus*, *Leu. mesenteroides* и *Leu. citreum* [204, 210, 211].

В закваске дрожжам приходится выдерживать стрессовую среду, связанную с низким уровнем pH, ограничением кислорода, высокой концентрацией углеводов (в основном мальтозы) и присутствием сообщества молочнокислых бактерий [212]. Наиболее часто в закваскaх встречаются представители дрожжей видов *S. cerevisiae, Candida humilis, Candida colliculosa, Hansenula anomala; Saccharomyces exiguus; Candida krusei* и *Candida glabrata* [208, 211].

Одна закваска часто содержит только один или два вида дрожжей, в частности, в закваскaх итальянских пекарен встречается пара *S. cerevisiae* и *C. humilis*, во французских органических закваскaх - *Kazachstania bulderi* и *C. humilis*, в закваске бельгийского происхождения - *S. cerevisiae* и *W. anomalus* [211].

Разнообразие микрофлоры заквасок объясняются специалистами качеством и химическим составом применяемых видов муки [171, 204, 209, 277, 302, 303].

При выработке ржаных и ржано-пшеничных сортов хлеба основная задача сбраживания полуфабрикатов заключается в накоплении достаточного количества кислот, обеспечивающих инактивацию амилолитических ферментов и придание готовым продуктам соответствующего вкуса и аромата. Второй, не менее важной задачей является получение полуфабрикатов с высокой подъемной силой, т.е. способных выделять достаточное количество газообразных веществ для разрыхления теста и получения хлеба хорошего объема [8, 75].

Эта задача решается применением сложных многоступенчатых технологических схем, предусматривающих разнообразные варианты культивирования бродильных микроорганизмов. Исторически самый ранний способ сбраживания полуфабрикатов заключается в использовании в качестве исходной фазы естественной культуры микроорганизмов, проявляющих свою жизнедеятельность в суспензии муки с водой. Современный и наиболее прогрессивный принцип заключается в применении чистых культур молочнокислых бактерий различных видов, культивируемых направленно через определенные ступени, с добавлением дрожжей. Таким образом, наряду с дрожжами вида *S. cerevisiae* и некоторым количеством отдельных разновидностей диких дрожжей

существенную роль в формировании органолептических и физико-химических показателей хлеба, особенно ржаных и ржано-пшеничных сортов, играют молочнокислые бактерии [75, 90].

В результате сбраживания сахаров различными видами гомо- и гетероферментативными молочнокислыми бактериями в тесте накапливается этиловый спирт, а также ряд органических кислот (преимущественно молочная и уксусная), которые придают ржаным и ржано-пшеничным сортам хлеба более высокую кислотность, чем пшеничным [8, 75, 90].

Существенный интерес для технологии имеет вопрос о механизмах сбраживания углеводов различными видами молочнокислых бактерий. Гетероферментативные молочнокислые бактерии в ржаных полуфабрикатах являются не только кислотообразователями, синтезируя помимо молочной кислоты уксусную, но и энергичными газообразователями, играющими существенную роль в разрыхлении теста [75, 90, 210, 213].

Некоторые исследователи отрицают значительную роль молочнокислых бактерий в разрыхлении тестовых полуфабрикатов [334]. Однако, большинство исследователей, не отрицая большой роли дрожжей в разрыхлении ржаного теста, отмечают и существенную роль в этом процессе кислото- и газообразующих бактерий. Такая точка зрения обосновывается следующим образом: в ржаных заквасках и ржаном тесте число молочнокислых бактерий – энергичных газообразователей – во много раз превышает число дрожжевых клеток, следовательно, количество образуемого углекислого газа в процессе метаболизма молочнокислых бактерий сопоставимо с количеством газа, выделяемого дрожжами при спиртовом брожении [75, 90, 210, 213, 224].

Биохимические изменения, происходящие в результате действия микробных ферментов наряду с собственными ферментами муки, в значительной степени влияют на характеристики закваски и, в конечном счете, на качество хлеба, его пищевую ценность [231, 351].

В процессе брожения закваски и теста накапливаются молочная и уксусная кислоты, синтезируемые молочнокислыми бактериями, что приводит к повышению растворимости белков клейковины, ее растяжимости и эластичности клейковины [75, 90, 210, 213, 253].

На состояние белковой фракции теста положительное влияние оказывает снижение кислотности теста до значений pH 4,2-4,4, что способствует пептизации белков и их набуханию, вызывая улучшение реологических характеристик ограниченно набухшей части белков. Дальнейшее повышение кислотности приводит к ухудшению процесса пептизации. Следует подчеркнуть, что для ржаного теста является нежелательной излишняя пептизация белковых веществ, так как это может вызвать чрезмерное разжижение теста и, как следствие, привести к снижению его газоудерживающей способности [334]. Высокая кислотность тестовых полуфабрикатов вызывает также снижение активности α-амилазы ржаной муки, что позволяет

устранить такие недостатки ржаных и ржано-пшеничных хлебобулочных изделий как липкость и заминаемость [75, 90].

Таким образом, роль молочнокислых бактерий в формировании хороших реологических свойств тестовых полуфабрикатов и в конечном итоге качественной готовой продукции очень велика. Некоторые виды молочнокислых бактерий способны синтезировать экзополисахариды, которые улучшают реологию теста и текстуру мякиша хлеба [158, 203], замедляют ретроградацию крахмала и уменьшают скорость черствения хлеба во время хранения [158, 187, 202].

Существенным является также вопрос о соотношении в ржаных заквасках летучих кислот. Доля уксусной кислоты в общей кислотности ржаного теста обычно варьирует в пределах от 20 до 40 % [8, 12, 90]. Если более 30 % общего содержания кислот ржаного хлеба приходится на долю летучих кислот, вкус хлеба будет резко кислым даже при нормальном уровне общей титруемой кислотности. Определенное влияние на вкус хлеба оказывает и присутствие в тесте ди- и трикарбоновых кислот – янтарной, яблочной, винной и лимонной, доля которых в общей кислотности ржаного хлеба может достигать 80 % [90, 202, 213].

Регулирование накопления молочной и уксусной кислот в ржаном тесте, по мнению исследователей, можно осуществлять подбором определенного соотношения высокоактивных гомо- и гетероферментативных бактерий, вводимых в ржаную закваску [140]. Также основным способом регулирования кислотонакопления в тесте является оптимизация процесса приготовления заквасок и теста [75, 90, 210].

Хлеб, приготовленный на закваске имеет высокое содержание летучих веществ и достигает более высоких органолептических показателей по сравнению с химически подкисленным хлебом, что указывает на то, что не только подкисление теста ответственно за улучшение вкуса хлеба [75, 90, 190, 245, 325]. Молочнокислая ферментация компонентов муки является основным путем образования летучих веществ в закваске и тесте, в результате чего образуются кислоты, спирты, альдегиды, эфиры и кетоны [8, 324]. Гетероферментативные молочнокислые бактерии вносят основной вклад в производство уксусной кислоты и этанола, но они также производят специфические эфиры и восстанавливают альдегиды до соответствующих спиртов [12, 263, 369]. Гомоферментативные молочнокислые бактерии в основном синтезируют диацетил, ацетальдегид и гексанал [12, 53, 334]. Изоспирты, соответствующие им альдегиды и этил-ацетат являются характерными летучими соединениями спиртового брожения [322]. Многие летучие соединения отвечают за спиртовой, фруктовый, солодовый и кислый запах, обеспечивая интенсивный аромат хлебобулочных изделий [208, 245, 322, 350, 384, 385].

Внесение в закваску дрожжей, особенно кислотоустойчивых заквасочных, форсирует общее кислотонакопление и снижает долю уксусной кислоты. Это, очевидно, связано с образованием из диоксида углерода угольной кислоты и накоплением ее в полуфабрикатах [8, 90, 213].

Важным для технологии является вопрос об азотистом питании молочнокислых бактерий, размножаемых в заквасках и жидких дрожжах. По имеющимся данным, большая часть этих микроорганизмов не способна синтезировать органические соединения азота из его неорганических солей. Следовательно, для оптимального развития данных микроорганизмов в культуральной среде должны содержаться аминокислоты и пептиды. Источниками последних могут служить не только специально подобранные смеси аминокислот, но и белковые гидролизаты, полученные методом ферментативного и кислотного гидролиза, богатых белком субстратов – казеина, муки бобовых культур. Отдельные виды бактерий обладают способностью развиваться в среде, содержащей соли аммония как единственный источник азотного питания. Для стимулирования роста и развития молочнокислых бактерий в заквасках существует возможность применения ферментных препаратов плесневых грибов или бактерий, содержащих активные протеазы [75, 90, 213].

Микроорганизмы закваски служат в качестве агентов для биозащиты, предотвращают микробную порчу хлебобулочных изделий [193, 258, 281]. Во всем мире активно проводятся исследования по изучению применения молочнокислых бактерий в качестве биологических консервантов в хлебопекарной промышленности, что связано с их способностью ингибировать рост грибов и бактерий за счет производства органических кислот, противомикробных пептидов, перекиси водорода, диацетила, ацетоина, бактериоцинов и других соединений, что значительно продлевает срок хранения хлебобулочных изделий и обеспечивает безопасность продукции [236, 246, 313, 314, 335, 340, 379]. Кроме того, некоторые дрожжи, синтезирующие этилацетат, также проявляют противогрибковую активность [196, 197, 351]. Доказана способность молочнокислых бактерий и дрожжей заквасок и теста синтезировать витамины, в частности, витамины группы В [208] и фолат [262, 264, 283]. Установлено, что молочнокислая ферментация повышает антиоксидантный статус продуктов питания на основе злаков, который зависит от наличия в хлебе биоактивных фенольных соединений [211]. Исследования показывают, что хлеб, приготовленный на заквасках, отличается лучшей усвояемостью по сравнению с обычным хлебом [211, 350].

В связи с вышесказанным, существенное значение для приготовления ржаного хлеба имеет протеолитическая активность молочнокислых бактерий [53, 75, 262]. Кроме того, в процессе брожения может происходить автолиз бактериальных клеток, в результате чего также происходит поступление протеолитических ферментов в сбраживаемый

полуфабрикат. Благодаря деградации белков под действием протеолитических ферментов в тесте происходит накопление азотсодержащих и водорастворимых веществ [75, 90, 262].

Исключительно важным для технологии хлебопечения является вопрос о спиртоустойчивости молочнокислых бактерий, так как основным продуктом метаболизма дрожжей, которые также развиваются в хлебопекарных полуфабрикатах, является этанол. Молочнокислые бактерии, в том числе и такие виды, которые встречаются в ржаных заквасках, способны развиваться и проявлять активную жизнедеятельность при достаточно высоких концентрациях спирта – в пределах 12-18 %. Некоторые штаммы молочнокислых бактерий способны развиваться даже при концентрации спирта 20 %, а единичные – при 24 % [126,138]. Интересно отметить, что высокая спиртоустойчивость этих бактерий сочетается с их высокой кислотообразующей активностью. Заслуживает внимания и то обстоятельство, что угнетающее действие высоких концентраций спирта проявляется более выражено при высокой температуре [12, 90].

Основные технологические инновации в производстве хлеба на заквасках касаются селекции штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей, обладающих высокими функционально-технологическими свойствами, а также применению альтернативных видов муки [159, 181, 198, 259, 264, 283, 338, 342, 360]. Синтез и накопление биоактивных соединений микрофлорой закваски в процессе брожения заквасок и теста имеет большое значение для производства функциональных хлебобулочных изделий.

Экзополисахариды, производимые молочнокислыми бактериями, могут служить заменителями добавок, обычно используемых для улучшения объема и текстуры хлеба, особенно в технологии безглютеновых сортов хлебобулочных изделий [235]. Кроме того, пребиотические углеводы, производимые молочнокислыми бактериями, могут улучшить пищевую ценность хлеба [233, 234, 377].

Большое внимание исследователи уделяют способности молочнокислых бактерий гидролизовать глиадины [336, 338, 339], что показывает целесообразность их применения в технологии безглютеновых хлебобулочных изделий. Исследования показали, что *L. plantarum, L. fermentum и L. paralimentarius, L. graminis, L. sakei* и *P. pentosaceus*, являются частыми изолятами из безглютеновых заквасок на основе рисовой, кукурузной, гречневой и амарантовой муки [382].

Установлено, что молочнокислые бактерии обладают способностью продуцировать γ-аминомасляную кислоту - основной ингибирующий нейротрансмиттер центральной нервной системы млекопитающих [168, 189, 197, 198, 207, 309]. Штаммы, синтезирующие γ-аминомасляную кислоту, рассматриваются как вектор ее доставки в нужное место в кишечнике, они могут быть использованы как средство, способствующее адаптации

человека к стрессовым воздействиям [198, 207]. Способностью синтезировать γ-аминомасляную кислоту обладают представители микрофлоры хлебных заквасок видов *L. plantarum, L. brevis, L. rhamnosus* [168, 189, 197, 198, 207, 323].

Таким образом, молочнокислые бактерии играют важную роль в процессах созревания теста и формирования качества конечных продуктов – ржаных и ржано-пшеничных сортов хлеба. Они не только участвуют в формировании вкуса и аромата готовой продукции, но и оказывают стимулирующее воздействие на дрожжевые клетки за счет подавления деятельности конкурентных видов микроорганизмов выделяемыми метаболитами (органическими кислотами), а также улучшения их питания благодаря расщеплению сложных соединений (за счет системы протеолитических ферментов) и повышению количества доступных азотсодержащих соединений.

Управление ходом микробиологических процессов в заквасках и тесте, в частности, регулирование жизнедеятельности дрожжей и молочнокислых бактерий, является важным условием интенсификации процессов приготовления хлеба и улучшения качества готовой продукции.

1.4 Перспективы развития криотехнологии в хлебопечении

Одним из интенсивно развивающихся направлений развития хлебопекарного производства во всем мире является производство хлебобулочных изделий с применением криогенных технологий. Разработаны различные варианты криотехнологии хлебобулочных изделий, в зависимости от того, на каком этапе производства производится замораживание: после замеса, на различных этапах расстойки и выпечки полуфабрикатов, замораживание готовой продукции [33, 59, 63, 84].

К преимуществам внедрения криотехнологии специалисты относят технологичность, гибкость производственного процесса, сокращение расходов на квалифицированную рабочую силу, производственные площади, оборудование, возможность продажи готовых изделий в свежем виде. При этом технология приготовления замороженного теста имеет ряд существенных особенностей и отличий от традиционной технологии, применяемой в хлебопекарном производстве.

В связи с этим произошли изменения в структуре хлебопекарного производства: возникли предприятия, специализирующиеся на выработке замороженного теста, предназначенного для реализации в пекарнях с неполным производственным циклом, в системе доготовочных цехов (пекарнях бистро, супермаркетах, розничной торговле, торговле на экспорт) [84].

Во многих странах быстрое замораживание используется как промышленный метод, обеспечивающий долгосрочное хранение скоропортящихся пищевых продуктов. Интенсивность замораживания значительно влияет на качество замороженных продуктов, в которых основная часть содержащейся воды должна быть быстро превращена в мелкозернистую кристаллическую структуру, чтобы предотвратить повреждение структуры и немедленно ингибировать нежелательные микробиологические и ферментативные процессы [63, 84].

При внедрении криогенных технологий в хлебопечение возникает необходимость внесения изменений в технологический процесс [63, 84, 249, 331, 344, 352]. На качество хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов влияет состав теста и технологические параметры процесса приготовления, такие как время замешивания теста, скорость замораживания, продолжительность хранения и скорость дефростации полуфабрикатов. Эти факторы могут действовать независимо или совместно усиливая друг друга, снижая жизнеспособность и активность дрожжей, что приводит к уменьшению образования углекислого газа или повреждению структуры клейковины, что, в свою очередь, приводит к снижению газоудерживающей способности теста и ухудшению качества хлебопекарной продукции [249, 331, 372, 381].

Ухудшение прочности теста объясняется различными факторами, такими как высвобождение редуцирующих веществ из клеток дрожжей (например, глутатиона), уменьшение образования поперечных связей клейковины, вызванное перекристаллизацией льда, и перераспределение воды, вызванное изменением водосвязывающей способности компонентов теста. При длительном низкотемпературном хранении полуфабрикатов белковая матрица подвергается деполимеризации, которая усиливается по мере увеличения периода хранения теста в замороженном виде. Описанные процессы могут вызвать потерю газоудерживающей способности во время брожения, что выражается в меньшем объеме хлеба и увеличении продолжительности брожения и расстойки полуфабрикатов [344].

Основными проблемами при производстве замороженных полуфабрикатов являются выживаемость клеток дрожжей и снижение газоудерживающей способности теста [182, 293].

Газообразующая способность дрожжей зависит от штамма, дозировки вносимых дрожжей, активности клеток и количества сбраживаемых сахаров. На газообразующую способность дрожжей также влияют скорость замораживания и дефростации, температура и продолжительность хранения теста в замороженном виде [237 331]. Установлено, что морозостойкость дрожжей в пресном тесте лучше, по сравнению с тестом, подвергнутого брожению перед замораживанием [26, 144, 275].

Стабильность качества замороженного теста при хранении в значительной степени зависит от свойств сырья, его химического состава, а также рецептуры и параметров технологического процесса производства замороженного теста.

Для приготовления хлебобулочных изделий с применением криотехнологии требуется мука с более высоким содержанием белка и хорошей газоудерживающей способностью, чем для производства хлеба по традиционной технологии. Рекомендуется применять муку пшеничную и ржаную с числом падения 300-350 и 150-250 соответственно [331, 333]. При этом следует выбирать муку с высоким содержанием глютена (9,5-11 %), замороженное тесто из такой муки более устойчиво к повреждениям от замораживания, а органолептические характеристики продукта (текстура мякиша, цвет и объем хлеба) аналогичны продукции, выработанной по традиционной технологии [220]. Для улучшения реологических свойств полуфабрикатов в тесто при замесе добавляется сухая клейковина в количестве до 2% к массе муки [26, 144].

В последние годы возрастает интерес исследователей к изучению хлебопекарных свойств нетрадиционных видов муки и применению их в технологии хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов. Показано положительное влияние цельнозерновой пшеничной муки [378], ячменной муки и ее фракции, богатой β-глюканом [242], нутовой [315] и овсяной муки [355] на качественные характеристики хлеба, его пищевую ценность и продолжительность хранения.

Для компенсации потерь газообразующей способности теста рекомендуется в рецептурах замороженного теста увеличить дозировку хлебопекарных дрожжей до 50 % [333], использовать специальные дрожжи пониженной активности с содержанием белка 46% [26] или дрожжи с криорезистентными свойствами [115, 285].

Соль поваренная пищевая является буферной добавкой, позволяющей регулировать скорость брожения, снижать активность дрожжей в тесте. Дозировку соли в тесте рекомендуется увеличить в среднем на 10%, доведя до 1,7-2,2 % к массе муки [144].

Производителями замороженных тестовых полуфабрикатов широко применяются жировые продукты с целью замедления процесса обезвоживания дрожжевых клеток, улучшения структурно-механических свойств теста и структуры пористости готовых изделий, увеличения сроков хранения полуфабрикатов в замороженном виде [271].

Количество вносимых сахаров в замороженном тесте зависит от вида изделий, требуемых свойств корки, однако оно выше, чем в традиционной технологии. Увеличение дозировки сахаров (сахарозы, фруктозы, декстрозы) до 4 % приводит к увеличению активности дрожжей в процессе дефростации и расстойки тестовых полуфабрикатов [26, 144].

Молочные продукты (молоко цельное, сухое молоко, казеинат натрия, сухая подсырная сыворотка) и яйцепродукты улучшают реологические свойства замороженных полуфабрикатов за счет повышения содержания белка, влияют на активность дрожжей и скорость процесса брожения теста, улучшают цвет корки готовых изделий [62, 266].

Из-за необходимости сохранения формоудерживающей способности тестовых заготовок, снижающейся при их замораживании под действием кристаллов льда, предусматривается меньшая дозировка воды по сравнению с традиционной технологией. Пониженная абсорбция теста способствует уменьшению излишнего количества свободной влаги, которая кристаллизуется и рекристаллизуется во время замораживания и хранения и может повредить клейковину [237, 344, 352, 381].

В настоящее время производители замороженных тестовых полуфабрикатов применяют различные режимы процесса замораживания в диапазоне минус 10-40 ^{0}С, выбор конкретных параметров зависит от рецептуры хлебобулочных изделий, массы полуфабриката, возможностей технологического оборудования и др. [83, 144, 182, 249, 331, 344, 352, 372, 381].

Скорость замораживания оказывает влияние на свойства теста, структуру дрожжевых клеток и процентное содержание жизнеспособных дрожжевых клеток в замороженном тесте. Низкая скорость замораживания приводит к образованию крупных кристаллов льда, которые могут серьезно повредить клетки дрожжей [333, 344]. Быстрое замораживание может увеличить растяжимость теста и уменьшить повреждение микроструктуры сети теста, но в то же время может оказать негативное влияние на активность клеток дрожжей [331]. Оптимальной скоростью замораживания тестовых полуфабрикатов является 0,14 ^{0}С/мин. [84, 331, 333, 344].

Температура и продолжительность хранения могут влиять на рост кристаллов льда и перекристаллизацию воды в замороженном тесте. Образование крупных кристаллов льда во время хранения происходит в результате колебаний температуры, которые приводят к растворению мелких кристаллов льда, при этом большое количество молекул воды адсорбирует поверхность пор теста [331, 344]. Эти изменения могут быть не существенными при кратковременном хранении полуфабрикатов, однако при увеличении хранения теста в замороженном виде могут постепенно образовываться более крупные кристаллы льда. Оптимальная температура хранения замороженного теста составляет минус 18-22 °С [26, 83, 84, 331], при этом следует избегать любых колебаний температуры во время хранения, так как повторяющиеся циклы замораживание-оттаивание приводят к снижению эластичности и растяжимости клейковины, ухудшению способности теста удерживать CO_2, снижению активности клеток дрожжей [331, 333, 344].

Многие исследователи, изучавшие стабильность замороженного теста, разрабатывали различные рецептуры теста, пригодного для замораживания, поскольку благодаря изменениям в рецептуре можно достичь существенного улучшения качества замороженных полуфабрикатов и готовых изделий [17, 58, 62, 74, 91, 140, 144, 331, 270, 286, 306, 374]. Многочисленные исследования направлены на разработку и применение различных добавок с целью улучшения качества и увеличения сроков годности хлебобулочных изделий из замороженного теста. Основными добавками, применяемыми в криогенных технологиях хлебопечения, являются улучшители окислительного действия, ферментные препараты, гидроколлоиды, минеральные соли, эмульгаторы и др. (табл. 1.1).

Добавки окислительного действия необходимы для улучшения структуры и удельного объема хлеба, поскольку из-за гибели дрожжевых клеток при хранении полуфабрикатов в замороженном виде образуются восстанавливающие вещества (в частности, глутатион), приводящие к снижению прочности клейковины в результате ослабления дисульфидных мостиков [333], что и объясняет необходимость введения в рецептуру замороженного теста соединений – окислителей. В практике производства хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов в качестве улучшителей окислительного действия широко применяются аскорбиновая кислота и азобисформамид в количестве 0,03-0,06 % к массе муки [138, 307].

Положительные эффекты применения гидроколлоидов в криогенной технологии хлеба связаны с их водоудерживающей способностью, что вызывает перераспределение воды между крахмалом и глютеном [174, 175, 329, 348, 387].

Влияние на качественные характеристики теста и готовых изделий зависит от природы, происхождения, размера частиц, дозировки гидроколлоидов, включенных в состав рецептуры. Добавление ксантановой камеди в количестве 0,16-0,20 % к массе муки увеличивает водопоглотительную и газоудерживающую способности теста, повышает активность воды в мякише и удельный объем хлеба [219]. Аналогичные результаты получены при использовании гуаровой камеди при дозировке 1,5 % [331], карбоксиметилцеллюлозы 1 % [219], гуммиарабика и *к*-каррагинана 3 % к массе муки [364]. Кроме того, ксантановую и гуаровую камедь и к-каррагинан, можно использовать для продления срока годности замороженного теста [349].

Таблица 1.1 – Хлебопекарные улучшители и их влияние на свойства и качество хлебобулочных изделий на основе криотехнологии

Группа улучшителей	Наименование	Оказываемое влияние
Улучшители окислительного действия	аскорбиновая кислота, пероксид кальция, йодат калия, азодикарбонамид	улучшают реологические свойства теста и качества готовых изделий (увеличение объема изделий, улучшение цвета мякиша, структуры пористости). повышают устойчивость теста при хранении, стабилизируют его свойства
Ферментные препараты	α-амилаза	повышает газообразующую способность теста, увеличивает удельный объем хлеба, однородность структуры мякиша
	глюкоамилаза	увеличивает газообразующую способность теста, вносится в тесто с низким содержанием сахаров; расщепляет крахмал и декстрины, повышает содержание сахаров
	протеиназы	увеличивают газооудерживающую способность теста за счет протеолиза белка; вносится в комплексе с окислителями для ограничения процесса деструкции
	оксидоредуктазы	рекомендуются как заменители улучшителей окислительного действия
	ксиланазы	увеличение водопоглотительной способности муки, снижение вязкости теста, увеличение пористости и удельного объема хлеба
	липазы	увеличение стабильности теста, улучшение цвета и состояния корки, структуры и цвета мякиша, замедление черствения
Эмульгаторы	стеароил-лактаты натрия и калия	усиливают структуру теста, взаимодействуя с клейковинными белками, улучшают свойства мякиша (упругость и пористость), повышают стабильность теста в процессе хранения
	эфиры диацетилвинной кислоты и моноглицеридов	улучшают дисперсность воды в тесте, стабилизируют свойства теста в процессе хранения, повышают качество готовых изделий, свойства мякиша
Гидроколлоиды	ксантовая камедь, гуаровая камедь, пектин, хитозан	повышают водопоглощение в тесте, улучшают реологические свойства теста в процессе дефростации и расстойки, способствуют увеличению объема хлеба
Модифицированные крахмалы	набухающие, экструзионные, окисленные	способствуют связыванию свободной воды в тесте, упрочняют структуру клейковинных белков, повышают стабильность теста в процессе хранения, действуют как окислители
Минеральные соли	кальциевые и натриевые соли фосфорной кислоты, сульфаты и фосфаты аммония	способствуют связыванию воды в тесте, повышая его устойчивость и газообразующую способность; служат источником питания для дрожжевых клеток

На современном этапе развития криотехнологии хлебобулочных изделий большое внимание исследователей привлекают ингредиенты с пребиотическими свойствами, такие как инулин [265, 373] и пектин [54-57], которые помимо улучшения реологических, физико-

химических и органолептических характеристик готовой продукции, позволяют получить продукты питания с функциональными свойствами, обогащенные пищевыми волокнами.

Было высказано предположение, что влияние поверхностно-активных веществ на замедление черствения хлеба является результатом их взаимодействия с крахмалом, замедления процесса ретроградации и блокирования миграции влаги между глютеном и крахмалом, что предотвращает поглощение воды крахмалом. Эмульгаторы также могут взаимодействовать с добавленными липидами, уменьшая поверхностное натяжение пузырьков газа, что приводит к увеличению количества пузырьков меньшего размера [331, 333].

В практике технологии хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов широкое применение находят ферментные препараты и их композиции, основу которых составляют мальтогенная и α-амилазы, глюкоамилаза, ксиланаза, протеазы [61, 71, 91, 254, 332]. Специалисты также отмечают, что комбинация эмульгаторов, гидроколлоидов, окислителей и ферментов может иметь синергетический эффект, приводящий к улучшению реологических характеристик тестовых полуфабрикатов, структурно-механических свойств мякиша, повышению пористости и удельного объема хлебобулочных изделий [243].

Таким образом, получение хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов, сравнимых по качеству со свежевыпеченным хлебом, является сложной задачей. Для улучшения качества хлебопекарной продукции на основе криотехнологии ученые проводят исследования в следующих направлениях: выделение морозоустойчивых дрожжей; модификация рецептур и подбор пищевых ингредиентов; оптимизация процессов тестоприготовления, замораживание, хранение и дефростация полуфабрикатов; применение хлебопекарных улучшителей.

1.5 Теоретические и практические основы выживаемости микроорганизмов при реализации криогенных технологий

Температура является важнейшим физическим фактором внешней среды, определяющим жизнеспособность микроорганизмов [122]. Температура действует не только на скорость химических реакций, но также является причиной структурной перестройки протеинов, фазовых превращений жиров, изменения структуры воды в клетках и их окружении [2].

Различные виды микроорганизмов способны переносить процессы охлаждения и хранения в замороженном состоянии при очень низких температурах. Однако чувствительность микроорганизмов к замораживанию и дефростации сильно варьирует от их видовой принадлежности [14, 120].

Процент выживающих клеток при низкотемпературном консервировании зависит от индивидуальных особенностей различных видов микроорганизмов, состава среды, в которой они находятся в период замораживания, продолжительности хранения, скорости охлаждения и дефростации [14, 123, 148].

Установлено, что клетки молочнокислых бактерий более устойчивы к замораживанию по сравнению с дрожжевыми клетками, однако, погибает определенный процент даже устойчивых клеток [120, 148].

Несомненный интерес представляет выяснение причин различной криорезистентности микроорганизмов, определяемый многими факторами. К ним, прежде всего, относятся размеры, форма, морфологические особенности организации и метаболизма клеток. Форма сферических бактерий наиболее оптимальна за счет минимального значения поверхностного натяжения. При этом внешнее давление на мембрану равномерно распределяется по поверхности и передается внутрь клетки, в результате чего она деформируется равномерно, и на поверхностной мембране не создается участков повышенного риска [148].

Устойчивость микроорганизмов к низким температурам зависит также от химического состава и строения клеточной стенки и мембран. В частности, каркас клеточной стенки грамположительных бактерий образован пептидогликанами. Пептидогликановый каркас состоит из множества слоев и составляет до 90 % клеточной стенки. Пептидогликаны состоят из тетрапептидов, соединенных между собой поперечными мостиками, связывающими диаминокислоту одного тетрапептида с L-аланином другого. Обладая жесткой структурой, пептидогликаны, способствуют сохранению клетками определенной формы, обеспечивают им механическую защиту, придают регидность мембране, вследствие чего повышается устойчивость клеток к действию осмотического давления. Кроме того, в состав клеточных стенок входят полисахариды, тейхоевые кислоты, благодаря которым бактерии сохраняют свои свойства в процессах замораживания и последующей дефростации [299].

Криоустойчивость микроорганизмов определяют также свойства компонентов мембран. Клетки, богатые полифосфатами, гликогеноподобными веществами, липидами, пептидами более устойчивы [148, 299]. По мере увеличения количества цитохромов, структурно связанных с мембранами клеток, устойчивость клеток к процедуре замораживания - размораживания снижается. Это можно объяснить тем, что между компонентами мембран и цитохромами существуют чувствительные к повышению концентрации солей связи, которые нарушаются под влиянием возрастания в процессе замораживания концентрации солей [299].

Для объяснения повреждений клеток при замораживании предложено много теорий. Согласно современным представлениям о процессах замораживания и последующей дефростации на клетку при криоконсервировании могут воздействовать несколько повреждающих факторов физико-химической природы: образование внутри- и внеклеточного льда, повреждение цитоплазматической мембраны, осмотические эффекты, инактивация «ключевых» ферментов метаболизма, активация внутримембранных фосфолипаз и лизосомальных гидролаз, нарушения процессов метаболизма.

В настоящее время установлено, что повреждения клеток при замораживании могут быть вызваны как проявлением механического феномена, так и обезвоживающим действием внутриклеточного льда [367]. Образование льда происходит как в межклеточном пространстве, так и внутри клеток, способствующее более серьезным повреждениям [299].

Растущие внеклеточные кристаллы вызывают сильное сдавливание и деформацию клеток, что в конечном итоге приводит к появлению разрывов в структуре клеточной мембраны и «выдавливанию» белков из нее. Если небольшие повреждения клетка еще способна регенерировать, с более значительными разрушениями она не справляется [16, 367].

Кроме того, из-за разрастания кристаллов льда в межклеточном пространстве уменьшаются размеры клетки, что вызывает сжатие и образование складок в оболочке, в результате чего может произойти механическое повреждение протоплазмы. При поступлении воды в клетку во время размораживания тесно соприкасающиеся слои протоплазмы начинают расходиться, при этом она часто отрывается от оболочки, что приводит к повреждению структуры клетки [41].

Согласно гипотезе физического контакта необратимые изменения, вызывающие повреждения клеток в процессе низкотемпературного воздействия, связаны с образованием дисульфидных мостиков между соседними белками или отдельными участками одной молекулы путем окисления SH-групп. Это происходит в процессе обезвоживания клеток и возникающей деформации их мембран: увеличивается концентрация белков, например, ферментов, или происходит соприкосновение мембранных структур, которые в нормальном состоянии отделены друг от друга. Возникающие при этом S-S-связи являются более прочными, чем водородные, и обуславливают необратимость процесса [16, 343].

В соответствии с условиями окружающей среды и потребностями клетки состояние мембраны изменяется, в результате чего снижается пластичность мембранной структуры. Максимальная проницаемость мембраны для ионов и воды обнаруживается в случае, когда соотношение гель-фазы и жидкокристаллических областей будет равным, то есть оно имеет место при температурах выше фазового перехода липидов. Таким образом, при низких температурах происходит изменение проницаемости мембраны [16].

Переход в фазу геля липидов, иммобилизованных белками, приводит к снижению активности некоторых ферментов. Эти фазовые превращения могут привести к различным последствиям: нарушить активный и пассивный транспорт метаболитов и ионов, синтез веществ, производство энергии в клетках [41].

В некоторых типах мембран (например, *E. coli*) кроме фазово-структурных переходов липидов может происходить латеральное разделение липидов в бислое, что способствует формированию трансмембранных дефектов, часто необратимых при восстановлении нормального температурного режима, через которые содержимое клетки может покидать цитоплазму, что становится одной из причин гибели клетки [222].

Многие микроорганизмы весьма чувствительны к нарушению привычной концентрации и связанного с ней осмотического давления. В процессе замораживания происходит нарушение равновесия между внутренней средой клетки и окружающей ее жидкости, что в конечном итоге приводит к обезвоживанию клетки. Осмотические явления, связанные с переносом различных веществ через избирательно проницаемые мембраны, вносят значительный вклад в защиту и возникновение повреждений клеточных мембран на различных этапах криообработки [299].

В результате обезвоживания клеток, как в процессе диффузии воды в межклеточное пространство, так и в результате ее частичного перехода в замороженное состояние, возрастает концентрация минеральных солей (электролитов), растворенных в оставшейся незамерзшей части клеточной влаги. Происходит увеличение осмотического давления на клетку, изменение ионной силы раствора, омывающего клетки, его кислотности, вязкости и других физико-химических свойств [41]. Такие изменения вызывают осаждение – высаливание, денатурацию и коагуляцию – вне- и внутриклеточных белков.

К повышению концентрации солей особенно чувствительны липопротеиды, из которых в основном состоят мембраны клеток. Поскольку с повышением концентрации солевых растворов возрастает осмотическое давление, весь комплекс явлений, развивающихся при замораживании, получил название «осмотический шок» [299].

Механизм высаливания белков состоит в том, что увеличение анионов и катионов солевого раствора приводит к снятию гидратной оболочки белка, являющейся одним из факторов его устойчивости. Способность к провоцированию высаливания наиболее выражена у анионов солей [14].

Для каждого типа белка имеется своя зона высаливания, и существует такая концентрация соли, которая вызывает его дегидрирование и осаждение. При удалении высаливающего агента (восстановлении концентрации растворенных веществ) белок возобновляет свои природные свойства и функции. Поэтому при криоконсервировании и

дальнейшей дефростации высаливание белковых компонентов клетки не оказывает угнетающего действия на клетки микроорганизмов [14, 122]. Низкая температура и связанная с ней внутриклеточная кристаллизация воды является одним из денатурирующих факторов веществ белковой природы [2].

Дефростация клеточной суспензии также приводит к резкому уменьшению концентрации растворенных во внеклеточной среде веществ за счет таяния льда. Если все растворенные вещества проникают через клеточные мембраны значительно медленнее, чем молекулы растворителя (воды), выравнивание значений химического потенциала воды вне и внутри клеток будет происходить практически только за счет тока воды в клетки, а не за счет выхода накопленных клетками при замораживании растворенных веществ наружу. При этом возрастает опасность постгипертонического лизиса [148].

Хорошо известно, что различные ферментные белки по-разному относятся к воздействию низких температур. Одни из них значительно изменяют свою активность, другие остаются почти неизменными. Однако следует предполагать, что наиболее важную роль играют изменения в тех ферментативных реакциях, которые являются определяющими в метаболизме клетки и осуществляются ферментами, белки которых наиболее чувствительны к неблагоприятным факторам среды [123, 299, 332].

В научно-технической литературе имеются сведения о том, что к воздействию процессов замораживания и замораживания-высушивания весьма чувствительна сукцинатдегидрогеназа, прочно связанная с митохондриальной мембраной [120]. Нарушение белковой части данного фермента или нарушение ее коллоидного состояния, структуры всего комплекса может вести к нарушению окислительных процессов и снижению жизнеспособности клеток [367].

В процессе низкотемпературной обработки клеток микроорганизмов наступают изменения и в других ферментных системах, связанных с протеиновыми структурами – активация внутримембранных фосфолипаз и лизосомальных гидролаз, снижающие уровень фосфолипидов в мембранах и модифицирующие реакционно-активные группировки белков [16, 41]. Мембранные фосфолипиды и белки, обеспечивая специфическую проницаемость мембран и, таким образом, контролируя транспорт веществ, участвуют в регуляции метаболизма клетки и ее жизнедеятельности. Так как фосфолипиды являются основной группой липидов цитоплазматической мембраны, их гидролиз, наступающий вследствие активации фосфолипаз, является важным механизмом повреждения мембран [41].

Кроме того, происходит существенная активация процесса образования свободных радикалов, приводящее к усилению перекисного окисления липидов и, как следствие, повреждению мембран. Благодаря ненасыщенности углеводородной цепи жирных кислот

фосфолипиды клеточных мембран наиболее предрасположены к реакции окисления, инициируемой свободными радикалами, образующимися в клетке. Свободные радикалы в условиях кислородного голодания (что наблюдается при брожении теста) приводят к повреждениям многих макромолекул клеток [222, 343].

Одной из причин интенсификации процессов гидролиза фосфолипидов в мембранах митохондрий является разрушение природных антиоксидантных систем при низкотемпературном воздействии. Установлено, например, что в процессе замораживания митохондрий они теряют эндогенный глутатион, который является эффективным фактором защиты от процессов перекисного окисления липидов. Появление в составе мембраны перекисных группировок приводит к резкому ослаблению связей липидных молекул друг с другом, белками и другими компонентами, повышается вероятность окисления SH-групп белков, что существенно модифицирует функционирование ферментов-катализаторов, ионных переносчиков [240, 299].

Весьма нестабильными структурами клетки являются лизосомы. При воздействии неблагоприятных факторов, в частности низких температур, они могут легко повреждаться.

В связи с высоким содержанием гидролитических ферментов, обладающих широким спектром разрушительного действия, лизосомы являются наиболее опасными клеточными органеллами, которые повреждаются при замораживании. Часть ферментов лизосом связана с мембраной, часть растворена в их матриксе. Поскольку лизосомы являются структурами, в которых ассоциации неактивных гидролитических ферментов размещены в ячейках, имеющих однослойную фосфолипопротеиновую мембрану, то в условиях замораживания или дефростации они могут резко изменять свою проницаемость, либо подвергаться механическим разрывам, в результате чего вышедшие внутрь клетки гидролазы вступают во взаимодействие с важнейшими структурами клетки, вызывая переваривание белков, нуклеиновых кислот и других компонентов [223, 299, 365]. Поэтому в процессе криоконсервирования и дальнейшей дефростации клеток необходимо соблюдать условия, при которых повреждения лизосом были бы минимальными.

В литературных источниках имеются сведения о том, что под воздействием процессов замораживание – хранение – дефростация может происходить нарушение процессов метаболизма клеток микроорганизмов. Например, представители родов *Pseudomonas, Shigella* теряют способность усваивать азот из неорганических источников [148]. При изучении действия процесса замораживания на клетки молочнокислых бактерий, в частности *L. brevis* и *L. plantarum,* были обнаружены изменения в способности синтезировать уксусную и молочную кислоты данными микроорганизмами [127, 163, 228, 341].

Таким образом, выживаемость клеток при воздействии низких температур и их жизнеспособность зависит от целого ряда факторов [148].

В практике низкотемпературного консервирования микроорганизмов широкое применение нашли среды сложного состава с добавлением специальных веществ – криопротекторов. Механизм защитного действия каждого криопротектора индивидуален. Молекулы криопротекторов содержат гидроксильные, карбоксильные, либо аминогруппы и способны образовывать водородные связи с молекулами воды, переводя ее в связанное состояние и предотвращая ее замерзания при низких температурах. Кроме того, они снижают концентрацию электролитов в среде, противодействуют осмотическому давлению, действуют на проницаемость клеточных мембран [283, 318].

По характеру взаимодействия с клетками микроорганизмов криопротекторы можно разделить на две группы: низкомолекулярные, проникающие в клетку через цитоплазматическую мембрану (криопротекторы эндоцеллюлярного действия) и высокомолекулярные, не проникающие в клетку и оказывающие свои защитные свойства извне (криопротекторы экзоцеллюлярного действия) [256, 300].

При определенных концентрациях проникающие в клетку криопротекторы (глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль, ацетамид, диметилсульфоксид) вызывают обезвоживание клеток, что в свою очередь, повышает концентрацию внутриклеточных коллоидов. Последние в высоких концентрациях проявляют защитные свойства: способствуют переохлаждению внутриклеточной среды и ее частичному переходу в стеклообразное состояние, исключающее образование крупных кристаллов льда, повреждающих клетки. При использовании криопротекторов, не проникающих в клетку (полиэтиленгликоль, сахароза, фикол), уменьшается поток воды через мембрану и осмотический стресс. При этом внутриклеточное содержимое обезвоживается в степени, достаточной для того, чтобы внутриклеточная кристаллизация не вызывала летальных повреждений клетки [238].

Многими исследователями показана эффективность применения криопротекторов, способных проникать в клетки, обеспечивая тем самым более эффективную защиту, чем тех, которые остаются на поверхности клетки [300]. Превосходство проникающих криопротекторов подтверждает точку зрения исследователей о том, что утрата жизнеспособности микроорганизмов при замораживании обусловлена не только повреждением цитоплазматической мембраны, но может быть вызвана кумулятивным эффектом повреждения структурных функциональных макромолекул [238].

Исследование механизмов защитного действия криопротекторов экзо- и эндоцеллюлярного действия до настоящего времени – один из актуальных вопросов

криобиологии. Полученные на сегодняшний день факты свидетельствуют, что существенное значение в механизме криопротекции играют физико-химические изменения, происходящие в среде и внутри клеток при введении криопротекторов и в процессе замораживания. В области положительных температур эти изменения проявляются в виде повышения вязкости растворов и увеличения их осмотической силы, уменьшения диэлектрической постоянной среды, изменений структуры воды [38, 300].

Согласно коллигативной гипотезе, защитные свойства криопротекторов обусловлены в основном их противосолевым буферным действием, в результате чего при образовании льда понижается концентрация солей при любой температуре ниже точки замерзания воды [250].

Непроникающие криопротекторы тормозят поступление метаболитов и ионов в клетки при более низких концентрациях в криозащитной среде, чем проникающие. Нарушение транспортных процессов, по-видимому, связано с изменениями физико-химических условий среды: повышением вязкости растворов, уменьшением диэлектрической постоянной среды, увеличением осмотической силы растворов, что затрудняет взаимодействие мембраны и переносчиков с субстратами и создают неблагоприятные условия для переноса веществ в клетки. В случае использования проникающих криопротекторов возможна прямая конкуренция их молекул с субстратами за связывание с активным центром переносчиков [250].

Нарушение транспорта метаболитов и ионов – основная причина снижения уровня метаболизма аминокислот и нуклеозидов в клетке. При использовании эндокриопротекторов торможение метаболизма аминокислот дополняется непосредственным ингибированием криопротекторами компонентов трансляции, а при использовании экзопротекторов торможение метаболизма аминокислот и нуклеозидов, по-видимому, дополнительно усиливает осмотической дегидратацией [250].

Вещества криопротекторного действия должны обладать следующими характеристиками: низкая молекулярная масса, хорошая растворимость в воде, эффективное снижение количества вымораживаемой воды в виде чистого льда, предотвращение кристаллизации и поддерживание в растворенном состоянии солей и белков клетки [250]. Однако нельзя забывать о том, что при использовании криопротектора в пищевых технологиях основным требованием является его абсолютная безвредность как для клеток микроорганизмов, так и для организма человека в целом.

Многочисленные исследования различных соединений с целью выявления их криопротекторных свойств по отношению к клеткам микроорганизмов при замораживании показывают, что эффективность защитного действия каждого вещества различна [78, 79,

87, 172, 261, 268, 320]. На сегодняшний день наиболее изученными являются такие классы соединений как углеводы, аминокислоты, одно- и многоатомные спирты. Различные сахара (глюкоза, фруктоза, лактоза, манноза и сахароза), сахарные спирты (сорбит и инозитол) и невосстанавливающие сахара (трегалоза) были протестированы на предмет их защитного действия при низкотемпературном воздействии. Высокие защитные свойства присущи таким сахарам, как глюкоза, сахароза, арабиноза [218, 250]. С увеличением молекулярного веса ухудшается их проникающая способность в клетки, и, следовательно, уменьшается эффективность действия подобного рода соединений.

В отношении молочнокислых бактерий рядом исследователей показано, что высокая выживаемость клеток достигается при использовании сахарозы в качестве основного компонента защитной среды. Установлено, что для бифидобактерий и бактерий вида *Lactobacillus brevis* оптимальная дозировка сахарозы в среде составляет 10 % [87]. Показано, что сахароза наряду с лактозой и трегалозой способствует повышению криоадаптивных свойств культуры *Lactobacillus delbrueckii* к осмотическому стрессу [320].

Механизм действия трегалозы основан на ее способности поглощать воду, которая в свою очередь, обусловлена наличием гидроксильных групп, придающих ей гидрофильные свойства. Кроме того, уменьшение диффузии воды снижает точку замерзания и защищает мембраны клеток от повреждений, вызванных замораживанием, осмотической дегидратацией и денатурацией [218]. Установлено, что при длительном низкотемпературном хранении (более 12 мес.) трегалоза демонстрирует высокую эффективность в отношении дрожжей, чем бактерий (72 % и 7 % жизнеспособность клеток соответственно) [359].

Искусственное введение в клетки низкомолекулярных сахаров приводит к повышению их концентрации в цитоплазме, что позволяет ей осмотически удерживать связанную воду. Установлено, что эти вещества противодействуют сильному дегидратирующему эффекту замораживания и этим удерживают SH-группы соседних белков на расстоянии, достаточном для предотвращения или замедления реакции между ними [218].

Хорошими криозащитными свойствами по отношению к микроорганизмам обладает глутаминовая кислота и ее соли [185]. Для *L. brevis* оптимальная дозировка глутамата натрия установлена на уровне 2,5 %. При этом выживаемость клеток культуры может достигать 53,6 % [185]. Данное вещество снижает криоскопическую точку среды в процессе замораживания. Криопротекторный эффект глутаминовой кислоты и ее солей объясняется тем, что их присутствие в среде приводит к уменьшению количества кристалликов льда, формирующихся в процессе замораживания, за счет перевода части воды в связанное состояние посредством водородных связей [185].

Глицерин – многоатомный спирт, который относится к эндоцеллюлярным криопротекторам, защитное действие которого весьма хорошо изучено. Установлено, что глицин в составе защитных сред способно обеспечивать сохранность *Str. pneumoniae* при хранении в замороженном состоянии в течение продолжительного времени. Механизм защитного действия глицина, прежде всего, объясняется осмотической стабилизацией концентрации внутриклеточных растворов [247].

Имея низкую эвтектическую температуру и являясь хорошим растворителем, он действует как противосолевой буфер, защищает как внутриклеточную структуру, так и мембраны от возрастающей концентрации солей и электролитов по мере снижения температуры. Для протекторного действия глицерина при медленном замораживании необходимо, чтобы число его молекул превосходило количество молекул солей. Это позволяет снизить при замораживании концентрацию солей ниже биологически опасного уровня [301].

Кроме того, имея малый молекулярный вес, глицерин свободно проникает через мембраны в клетки микроорганизмов и препятствует замерзанию воды путем стабилизации водородных связей в кристаллической решетке. Он замещает часть воды, которая при понижении температуры выводится во внеклеточную среду, в которой повреждающее действие кристаллов льда менее опасно [247].

Между тем, проникая в клетки, глицерин способен не только изменять кристаллическую структуру воды в направлении ее большей стабилизации, но и образовывать связи с реакционно-активными боковыми группами белков, обратимо изменяя их конфигурацию, и, возможно, конформацию [247]. Показано, что можно значительно увеличить содержание живых клеток молочнокислых бактерий и их стойкость при замораживании с последующим высушиванием, используя в составе защитной среды наряду с сахарозой и крахмалом лимоннокислый натрий [179]. Его оптимальная дозировка устанавливается экспериментальным путем для каждого вида бактерий и колеблется в пределах 2-4 %.

Установлено, что присутствие натриевой соли аскорбиновой кислоты и бетаина в составе криопротекторных сред позволяет максимально снизить криоскопическую точку среды [186] и тем самым предотвратить гибель клеток микроорганизмов. Возможным объяснением данного факта является наличие в молекулах данных веществ карбоксильных групп, способных образовывать водородные связи с молекулами воды, переводя ее в связанное состояние и предотвращая ее замерзание при низких температурах среды. В работе [191] показано положительное влияние ионов кальция на сохранность *L. brevis* в процессе низкотемпературного консервирования.

В ряде работ исследовано влияние желатина на стойкость микроорганизмов при замораживании. Показано, что концентрация желатина 1 % в среде замораживания

позволяет снизить величину активности воды и изменить осмотическое давление в среде, что повышает устойчивость микроорганизмов к деградации [194].

Таким образом, рассмотрев возможные последствия действия процессов замораживания на клетки микроорганизмов, можно сделать следующий вывод: при низкотемпературном консервировании хлебопекарных полуфабрикатов молочнокислые бактерии и дрожжи оказываются в условиях, сильно отличающихся от тех, в которых они обычно функционируют, и подвергаются воздействию большого количества неблагоприятных факторов.

Эффективная защита от повреждающего действия низких температур клеток микроорганизмов, применяемых в криогенной технологии хлеба, возможна благодаря внедрению в практику достаточно небольшого количества соединений. Почти все применяемые криопротекторы способны хорошо растворяться в воде и определенным образом влиять на структуру и соотношение вне- и внутриклеточной воды, вступать непосредственно во взаимодействие с гидратной оболочкой биологически активных макромолекул и воздействовать таким образом на их структуру.

Следует признать целесообразными дальнейшие изучения данной проблемы и поиск криопротекторов нового типа, оказывающих защитное влияние на различные уровни организации биоструктур и, возможно, способных изменять метаболизм клеток таким образом, чтобы повысить их жизнеспособность при низкотемпературном воздействии.

1.6 Заключение к первой главе

Анализ научно-технической литературы показывает, что криотехнология хлебобулочных изделий является перспективной, ресурсосберегающей, эффективной и инновационной. Развитию данной технологии на примере производства теста и мелкоштучной хлебобулочной продукции посвящено множество научных работ. Сегмент данной продукции широко развивается как на внутреннем рынке, так и за рубежом.

Исследования в данной области направлены на повышение качества хлеба на основе замороженных полуфабрикатов различной степени готовности, применению различных добавок и хлебопекарных улучшителей, при этом подавляющее большинство работ рассматривает производство хлебобулочных изделий из пшеничной муки, и недостаточно сведений о выработке ржаных и зерновых сортов хлеба с применением криотехнологии.

Актуальным остается вопрос разработки оптимальных режимах процессов замораживания, хранения и дефростации тестовых заготовок, что, связано с многообразием используемого сырья и особенностями отечественного хлебопечения.

Изучение роли молочнокислых бактерий и дрожжей в формировании качества ржаных и ржано-пшеничных хлебопекарных полуфабрикатов и готовой продукции, а также исследование физико-химических аспектов повреждения клеток микроорганизмов в процессе низкотемпературной обработки позволяет сделать следующее заключение: при реализации процессов криогенной технологии хлеба микроорганизмы подвергаются воздействию целого ряда неблагоприятных факторов, оказывающих отрицательное воздействие на их физиологическую и биохимическую активность в размороженных полуфабрикатах.

На сегодняшний день установлена роль молочнокислых бактерий в формировании качества ржаных и ржано-пшеничных сортов хлеба, но недостаточно изучено повреждающее действие на их клетки процессов замораживания, хранения и последующей дефростации тестовых полуфабрикатов. В этой связи необходимыми представляются исследования, направленные на изучение влияния низкотемпературной обработки на физиологическую активность молочнокислых бактерий и поиск путей повышения их криорезистентности.

Не определено, в какой мере происходит изменение жизнедеятельности дрожжей и молочнокислых бактерий при низкотемпературной обработке тестовых полуфабрикатов.

В научно-технической литературе недостаточно сведений о функциональных свойствах сырья, обладающих криопротекторными характеристиками для получения ржано-пшеничного хлеба.

Недостаточное внимание уделено подбору молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами, использование которых позволит стабилизировать биотехнологические процессы при производстве ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов и повысить качество готовых изделий.

Выживаемость клеток микроорганизмов при действии отрицательных температур зависит от многих факторов. Для повышения жизнеспособности клеток необходимо применение криопротекторов и оптимальных режимов замораживания, хранения и дефростации, что следует учитывать при получении продуктов с использованием микроорганизмов на основе замороженных полуфабрикатов, в частности при производстве хлебобулочных изделий.

На основании изложенных фактов очевидна актуальность проведения комплексных исследований, направленных на разработку эффективных способов стабилизации физиологической активности и жизнеспособности дрожжей и лактобактерий и улучшению качества замороженных полуфабрикатов, что позволит наряду с сохранением высоких потребительских свойств, расширить ассортимент хлебобулочных изделий, приготовленных на основе криотехнологии.

В результате проведенных исследований были намечены основные направления решения обозначенной проблемы, которые нацелены на регулирование технологического процесса производства хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов (рис. 1.3).

Рисунок 1.3 – Поиск эффективных путей стабилизации биотехнологических свойств тестовых полуфабрикатов на основе криотехнологии

Регулирование технологического процесса производства ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов можно обеспечить путем подбора и применения дрожжей и молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами, тем самым минимизировать гибель ключевой микрофлоры, участвующей в процессах созревания тестовых полуфабрикатов. С этой же целью эффективным также является разработка способа повышения криозащитных свойств микроорганизмов на стадии культивирования их в питательных средах перед низкотемпературной обработкой.

Эффективным способом, предотвращающим гибель дрожжей и молочнокислых бактерий при воздействии отрицательных температур, может служить применение рецептурных компонентов – криопротекторов, а также применение ферментных препаратов преимущественно протеолитического и амилолитического действия.

В настоящее время актуальными являются также исследования, определяющие выбор оптимальных технологических параметров тестоприготовления, замораживания, хранения и дефростации ржано-пшеничных полуфабрикатов, использование которых позволит сохранить высокую бродильную активность микрофлоры и повысить качественные характеристики продукции.

Таким образом, выявлены основные пути повышения выживаемости и физиологической активности дрожжей и молочнокислых бактерий, а также стабилизации

биотехнологических свойств тестовых полуфабрикатов из смеси ржаной и пшеничной муки, применение которых позволит:

- создать оптимальные условия жизнедеятельности дрожжей и молочнокислых бактерий в тестовой среде с целью достижения наилучшего качества готовых изделий;
- получать продукты разнообразного вкуса и повышенной пищевой ценности, используя специфические свойства отдельных штаммов молочнокислых бактерий;
- создать возможность направленного управления процессом созревания полуфабрикатов и предотвратить развитие посторонней микрофлоры;
- обеспечить приготовление полуфабрикатов высокого качества в наиболее короткий период времени;
- увеличить продолжительность хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Организация работы и схема проведения эксперимента

Экспериментальные исследования выполнялись в лабораториях ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» на кафедрах технологии пищевых производств, технологии мясных и молочных продуктов.

Опытно-промышленную апробацию новых технологий проводили в условиях производства на хлебопекарных предприятиях АО «Татхлеб» (г. Казань) и предприятиях малой мощности (ИП «Саляхетдинова Э.Ф.» (г. Казань), ИП «Рамеев Р.Р.» (г. Набережные Челны).

Схема проведения экспериментов представлена на рисунке 2.1.

2.2 Объекты исследования

В соответствии с целями и задачами работы объектами исследования служили: молочнокислые бактерии выделенные из различных пищевых источников животного и растительного происхождения, молочнокислые бактерии и дрожжи, участвующие в процессе брожения ржаной закваски и ржано-пшеничного теста; сухие молочнокислые закваски (предоставлены ФГБОУ ВО МГУПП); мука хлебопекарная – ржаная обдирная мука (ГОСТ 7045–2017), пшеничная мука 1 сорта (ГОСТ 26574–2017); пшеница 3-го класса (ГОСТ 9353–2016); молоко сухое обезжиренное (ГОСТ 33629–2015); сыворотка молочная сухая (ГОСТ 33958–2016); кислота янтарная (ГОСТ 6341–75), сукцинаты калия и аммония (ТУ 2634–007–33880306–96); дрожжи хлебопекарные прессованные (ГОСТ 171–81), дрожжи хлебопекарные сушеные (ГОСТ 54845–2011); ферментные препараты (Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG); кукурузные модифицированные крахмалы; солодовые препараты (сухой пшеничный, гречневый, ржаной и ячменные солод, а также солодовые экстракты); соль поваренная пищевая (ГОСТ 51574–2018); вода питьевая (СанПиН.1.4.1074–01), а также тестовые полуфабрикаты и хлебобулочные изделия на основе замороженных полуфабрикатов.

Все сырье соответствовало требованиям качества нормативной документации и безопасности по ТР ТС 021/2011, ТР ТС 029/2011.

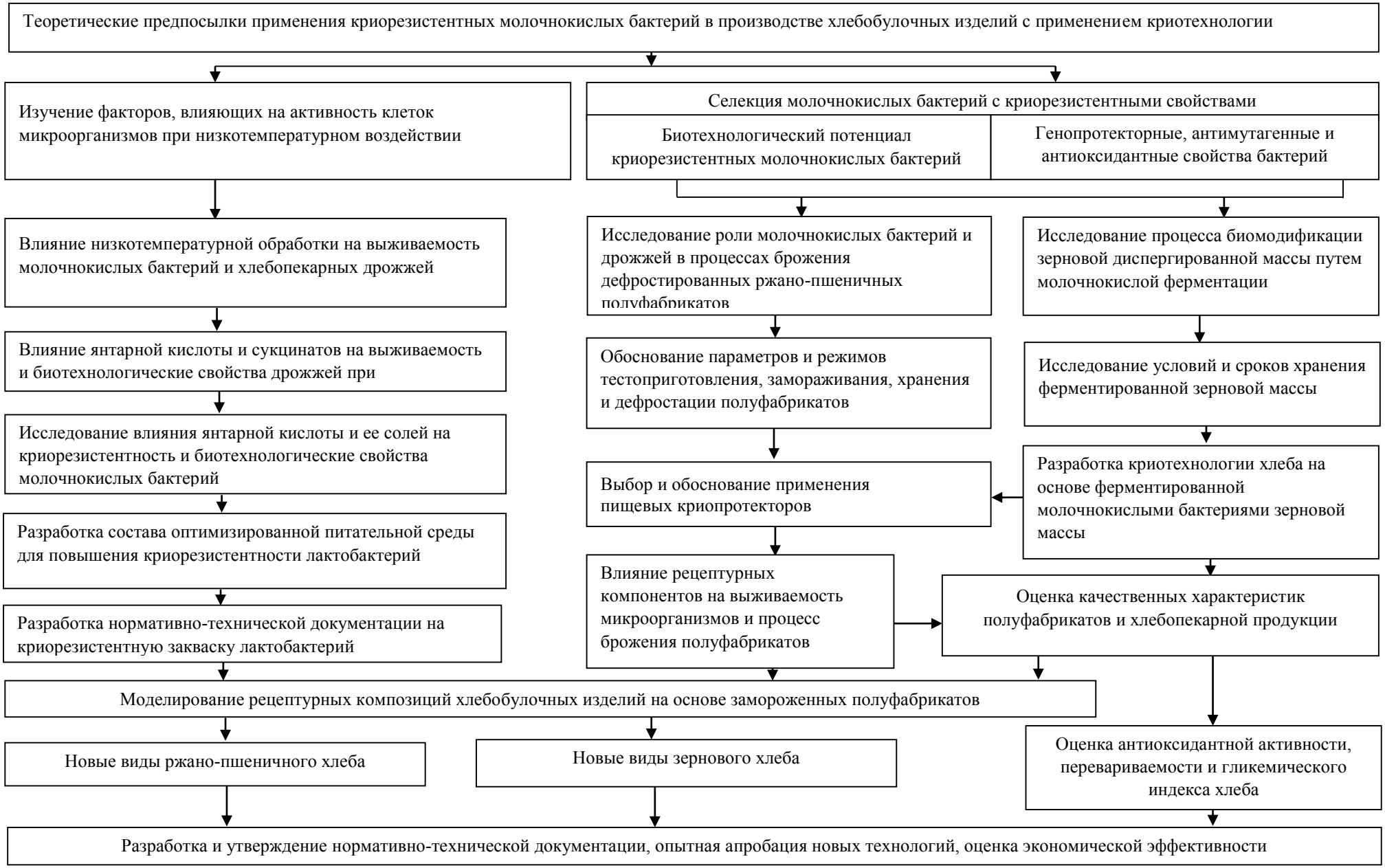


Рисунок 2.1 – Схема экспериментальных исследований

2.3 Методы исследований

2.3.1 Методы выделения молочнокислых бактерий и исследование их биотехнологического потенциала

В целях выделения молочнокислых изолятов из различных пищевых источников отбирали пробы и готовили серию разведений, посев осуществляли глубинным методом на агаризованные питательные среды (агар с $CaCO_3$, MRS) с последующим выделением микроорганизмов в чистую культуру. Далее все выделенные в чистую культуру бактериальные изоляты культивировали на жидкой питательной среде MRS с последующим поверхностным пересевом их на агаризованную среду MRS. Среди морфологически идентичных колоний (по окраске, форме, текстуре) для выделения в чистую культуру выбирали одну с точным учетом количества всех тождественных ей признаков и культивировали на плотной среде MRS с последующей идентификацией молочнокислых изолятов.

Идентификацию молочнокислых бактерий проводили на основе классических физиолого–биохимических тестов [104, 161, 162] и результатов ДНК-секвенирования по методу Сэнгера на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета. Тесты на каталазную активность, восстановление нитратов, сбраживание сахаров, газообразование, наличие элементов дыхательной цепи, рост при различных температурах и другие признаки определяли с применением стандартных методов [9, 95], ГОСТ 10444.11–2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов», ГОСТ Р 56139–2014 «Продукты пищевые функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов».

Выделение молочнокислых микроорганизмов из ржаных и ржано-пшеничных полуфабрикатов. Метод основан на высеве определенного количества продукта (закваски, теста) и его разведений в жидкие или агаризованные питательные элективные среды, культивировании посевов при оптимальных условиях и определении морфологических и биохимических свойств обнаруженных микроорганизмов и их подсчете.

Определение количества жизнеспособных молочнокислых бактерий бактерий родов *Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Pediococcus,* производилось согласно ГОСТ 10444.11–2013. Для посева на чашки Петри глубинным методом отбирали по 1,0 мл подготовленной пробы продукта и его разведения, для посева поверхностным методом по 0,1 мл. Посевы

глубинным или поверхностным методами проводили по ГОСТ 26670–91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».

Для определения присутствия или подсчета количества молочнокислых бактерий производили посев на жидкую среду Брикфельдта и MRS.

Для определения присутствия или подсчета бактерий рода *Lactobacillus* производили посев на жидкие среды MRS и Рогоза или глубинным методом в агаризованные среды MRS и Рогоза.

Для определения присутствия бактерий рода *Leuconostoc* производили посев на жидкую дрожжевую среду или на агаризованную среду с сахарозой поверхностным способом.

Для определения присутствия и подсчета количества бактерий рода *Streptococcus* производили посев глубинным методом в агаризованную среду Lee, а для *S.thermophilus* использовали среду Редди.

Для определения присутствия и подсчета количества бактерий рода *Pediococcus* проводили посев глубинным методом в агаризованную среду Брига в модификации Шарп.

Для подтверждения принадлежности характерных колоний к молочнокислым бактерям одного из родов отбирали из посевов не менее 5-ти характерных колоний. Принадлежность каждой отобранной колонии к определенным микроорганизмам устанавливали по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы, дополнительно при идентификации бактерий рода *Leuconostoc* определяли наличие капсул, при идентификации стрептококков отсутствие роста в мясопептонном бульоне с pH 9,6 и мясопептонном бульоне с 6,5 % NaCl.

Для определения отношения микроорганизмов к окраске по Граму из колоний приготавливали мазки и окрашивали их по ГОСТ 30425 и микроскопировали.

Для изучения подвижности микроорганизмов из колоний приготавливали препараты методом висячей или раздавленной капли и микроскопировали.

Каталазную активность культур определяли по ГОСТ Р 56139–2014.

Разложение перекиси водорода у бактерий рода *Pediococcus* возможно за счет фермента псевдокаталазы. Поэтому, при обнаружении в характерных колониях грамположительных, неподвижных микроорганизмы, дающих положительную каталазную реакцию, их высевали на среду для псевдокаталазы. Определение псевдокаталазы проводили, как и каталазы по ГОСТ Р 56139–2014. Культуры, образующие псевдокаталазу, относили к роду *Pediococcus*.

Для определения присутствия и подсчета дрожжевых клеток производили посев глубинным и поверхностным методами на агаризованную среду сусло-агар, среду Сабуро согласно ГОСТ 10444.12–2013.

Оценку функционально-технологических свойств штаммов оценивали по способности их к кислотообразованию при росте на обезжиренном молоке, активности его сквашивания, количеству клеток молочнокислых бактерий, степени синерезиса, вязкости и плотности сгустка [153, 311].

Антагонистические свойства штаммов оценивали измерением зон подавления роста тест-культур патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [9, 95, 226]. Оценку чувствительности штаммов к антибиотическим веществам проводили по диаметру зоны задержки роста исследуемых штаммов вокруг дисков, пропитанных антибиотиками [9, 95]. Для изучения устойчивости штаммов к неблагоприятным условиям проведены исследования по сравнительной выживаемости штаммов молочнокислых бактерий при экспозиции 24 ч в жидкой среде с различными концентрациями желчи (20 и 40 %), фенола (0,4 %) и NaCl (6,5 %) [9, 95].

Для выявления активности казеиназы у культур молочнокислых бактерий использовали молочный агар по Эйкману, где в качестве субстрата использовали обезжиренное молоко, способность к образованию протеолитических ферментов определяли по прозрачным ореолам вокруг зоны роста бактерий, что обуславливает пептонизацию казеина [12, 95].

Способность молочнокислых бактерий гидролизировать саркоплазматические и миофибриллярные белки оценивали по диаметру прозрачной зоны на плотной питательной среде обогащенной стерильными вытяжками саркоплазматических или миофибриллярных белков, полученных методом экстрагирования, в количестве 1 мг/мл [184, 241].

Степень воздействия микробных протеаз на белковые субстраты (казеин, альбумин) оценивали по изменению содержания белков, пептидов и свободных аминокислот спектофотометрическими методами, согласно рекомендаций [160, 166, 310]. Степень гидролиза белка определяли как отношение аминного азота к общему [145], содержание аминного азота в растворе определяли методом формольного титрования [145].

Активность протеаз оценивали модифицированным методом Ансона [130], о протеолитической активности судили по количеству высвободившегося тирозина, накапливающегося в субстрате за 1 ч под действием протеаз, секретируемых в культуральную жидкость лактобактериями через 12 ч и 24 ч культивирования на жидкой питательной среде MRS. В качестве субстрата использовали 2 % раствор гемоглобина на универсальном буфере (уксусная, ортофосфорная и борная кислоты с концентрацией 0,1 М смешивали в равных соотношениях) со значениями pH 5,0, 6,5 и 8,0 для определения протеолитической активности слабокислых, нейтральных и щелочных протеаз молочнокислых бактерий соответственно.

Определение активности липолитических ферментов молочнокислых бактерий проводили по модифицированному методу Ота, Ямада [68]. Специфическую активность липазы выражали в микромолях олеиновой кислоты, освобождающейся за 1 ч при гидролизе субстрата (оливкового масла) 1 мл культуральной жидкости.

Для получения культуральной жидкости клетки микроорганизмов выращивали в среде MRS при температуре 37 ^{0}C до достижения стационарной фазы роста, по окончании инкубации биомассу отделяли центрифугированием (8000 об./мин., 15 мин.), надосадочную жидкость стерилизовали, пропуская ее через мембранный фильтр «Synpor» с диаметром пор 0,45 мкм. В работе исследовали культуральную жидкость с концентрацией сухих веществ 6 % и 30 % (концентрированную в 5 раз). Концентрирование культуральной жидкости проводили путем высушивания при температуре 30-40 ^{0}C. Для получения клеточного экстракта молочнокислых бактерий клетки разрушали ультразвуком.

В работе использовали методы определения антиоксидантной активности, которые широко применяются для анализа пищевых объектов и чистых химических веществ. Методы основаны на различных принципах измерения, модельных системах, имеют разную размерность показателя антиоксидантной активности.

В работе использовали спектрофотометрические методы определения антиоксидантной активности молочнокислых бактерий. Об антиоксидантной активности клеток и метаболитов молочнокислых бактерий судили по восстанавливающей силе [276]; антирадикальной активности [177]; по продуктам окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [155]; по продуктам окисления β-каротина в присутствии перекиси водорода [125].

В работе проводили оценку антиоксидантного потенциала штамма *L. casei 32* на лабораторных животных – белых крысах породы Вистар, весом 90-120 г, возрастом 6-8 нед. Были сформированы 4 группы по 6 крыс-аналогов по происхождению, возрасту и полу. Крысы первой контрольной группы (NR) получали основной рацион; крысы второй опытной группы (NR+LC32) получали основной рацион с добавлением ферментированного обезжиренного молока штаммом *L. casei 32* (2 г/животное); крысы третьей опытной группы получали жировой рацион (FR); животные четвертой опытной группы получали жировой рацион кормления с добавлением ферментированного обезжиренного молока (FR+LC32) в количестве 2 г/животное. Длительность эксперимента составила 42 сут. В течение исследуемого периода регистрировали ежедневное потребление корма и еженедельно массу тела. Рассчитывали абсолютную и относительную прибавку массы крыс, проводили морфологическую оценку состояния внутренних органов, а также проводили посев каловых масс методом серийных разведений на плотные питательные среды.

Материалом для исследования служили кровь и ткань печени животных. Изучали показатели, отражающие состояние «структурного» антиоксиданта – активности аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, определяли содержание триглицеридов, холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов в клетках животных оценивали по перекисному и кислотному числам липидов печени, а также по концентрации субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в клетках печени и сыворотке крови. Для выявления молочкокислых бактерий использовали агаризованную среду MRS, для определения колиформных бактерий – среду Эндо, для определения дрожжей – среду Сабуро.

О влиянии стартовых культур на интенсивность процесса окисления жиров мясного сырья судили по кислотному, перекисномуи тиобарбитуровому числам липидов [97]. При проведении экспериментальной работы в качестве мясного сырья использовали говядину высшего сорта, свинину полужирную и грудные мышцы кур. Для проведения исследований были изготовлены опытные образцы модельно-фаршевых систем из мясного сырья с содержанием составляющего жира-сырца 25 %. Измельчение мяса производили в лабораторной мясорубке с диаметром решетки 4 мм. В полученный фарш вносили молочнокислые закваски в количестве 10^7 КОЕ/г и тщательно перемешивали. Контрольные образцы готовили без молочнокислых бактерий. Модельно-фаршевые системы хранили в охлажденном виде при температуре 2±2 ^{0}С.

Для определения антимутагенной активности и выяснения вкладов систем репараций в исправление повреждений генетического аппарата клетки применяли суспензионный метод ДНК-повреждающего теста, в котором индикаторные бактерии инкубируют в жидкой питательной среде [1].

В качестве позитивного контроля в работе использовали известные ДНК-повреждающие агенты – фурацилин (100 мкг/мл) и нитрит натрия (44 мг/мл).

Для определения антимутагенной активности исследуемого вещества использовали тестерные штаммы *E. coli:*

- Wp – дикий тип, trp-;

Три мутантных штамма, дефектные по различным системам репарации:

- Pol A^- – штамм, с нарушенным синтезом ДНК-полимеразы 1, trp-;
- Rec A^- – нарушена пострепликативная репарация, общая рекомбинация, trp-;
- Uvr A^- – нарушена эксцизионная репарация, trp-.

Изучение протекционных свойств препарата проводили в двух вариантах:

1) бактерии тест-штамма *E. coli* инкубировали в мясо-пептоном бульоне совместно с мутагеном и культуральной жидкостью (КЖ);

2) бактерии тест-штамма *E. coli* и КЖ предварительно инкубировали в мясо-пептоном бульоне в течение 100 мин., затем бактерии отмывали и инкубировали вместе с мутагеном.

Антимутагенную активность (АА) исследуемого вещества определяли по формуле:

$$AA = 1 - \left(\frac{X_3 - X_1}{X_2 - X_1} \right) \cdot 100, \quad (2.1)$$

где X_1 – изменение оптической плотности клеточной суспензии тестерного штамма в опыте с 0,85 % NaCl (негативный контроль);

X_2 – изменение оптической плотности клеточной суспензии тестерного штамма в опыте с мутагеном (позитивный контроль);

X_3 – изменение оптической плотности клеточной суспензии тестерного штамма в опыте с мутагеном и исследуемым веществом (эксперимент).

Генопротекторные свойства культуральной жидкости молочнокислых бактерий исследовали используя модифицированный ДНК-повреждающий тест с метаболической активацией *in vitro*. Микросомную активирующую смесь и культуральную жидкость в соотношении 1:1 инкубировали в течении 40 мин. По окончании инкубации смесь центрифугировали при 8000 об/мин в течение 15 мин. Далее надосадочную жидкость сливали и стерилизовали, пропуская ее через мембранный фильтр (диаметр пор 0,45 мкм). Лиофилизированные фракции клеток печени крыс, предоставлены институтом экологии и генетики УрО АН России (г. Пермь).

Метаболически активированную культуральную жидкость использовали во втором варианте модифицированного ДНК-повреждающего теста.

Оценку антимутагенной активности культуральной жидкости молочнокислых бактерий производили, используя модифицированный тест Эймса [1], который позволяет определить способность химических соединений индуцировать генные обратные мутации к гистидиновой прототрофности $his^- \rightarrow his^+$ у тесторных штаммов *Salmonella typhimurium.* В работе использовали ауксотрофные по гистидину штамм ТА 100, ревертирующий по типу сдвига рамки считывания: ТА 100 – his G46, rfa, uvr, bio, pkm 101.

Метод включает в себя предобработку клеток тестерного штамма исследуемым веществом с последующим добавлением супермутагена [29, 30]. Бактериальную суспензию тестерного штамма инкубировали вместе с исследуемым препаратом 40 мин. Применяли инкубационную смесь следующего состава: бактериальная культура – 0,5 мл, раствор вещества – 0,4 мл, минеральная среда (Stm) – 1 мл. В контроль вместо вещества вносили тот же объем растворителя (0,85 % NaCl). По истечении срока инкубации смесь центрифугировали 15 мин. при 5000 об./мин. Осадок ресуспендировали в 1 мл минеральной среды. 0,1 мл обработанной

культуры и 0,1 мл раствора супермутагена вносили в 3 мл 0,6 % верхнего агара и смесь наслаивали на поверхность нижнего агара в чашках Петри. В качестве супермутагенов использовали раствор фурацилина. Чашки инкубировали 48 ч при температуре 37 ^{0}С, затем считали число колоний - ревертантов в опытных и контрольных чашках.

Оценку антимутагенной активности производили по следующей формуле:

$$AA = 1 - \left(\frac{S - N}{P - N} \right) \cdot 100, \qquad (2.2)$$

где S – количество колоний – ревертантов в опыте с мутагеном и исследуемым веществом, КОЕ/мл;

N - число спонтанных ревертантов, КОЕ/мл;

P - число колоний – ревертантов в опыте с мутагеном, КОЕ/мл.

2.3.2 Методы исследования сырья, полуфабрикатов и хлебобулочных изделий

В работе применяли общепринятые и специальные методы исследования свойств сырья, полуфабрикатов и готовой хлебопекарной продукции.

В полуфабрикатах определяли влажность, титруемую кислотность после замеса и в процессе их брожения, объем теста (газоудерживающую способность), подъемную силу полуфабрикатов, бродильную активность, расплываемость шарика теста, закономерности газообразования полуфабрикатов при помощи микрогазометрического устройства системы Елецкого [121, 137].

Об активности амилолитических ферментов муки или полуфабрикатов судили по массе расщепленного крахмала, определяемого колориметрическим методом. За единицу амилолитической активности принимали количество расщепленного крахмала в мг на 1 г муки за 1 ч. Активность протеаз в муке или полуфабрикатах оценивали методом Ансона [130], о протеолитической активности судили по количеству высвободившегося тирозина, накапливающегося за 1 ч под действием протеаз муки (в расчете на 1 мг белка). В качестве субстрата для кислых протеаз использовали 2 % раствор альбумина на 0,2 М ацетатном буфере рН 3,0 и рН 5,5; для щелочных – 2% раствор казеина на 0,2 М фосфатном буфере рН 8,0.

Органолептическую оценку полуфабрикатов оценивали по следующим показателям: состояние поверхности (выпуклая, плоская, осевшая, заветренная, в мелкой сеточке и др.); степень подъема и разрыхленности; консистенция (слабая, крепкая, нормальная) и промес; степень «сухости» (влажные, сухие, мажущиеся, липкие, слизистые); вкус, цвет, запах.

Для определения скорости замораживания и дефростации тестовых заготовок измеряли температуру внутренних слоев, используя неэкранированные (открытые) термопары.

Для оценки количества жизнеспособных клеток дрожжей в полуфабрикатах использовали метод высева на плотную среду Сабуро поверхностным способом, в суспензии – при помощи микроскопа «Микромед Р-1» с диапазоном увеличения 40.

Анализ готовых изделий производили через 18-20 ч после выпечки.

Органолептическую оценку, включающую определение таких показателей как внешний вид, цвет, состояние корки, структура пористости, эластичность и цвет мякиша, вкус и аромат проводили по методике, описанной в руководстве [121].

В готовой продукции определяли следующие физико-химические показатели - влажность, пористость, кислотность, крошковатость, удельная набухаемость, формоустойчивость, удельный объем [121].

Структурно-механические свойства мякиша хлеба оценивали на приборе «Структурометр СТ-2» с расчетом относительной упругости и относительной пластичности [137].

Определение аминокислотного состава полученных продуктов проводили методом ионообменной хроматографии. Метод основан на количественном определении аминокислот с помощью ионообменной хроматографии на колонках, заполненных твердым носителем, химически соединенным с заряженными группами, которые обеспечивают электростатическое взаимодействие с исследуемым объектом. Разделение аминокислот методом хроматографии проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе марки «ААА-881» (Mikrotecna, Прага).

Определение цветности осуществляли с помощью специального прибора «Chroma Meter», который определяет насыщенность (L), интенсивность красного оттенка (a) и желтизны (b), с последующим расчетом цветовых характеристик, согласно инструкции к прибору.

Микрофлору хлеба оценивали путем определения КМАФАнМ (ГОСТ 10444.15– 94), наличия дрожжей, плесневых грибов (ГОСТ 10444.12–2013), *p. Proteus* (ГОСТ 28560–90), бактерий группы кишечной палочки (ГОСТ 31747–012) [95].

В процессе хранения хлеба исследовали изменение связанной воды методом нерастворяющего объема, который заключается в определении изменения концентрации сахарозы при смешивании ее с изделием [121].

Содержание жира в готовом изделии определяли бутирометрическим методом (ускоренным), который основан на растворении исследуемой навески изделия в растворе серной кислоты с массовой долей 60 % [121].

Количество нелетучих органических кислот в хлебе определили по методу М.И. Княгиничева и Г.А. Дерновской-Зеленцовой [45], основанному на извлечении органических кислот по разной растворимости в воде, спирте и эфире.

Определение ароматических веществ в хлебе проводили по методу, предложенному Р.Р. Токаревой и В.Л. Кретовичем [45], основанном на связывании альдегидов и некоторых кетонов бисульфитом натрия.

Общее содержание белка в готовых изделиях определяли методом Лоури. Предлагаемый колориметрический метод основан на реакции белковых соединений с фенольным реактивом Фолина-Чокальтеу. Определение массовой доли белка проводили также по методу Бредфорда, основанному на образовании окрашенного комплекса с красителем Кумасси бриллиантовым синим G-250.

Гликемический индекс хлебобулочных изделий оценивали по методике, приведенной в рекомендациях [225]. В эксперименте принимали участие здоровые люди в возрасте от 18 до 45 лет в количестве 14 человек за исключением беременных и людей, имеющих избыточную массу тела, заболевания эндокринной системы, сахарным диабетом. После употребления ими одной порции анализируемого образца с содержанием 50 г углеводов (хлеб, стандартная доза глюкозы) определяли в крови уровень глюкозы на глюкометре «Contour TS».

Перевариваемость белков хлеба определяли методами *in vitro* под действием пищеварительных ферментов (пепсин, трипсин) [6].

Антиоксидантную емкость хлебобулочных изделий оценивали по восстанавливающей силе [276]; антирадикальной активности [177]; по гидроксил-связывающей активности [155]; по продуктам окисления β-каротина в присутствии перекиси водорода [125].

Об антиоксидантной активности хлебобулочных изделий судили величине показателя Р (prior) – критерия [17], данный метод основан на определении антиоксидантной активности гидрофильной и липофильной фракции хлебобулочных изделий по катион - радикалу ABTS+•.

2.4 Способы приготовления замороженных полуфабрикатов и хлебобулочных изделий на их основе

Подготовку хлебопекарного сырья для выработки хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов осуществляли в соответствии с действующей нормативно-технической документацией.

Тесто замешивали в лабораторной тестомесильной машине марки «Diosna» в течение 5-7 мин. Сырье, используемое при замесе, предварительно охлаждали. При замесе теста в готовую закваску вносили необходимые компоненты согласно рецептуре (табл. 2.1).

Соль в тесто вносили в виде водного раствора, дрожжи вносили в виде дрожжевой суспензии. Полуфабрикаты формовали весом 100 г, упаковывали во влагонепроницаемую полиэтиленовую пленку и замораживали в морозильной камере. Температура замораживания и продолжительность хранения полуфабрикатов в замороженном виде зависела от задач конкретного исследования. Дефростацию замороженных тестовых полуфабрикатов проводили до полного размораживания при температуре помещения, до температуры в центре тестовой заготовки 20-23 ^{0}С различными способами в зависимости от задач исследования. После размораживания из теста формовали тестовые заготовки массой 0,35 кг, которые помещали в расстойный шкаф с температурой 38-40 ^{0}С и относительной влажностью воздуха 70-75 %. Готовность тестовых заготовок к выпечке определяли органолептически. Выпечку ржано-пшеничного хлеба осуществляли в печи при температуре 230-240 °С в течение 40 мин. Выпеченные изделия охлаждали при комнатной температуре и анализировали через 18-20 ч.

Таблица 2.1 – Рецептура хлеба «Дарницкий»

Наименование сырья	Расход сырья	
	закваска	тесто
Закваска густая предыдущего приготовления, кг	19	57
Мука с закваской, кг	-	(33)
Мука пшеничная первого сорта, кг	-	40
Мука ржаная обдирная, кг	22	27
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	-	0,7
Соль поваренная пищевая, кг	-	1,5
Вода, л	16	по расчету

Для получения экспериментальных образцов зернового хлеба зерно пшеницы промывали водой не менее 5 раз, отволаживание проводили в течение 32 ч при температуре 18 ^{0}С, затем подготовленное зерно измельчали на лабораторной мельнице. В диспергированную зерновую массу вносили исследуемые культуры молочнокислых бактерий в количестве 10^7 КОЕ/г. Ферментацию зерновой массы осуществляли при температуре 37 ^{0}С в течение 4 ч до достижения pH 4. На основе ферментированной зерновой массы готовили тесто безопарным способом согласно рецептуре (табл. 2.2). Брожение теста осуществлялось при температуре 33-35 ^{0}С. Расстойку тестовых заготовок осуществляли при температуре 38 ^{0}С и относительной влажности воздуха 75-80 %. Выпечку тестовых заготовок проводили при температуре пекарной камеры 180-200 ^{0}С. Продолжительность выпечки составляла 45-50 мин. для формового зернового хлеба массой 0,35 кг.

Таблица 2.2 – Рецептура для приготовления хлеба из целого зерна пшеницы

Наименование сырья	Расход сырья
Пшеница 3 класса (нативное зерно), кг	100/155*
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	2,0
Соль поваренная пищевая, кг	1,5
Вода, кг	по расчету

Примечание: * - масса набухшего зерна

Выбор рецептур обусловлен минимальным количеством рецептурных компонентов, что позволяет максимально снизить влияние отдельных вносимых ингредиентов на снимаемые характеристики, т.к. тесто является сложной многокомпонентной системой.

2.5 Математические методы планирования эксперимента, обработки результатов исследований и оптимизации

В работе применялись методы математического планирования эксперимента и статистической обработки данных. Опыты проводили в 3-5 кратной повторности с получением средних значений и доверительного интервала. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили путем применения критерия Стьюдента (для определения значимости коэффициентов уравнений регрессии), Кохрена (для оценки воспроизводимости опытов) и Фишера (для проверки адекватности уравнений регрессии).

Полученные данные обрабатывали в программе Statistica 10, статистическую обработку и построение графиков осуществляли с помощью Microsoft Office Excel 2013. Количественные данные в работе представлены в виде M±m, где M – среднее значение, m – стандартное отклонение. Достоверность различий между группами данных определяли с помощью t-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$).

ГЛАВА 3. СЕЛЕКЦИЯ КРИОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ОЦЕНКА ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

На основе анализа биотехнологических свойств микроорганизмов во всем мире создаются различные варианты заквасок, состоящих из монокультур или же их сочетаний; комплексных заквасок с другими группами микроорганизмов, позволяющих в максимальной степени реализовать биотехнологический потенциал отдельных штаммов и их консорциумов.

В настоящее время в хлебопекарной промышленности наметилась стойкая тенденция к росту выпуска замороженных тестовых полуфабрикатов, однако при реализации процессов криогенной технологии хлеба наблюдается ухудшение качественных характеристик готовой продукции, связанного, в первую очередь, с гибелью микрофлоры при низкотемпературном хранении [33, 59], в связи с чем работа, направленная на поиск и разработку новых стартовых заквасок с криорезистентными свойствами, является актуальной. Промышленно-ценными культурами микроорганизмов, применяемыми в составе большинства заквасок для пищевых продуктов, в том числе и хлебобулочных изделий, являются молочнокислые бактерии, относящиеся к роду *Lactobacillus,* и проявляющие высокую ферментативную активность, устойчивость к кислотам, солям и др., а также синтезирующие широкий спектр биологически активных соединений [64].

Целью настоящего этапа работы является поиск устойчивых к низкотемпературному воздействию штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus* и оценка их биотехнологического потенциала.

3.1 Направленный отбор изолятов молочнокислых бактерий, устойчивых к низкотемпературному воздействию

Определяющим этапом в создании микробиологических препаратов является подбор штаммов с высокими функционально-технологическими свойствами. Принципиальное значение имеет постоянная селекция продуктивных форм лактобацилл для производственных целей [11, 24, 34, 53]. Наряду с конструированием усовершенствованных генетических вариантов микроорганизмов для бактериальных препаратов разного назначения, актуальным остается отбор природных штаммов, поскольку многие современные биотехнологии базируются на активизации природных резервов микроорганизмов, повышающих их биохимическую активность и технологические свойства [7, 27, 51, 82, 94, 129].

На сегодняшний момент продолжается выделение и изучение новых штаммов молочнокислых бактерий с высокими биотехнологическими и пробиотическими свойствами [25, 82, 94, 170, 304, 308], причем, источниками выделения служат спонтанно сквашенное молоко различного происхождения, ферментированные продукты растительного и животного происхождения. Выделенные дикие штаммы выгодно отличаются от промышленных штаммов устойчивостью в консорциуме, оказывают синергический эффект на традиционно используемые стартовые культуры, характеризуются повышенным синтезом антимикробных пептидов [305, 328], что является положительным фактором дальнейшего использования в прикладных целях.

Выбор конкретного штамма на внедрение в промышленное производство должен сопровождаться характеристикой целого ряда его биотехнологических свойств. Исследования в этой области ведутся постоянно и сопровождаются тестированием влияния новых штаммов на физико-химические, текстурные, органолептические и пробиотические свойства ферментированных пищевых продуктов [70, 153, 298, 311, 312, 347].

Таким образом, поиск и изучение новых штаммов молочнокислых бактерий с высоким биотехнологическим потенциалом, в том числе проявляющих криорезистентные свойства, является перспективным направлением для решения актуальных задач пищевой промышленности и вопросов здорового питания.

В данной работе проведен направленный скрининг изолятов молочнокислых бактерий, устойчивых к низкотемпературному воздействию, охватывающий различные пищевые среды (ржаная мука, спонтанно сквашенное коровье молоко, квашенная капуста) с использованием плотных селективных сред Рогозы и MRS. Источники происхождения 114 изолятов молочнокислых бактерий и их устойчивость к низкотемпературной обработке при различных температурных режимах представлены в приложении А (продолжительность замораживания 24 ч).

В результате проведенного скрининга было отобрано 15 изолятов бактерий с характерными свойствами возбудителей молочнокислого брожения, на базе которых осуществлен первичный отбор с учетом криорезистентности и типа брожения. Идентификацию изолятов молочнокислых бактерий осуществляли на основе системы классификации микроорганизмов Берги, включающая традиционные тесты для молочнокислых бактерий [9, 95, 104, 161, 162]. По совокупности классических дифференциально–диагностических тестов (морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков) установили принадлежность изолятов к систематической группе - семейству *Lactobacillaceae*, роду

Lactobacillus. Дифференцирующие особенности выделенных штаммов, в том числе их сахаролитические способности представлены в таблицах 3.1 и 3.2.

Изучение культуральных, морфологических и биохимических свойств выделенных штаммов микроорганизмов позволило охарактеризовать их следующим образом: все изоляты относятся к грамположительным палочкам различной длины, располагающимся в виде отдельных или двойных клеток, а также коротких цепочек; не подвижны, каталазоотрицательны, спор и капсул не образуют, желатину не разжижают, не восстанавливают NO_3^-.

При росте изолятов в жидких средах наблюдаются помутнения среды, осаждение клеток вскоре после прекращения роста. Осадок однородный, поверхностная пленка не образуется. На плотных питательных средах все лактобактерии формируют округлые мелкие, размером 2-5 мм, гладкие колонии белого цвета со выпуклой сферической поверхностью. Глубинные колонии имеют преимущественно выпуклую форму, иногда с выростом, глубинные колонии изолята СМ-9 имеют серый оттенок. Выделенные изоляты хорошо растут по уколу на агаризованных питательных средах (среда Рогоза, MRS, капустный агар, среда на основе гидролизованного молока, среда на основе творожной сыворотки). Являются факультативными анаэробами.

Температурный оптимум большинства изолятов 30-35 ^{0}C, некоторые изоляты (РМ-16, КК-6, КК- 12, КК-23, СМ-9 и СМ-32) хорошо размножаются при 36-45 °С, при 15 °С способны расти все изоляты, кроме РМ-16, КК-16, СМ-9.

Оптимальное значение pH составляет 5,5-6,2, все изоляты устойчивы к щелочной реакции среды (pH 9,2), также лактобактерии способны расти в кислой среде (pH 2), за исключением РМ-1, РМ-3, РМ-7, КК-1 и СМ-36 (таблица 4.2).

Исследование выделенных изолятов на наличие роста в присутствии различных концентраций NaCl и желчи показали, что все лактобактерии устойчивы к 2 % и 4 % NaCl в жидкой питательной среде, большинство способны расти в присутствии 6,5 % NaCl, кроме РМ-16 и КК-6. Все изоляты растут при концентраций желчи 20 % и 40 %.

Установлено, что все исследуемые лактобактерии сбраживают фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу и сахарозу. Изоляты способны утилизировать целлобиозу, за исключением РМ-3 и РМ-10, и рибозу, кроме СМ-9. В отношении утилизации других сахаров имеются значительные вариации в зависимости от изолята. Многоатомные спирты манит и сорбит сбраживают семь исследуемых лактобактерий:РМ-3, РМ-10, КК-6, КК-12, СМ-9, СМ-13, СМ-24, ксилозу лишь четыре изолята – РМ-21, КК-12, СМ-13 и СМ-24. Результаты исследований показали, что большинство исследуемых изолятов способны утилизировать многие сахара, что говорит о наличии у них активной ферментативной системы.

Таблица 3.1 – Дифференцирующие особенности изолятов криорезистентных молочнокислых бактерий

№	Условное обозначение	Форма и величина		Рост при температуре, °С		Рост при различных значениях pH			Продукция CO_2	Рост в присутствии NaCl, %		
		клеток	колоний	15	45	2	3	9,2		2	4	6,5
1	РМ-1	палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	мелкие, куполообразные, беловатые	+	-	-	+	+	-	+	+	+
2	РМ-3	толстые короткие палочки с закругленными концами	мелкие, выпуклые, беловатые, блестящие	+	-	-	-	+	+	+	+	+
3	РМ-7	палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	мелкие, выпуклые, белые матовые	+	-	-	+	+	-	+	+	+
4	РМ-10	палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	мелкие, округлые, белые	+	-	+	-	+	-	+	+	+
5	РМ-16	палочки средней длины, одиночные и в коротких цепочках	мелкие, выпуклые, беловатые	-	+	+	+	+	-	+	+	-
6	РМ-21	прямые палочки, расположенные попарно или в коротких цепочках	мелкие, выпуклые, белые, матовые	+	-	+	+	+	-	+	+	+
7	КК-1	палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	мелкие, плоские. беловатые	+	-	-	+	+	-	+	+	+
8	КК-6	толстые палочки средней длины в виде отдельных или спаренных клеток	мелкие, круглые, сероватые	-	+	+	+	+	+	+	+	-
9	КК-12	палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	мелкие, округлые, белые	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10	КК-23	толстые палочки средней длины в виде отдельных или двойных клеток	мелкие, выпуклые, белые	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	СМ-9	толстые палочки средней длины одиночные и в коротких цепочках	мелкие, округлые, белые	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	СМ-13	изогнутые палочки средний длины, одиночные и в коротких цепочках	мелкие, выпуклые, белые	+	-	+	+	+	-	+	+	+
13	СМ-24	палочки средней длины, расположенные преимущественно в коротких цепочках	мелкие, округлые, белые	+	-	+	+	+	-	+	+	+
14	СМ-32	толстые палочки средней длины одиночные и в коротких цепочках	мелкие, куполообразные, белые	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	СМ-36	прямые палочки, расположенные преимущественно попарно или в коротких цепочках	мелкие, выпуклые, белые, матовые	+	-	-	+	+	-	+	+	+

Примечание: «+» тест положителен; «–» тест отрицателен.

Таблица 3.2 – Ферментация углеводов и многоатомных спиртов изолятами молочнокислых бактерий

Обозначение	Арабиноза	Целлобиоза	Фруктоза	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Манноза	Мелибиоза	Рафиноза	Рибоза	Сахароза	Трегалоза	Ксилоза	Маннит	Сорбит	Идентифицируемый вид
РМ-1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	*L. casei*
РМ-3	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	*L. brevis*
РМ-7	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	*L. casei*
РМ-10	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	*L. fermentum*
РМ-16	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	*L. casei*
РМ-21	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	*L. plantarum*
КК-1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	*L. plantarum*
КК-6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	*L. bavaricus*
КК-12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	*L. fermentum*
КК-23	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	*L. casei*
СМ-9	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	*L. acidophilum*
СМ-13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	*L. fermentum*
СМ-24	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	*L. plantarum*
СМ-32	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	*L. casei*
СМ-36	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	*L. casei*

С учетом идентифицируемого вида приняты новые обозначения выделенных изолятов молочнокислых бактерий, которые представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Обозначения выделенных изолятов с учетом идентифицируемого вида

№	Изолят	Новое обозначение штамма
1	РМ-1	*L. casei 1*
2	РМ-7	*L. casei 7*
3	РМ-16	*L. casei 16*
4	КК-23	*L. casei 23*
5	СМ-32	*L. casei 32*
6	СМ-36	*L. casei 36*
7	РМ-10	*L. fermentum 10*
8	КК-12	*L. fermentum 12*
9	СМ-13	*L. fermentum 13*
10	СМ-24	*L. plantarum 24*
11	КК-1	*L. plantarum 1*
12	РМ-21	*L. plantarum 21*
13	СМ-9	*L. acidophilum 9*
14	КК-6	*L. bavaricus 6*
15	РМ-3	*L. brevis 3*

Таким образом, первоначальные исследования вновь выделенных культур молочнокислых бактерий по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам позволили отнести их к следующим видам *p. Lactobacillus*: *L. casei, L. plantarum, L. bavaricus, L. acidophilum, L. fermentum* и *L. brevis.*

3.2 Оценка функционально-технологических свойств новых штаммов молочнокислых бактерий

На сегодняшний день представляет научный и практический интерес исследование и внедрение в производство штаммов молочнокислых бактерий, обладающих одновременно технологической и физиологической функциональностью, с целью увеличения выпуска пищевых продуктов с дополнительными функциональными характеристиками, так называемых функциональных продуктов питания.

Такие продукты при систематическом ежедневном употреблении в составе обычных пищевых рационов обладают, помимо общей пищевой ценности, способностью специфически поддерживать и регулировать конкретные физиологические функции, биохимические и поведенческие реакции или группы их, сохранять и улучшать физическое и психическое здоровье человека и снижать риск возникновения заболеваний [13, 25, 143, 278].

В настоящей работе проведено сравнительное изучение некоторых технологических и функциональных свойств ранее выделенных штаммов молочнокислых бактерий с целью выявления перспективных для применения их в производстве хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов. При подборе функционально-активных штаммов молочнокислых микроорганизмов необходимо учитывать такие их свойства, как энергия кислотообразования, антагонистическая активность по отношению к патогенной и условно патогенной микрофлоре, синтез протеолитических ферментов, резистентность к высоким концентрациям соли, желчи, антибиотикам и др.

3.2.1 Изучение кислотообразующей активности молочнокислых бактерий

Динамика накопления биомассы является важной характеристикой культур молочнокислых бактерий, позволяющей судить о физиологической активности штамма. Результаты изучения динамики роста у изучаемых штаммов в стационарных условиях культивирования в питательной среде MRS в течение 24 ч при температуре 37 ^{0}C представлены на рисунках 3.1- 3.4.

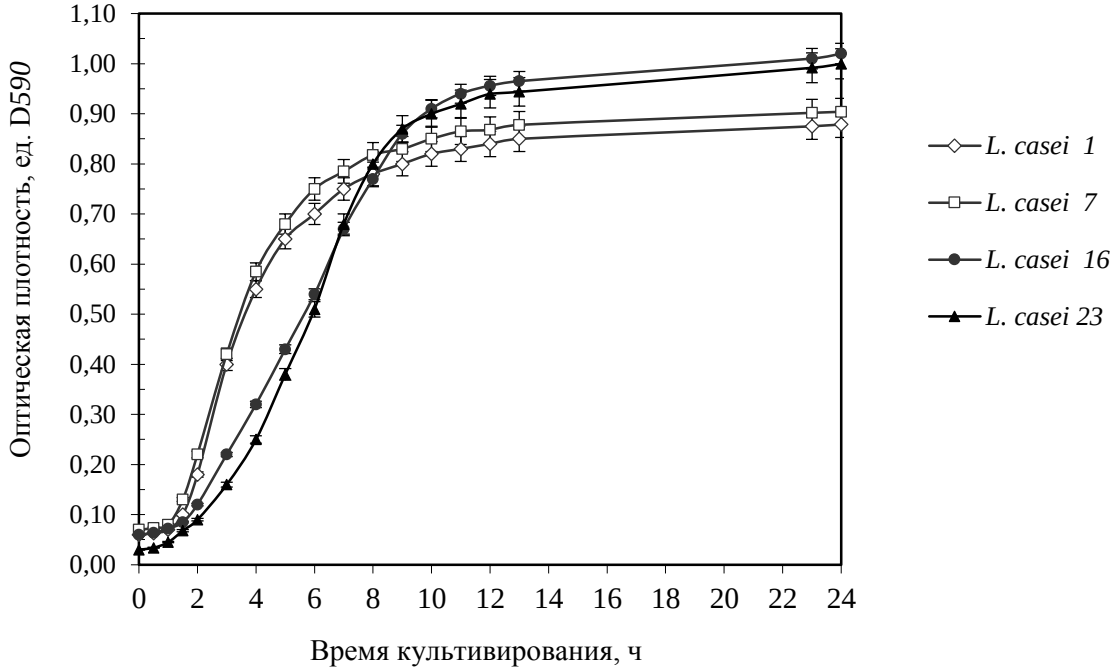


Рисунок 3.1 – Динамика накопления биомассы штаммами *L. casei 1, 7, 16* и *23*

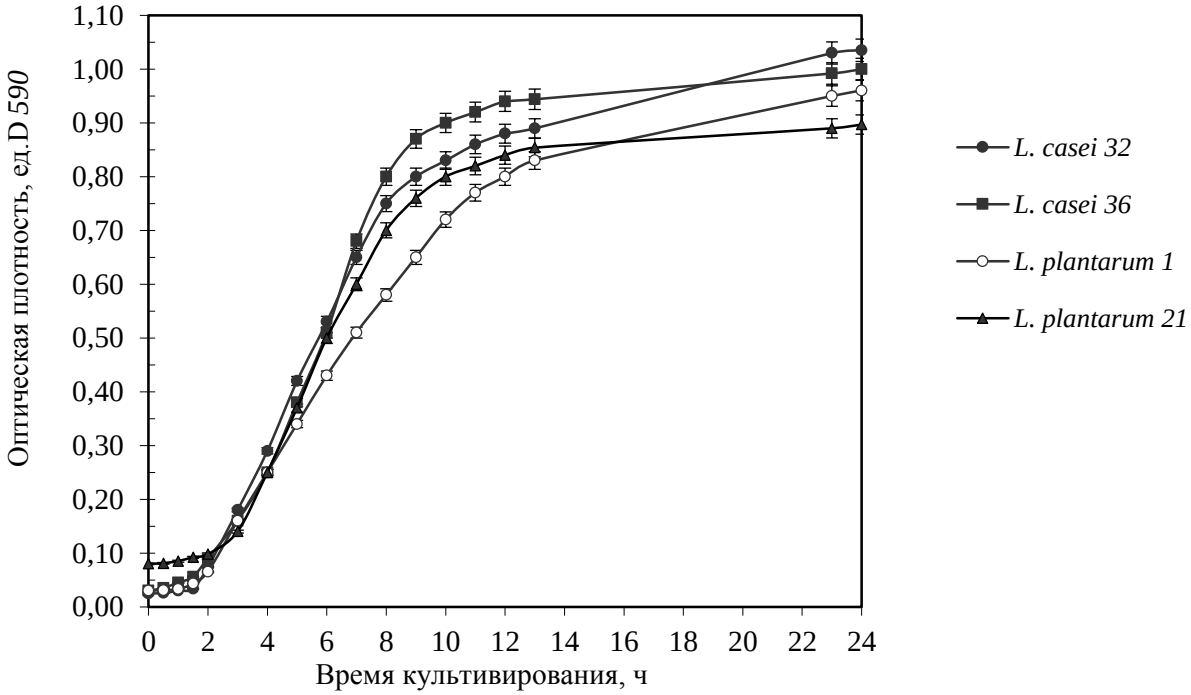


Рисунок 3.2 – Динамика накопления биомассы штаммами *L. casei 32* и *36, L. plantarum 1* и *21*

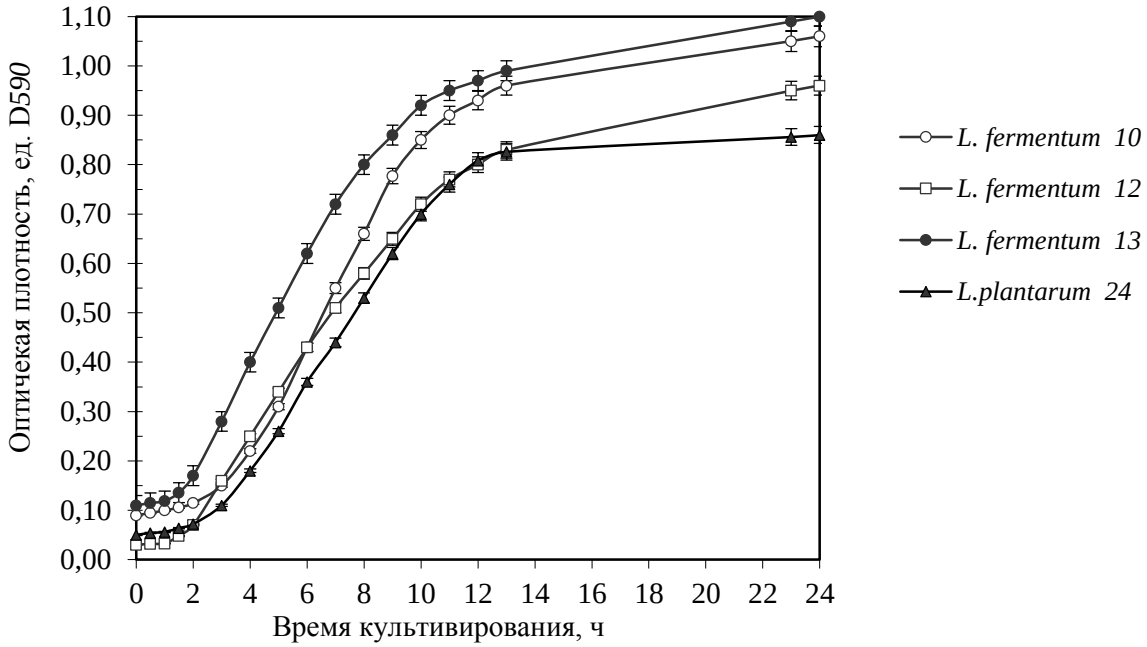


Рисунок 3.3 – Динамика накопления биомассы штаммами молочнокислых бактерий *L. fermentum* и *L. plantarum 24*

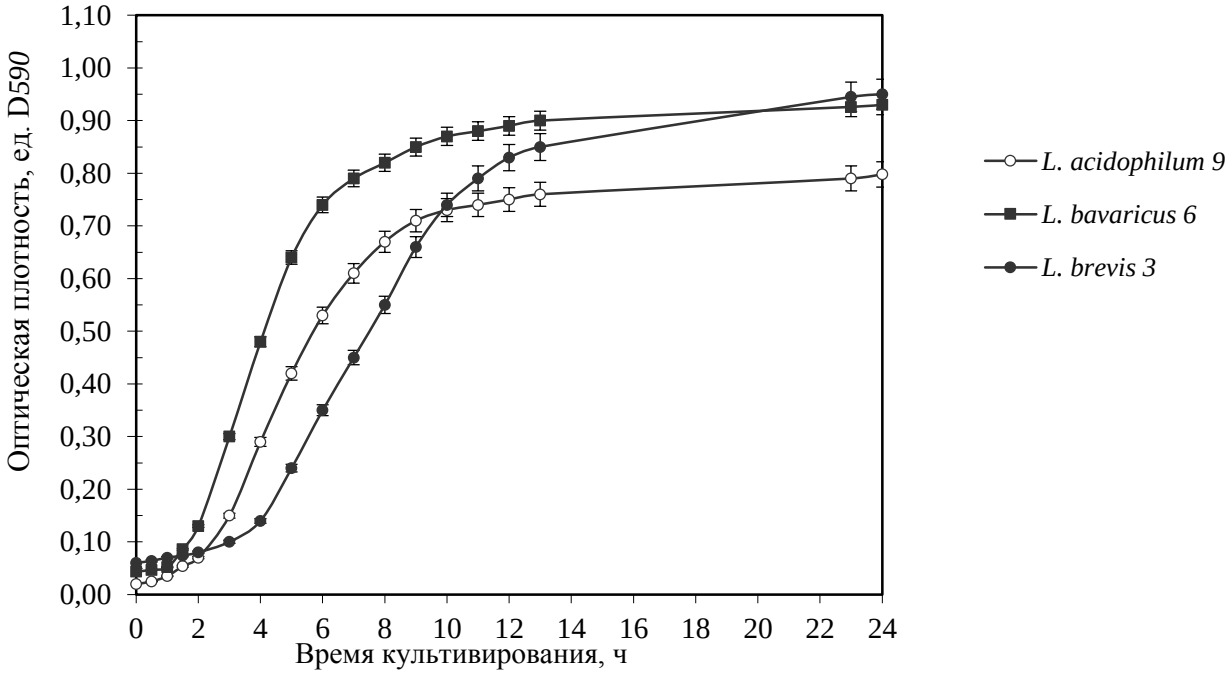


Рисунок 3.4 – Динамика накопления биомассы штаммами молочнокислых бактерий *L. acidophilum 9, L. bavaricus 6, L. brevis 3*

Изучение динамики роста штаммов лактобактерий показало, что биомасса активно накапливается в первые 9-12 ч, достигает значений 5,27-6,31 г/100 мл в зависимости от штамма, исключение составляет *L. brevis 3*, имеющий конечную концентрацию биомассы

4,17 г/100 мл (табл. 3.4). Максимальное количество клеток на конец стационарной фазы составляет 0,8-2,1·10^{10} КОЕ/мл. Выявлено, что максимально сбраживают глюкозу штаммы *L. casei 32, L. fermentum 13, L. acidophilum 9.* Лаг-фаза длится 1,5-4 ч в зависимости от штамма, более короткая лаг-фаза (1,5-2 ч) наблюдается у штаммов вида *L. casei* и штамма *L. fermentum 1*3, самой длинной лаг-фазой обладает *L. brevis 3* (4 ч). Длительность экспоненциальной фазы различна, в зависимости от штамма составляет в среднем 8-10 ч. Фаза замедленного роста (конец логарифмической фазы) наступает после 10 ч культивирования. На 14-16 ч культивирования все культуры выходят в стационарную фазу роста.

Таблица 3.4 – Показатели периодического культивирования криорезистентных лактобактерий на среде MRS

№	Штамм	Конечная концентрация биомассы, г/100 мл	Количество жизнеспособных клеток, Lg КОЕ/мл	Степень потребления глюкозы, %
1	*L. casei 1*	6,14±0,19	10,36±0,25	94,1±0,5
2	*L. casei 7*	5,85±0,12	10,21±0,31	94,9±0,6
3	*L. casei 16*	5,46±0,16	9,98±0,22	93,8±0,5
4	*L. casei 23*	5,23±0,12	9,53 ±0,24	92,3±0,5
5	*L. casei 32*	5,92±0,14	10,05±0,30	96,5±0,5
6	*L. casei 36*	5,96±0,14	9,81±0,19	95,6±0,5
7	*L. fermentum 10*	5,78±0,11	9,46±0,27	95,4±0,5
8	*L. fermentum 12*	5,39±0,15	9,38±0,16	95,0±0,5
9	*L. fermentum 13*	6,22±0,18	10,24±0,28	97,8±0,5
10	*L. plantarum 24*	5,27±0,12	9,77±0,16	93,7±0,5
11	*L. plantarum 1*	6,08±0,14	10,18±0,25	95,2±0,6
12	*L. plantarum 21*	6,31±0,17	9,73±0,20	94,6±0,6
13	*L. acidophilum 9*	5,66±0,15	10,32±0,27	97,8±0,5
14	*L. bavaricus 6*	5,41±0,13	9,75±0,33	92,4±0,5
15	*L. brevis 3*	4,17±0,10	8,69±0,14	91,2±0,4

Результаты экспериментальных исследований показали, что характер накопления биомассы у исследуемых штаммов варьирует на уровне, как вида, так и штамма молочнокислых бактерий. Следует отметить, что все штаммы в течение первых 10-12 ч активно накапливают биомассу.

Кислотообразующая активность – одно из основных технологических свойств молочнокислых бактерий, которое является критерием отбора штаммов для использования в производстве ферментированных пищевых продуктов. Результаты экспериментов показали, что активность свертывания молока при оптимальной температуре у исследуемых штаммов колеблется в интервале 4-8 ч, единственный штамм *L. brevis* 3 свертывает молоко через 14 ч (табл. 3.5).

Таблица 3.5 – Активность штаммов криорезистентных молочнокислых бактерий в молоке

№	Штамм	Активность ферментации, ч	Кислотность			Количество жизнеспособных клеток КОЕ/см^3
			Активная, pH	Титруемая, °Т	Предельная, °Т	
1	*L. casei 1*	6	4,64±0,05	106±2	154±4	$2{,}2\cdot10^{10}$
2	*L. casei 7*	6	4,63±0,06	108±3	158±3	$1{,}8\cdot10^{10}$
3	*L. casei 16*	7	4,70±0,05	108±3	154±3	$1{,}0\cdot10^{10}$
4	*L. casei 23*	6	4,68±0,05	110±3	158±2	$5{,}3\cdot10^{9}$
5	*L. casei 32*	4	4,59±0,04	120±4	170±3	$3{,}0\cdot10^{10}$
6	*L. casei 36*	6	4,71±0,05	110±3	156±3	$1{,}8\cdot10^{10}$
7	*L. fermentum 10*	7	4,70±0,05	104±3	142±2	$5{,}4\cdot10^{9}$
8	*L. fermentum 12*	8	4,76±0,05	106±3	148±3	$9{,}5\cdot10^{9}$
9	*L. fermentum 13*	6	4,75±0,06	100±3	138±2	$3{,}6\cdot10^{9}$
10	*L. plantarum 24*	6	4,77±0,06	112±4	154±3	$2{,}4\cdot10^{10}$
11	*L. plantarum 1*	6	4,71±0,06	104±3	176±3	$7{,}7\cdot10^{9}$
12	*L. plantarum 21*	7	4,70±0,06	102±3	178±4	$1{,}5\cdot10^{9}$
13	*L. acidophilum 9*	4	4,62±0,05	119±3	210±4	$2{,}1\cdot10^{9}$
14	*L. bavaricus 6*	6	4,67±0,04	112±3	174±3	$1{,}9\cdot10^{10}$
15	*L. brevis 3*	14	5,00±0,05	76±2	122±2	$4{,}9\cdot10^{8}$

Все изучаемые культуры хорошо ферментируют молоко, штаммы, относящиеся к *L. casei, L. plantarum* и штаммы *L. acidophilum и L. bavaricus* образуют плотные сгустки однородной консистенции. Вкус сгустка чистый кисломолочный. Штаммы *L. fermentum и L. brevis* образуют неплотные сгустки с отделением сыворотки.

По истечении семидневного срока инкубации титруемая кислотность в большинстве случаев достигает характерных для своего вида значений. При культивировании максимальная кислотность питательной среды достигается у штамма *L. acidophilum* - 220 °Т, предельная кислотность у штаммов, относящихся к *L. casei* колеблется в интервале 162-180 °Т, из которых самым активным кислотообразователем явился штамм *L. casei 32.* У Штаммов *L. plantarum* 1, *L. plantarum* 21 и *L. bavaricus 6* кислотность питательной среды достигает 186, 188 и 184 °Т соответственно. Кислотность у штаммов *L. fermentum* достигла меньших значений предельной кислотности, порядка 148-158 °Т, а у *L. brevis* – 132 °Т, что объясняется гетероферментативностью данных штаммов, отличием в механизмах сбраживания углеводов.

Анализ полученных результатов показывает, что по технологическим показателям все исследуемые штаммы, кроме *L. brevis,* подходят для производственных целей, о чем свидетельствует быстрая ферментация молока и максимальное количество

жизнеспособных клеток (10^9-10^{10} КОЕ/см^3), а также уровень титруемой кислотности 100-120 °Т после 24 ч культивирования.

3.2.2 Исследование степени устойчивости молочнокислых бактерий к неблагоприятным факторам внешней среды

Многие исследователи сходятся на мнении, что способность микроорганизмов выживать и размножаться в кишечнике человека во многом определяют пробиотические свойства культур. Клетки должны быть стабильными при хранении в производственных условиях, выживать при прохождении через желудочно-кишечный тракт, быть метаболически активными в экосистеме кишечника [51, 149, 226, 346, 357].

Известно, что толерантность к веществам, содержащимся в желудочно-кишечном тракте организма может значительно варьировать у культур, даже относящихся к одному таксону. В этой связи представляется необходимым проводить направленный отбор штаммов с учетом их чувствительности к неблагоприятным факторам окружающей среды, воспроизводящих *in vitro* некоторые условия желудочно-кишечного тракта.

Для изучения устойчивости штаммов к неблагоприятным условиям желудочно-кишечного тракта проведены исследования по сравнительной выживаемости штаммов молочнокислых бактерий при экспозиции 24 ч в средах с различными уровнями pH (2, 3, 4, 5, 7, 8,5 и 9,2), концентрацией соли (6,5 %), желчи (0,5, 20 и 40 %) и фенола (0,4 %).

Исследования показывают, что значительная часть пробиотических клеток теряет свою активность вследствие гибели микроорганизмов при хранении продукта, а также в процессе прохождения через желудочно-кишечный тракт. Это объясняется низкими значениями pH у кисломолочных продуктов, влиянием соляной кислоты и пепсина желудочного [51, 149].

Клетки микроорганизмов претерпевают наибольший стресс в желудке, где pH среды порядка 2,0 [149], впоследствии, в тонком кишечнике клетки попадают в среду с высокими значениями pH 7,0-9,0. Поэтому пробиотик должен отвечать нескольким критериям, одним из которых является толерантность к кислым и щелочным реакциям среды.

В связи с этим нами проведены эксперименты по изучению резистентности тестируемых штаммов молочнокислых бактерий к различным значениям pH, которую определяли по уровню накопления биомассы и числа КОЕ после 24 ч культивирования посевов в жидкой питательной среде при интервале pH от 2,0 до 9,2.

Динамика степени выживаемости исследуемых штаммов при различных значениях pH представлены на рисунке 3.5-3.7.

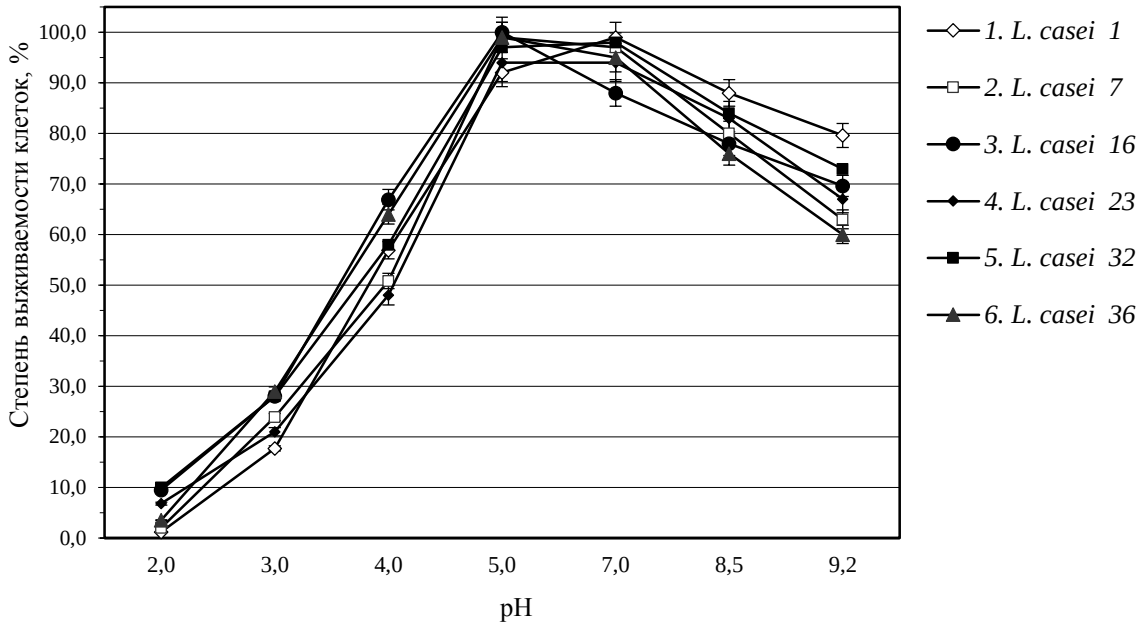


Рисунок 3.5 – Изменение степени выживаемости штаммов *L. casei* при различных значениях pH

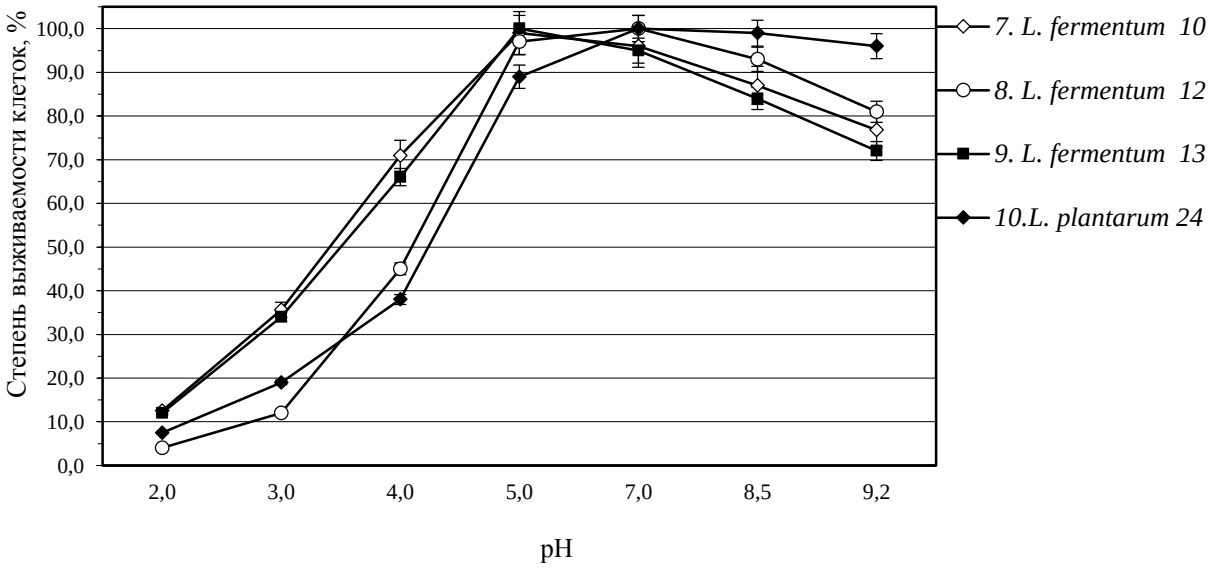


Рисунок 3.6 – Изменение степени выживаемости при различных значениях pH у штаммов *L. fermentum* и *L. plantarum 24*

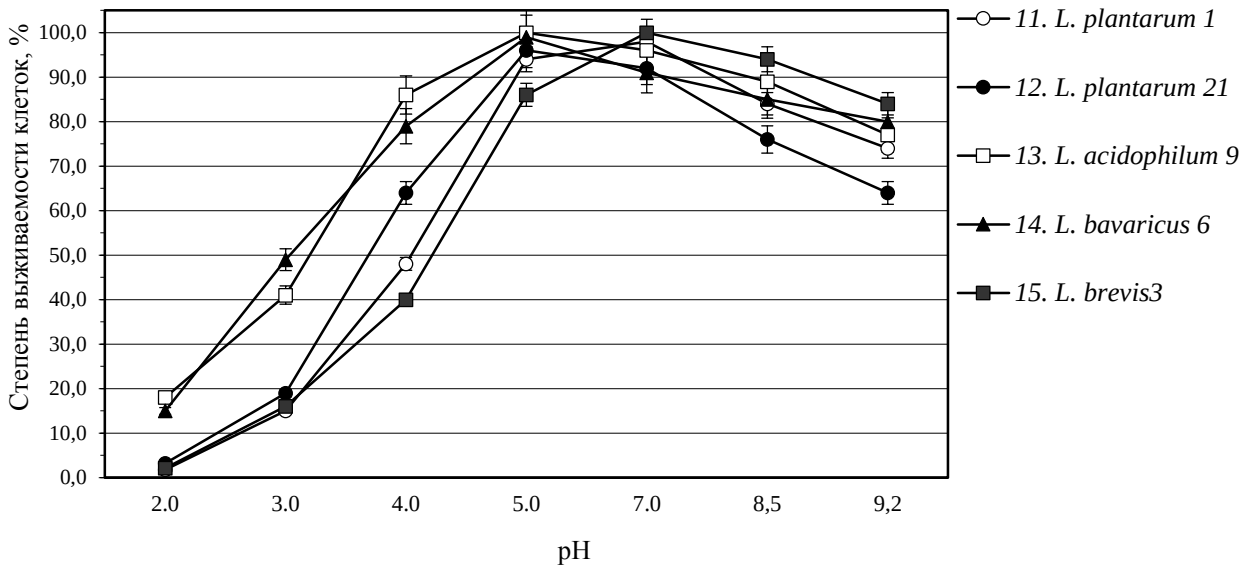


Рисунок 3.7 – Изменение степени выживаемости при различных значениях pH у штаммов *L. plantarum, L. acidophilum, L. bavaricus* и *L. brevis*

Выявлено, что значение pH 2,0 является ингибирующим для большинства штаммов, процент выживаемости колеблется в пределах 0,5-10 % для штаммов *L. casei* и *L. plantarum*, 4-12 % для *L. fermentum*. Наибольшую кислотоустойчивость проявляют штаммы *L. acidophilum, L. bavaricus* – 18 и 15 % соответственно.

Все штаммы развиваются при pH 3,0, больший процент выживаемости у штаммов *L. bavaricus 6* – 49 %, *L. acidophilum 9* – 41 %, *L. fermentum 10* – 36 % и *L. fermentum 13* – 34 %.

Увеличение pH среды до 9,2 не является сильным стрессом для тестируемых штаммов молочнокислых бактерий, так как культуры в этих условиях имеют хороший процент выживаемости 62-96 % в зависимости от штамма, наибольшую устойчивость к щелочной среде проявляют штаммы *L. plantarum 24* – 96 % и *L. brevis 3* – 84 %.

Результаты экспериментальных исследований показали, что степень резистентности молочнокислых бактерий к различным значениям pH варьирует в зависимости как от вида, так и от штамма. Удалось выделить четыре штамма молочнокислых бактерий, два из которых *L. bavaricus* 6, *L. fermentum 13* наиболее устойчивы к низким значениям pH, а штаммы *L. piantarum 2*4 и *L. brevis* 3 толерантены к сильнощелочной реакции среды.

Солеустойчивость молочнокислых бактерий является одним из критериев отбора штаммов для их использования в производстве ферментированных пищевых продуктов, в том числе с функциональными свойствами. Солеустойчивые штаммы способны выживать в пищевом продукте в течение всего срока хранения и, соответственно, имеют больше шансов прижиться в экосистеме кишечника [51, 93, 149].

В пищевой промышленности широко используются такие технологические приемы, как охлаждение, замораживание, лиофилизация, распылительная сушка, термообработка. Эти процессы могут вызвать структурные и физиологические повреждения бактериальных клеток, приводящие к существенной потере биологической активности. В связи с этим важным является исследования устойчивости штаммов молочнокислых бактерий к осмотическому стрессу для определения условий сохранения жизнеспособности и биологической активности промышленно важных штаммов микроорганизмов.

Рост многих микроорганизмов ингибируется присутствием в среде NaCl в концентрации 6,0-6,5 %, в связи с этим представляло интерес изучить влияние концентрации соли 6,5 %. Устойчивость к соли определяли по уровню накопления биомассы и числу КОЕ через 24 ч культивирования в жидкой питательной среде с 6,5 % NaCl. Контролем служили варианты без внесения NaCl в среду культивирования.

Результаты экспериментальных исследований представлены на рисунке 3.8. Установлено, что все исследуемые штаммы способны развиваться в присутствии 6,5 % NaCl, но степень их выживаемости различна. Наименьшая резистентность наблюдается у штамма *L. brevis* 3 – 8 %, максимальную устойчивость проявляет *L. casei* 32 – 47 %.

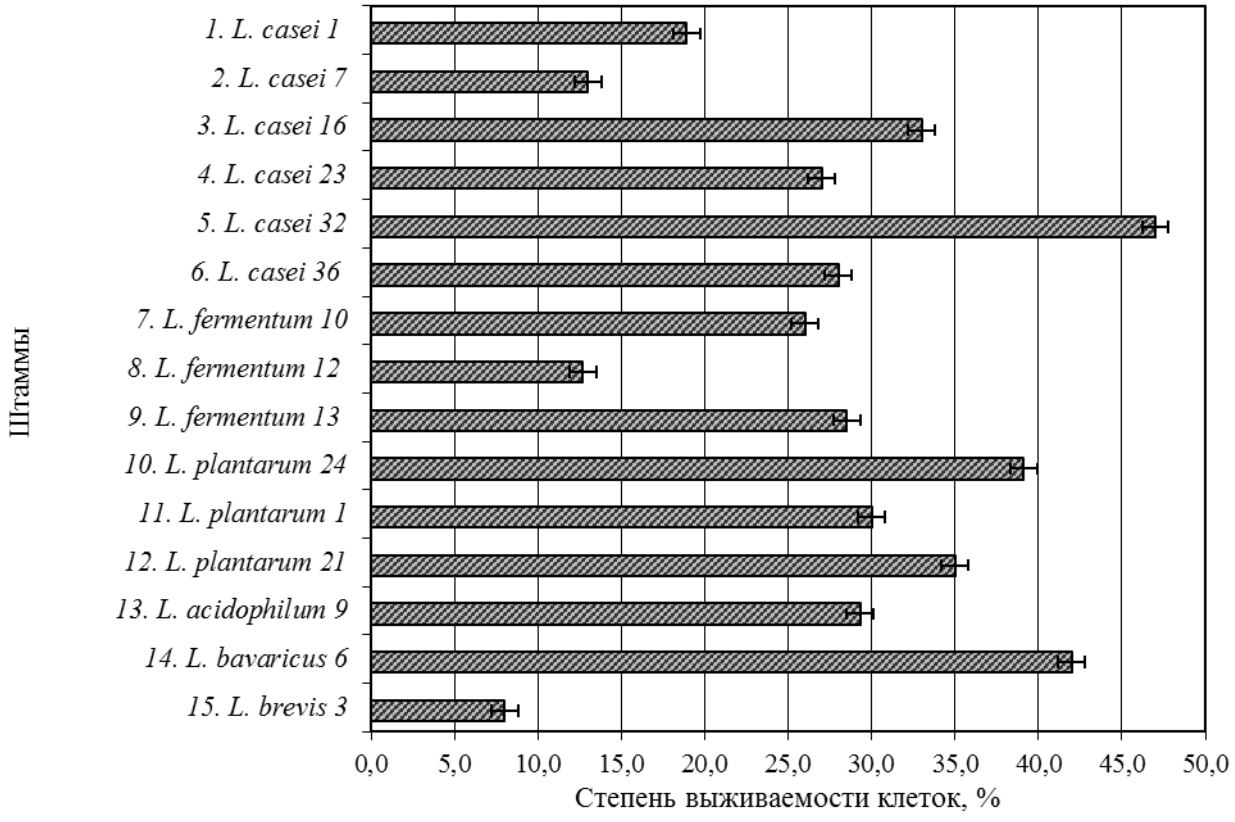


Рисунок 3.8 – Степень выживаемости штаммов молочнокислых бактерий в присутствии 6,5 % NaCl

Культивирование проводили на жидкой питательной среде (капустная среда с 2 % глюкозы), содержащей 0,5, 20 и 40 % желчи в течение 24 ч. Концентрации желчи были выбраны на основании максимальных с которыми встречаются клетки бактерий в момент поступления желчи в кишечник (20-40 %). В тоже время необходимо было учитывать воздействие постоянных концентраций желчи в двенадцатиперстной кишке (0,3-0,5 %). Устойчивость к желчи оценивали по количеству жизнеспособных клеток бактерий в 1 $см^3$ суспензии. Контролем служили варианты без внесения желчи в среду культивирования.

В результате проведенных исследований, можно выделить пять солеустойчивых штаммов: *L. casei* 32, *L. bavaricus* 6, *L. casei* 16 и *L. plantarum 24*, имеющих более 30 % выживших клеток при культивировании в присутствии 6,5 % NaCl.

При попадании молочнокислых бактерий в организм часто возникает проблема выживаемости микроорганизмов в присутствии таких экстремальных факторов, как желудочный сок или соли желчных кислот. Желчь поступает в дуоденальный отдел тонкого кишечника, обусловливает отмирание большого количества бактерий, так как клеточные мембраны, состоящие из липидов и жирных кислот, очень чувствительны к разрушению солями желчных кислот [42, 51, 149].

Рост культур молочнокислых бактерий на среде с желчью и изменение pH представлены в таблице 3.6, степень выживаемости клеток при культивировании с 20 и 40 % желчи представлена на рисунке 3.9.

Таблица 3.6 – Рост культур и изменение pH среды на среде с желчью

№ п/п	Штамм	Концентрация желчи в среде, %							
		0		0,5		20		40	
		КОЕ/$см^3$	pH	КОЕ/$см^3$	pH	КОЕ/$см^3$	pH	КОЕ/$см^3$	pH
1	*L. casei 1*	$1,8\cdot10^{10}$	4,6	$3,0\cdot10^{10}$	4,6	$7,8\cdot10^{9}$	5,4	$2,5\cdot10^{9}$	5,8
2	*L. casei 7*	$2,0\cdot10^{10}$	4,6	$3,7\cdot10^{10}$	4,6	$6,2\cdot10^{9}$	5,5	$3,4\cdot10^{9}$	5,8
3	*L. casei 16*	$7,0\cdot10^{9}$	4,7	$9,5\cdot10^{9}$	4,6	$3,0\cdot10^{9}$	5,3	$1,0\cdot10^{9}$	5,7
4	*L. casei 23*	$9,5\cdot10^{9}$	4,7	$1,1\cdot10^{10}$	4,7	$4,2\cdot10^{9}$	5,5	$9,5\cdot10^{9}$	5,8
5	*L. casei 32*	$1,8\cdot10^{10}$	4,6	$3,5\cdot10^{10}$	4,6	$9,5\cdot10^{9}$	5,2	$5,5\cdot10^{9}$	5,5
6	*L. casei 36*	$1,5\cdot10^{10}$	4,7	$4,8\cdot10^{10}$	4,7	$4,6\cdot10^{9}$	5,7	$2,5\cdot10^{9}$	5,9
7	*L. fermentum 10*	$1,4\cdot10^{9}$	4,7	$3,2\cdot10^{9}$	4,7	$8,0\cdot10^{8}$	5,8	$4,2\cdot10^{8}$	6,0
8	*L. fermentum 1*	$8,0\cdot10^{9}$	4,8	$1,0\cdot10^{10}$	4,8	$2,0\cdot10^{9}$	5,9	$1,4\cdot10^{9}$	6,1
9	*L. fermentum 13*	$2,4\cdot10^{9}$	4,8	$5,6\cdot10^{9}$	4,7	$9,0\cdot10^{8}$	5,8	$7,5\cdot10^{8}$	6,1
10	*L. plantarum 24*	$1,2\cdot10^{10}$	4,8	$4,2\cdot10^{10}$	4,7	$6,1\cdot10^{9}$	5,8	$2,4\cdot10^{9}$	5,9
11	*L. plantarum 1*	$4,5\cdot10^{9}$	4,7	$9,2\cdot10^{9}$	4,6	$1,7\cdot10^{9}$	5,7	$9,0\cdot10^{8}$	6,0
12	*L. plantarum 21*	$2,0\cdot10^{9}$	4,7	$7,5\cdot10^{9}$	4,6	$1,0\cdot10^{9}$	5,7	$3,5\cdot10^{8}$	5,9
13	*L. acidophilum 9*	$1,8\cdot10^{9}$	4,6	$4,0\cdot10^{9}$	4,5	$8,3\cdot10^{8}$	5,2	$3,8\cdot10^{8}$	5,8
14	*L. bavaricus 6*	$1,2\cdot10^{10}$	4,7	$3,0\cdot10^{10}$	4,6	$2,1\cdot10^{10}$	5,4	$1,0\cdot10^{10}$	5,6
15	*L. brevis 3*	$6,2\cdot10^{8}$	5,2	$1,8\cdot10^{9}$	5,1	$9,5\cdot10^{7}$	6,1	$4,0\cdot10^{7}$	6,2

Выявлено, что при концентрации желчи 0,5 % наблюдается стимуляция роста у всех штаммов молочнокислых бактерий. При концентрации желчи 20 и 40 % наблюдается снижение показателей роста и кислотообразования культур, поскольку клеточные мембраны очень чувствительны к разрушению солями желчных кислот. Степень выживаемости при 20 % желчи составляет 20-69 %, а при концентрации 40 % – 12-36 % в зависимости от штамма. Наиболее устойчивыми к различным концентрациям желчи являются штаммы молочнокислых бактерий – *L. bavaricus 6, L. casei 32, L. casei 23, L. plantarum 24* и *L. plantarum 21*.

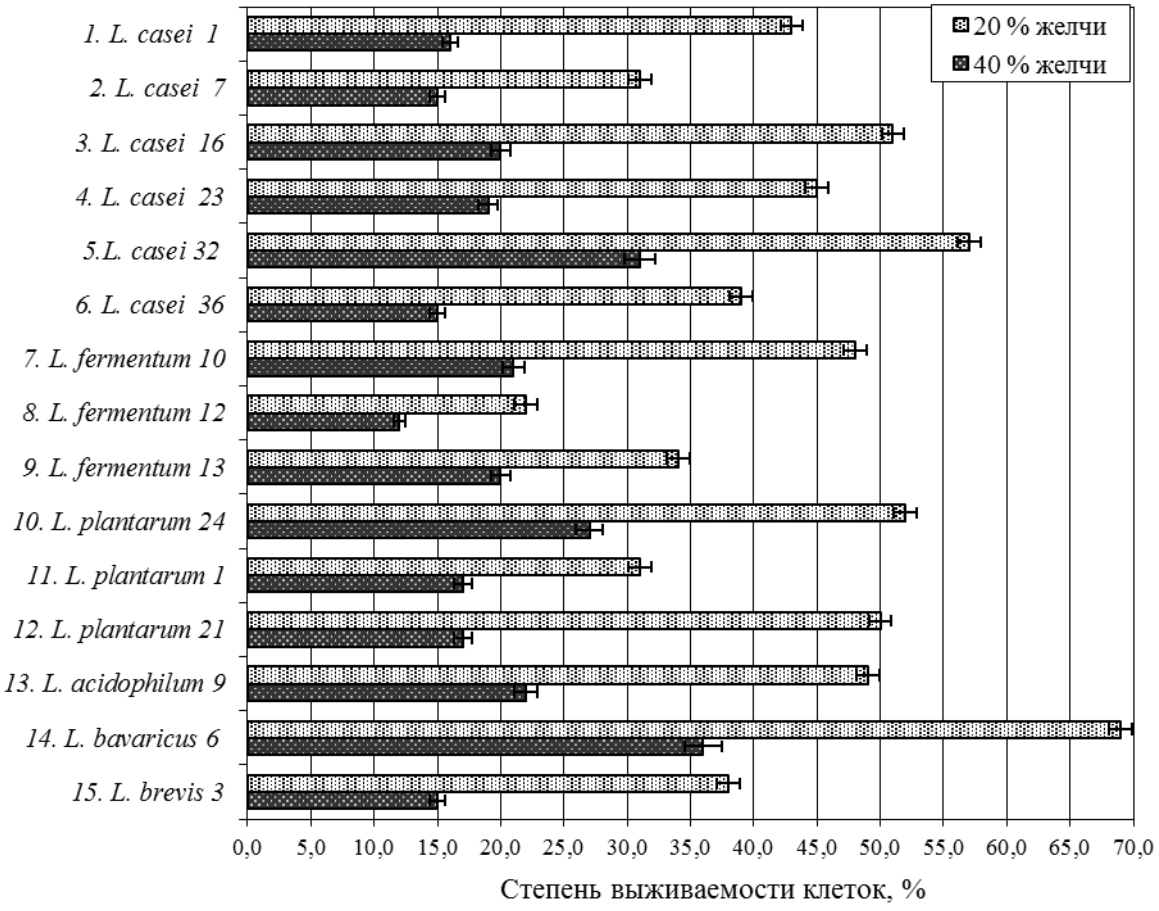


Рисунок 3.9 – Степень выживаемости клеток молочнокислых бактерий при культивировании с 20 % и 40 % желчи

Устойчивость штаммов молочнокислых бактерий к фенолу определяли по уровню накопления биомассы (изменению оптической плотности) и числа КОЕ после 24 ч культивирования при оптимальной температуре в жидкой питательной среде с 0,4 % фенола. Контролем служили варианты без внесения фенола в среду культивирования. Результаты экспериментальных исследований представлены на рисунке 3.10.

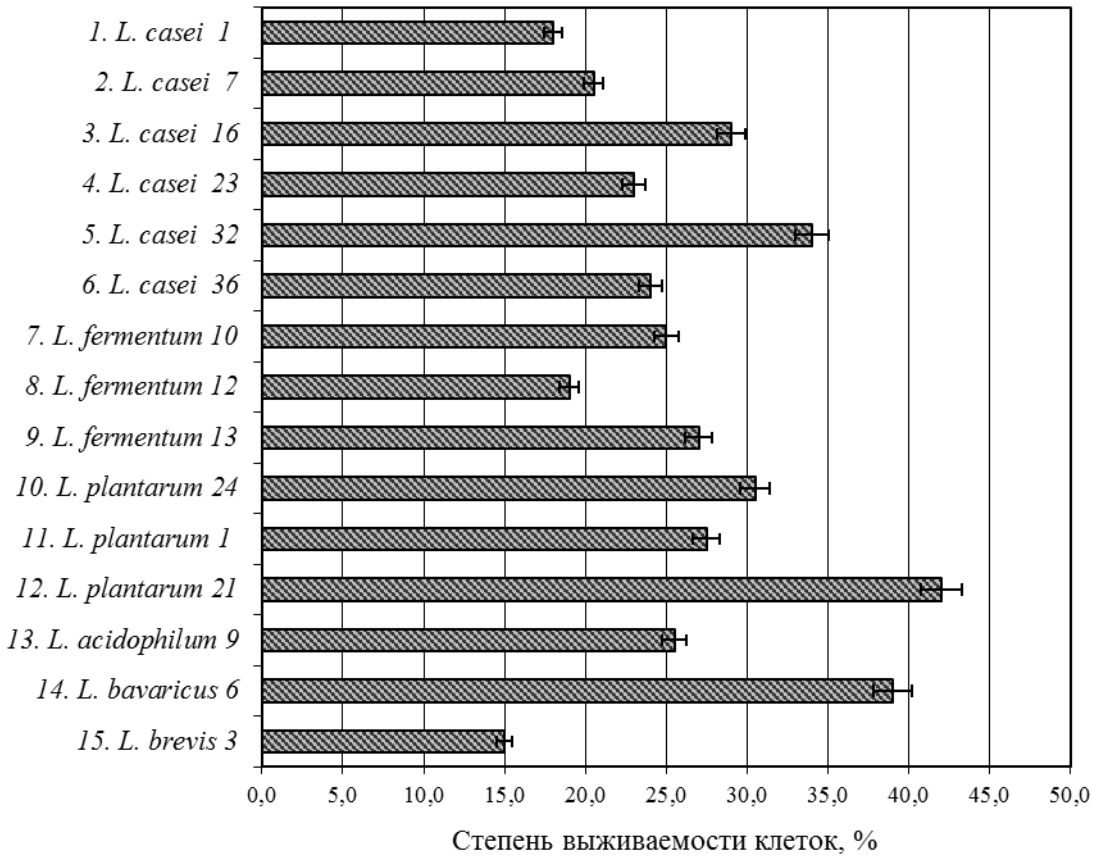


Рисунок 3.10 – Степень выживаемости штаммов молочнокислых бактерий в присутствии 0,4 % фенола

Установлено, что все культуры способны развиваться в среде с 0,4 % фенола. Из данных, представленных на рисунке 3.10, следует, что наибольшей устойчивостью обладает штамм *L. plantarum 24* – 43 %, наименьшей *L. brevis 3* – 15 %.

Наиболее перспективными по показателю устойчивости к фенолу являются четыре штамма молочнокислых бактерий *L. plantarum 21, L. bavaricus 6, L. casei 32, L. plantarum 24,* степень выживаемости которых в присутствии 0,4 % фенола превышает 30 %, что согласно данным научно-технической литературы характеризует высокотолерантные к фенолу штаммы микроорганизмов [51, 149].

Анализируя результаты экспериментальных исследований важно отметить, что четыре штамма молочнокислых бактерий *L. bavaricus 6, L. casei 32, L. plantarum 21* и *L. plantarum 24* отличаются соле-, желче-, кислото- и фенолустойчивостью по сравнению с другими криорезистентными штаммами в соответствующих экспериментах. Полученные данные служат основой для прогнозирования способности данных штаммов молочнокислых бактерий к сохранению ими ферментативной активности по мере прохождения через желудочно-кишечный тракт и приживаемости в кишечнике, а также прогнозирования высокой выживаемости штаммов в процессе хранения пищевых продуктов.

3.2.3 Исследование антагонистической активности молочнокислых бактерий

Важнейшим критерием оценки штаммов молочнокислых бактерий, применяемых в производстве продуктов питания, является антагонистическое действие на нежелательную, патогенную и условно-патогенную микрофлору [51, 149]. Известно, что молочнокислые микроорганизмы даже одного вида могут обладать различной антимикробной активностью [35, 82, 89, 94, 133, 205, 319]. Антагонизм молочнокислых бактерий связывают с наличием целого ряда факторов, которые можно разделить на две группы. Первая группа факторов включает антимикробные метаболиты – органические кислоты, перекись водорода, окись азота, диацетил, реутерин, лизоцим, бактериоцины, оказывающие непосредственное действие на микроорганизмы [148]. Вторую группу факторов называют «механизмами опосредованного воздействия» на патогенные бактерии, грибы, вирусы и простейшие, к ним можно отнести изменение pH среды, препятствие адгезии к поверхности слизистой кишечника, конкуренция за метаболиты и сайты прикрепления [148].

На данном этапе работы были проведены эксперименты по изучению антагонистической активности выделенных штаммов криорезистентных молочнокислых бактерий в условиях *in vitro*.

Антимикробную активность молочнокислых бактерий определяли методом диффузии в агар с измерением зон подавления роста тест-культуры в мм. В качестве тест-организмов использовали патогенные и условно-патогенные штаммы бактерий – *E. coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis,* а также штаммы микроскопических грибов, включая дрожжи – *Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum, Fusarium oxysporum, Candida guilliermondii.*

Результаты изучения спектров антимикробной активности исследуемых штаммов представлены в таблице 3.7.

Установлено, что зона ингибирования роста патогенной и условно-патогенной микрофлоры криорезистентными штаммами молочнокислых бактерий зависит как от вида тест-культуры, так и от штамма. Все штаммы молочнокислых бактерий обладают выраженной антагонистической активностью по отношению к *E. coli* и возбудителю картофельной болезни хлеба – *Bacillus subtilis,* величина зоны ингибирования тест-культуры составляет 14-30 мм и 11-25 мм соответственно. Наибольшая антагонистическая активность по отношению к *E. coli* наблюдается у штаммов *L. bavaricus 6, L. casei 32, L. fermentum 10* (зона ингибирования роста тест-культуры 27-30 мм), по отношению к *Bacillus subtilis* у *L. casei 32, L. casei 36, L. plantarum 24* (зона ингибирования 23-25 мм). Некоторые исследуемые штаммы проявляют антагонистическую активность по

отношению *Staph. aureus,* к ним следует отнести четыре штамма – *L. casei 16, L. casei 23, L. fermentum 10* и *L. bavaricus 3*, радиус зоны лизиса тест-культуры составляет 12-18 мм. Выявлено, что все штаммы молочнокислых бактерий в некоторой степени ингибируют рост *Pr. vulgaris,* максимальный радиус зоны лизиса 10 мм демонстрируют *L. casei 23, L. casei 32.* По отношению к *Ps. aeruginosa* исследуемые штаммы проявляют низкую активность, наибольший радиус зоны ингибирования роста тест-культуры 8 мм проявляет *L. casei 32.*

Таблица 3.7 – Антимикробный спектр действия криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий

Тест-культура	Штамм молочнокислых бактерий														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Диаметр зоны ингибирования роста, мм														
Escherichia coli	25±1	14±1	20±2	22±2	27±2	18±1	28±2	22±2	20±2	22±1	14±1	15±1	16±1	30±3	24±2
Staphylococcus aureus	0	6±1	12±1	10±1	12±1	4±1	14±1	4±1	10±1	8±1	2±1	2±1	0	18±1	0
Pseudomonas aeruginosa	5±1	0	0	0	8±1	4±1	2±1	4±1	2±1	3±1	0	0	0	3±1	2±1
Proteus vulgaris	7±1	4±1	9±1	10±1	10±1	6±1	2±1	2±1	6±1	4±1	2±1	5±1	8±1	8±1	2±1
Bacillus subtilis	14±1	16±1	18±2	18±1	25±2	23±2	21±1	19±1	20±3	24±2	15±1	18±2	18±2	11±1	12±1
Aspergillus niger	0	0	6±1	0	14±1	10±1	12±1	0	0	8±1	0	6±1	0	6±1	0
Penicillium chrysogenum	0	0	0	0	12±1	11±1	15±1	0	0	10±1	0	0	0	0	0
Fusarium oxysporum	0	0	8±1	0	10±1	10±1	16±1	0	0	8±1	0	0	0	6±1	0
Candida guilliermondii	0	0	0	0	17±1	14±1	10±1	0	0	10±1	0	4±1	0	11±1	0

Следует отметить, что многие штаммы молочнокислых бактерий не проявляют ингибиторную активность по отношению к плесневым грибам и дрожжам, максимальной антагонистической активностью обладают *L. casei 32, L. casei 36, L. fermentum 10* и *L. plantarum 24* зона ингибирования роста *Aspergillus niger* составляет 8-14 мм, *Penicillium chrysogenum* – 10-15 мм, *Fusarium oxysporum* – 8-16 мм, *Candida guilliermondii* – 10-17 мм.

Таким образом, в результате изучения спектров антибиотического действия установлено, что криорезистентные лактобактерии *L. casei 32, L. casei 36, L. fermentum 10* и *L. plantarum 24* обладают более широким спектром антибактериального действия, способны эффективно подавлять рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий: *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris* (табл. 4.7). Эти штаммы также проявляют и фунгицидное действие – подавляют

рост мицелиальных грибов и дрожжей – *Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum, Fusarium oxysporum, Candida guilliermondii*, вызывающих порчу сырья и продуктов питания в условиях длительного хранения.

В работе была также изучена антагонистическая активность данных штаммов молочнокислых бактерий в отношении *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris* (рис. 3.11 и 3.12) при совместном культивировании их в мучной болтушке из ржаной муки влажностью 60 % с добавлением глюкозы в количестве 2 % к массе среды при температуре 37 ±1 ^{0}C в течение 48 ч. Выявлено, что все штаммы проявляют высокую антагонистическую активность против тест- штаммов *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*, степень подавления роста через 48 ч совместного культивирования составляет от 62,9 % до 82,1 %, тогда как против штамма *Proteus vulgaris* от 35,9 до 48,2 %.

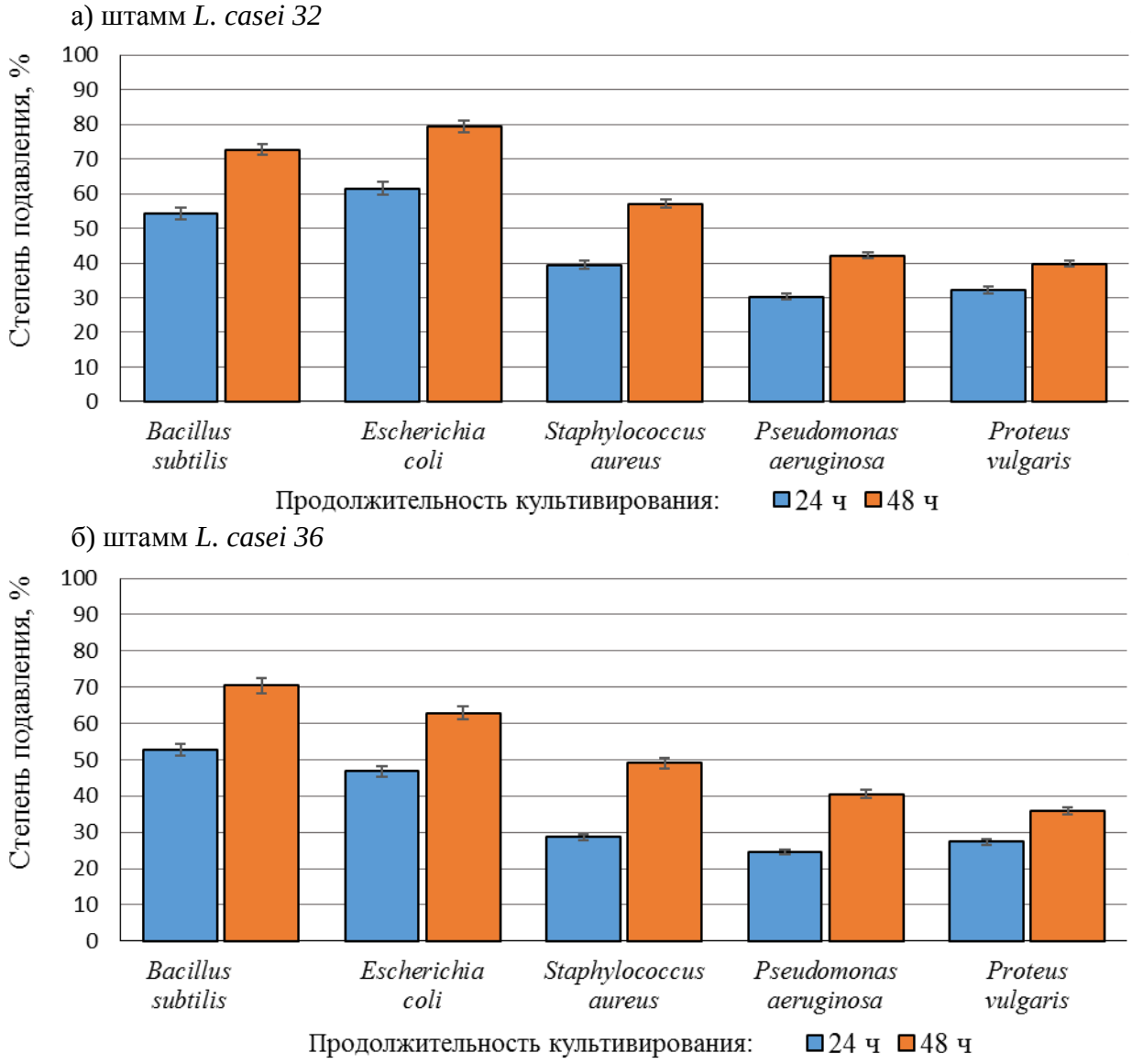
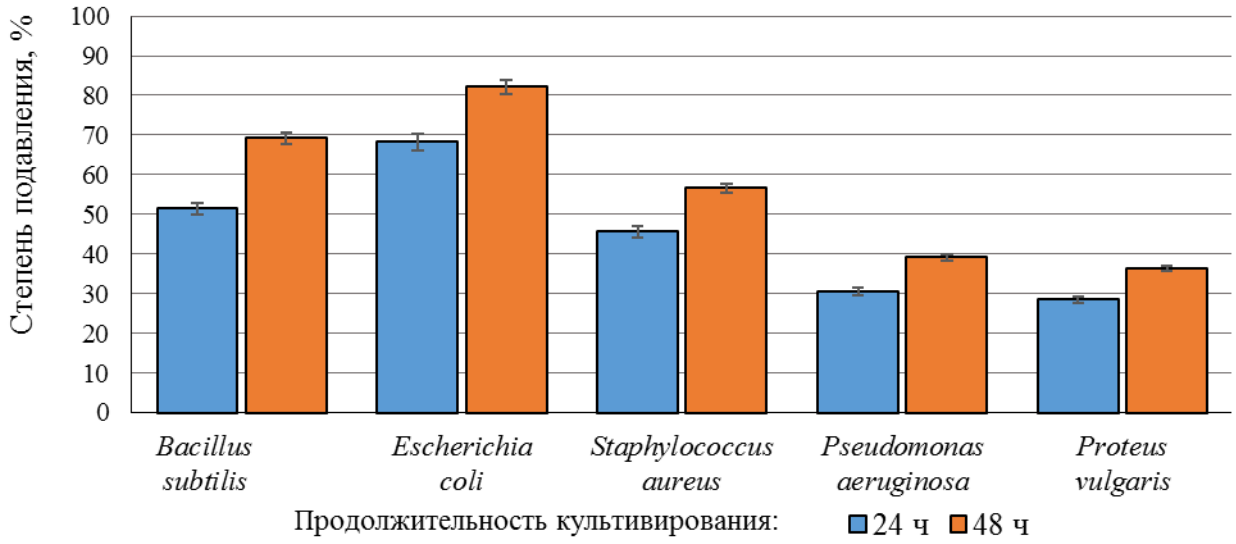


Рисунок 3.11 – Степень подавления роста патогенной и условно-патогенной микрофлоры при совместном культивировании со штаммами *L. casei*

а) штамм *L. fermentum 10*



б) штамм *L. plantarum 24*

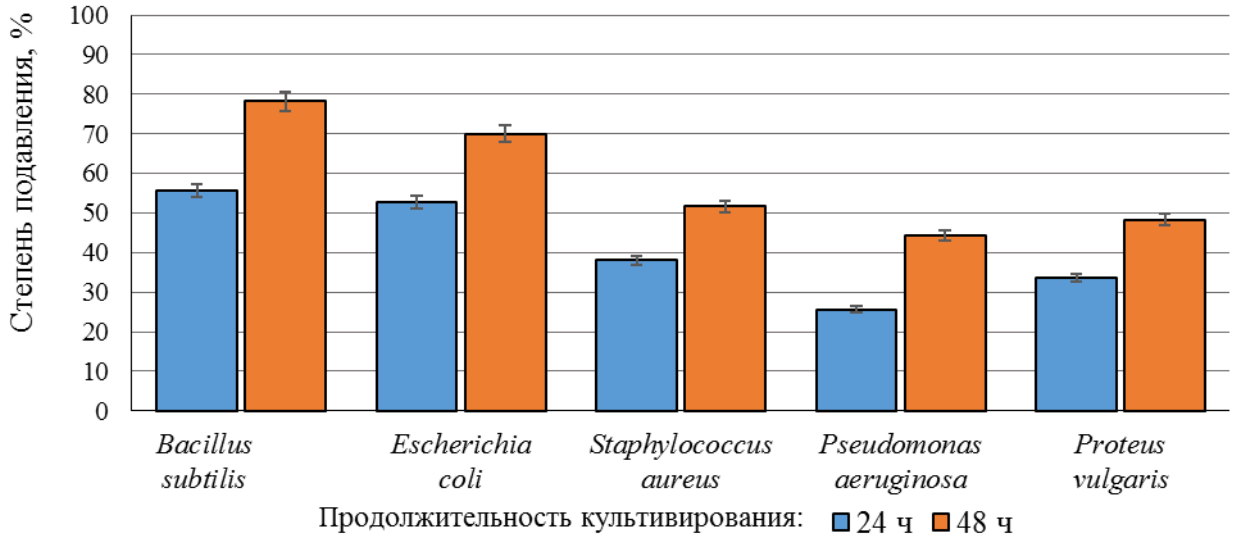


Рисунок 3.12 – Подавление роста патогенной и условно-патогенной микрофлоры при совместном культивировании со штаммами *L. fermentum 10 и L. plantarum 24*

3.2.4 Изучение чувствительности штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам

Нами была изучена устойчивость исследуемых штаммов молочнокислых бактерий к ряду антибиотиков, ингибирующих синтез белка: линкомицин канамицин, неомицин, рифамицин, доксициллин, тетрациклин, левомицетин, стрептомицин; и синтез клеточной стенки: бензилпенициллин, карбенициллин, ристомицин, метициллин, цефалексин, цефалотин. В основном это антибиотики широкого спектра действия, активные как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Результаты исследования представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Антибиотикочувствительность криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий

Антибиотики	Концентрация в диске, мкг	Штамм молочнокислых бактерий														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		Диаметр зоны ингибирования роста, мм														
Бензилпенициллин	10	24±1	26±2	19±1	18±1	19±1	20±1	21±1	19±1	3±1	22±1	19±1	24±2	22±2	13±1	19±1
Канамицин	30	2±1	1±1	2±1	2±1	1±1	2±1	2±1	1±1	2±1	2±1	2±1	1±1	4±1	0	2±1
Неомицин	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1±1	0	0	0	0	0
Рифампицин	10	24±1	15±1	19±2	17±1	14±1	14±1	15±1	18±1	0	14±1	14±1	15±1	11±1	10±1	14±1
Линкомицин	2	3±1	2±1	3±1	9±1	2±1	2±1	0	0	0	0	12±1	3±1	2±1	2±1	12±1
Доксициклин	10	2±1	3±1	7±1	2±1	2±1	8±1	6±1	13±1	6±1	4±1	9±1	9±1	2±1	3±1	8±1
Карбенициллин	100	0	0	0	0	0	2±1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ристомицин	30	0	2±1	0	0	0	6±1	2±1	0	0	7±1	0	1±1	0	0	0
Тетрациклин	30	22±1	28±2	20±2	27±2	32±2	35±2	30±2	28±1	12±1	26±2	15±1	18±1	28±2	32±2	12±1
Левомицетин	30	20±1	18±1	18±1	20±1	22±1	20±1	19±1	21±1	18±1	22±1	26±1	19±1	18±1	22±1	20±2
Стрептомицин	10	10±1	12±1	14±1	10±1	2±1	3±1	8±1	4±1	4±1	6±1	11±1	6±1	2±1	8±1	14±1
Метициллин	10	21±1	13±1	11±1	15±1	2±1	0	0	16±1	4±1	8±1	8±1	6±1	4±1	0	4±1
Цефалексин	30	24±2	19±1	14±1	17±1	9±1	14±1	8±1	16±1	12±1	13±1	16±1	18±1	12±1	25±1	12±1
Цефалотин	30	22±2	20±1	30±2	24±1	18±1	26±2	15±1	19±1	16±1	20±1	28±1	20±1	24±1	15±1	32±2

Примечание: зона диаметром до 9 мм является показателем малой чувствительности микроорганизмов к данному антибиотику, зона от 9 до 19 мм свидетельствует о том, что микроорганизм проявляет чувствительность, а зона более 19 мм указывает на высокую чувствительность к антибиотику.

Лактобациллы обладают хромосомной устойчивостью к ряду антибиотиков, которая варьируется в зависимости от вида и штамма [34, 100, 101, 142]. В научно-технической литературе имеются сведения, что плазмидной ДНК, опасной для распространения антибиотикоустойчивости среди других бактерий, лактобациллы не содержат, для них характерны плазмиды с малой молекулярной массой (менее 10 МД), которые не способны к самостоятельному переносу, что делает возможным широкое использование молочнокислых бактерий в лечебно-профилактических целях [7, 32, 147, 149].

Установлено, что все исследуемые штаммы проявляют высокую чувствительность к бензилпенициллину, рифамицину, тетрациклину, левомицетину, цефалексину и цефалотину, за исключением *L. plantarum 24*, который проявляет резистентность к бензилпенициллину, рифамицину. Три штамма *L. casei 23, L. plantarum 1* и *L. brevis 3* чувствительны к линкомицину, а штаммы *L. fermentum 12, L. plantarum 1, L. plantarum 21* к доксицилину. Практически все штаммы резистентны к таким антибиотикам, как канамицин, неомицин, карбенициллин и ристомицин, кроме того штаммы *L. casei 32, L. casei 36, L plantarum 24* и *L. bavaricus 6* проявляют резистентность к стрептомицину и метициллину.

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что в целом все изученные штаммы обладают либо устойчивостью, либо малой чувствительностью к большинству антибиотиков. Особую устойчивость к ряду антибиотиков проявляют три криорезистентных штамма молочнокислых бактерий – *L. casei 32, L plantarum 24* и *L. bavaricus 6.*

3.3 Изучение ферментативной активности криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий

Лактобактерии проявляют широкий спектр функционально-технологических свойств, обеспечивающих формирование физико-химических, органолептических и микробиологических показателей качества ферментированных продуктов питания, наиболее важными среди которых является активность гидролитических ферментов.

Особое внимание специалисты уделяют способности лактобактерий продуцировать протеолитические и амилолитические ферменты [40, 46, 151, 180, 284, 362]. Протеазы играют существенную роль в созревании ферментированных мясопродуктов (преимущественно сыровяленых и сырокопчёных изделий) и твердых сыров, а также формировании их органолептических показателей. Амилолитические ферменты молочнокислых бактерий оказывают существенное влияние на процессы, протекающие при брожении теста на основе ржаной муки.

Роль липолитических ферментов молочнокислых бактерий в процессах созревания ферментированных продуктов питания до конца не ясна. С одной стороны, липолиз является необходимым условием для формирования специфического вкуса и аромата мясопродуктов и твердых сыров, с другой, не должен превышать определённый критический уровень, поскольку гидролитические процессы, протекающие с участием липолитических ферментов, могут привести к порче данных жиросодержащих продуктов, образованию таких пороков, как прогорклый вкус и запах, нечистый и салистый привкус [20, 40, 356].

Целью следующего этапа работы явилось изучение способности криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий продуцировать протеолитические, амилолитические и липолитические ферменты.

3.3.1 Исследование способности штаммов молочнокислых бактерий синтезировать протеолитические ферменты

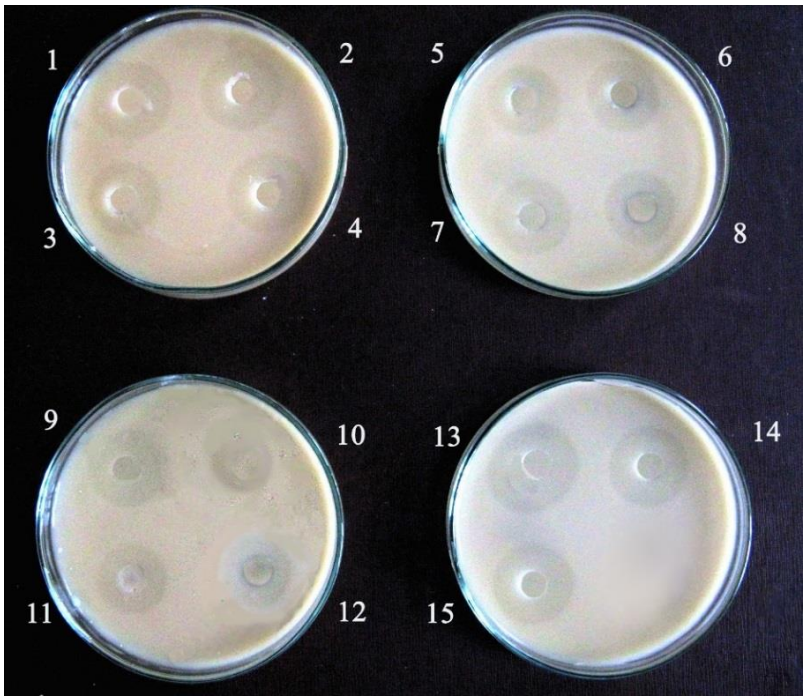
Общеизвестно, что молочнокислые бактерии обладают протеолитической активностью, так как все виды этих бактерий содержат активные протеазы и пептидазы и могут выделять во внешнюю среду ферменты, расщепляющие белки [27, 146, 180, 273, 284, 290, 330].

Протеолитическая активность является одним из критериев отбора штаммов молочнокислых бактерий в отношении использования их в пищевом производстве, так во многом определяет качество готовой продукции. Это объясняется тем, что продукты гидролиза белковых соединений либо входят в состав вкусовых веществ ферментируемых продуктов, либо являются предшественниками для их возникновения [40, 90, 188].

Для выявления активности казеиназы у культур молочнокислых бактерий использовали молочный агар по Эйкману, где способность к образованию протеолитических ферментов определяли по прозрачным ореолам вокруг колоний, что обуславливает пептонизацию казеина. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.13.

Диаметр зон просветления, свидетельствующий о пептизации молочного белка у штаммов молочнокислых бактерий колеблется от 1,0 до 2,5 см, максимальную зону просветления образует штамм *L. acidophilum 9*, наименьшую (1,0-1,5 см) штамм *L. plantarum 24.* Диаметр ореолов остальных штаммов находится приблизительно в единых пределах 1,8-2,0 см.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что все исследуемые штаммы образуют прозрачные ореолы пептизации казеина на молочном агаре по Эйкману, что свидетельствует о способности штаммов образовывать протеолитические ферменты, гидролизирующие молочный белок.



1 *L. casei 1*
2 *L. casei 7*
3 *L. casei 16*
4 *L. casei 23*
5 *L. casei 32*
6 *L. casei 36*
7 *L. fermentum 10*
8 *L. fermentum 12*
9 *L. fermentum 13*
10 *L. plantarum 24*
11 *L. plantarum 1*
12 *L. plantarum 21*
13 *L. acidophilum 9*
14 *L. bavaricus 6*
15 *L. brevis 3*

Рисунок 3.13 – Способность штаммов молочнокислых бактерий пептонизировать казеин

Для выявления протеолитической активности рассматриваемых штаммов микроорганизмов были проведены исследования по оценке содержания белков в модельных субстратах (1 % растворы сывороточного альбумина и казеина) после ферментации их лактобактериями.

Результаты исследования протеолитической активности исследуемых штаммов показали, что в процессе ферментации казеина наблюдается интенсивное снижение содержания белка относительно контрольных значений, причем наиболее выраженные изменения характерны для штаммов *L. casei 32, L. casei 36, L. fermentum 10, L. acidophilum 9,* для данных молочнокислых бактерий степень гидролиза казеина составляет в среднем 80 % (рис. 3.14). Наименьшую способность гидролизовать белки продемонстрировали штаммы *L. casei 16, L. plantarum 1, L. bavaricus 6* степень гидролиза казеина данными лактобактериями составляет 45,2 %, 32,8 % и 36,7 % соответственно.

Аналогичные результаты были получены при оценке протеолитической активности исследуемых штаммов молочнокислых бактерий при ферментации альбумина, однако способность микроорганизмов гидролизовать данный белок ниже в среднем на 10-15 % по сравнению со степенью протеолиза, продемонстрированной на казеине.

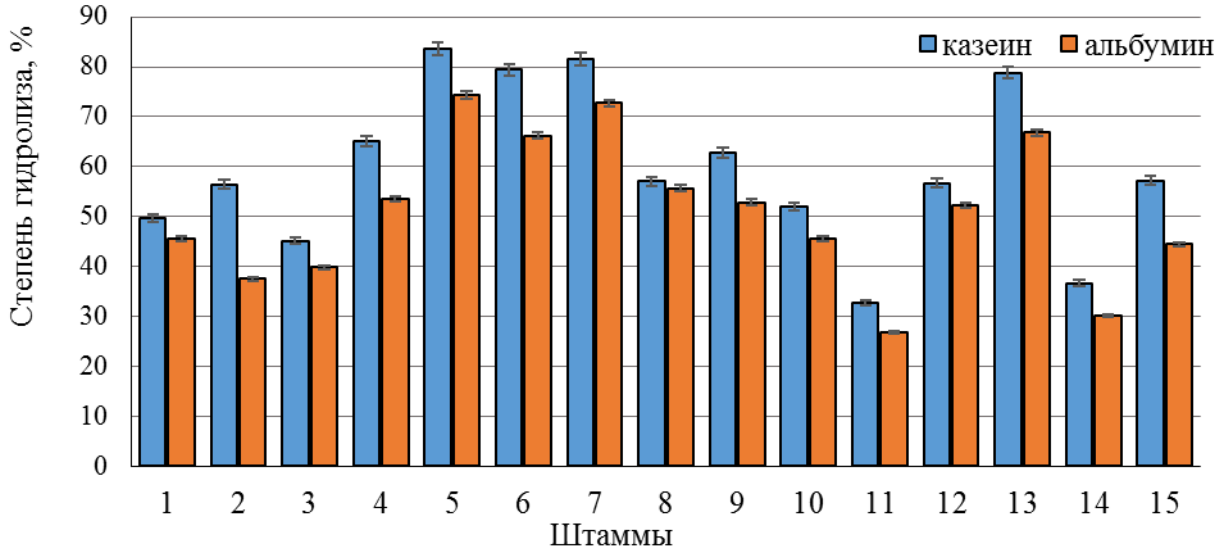


Рисунок 3.14 – Степень гидролиза белков молочнокислыми бактериями

При ферментации казеина в среде накаливается большее количество пептидов и свободных аминокислот, чем при ферментации альбумина. Ферментные системы штаммов *L. casei 32, L. casei 36* и *L. fermentum 10* оказывают интенсивное воздействие как на казеин, так и на альбумин, тогда как штаммы *L. fermentum 13, L. casei 7* и *L. acidophilum 9* активно пептонизируют молочный белок, однако показывают низкую активность при ферментации альбумина.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что активность протеолитической системы криорезистентных бактерий существенно зависит от природы исходного субстрата, в связи с чем при подборе штаммов для стартовых заквасок, разрабатываемых для пищевой промышленности, требуется изучение активности протеолитических ферментов не только общепринятыми методами, но и тестирование их на конкретных субстратах в зависимости от производственных целей.

Специалисты отмечают, что характер гидролиза белковых молекул до пептидов и аминокислот зависит не только от природы субстрата, но и от внешних условий, в первую очередь значений pH среды. Протеолитические ферменты лактобактерий способны проявлять активность в широком интервале значений pH и по этому признаку они делятся на слабокислые, нейтральные и щелочные.

В таблице 3.9 представлены данные по оценке активности внеклеточных протеаз криорезистентных штаммов *Lactobacillus* в зависимости от pH среды. Для учета субстрат-специфичности протеолитических ферментов, получения достоверных результатов и корректного их сравнения в качестве субстрата использовали 2 % гемоглобин, приготовленный на универсальном буфере [130].

Установлено, что протеолитическая активность криорезистентных молочнокислых бактерий не зависит от вида и является индивидуальной особенностью конкретного штамма, что еще раз подтверждает выводы о необходимости тщательного анализа функционально-технологических свойств каждого кандидата для включения в состав стартовых заквасок, предназначенных для ферментированных продуктов питания.

Все исследуемые штаммы проявляют более высокую активность в фазу интенсивного роста через 12 ч культивирования клеток в питательной среде. В дальнейшем наблюдается значительное снижение протеолитической активности (в среднем на 50-70 %), что свидетельствует об активном синтезе протеаз в ранние часы развития бактерий.

Таблица 3.9 – Протеолитическая активность криорезистентных штаммов

№	Штамм	Протеолитическая активность, мкг тирозина/мл×мин.					
		pH 5,0		pH 6,5		pH 8	
		12 ч	24 ч	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч
1	*L.casei 1*	12,29±0,62	8,52±0,43	19,24±0,97	16,71±0,80	32,89±1,60	20,60±1,08
2	*L.casei 7*	10,70±0,51	6,15±0,31	23,82±1,17	17,42±0,86	34,49±1,73	11,41±0,52
3	*L.casei 16*	14,03±0,69	9,21±0,42	28,53±1,39	20,18±0,97	43,38±2,09	22,26±1,11
4	*L.casei 23*	10,32±0,52	7,33±0,36	15,65±0,76	12,29±0,61	30,06±1,48	15,73±0,73
5	***L.casei 32***	**19,53±0,94**	**11,60±0,55**	**36,61±1,83**	**30,04±1,47**	**48,86±2,39**	**22,18±1,02**
6	***L.casei 36***	**17,86±0,87**	**12,08±0,61**	**34,75±1,71**	**28,33±1,41**	**47,92±2,40**	**20,69±1,06**
7	***L.fermentum 10***	**20,08±1,09**	**10,19±0,49**	**31,12±1,54**	**25,92±1,30**	**52,34±2,61**	**21,90±0,67**
8	*L. fermentum 12*	18,84±0,96	16,56±0,82	7,35±0,37	4,84±0,23	30,11±1,49	14,51±0,84
9	*L. fermentum 13*	11,07±0,52	8,77±0,43	24,91±1,22	16,59±0,82	36,48±1,76	17,03±0,49
10	*L. plantarum 24*	9,12±0,41	6,07±0,29	12,73±0,60	11,45±0,58	28,86±1,29	10,24±0,42
11	*L. plantarum 1*	5,62±0,28	2,31±0,14	9,9±0,48	6,58±0,32	27,72±1,75	8,57±0,89
12	*L. plantarum 21*	18,72±0,95	14,03±0,68	10,37±0,51	9,05±0,43	37,44±1,46	17,94±0,94
13	*L. acidophilum 9*	21,41±1,06	11,17±0,53	26,38±1,28	17,24±0,85	31,28±1,38	19,93±0,99
14	*L.bavaricus 6*	6,20±0,30	4,42±0,21	20,44±0,99	9,10±0,42	28,95±1,44	9,42±0,40
15	*L. brevis 3*	10,31±0,52	7,75±0,39	16,37±0,81	10,74±0,53	25,02±1,16	11,56±0,56

Для всех изучаемых штаммов лактобацилл максимальная протеолитическая активность была зарегистрирована при pH 8, тогда как оптимальное значение для роста и развития данных штаммов лежит в диапазоне от 5,5 до 6,2.

Показано, что в слабокислой среде самую высокую протеолитическую активность проявляют штаммы *L. casei 32, L. fermentum 10* и *L. acidophilum 9* (19,53-21,41 мкг тирозина/мл×мин.), в нейтральной *L. casei 32, L. casei 36* и *L. fermentum 10* (31,12-36,61 мкг тирозина/мл×мин.), в щелочной *L. casei 16, L. casei 32, L. casei 36* и *L. fermentum 10* (43,38-52,34 мкг тирозина/мл×мин.). Следует отметить, что протеолитическая активность для каждого отдельно взятого штамма молочнокислых бактерий в слабокислой

среде отличается низкими значениями по сравнению с ее показателями в нейтральной зоне pH, за исключением штаммов *L. fermentum 12* и *L. plantarum 21*. Данные штаммы характеризуются достаточно высокой активностью протеаз в слабокислой среде (21,41 и 18,72 мкг тирозина/мл×мин. соответственно) при значениях pH 5,0.

Штаммы *L. plantarum 1, L. bavaricus 6* и *L. brevis 3* демонстрируют наименьшую протеолитическую активность среди изучаемых лактобактерий, вне зависимости от pH среды и продолжительности культивирования клеток.

Результаты, полученные при количественном измерении протеолитической активности исследуемых штаммов, показывают, что значение pH оказывает большое влияние на активность внеклеточных протеаз, продуцируемых лактобактериями, что, вероятно, обусловлено изменением водородно-ионного равновесия, вызывающего модификацию структуры ферментов и снижение доступности субстрата [146, 330].

Среди пятнадцати новых функционально-активных штаммов *Lactobacillus* с криорезистентными свойствами штаммы *L. casei 32, L. casei 36* и *L. fermentum 10* продемонстрировали самую высокую протеолитическую активность на различных белковых субстратах и в широком диапазоне значений pH, что свидетельствует об универсальности протеолитического комплекса данных штаммов.

3.3.2 Исследование амилолитической активности штаммов молочнокислых бактерий

В технологии хлебобулочных изделий существенную роль играют амилолитические ферменты как собственно муки, так и молочнокислых бактерий – участников процесса брожения теста. Гидролиз крахмала при замесе, брожении и расстойке теста под воздействием амилолитических ферментов улучшает сбраживание сахаров микроорганизмами и приводит к интенсификации процесса брожения.

При производстве хлеба из ржаной муки присутствие амилолитических ферментов позволяет снизить количество амилодекстринов и за счет этого уменьшить липкость и заминаемость мякиша хлеба. Увеличение содержания в тесте низкомолекулярных сахаров также приводит к активации процесса меланоидинообразования при выпечке, что усиливает окраску корочки хлеба [8, 75, 90]. Кроме того, расщепление крахмала до декстринов способствует замедлению черствения хлеба, в основе которого лежат процессы ретроградации клейстеризованного крахмала и образование поперечных связей между молекулами крахмальных полисахаридов и белков клейковины [8, 90].

Важнейшими физико-химическими характеристиками фермента является оптимальные для действия значения pH среды и температуры. Известно, что амилазы бактерий по величине pH-оптимума относятся к слабокислым или нейтральным ферментам [316]. Поэтому исследования активности ферментов проводили при значении pH 4,8.

За единицу амилолитической активности принимали количество декстринов различной молекулярной массы, образуемых в качестве продуктов гидролиза 1 г крахмала в течение 60 мин. Результаты исследований приведены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Амилолитическая активность криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий

№ п/п	Штамм	Амилолитическая активность, ед.акт./мл				
		Продолжительность культивирования				
		6 ч	12 ч	18 ч	24 ч	36 ч
1	*L. casei 1*	18,64±0,23	24,59±0,36	28,01±0,21	35,86±0,22	32,28±0,31
2	*L. casei 7*	13,37±0,18	28,74±0,31	33,06±0,28	44,65±0,34	43,04±0,37
3	***L. casei 16***	**24,23±0,20**	**76,35±0,47**	**82,13±0,42**	**97,81±0,49**	**95,14±0,48**
4	*L. casei 23*	20,48±0,21	41,07±0,33	48,56±0,35	54,40±0,28	53,28±0,35
5	***L. casei 32***	28,67±0,25	72,26±0,42	90,54±0,49	101,17±0,51	97,82±0,43
6	*L. casei 36*	20,72±0,19	45,82±0,30	56,78±0,34	65,24±0,40	61,42±0,41
7	***L. fermentum 19***	**35,16±0,33**	**81,14±0,45**	**102,61±0,51**	**110,38±0,54**	**105,78±0,54**
8	*L. fermentum 12*	12,27±0,11	34,18±0,23	49,83±0,23	57,90±0,33	56,35±0,41
9	*L. fermentum 13*	27,59±0,13	38,35±0,22	50,17±0,25	53,10±0,38	54,27±0,50
10	***L plantarum 24***	**38,93±0,35**	**67,94±0,46**	**89,12±0,47**	**96,72±0,46**	**90,54±0,47**
11	***L. plantarum 1***	**22,83±0,31**	**50,18±0,37**	**78,95±0,41**	**91,88±0,42**	**86,02±0,39**
12	***L. plantarum 21***	**29,25±0,23**	**61,68±0,49**	**82,57±0,53**	**97,77±0,45**	**94,32±0,41**
13	*L. acidophilum9*	15,59±0,18	37,30±0,29	58,03±0,33	64,92±0,37	59,81±0,38
14	*L. bavaricus 6*	10,26±0,14	14,72±0,18	23,86±0,21	28,09±0,25	24,25±0,21
15	*L. brevis 3*	12,73±0,15	15,82±0,20	19,55±0,17	21,91±0,23	21,33±0,19

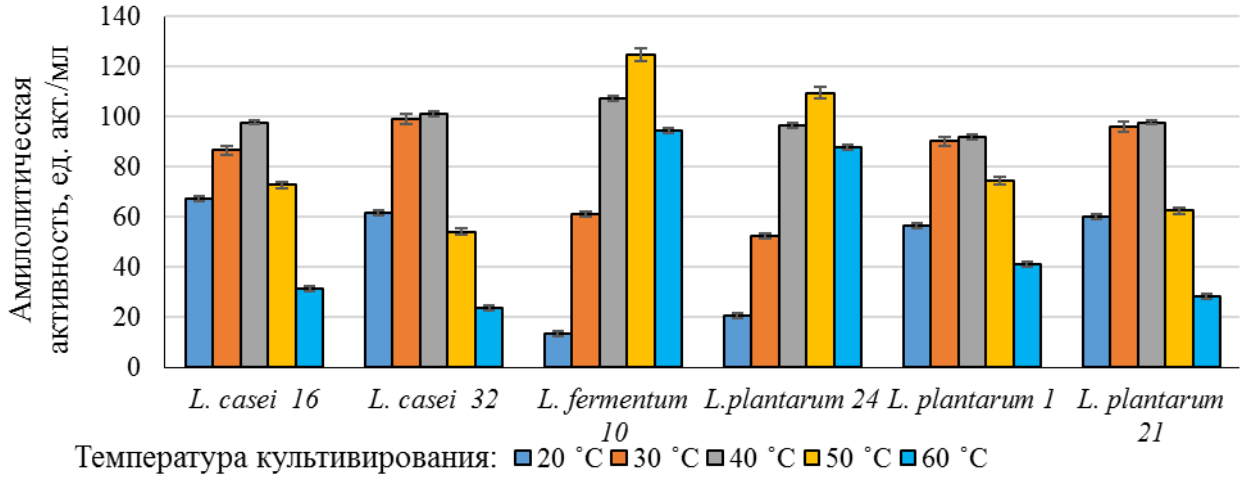
Установлено, что все криорезистентные штаммы молочнокислых бактерий проявляют амилолитическую активность, уровень продукции амилазы данными штаммами значительно увеличивается во время экспоненциальной фазы роста и достигает максимума через 24 ч культивирования лактобактерий в жидкой питательной среде. Снижение синтеза амилазы происходит примерно через 36 ч инкубации клеток и может быть связано с повышением концентрации молочной кислоты и изменением pH среды [157] или с повышением уровня протеазы [353]. Наименьшую способность синтезировать амилазы

продемонстрировали штаммы *L. bavaricus 6, L. brevis 3* и *L. casei 1*, амилолитическая активность данных штаммов составляет 21-32 ед. акт./мл.

Штаммы *L. casei 7, L. casei 23, L. casei 36, L. fermentum 12, L. fermentum 13* и *L. acidophilum 9* отличаются средней амилолитической активностью (на уровне 45-65 ед. акт./мл) по сравнению с другими криорезистентными лактобактериями. В результате анализа уровня амилолитической активности выявлено шесть перспективных штаммов, проявляющих высокую амилолитическую активность (90-110 ед. акт./мл) *L. casei 16, L. casei 32, L. fermentum 10, L. plantarum 24, L. plantarum 1, L. plantarum 21*.

Изучение синтеза амилолитических ферментов данными штаммами через 24 ч культивирования в зависимости от температуры (рис. 3.15 а) и pH среды (рис. 3.15 б) показало, что мезофильные лактобактерии проявляет максимальную амилолитическую активность при температурах 30-40 ^{0}C, термофильные – при 50 ^{0}C, подтверждая, таким образом, тесную взаимосвязь между ростом клеток и производством амилазы [353].

а)



б)

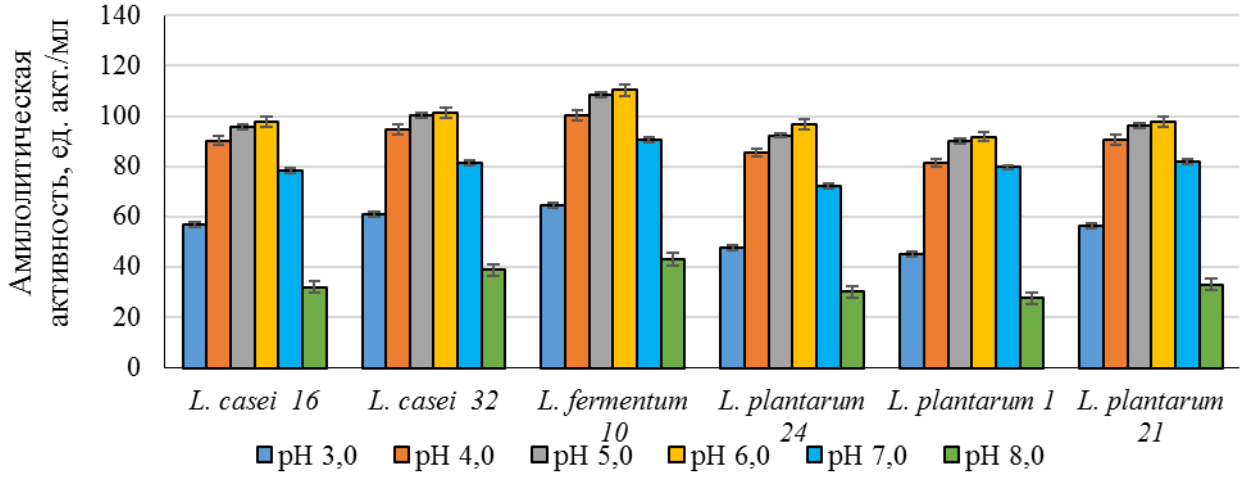


Рисунок 3.15 – Амилолитическая активность лактобактерий в зависимости от температуры (а) и pH среды (б)

На продукцию амилазы у лактобактерий существенно влияет исходное значение pH среды (рис. 3.15 б). Установлено, что максимальная амилолитическая активность при температуре культивирования 40 ^{0}C достигается в диапазоне pH 4,0-6,0, что следует отнести к положительным факторам для хлебопечения, поскольку процессы созревания теста протекают в кислой среде, в которой молочнокислые бактерии могут проявить свою максимальную активность.

3.3.3 Исследование способности штаммов молочнокислых бактерий синтезировать липолитические ферменты

Липолизу жиров принадлежит важная роль в формировании аромата ферментированных продуктов, в процессе которой образуются ди- и моноглицериды, летучие жирные кислоты (уксусная, масляная, капроновая, валериановая и др.) и продукты их распада (альдегиды, кетоны, метилкетоны, эфиры, спирты). Специалисты отмечают, что данный процесс осуществляется в основном молочнокислыми бактериями, продуцирующими липолитические ферменты, участвующие в превращениях жиров [40, 183, 356]. Образующиеся летучие низкомолекулярные жирные кислоты могут окисляться до перекисей, которые под действием каталазной активности микроорганизмов превращаются в карбоксильные соединения, способствующие образованию вкуса и аромата продукта [40, 92, 93].

В процессе ферментации сырья молочнокислыми бактериями в пищевых продуктах преимущественно накапливаются уксусная, муравьиная и пропионовая кислоты [40, 52, 53].

Важно отметить, что для молочнокислой микрофлоры липиды не являются источниками энергии, наличие липолитической активности обусловлено исключительно ее биосинтетическими нуждами.

Результаты исследования липолитической активности исследуемых штаммов молочнокислых бактерий через 24 ч культивирования их при оптимальных температурах роста представлены на рисунке 3.16.

Анализ полученных данных показывает, что уровень продукции липолитических ферментов у исследуемых лактобактерий не зависит от продолжительности культивирования клеток, за исключением штаммов *L. casei 23* и *L. fermentum 10*, активность которых через 24 ч на 30-50 % выше по сравнению с таковыми при 12 ч культивировании.

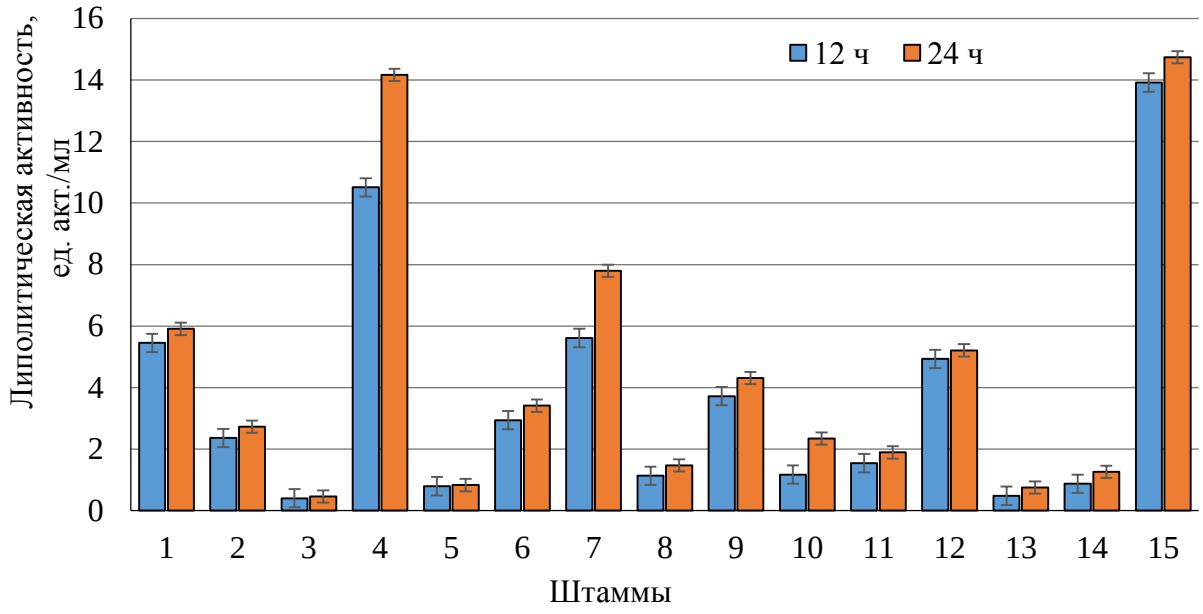


Рисунок 3.16 – Липолитическая активность криорезистентных молочнокислых бактерий

Выявлено, что штаммы *L. casei 16, L. casei 32, L. fermentum 12, L. acidophilum, L. bavaricus 6* не обладают липолитической активностью. Незначительное количество липолитических ферментов (3,5-5,0 ед. акт./мл) синтезируют молочнокислые бактерии *L. casei 1, L. casei 7, L. fermentum 12, L. plantarum 12.* Среди исследуемых лактобактерий максимальную липолитическую активность (14,0- 14,5 ед. акт./мл) проявляют штаммы *L. casei 23* и *L. brevis 3,* в связи с чем данные штаммы не рекомендуется использовать в качестве заквасок для хлебобулочных изделий с высоким содержанием жиров в рецептуре.

3.4 Исследование генопротекторных и антимутагенных свойств лактобактерий

Актуальной задачей современности является поиск и применение соединений, обладающих генопротекторным и антимутагенным действием, способных снижать или полностью устранять действие генотоксикантов на организм человека. Создание продуктов питания, содержащих такие вещества перспективно с точки зрения профилактики злокачественных новообразований и снижения мутационного груза популяции, в связи с чем, резко возрастает интерес к микроорганизмам, прежде всего молочнокислым бактериям, как к возможным продуцентам биологически активных веществ, обладающих в том числе генопротекторным и антимутагенным действием [29, 30, 38, 154, 169, 216, 248, 327]. Целью данного этапа работы было изучение генопротекторных и антимутагенных свойств криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus.*

3.4.1 Генопротекторная активность метаболитов криорезистентных лактобактерий в ДНК-повреждающем тесте

Для изучения генопротекторной активности и выяснения вкладов систем репараций в исправление повреждений генетического аппарата клетки применяли суспензионный метод ДНК-повреждающего теста [1]. В качестве индикаторных бактерий в работе применяли тест-штаммы *E. coli,* имеющие дефекты по следующим системам репарации: *UvrA*$^-$ – с нарушениями в эксцизионной репарации*; PolA*$^-$ – с нарушениями в репарации ДНК-полимеразы 1; *RecA*$^-$ – с нарушениями в пострекомбинационной репарации. В качестве тест-объекта с нормальным функционированием всех систем репарации использовали дикий тип *E. coli – Wp.*

Наибольший интерес с точки зрения исследования метаболитов бактерий представляет фаза замедленного роста, именно в этот период наблюдается максимальный уровень выделения продуктов жизнедеятельности клетки во внешнюю среду, а также стационарная фаза, поскольку в ней может происходить некоторая модификация выделившихся веществ под действием физических и химических факторов внешней среды.

Объектами исследования явились культуральные жидкости криорезистентных лактобактерий. В качестве позитивного контроля использовали известный ДНК-повреждающий агент – фурацилин (нитрофурал). Токсическое действие фурацилина основано на способности его молекул проникать в клетку микроорганизма и восстанавливаться там микробными флавопротеинами с образованием высокореактивных аминопроизводных, которые изменяют конформацию белков, в том числе рибосомальных, и других макромолекул и вызывают гибель клеток [44].

Изучение протекторных свойств лактобактерий проводили в двух вариантах:

1) с целью выявления десмутагенных свойств метаболитов клетки тест-штамма *E. coli* инкубировали в питательной среде совместно с мутагеном (фурацилин 100 мкг/мл) и культуральной жидкостью;

2) для оценки биоантимутагенных свойств продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий, клетки тест-штамма *E. coli* и культуральную жидкость предварительно инкубировали в мясопептоном бульоне в течение 100 мин., затем клетки отмывали и инкубировали совместно с мутагеном.

Изучение генопротекторных свойств культуральной жидкости штаммов молочнокислых бактерий (табл. 3.11 и 3.12) показало, что продукты жизнедеятельности исследуемых бактерий проявляют значительный биоантимутагенный эффект, что

указывает на внутриклеточный механизм протекторного действия культуральной жидкости молочнокислых бактерий. По-видимому, метаболиты лактобактерий приводят к снижению восприимчивости клеток тест-штаммов *E. coli* к действию ДНК-повреждающего соединения – фурацилина, либо активизируют альтернативные системы репараций, исправляющие повреждения в структуре ДНК.

Таблица 3.11 – Оценка десмутагенных свойств культуральной жидкости лактобактерий (вариант 1)

№ п/п	Штамм	Генопротекторная активность, %							
		Фаза замедленного роста				Стационарная фаза роста			
		Wp	*Pol*	*Rec*	*Uvr*	*Wp*	*Pol*	*Rec*	*Uvr*
1	***L. casei 1***	**24,1±1,1**	**33,2±1,5**	**5,2±0,3**	**16,3±0,8**	**18,3±0,9**	**14,5±0,7**	**4,1±0,3**	**11,8±0,5**
2	*L. casei 7*	20,1±1,0	27,7±1,4	4,6±0,2	15,2±0,7	13,9±0,7	19,9±0,9	2,0±0,2	5,5±0,3
3	*L. casei 16*	21,7±1,1	26,4±1,2	4,9±0,3	15,7±0,7	16,0±0,8	19,3±0,8	2,4±0,3	6,3±0,3
4	*L. casei 23*	18,8±0,9	20,5±1,0	6,2±0,3	10,1±0,5	14,3±0,7	15,6±0,8	4,8±0,3	3,3±0,2
5	***L. casei 32***	**24,4±1,2**	**32,8±1,6**	**10,3±0,5**	**16,2±0,8**	**22,4±1,1**	**24,1±1,2**	**8,2±0,4**	**15,1±0,7**
6	*L. casei 36*	18,0±0,9	11,7±0,5	8,1±0,4	14,5±0,7	17,3±0,9	7,4±0,4	4,8±0,4	12,0±0,6
7	***L. fermentum 10***	**26,1±1,3**	**28,4±1,4**	**17,5±0,8**	**20,1±0,9**	**14,9±0,7**	**13,3±0,6**	**16,7±0,8**	**4,0±0,2**
8	*L. fermentum 12*	18,4±0,9	25,5±1,2	18,1±0,9	17,9±0,8	10,8±0,5	12,6±0,6	7,4±0,4	6,9±0,4
9	***L. fermentum 13***	**30,4±1,4**	**33,7±1,6**	**19,4±0,9**	**15,5±0,6**	**20,1±1,1**	**29,2±1,5**	**8,0±0,4**	**7,6±0,4**
10	***L. plantarum 24***	**17,4±0,8**	**31,7±1,5**	**12,8±0,6**	**18,0±0,9**	**24,1±1,2**	**16,9±0,8**	**9,1±0,4**	**4,4 ±0,3**
11	*L. plantarum 1*	18,7±0,9	15,2±0,7	9,5±0,6	22,8±1,0	21,6±0,9	15,7±0,8	2,8±0,2	10,7±0,5
12	*L. plantarumc21*	20,3±1,0	14,4±0,7	16,3±0,8	23,5±1,1	13,8±0,6	9,6±0,4	11,4±0,5	14,2±0,7
13	*L. acidophilum 9*	27,4±1,3	19,3±0,9	12,7±0,6	18,7±0,9	12,7±0,5	8,8±0,4	7,9±0,4	16,4±0,7
14	***L. bavaricus 6***	**24,5±1,2**	**20,6±0,9**	**9,3±0,4**	**20,0±0,9**	**11,4±0,5**	**12,2±0,6**	**7,1±0,4**	**17,5±0,9**
15	*L. brevis 3*	16,3±0,8	7,2±0,4	5,8±0,3	16,9±0,7	7,1±0,4	6,8±0,4	2,0±0,2	11,6±0,5

Следует отметить, что во всех экспериментальных вариантах в присутствии культуральной жидкости молочнокислых бактерий не наблюдается прирост биомассы клеток *E. coli*, таким образом она не приводит к стимуляции роста тест-штаммов *E .coli*, следовательно, более активный рост бактерий в присутствии антимутагена обусловлен только генопротекторными свойствами культуральной жидкости молочнокислых бактерий.

Сравнительное изучение влияния культуральной жидкости на мутагенность фурацилина у штаммов *E. coli* показало, что ее антимутагенное действие зависит от фазы роста, вида и штамма молочнокислых бактерий. По мере старения культур генопротекторная активность культуральной жидкости снижается, это может быть связано с тем, что в более поздние фазы

роста активные вещества могут либо вновь потребляться культурами, либо подвергаться различным модификациям, например, окислению.

Таблица 3.12 – Оценка биоантимутагенных свойств культуральной жидкости лактобактерий (вариант 2)

№ п/п	Штамм	Генопротекторная активность, %							
		Фаза замедленного роста				Стационарная фаза роста			
		Wp	*Pol*	*Rec*	*Uvr*	*Wp*	*Pol*	*Rec*	*Uvr*
1	*L. casei 1*	39,7±1,6	48,1±2,2	11,4±1,1	17,1±0,9	37,8±1,8	5,1±0,4	5,2±0,5	15,4±1,3
2	*L. casei 7*	36,2±1,7	23,5±1,2	17,9±1,4	35,2±1,5	22,4±1,0	14,2±0,9	7,8±0,5	20,1±1,0
3	*L. casei 16*	37,0±1,5	25,1±1,2	20,4±1,3	37,3±1,8	22,3±1,1	11,9±0,8	15,1±1,0	21,0±1,1
4	*L. casei 23*	35,8±1,6	33,2±1,5	29,7±1,3	13,8±0,6	24,4±1,2	22,1±1,1	18,2±1,6	9,7±0,8
5	***L. casei 32***	**55,9±2,6**	**40,2±2,0**	**25,1±1,1**	**43,0±2,0**	**41,4±1,9**	**31,8±1,5**	**20,6±1,9**	**32,2±1,5**
6	*L. casei 36*	36,2±1,4	19,4±0,8	14,1±1,0	21,9±1,1	20,1±1,0	10,4±0,7	7,3±0,4	15,1±0,7
7	***L. fermentum 10***	**33,7±1,2**	**35,8±1,3**	**21,0±1,5**	**31,8±1,5**	**21,3±1,1**	**22,9±1,6**	**20,2±1,0**	**4,2±0,3**
8	*L. fermentum 12*	29,9±1,4	33,1±1,2	23,4±1,6	25,6±1,3	19,5±0,9	20,4±1,5	10,2±0,5	13,9±0,7
9	***L. fermentum 13***	**35,1±1,7**	**43,6±2,0**	**23,0±1,2**	**16,4±1,0**	**27,5±1,3**	**36,2±1,8**	**8,2±0,4**	**9,9±0,6**
10	*L. plantarum 24*	32,4±2,2	36,0±2,5	18,9±1,3	22,4±1,1	27,1±1,1	28,3±1,4	11,2±0,6	12,7±0,6
11	*L. plantarum 1*	29,8±1,4	22,0±1,3	15,4±1,2	31,7±1,4	26,8±1,2	19,7±1,4	8,3±0,4	24,6±1,2
12	***L. plantarum 21***	**43,6±2,1**	**21,1±1,1**	**24,2±2,0**	**38,9±1,8**	**36,0±1,7**	**15,4±1,2**	**15,5±0,9**	**25,7±1,2**
13	*L. acidophilum 9*	36,1±1,4	26,3±1,1	14,0±1,6	28,8±1,3	19,7±0,9	15,2±1,0	11,5±0,6	21,8±1,1
14	***L. bavaricus 6***	**43,7±2,1**	**34,2±1,7**	**27,7±2,1**	**19,5±0,9**	**35,3±1,6**	**26,3±1,2**	**21,2±1,0**	**16,0±0,8**
15	*L. brevis 3*	26,8±1,2	8,1±0,7	9,6±0,8	20,4±1,9	11,6±0,8	7,3±0,8	2,2±0,2	13,8±0,7

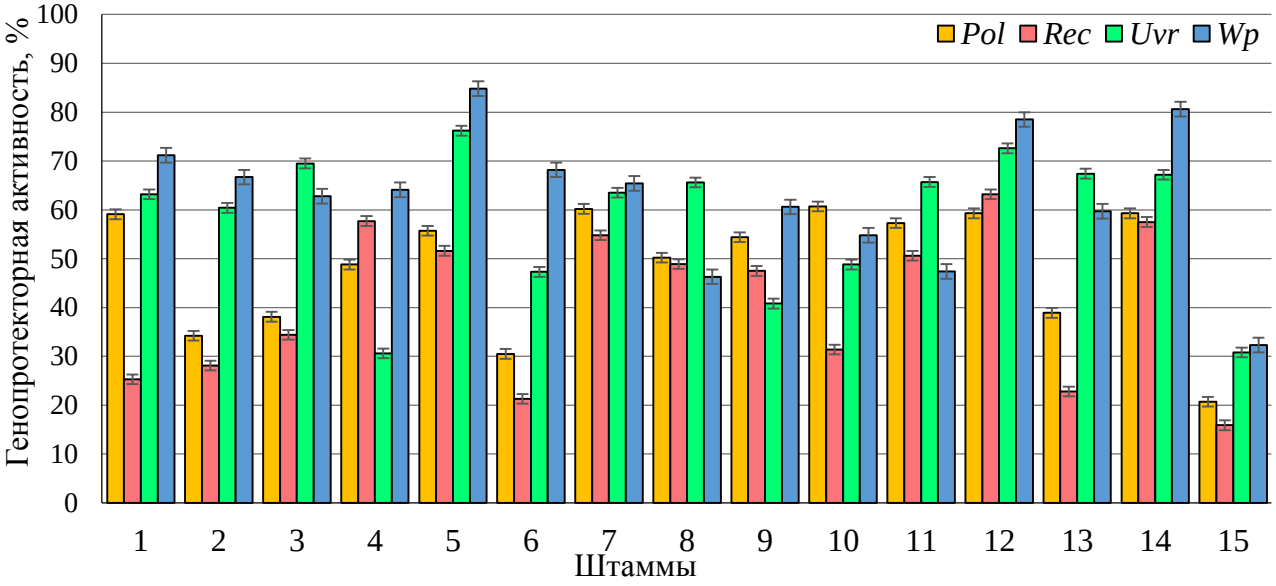
У большинства штаммов *L. casei* и *L. fermentum* пик антимутагенной активности приходится на штамм *Pol*, дефектный по ДНК-полимеразе1, из чего можно предположить, что метаболиты данных штаммов способны активизировать системы до- и постреплекативной репарации, в процессе которой устраняются «бреши» во вновь синтезируемой цепи ДНК. Для штаммов *L. plantarum* картина не однозначная, пик активности наблюдается, как на штамме *Uvr*, с нарушенной экцизионной репарацией *L. plantarum* 1, так и на штамме *Pol*, у *L. plantarum 21*.

Из мутагенных по репарации штаммов наибольшую чувствительность к мутагену демонстрировал мутантный штамм *rec,* у которого практически полностью отсутствует процесс пострепликативной репарации, также на этом штамме наблюдается минимальный защитный эффект. Вероятно, подобные расхождения обуславливаются различными механизмами возникновения мутаций в клетках тест-штаммов под действием фурацилина. Следует отметить, что практически все исследуемые культуральные жидкости лактобактерий за исключением *L. casei 16, L. fermentum 12* и *L. plantarum 24* демонстрируют максимальный эффект

на тест-штамме *E. coli* дикого типа, что свидетельствует о полифункциональном характере действия продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

Установлено, генопротекторные свойства исследуемых объектов существенно зависят также от дозы антимутагена, повышение концентрации культуральной жидкости в пять раз существенно усиливает ее защитное действие на клетки *E. coli* (эксперимент проводили по 2 варианту), причем и в этом случае, также прослеживается зависимость полученного эффекта от возраста лактобактерий, так генопротекторная активность культуральных жидкостей, отобранных в фазу замедленного роста (рис 3.17 а) выше по сравнению с таковой, отобранной в стационарную фазу роста (рис. 3.17 б).

а) фаза замедленного роста



б) стационарная фаза роста

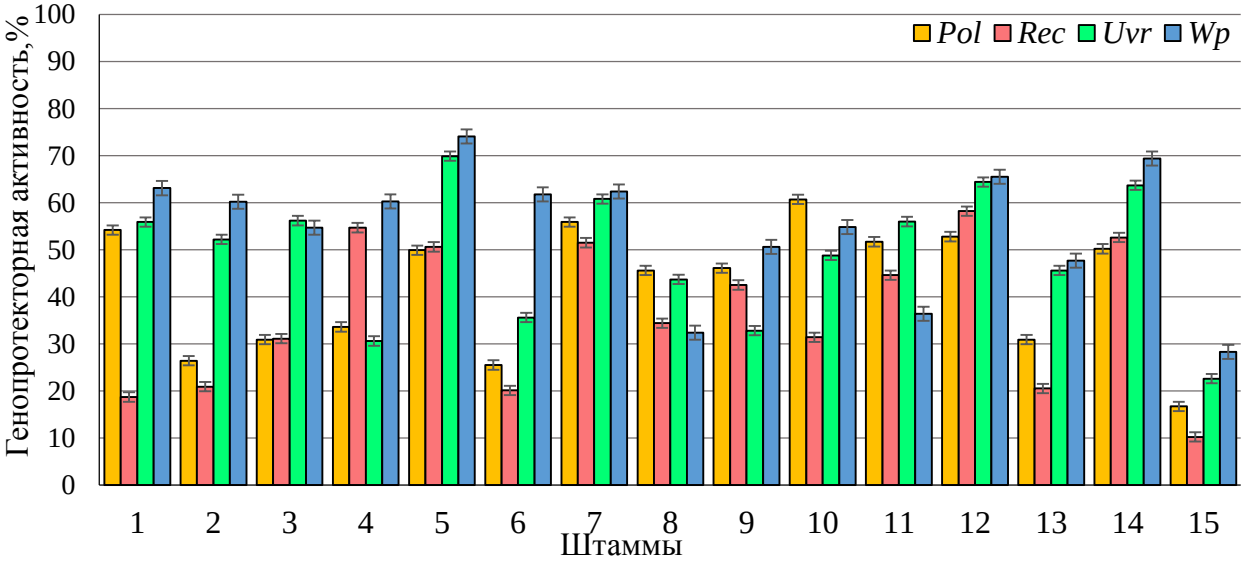


Рисунок 3.17 – Генопротекторный эффект концентрированной культуральной жидкости молочнокислых бактерий

Известно, что большинство химических мутагенов является веществами чужеродными для организма (ксенобиотиками), и при их проникновении в организм важную роль в проявлении их биологической активности играют ферментные системы. В большинстве случаев процесс превращения химических соединений расценивается как фактор детоксикации. Однако, известно, что многие вещества, будучи инертными в виде исходной молекулы, метаболизируются с образованием реакционно-способных структур, способных взаимодействовать с макромолекулами клетки. Метаболическая активация химических соединений обычно происходит в микросомах клеток печени животных, в том числе и человека, под влиянием ферментов монооксигеназ смешанных функций. Для того, чтобы учесть этот процесс, в среду культивирования микроорганизмов вносят микросомную фракцию S9, полученную из клеток печени крыс [1, 29].

Результаты исследования генопротекторных свойств продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий в условиях метаболической активации *in vitro* представлены в таблице 3.13. На данном этапе культуральные жидкости отбирали в фазу замедленного роста, концентрировали в пять раз, эксперимент проводили с предварительной инкубацией тест-штаммов *E. coli* (вариант 2).

Таблица 3.13 – Генопротекторное действие метаболически активированной культуральной жидкости против мутагенеза, индуцированного фурацилином у тест-штаммов *E. coli*

№ п/п	Штамм	Генопротекторная активность, %			
		Wp	*Pol*	*Rec*	*Uvr*
1	*L. casei 1*	70,6±3,1	59,1±2,8	24,4±1,4	62,6±3,0
2	*L. casei 7*	64,7±2,5	32,8±2,2	28,0±1,9	57,2±2,2
3	*L. casei 16*	60,8±3,2	35,7±2,6	31,9±1,7	69,1±2,9
4	*L. casei 23*	64,0±2,2	47,5±2,9	56,1±2,9	28,8±2,0
5	***L. casei 32***	**81,3±3,6**	**53,2±2,5**	**50,4±2,2**	**72,6±3,4**
6	*L. casei 36*	67,5±2,4	30,5±2,1	21,1±1,5	44,9±2,4
7	***L. fermentum 10***	**61,8±3,0**	**56,7±2,8**	**53,1±2,7**	**61,0±2,9**
8	*L. fermentum 12*	44,5±2,0	48,2±2,8	45,9±2,1	63,3±2,5
9	*L. fermentum 13*	57,6±2,8	52,0±2,6	42,5±2,6	37,6±2,1
10	***L. plantarum 24***	**72,8±3,7**	**56,4±2,6**	**60,2±3,0**	**68,3±3,2**
11	*L. plantarum 1*	45,8±2,6	56,0±2,5	48,1±2,7	62,5±2,8
12	*L. plantarum 21*	50,5±2,4	58,7±2,1	31,2±2,4	50,2±2,4
13	*L. acidophilum 9*	59,1±2,4	35,4±2,2	21,3±2,1	65,7±3,3
14	***L. bavaricus6***	**76,3±3,7**	**58±2,6**	**55,6±2,4**	**64,8±3,2**
15	*L. brevis 3*	30,4±2,5	20,1±1,7	13,6±1,2	27,5±1,8

Метаболическая активация практически не изменяла зарегистрированный эффект, это позволяет предположить, что и при проникновении в организм человека продуктов метаболизма молочнокислых бактерий их положительные свойства будут сохраняться.

Таким образом, результаты, полученные в ДНК-повреждающем тесте, показывают, что метаболиты, синтезируемые исследуемыми штаммами молочнокислых бактерий, проявляют значительный биоантимутагенный эффект, действуя на внутриклеточном уровне. Способность к образованию таких веществ лактобактериями, входящими в состав многих продуктов питания, имеет особое значение, так как биоантимутагены в отличие от десмутагенов универсальны по характеру своего действия [1, 29].

По полученным экспериментальным данным было выявлено пять штаммов: *L. casei 32, L. fermentum 10, L. fermentum 13, L. bavaricus 6 и L. plantarum 24*, метаболиты которых проявляют наибольший генопротекторный эффект против повреждающего действия фурацилина.

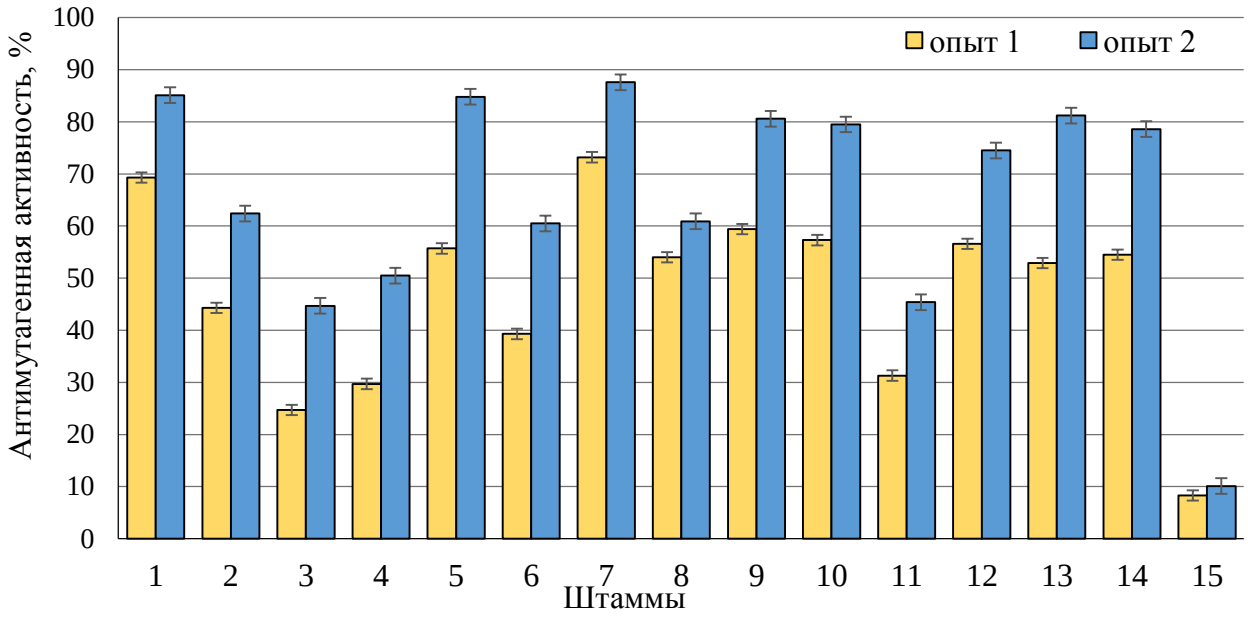
3.4.2 Изучение антимутагенной активности продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий

Для определения антимутагенных свойств продуктов жизнедеятельности исследуемых штаммов молочнокислых бактерий использовали модифицированный тест Эймса /196/, который позволяет определить способность химических соединений индуцировать генные обратные мутации к гистидиновой прототрофности $his^- \rightarrow his^+$ у тестерного штамма *Salmonella typhimurium TA 100*. В качестве мутагена использовали нитрит натрия в концентрации 45 мг/мл. В исследованиях использовали неконцентрированные (опыт 1) и сконцентрированные в пять раз (опыт 2) культуральные жидкости, отобранные в фазы замедленного роста и стационарную фазу.

Результаты проведенных исследований подтвердили ранее сделанные выводы о высоких антимутагенных свойствах штаммов *L. casei 32, L. fermentum 10, L. fermentum 13, L. bavaricus 6 и L. plantarum 21*, метаболиты которых проявляют максимальное антимутагенное действие против мутагенеза, индуцируемого нитритом натрия у *Salmonella typhimurium TA 100* (рис. 3.18). Кроме того, при помощи теста Эймса была выявлена высокая антимутагенная активность у штаммов *L. casei 1* и *L. acidophilum 9.* Данные штаммы демонстрируют антимутагенный эффект на уровне 75-85 %. Антимутагенная активность других криорезистентных штаммов составляет 40-45 %, за исключением

штамма *L. brevis 3*, метаболиты которого, как показали исследования, не проявляет генопротекторную и антимутагенную активность.

а) фаза замедленного роста



б) стационарная фаза роста

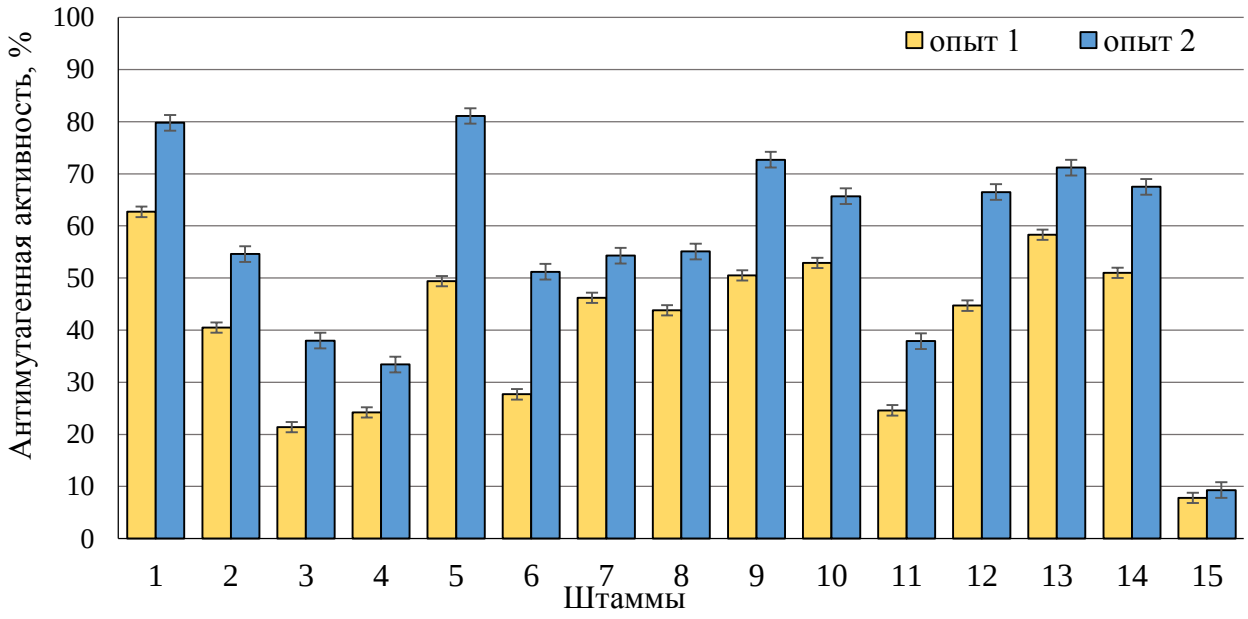


Рисунок 3.18 – Антимутагенное действие метаболитов молочнокислых бактерий против мутагенеза, индуцируемого нитритом натрия у *Salmonella typhimurium TA 100*

Сравнительное изучение антимутагенного действия метаболитов молочнокислых бактерий против мутагенеза, индуцируемого нитритом натрия у *Salmonella typhimurium TA 100* показало, что антимутагенная активность зависит не только от вида и штамма молочнокислых бактерий, но и от фазы роста микроорганизмов и дозы антимутагена в

среде, что согласуется с ранее полученными нами данными по изучению генопротекторных свойств.

Многочисленные исследования свидетельствуют об антимутагенных эффектах соединений белковой природы и органических кислот, являющихся продуктами жизнедеятельности целого ряда микроорганизмов [29, 30, 38, 154, 169, 216, 248, 327].

Полученные результаты изучения генопротекторных и антимутагенных свойств культуральной жидкости молочнокислых бактерий могут быть обусловлены присутствием в многокомпонентной смеси, какой является культуральная жидкость, какого-то одного соединения, но возможно, что зарегистрированный эффект связан не с одним веществом, а является результатом совместного действия нескольких компонентов. Известно, что вещества в смеси могут проявлять синергический эффект, влияя друг на друга, в результате чего повышается или понижается биологическая активность комплекса [38].

Способность молочнокислых бактерий, входящих в состав многих продуктов питания, образовывать подобные вещества, имеет особое значение, так как проявляемый внутриклеточный механизм защиты генома предполагает его универсальность, и, следовательно, применимость для профилактики генетических заболеваний у человека.

3.5 Оценка антиоксидантной активности криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий

Внимание исследователей в последнее время привлекает антиоксидантная активность молочнокислых бактерий. Синтезируемые ими ферменты каталаза, супероксиддисмутаза, глютатион-S-трансфераза, глютатионредуктаза. глютатионпероксидаза и др. являются эффективными компонентами антиоксидантной системы, обеспечивающей высокую резистетность клеток к действию активных форм кислорода [13, 50, 195, 220, 267, 282, 326]. Антиоксидантные свойства могут проявлять также витамины, белки, аминокислоты [13, 50, 156] и экзополисахариды, продуцируемые молочнокислыми бактериями [195, 220, 221, 267, 282, 326].

Многочисленными эпидемиологическими и клиническими исследованиями подтверждена важная роль антиоксидантов в защите от преждевременного старения, профилактике онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. Для того чтобы предотвратить окислительный стресс, в последнее время большое внимание уделяется антиоксидантной терапии, т.е. обеспечению в рационе питания нужного количества антиоксидантов, в первую очередь природных.

На наш взгляд, перспективным является включение в состав стартовых заквасок для производства продуктов питания, в основе которых лежит процесс молочнокислой ферментации сырья, культур молочнокислых бактерий, проявляющих высокую антиоксидантную активность и способных эффективно подавлять окислительные процессы, протекающие в липидной фракции продуктов питания при хранении.

Данный раздел экспериментальной работы посвящен изучению антиоксидантного потенциала выделенных нами криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий с помощью различных лабораторных анализов *in vitro* и *in vivo,* объектами исследования служили их внутриклеточные экстракты (ВКЭ) и культуральные жидкости (КЖ).

3.5.1 Изучение антиоксидантной активности молочнокислых бактерий *in vitro*

Об антиоксидантной активности клеток и метаболитов молочнокислых бактерий судили по восстанавливающей силе; антирадикальной активности; по продуктам окисления, реагирующим с 2-тиобарбитуровой кислотой; по продуктам окисления β-каротина в присутствии перекиси водорода, активности супероксиддисмутазы (СОД). Результаты исследования антиоксидантного потенциала молочнокислых бактерий, полученные различными методами, представлены в таблице 3.14.

Результаты исследования показали, что антиоксидантную активность проявляют как внутриклеточные экстракты лактобактерий, так и их метаболиты.

Установлено, что наибольшей восстанавливающей силой (свыше 50 %) обладают молочнокислые бактерии *L. casei 32* и *L. bavaricus 6.* Максимальную антирадикальную активность проявляют внутриклеточные экстракты *L. casei 32* (84,7 %), *L. bavaricus 6* (74,6 %) и культуральные жидкости штаммов *L. casei 32* (78,2 %) и *L. acidophilum 9* (73,2 %). Результаты исследования общей антиоксидантной активности, определяемой по продуктам окисления, реагирующими с 2-тиобарбитуровой кислотой, показали, что антиоксидантная активность культуральных жидкостей лежит в диапазоне 65-75%, внутриклеточных экстрактов 50-70 %. Максимальную антиоксидантную активность, определяемую по данному методу проявляют культуральные жидкости *L. casei 32, L. fermentum 10, L. acidophilum 9* и *L. bavaricus 6.* При исследовании антиоксидантной активности культур молочнокислых бактерий в β-каротин - H_2O_2 -модели показано, что все исследуемые объекты обладают высоким антиоксидантным потенциалом, максимальную способностью тормозить процессы разрушения β-каротина под воздействием перекиси водорода

(в пределах 80-95%) проявляют штаммы *L. casei 32, L. fermentum 10, L. plantarum 21, L. acidophilum 9* и *L. bavaricus 6.*

По уровню активности супероксиддисмутазы можно выделить штаммы видов *L. casei* и *L. fermentum,* отличающиеся максимальными значениями активности фермента антиоксидантной системы клеток.

Таблица 3.14 – Антиоксидантная активность молочнокислых бактерий

№ п/п	Штамм	Объект	Анти-радикальная активность,%	Ингибирование окисления липидов, %	Ингибирование деструкции β-каротина,%	Восстанав-ливающая сила, %	СОД, ед./мг белка
1	*L. casei 1*	ВКЭ	64,3±2,2	50,3±2,4	73,4±3,1	40,8±1,7	0,71±0,12
		КЖ	66,5±2,5	66,5±2,9	78,9±3,6	37,0±1,4	-
2	*L. casei 7*	ВКЭ	34,2±1,3	56,2±2,2	75,4±2,9	29,4±1,2	0,52±0,10
		КЖ	27,9±1,2	65,1±3,1	69,0±2,5	26,5±1,2	-
3	*L. casei 16*	ВКЭ	42,7±1,9	53,0±2,4	69,7±2,8	32,7±1,4	0,82±0,15
		КЖ	39,0±1,4	67,4±3,0	78,5±3,7	34,6±1,5	-
4	*L. casei 23*	ВКЭ	51,5±2,1	60,4±2,8	72,0±3,2	36,7±1,5	**1,34±0,24**
		КЖ	43,7±1,7	65,5±3,2	76,6±3,5	31,9±1,4	-
5	***L. casei 32***	ВКЭ	**84,7±2,5**	62,3±2,9	**82,1±3,9**	**57,3±1,8**	**2,07±0,31**
		КЖ	**78,2±2,5**	**75,1±3,4**	**94,5±4,1**	**52,1±1,6**	-
6	*L. casei 36*	ВКЭ	56,5±1,7	67,8±3,0	69,9±2,8	37,7±1,3	1,63±0,26
		КЖ	52,3±1,6	70,2±3,5	66,5±2,5	34,0±1,2	-
7	***L. fermentum 10***	ВКЭ	60,8±1,9	64,9±3,1	**87,4±3,7**	40,1±1,5	**2,16±0,35**
		КЖ	49,2±1,4	**78,0±3,7**	**83,3±3,5**	39,2±1,4	-
8	*L. fermentum 12*	ВКЭ	24,9±1,1	61,6±2,9	74,6±3,1	43,6±1,4	0,35±0,19
		КЖ	31,3±1,3	67,9±3,3	76,3±3,2	45,2±1,5	-
9	*L. fermentum 13*	ВКЭ	43,4±1,5	67,4±3,2	70,2±3,0	24,9±0,9	0,96±0,27
		КЖ	39,5±1,5	66,2±3,0	68,4±3,1	26,4±1,2	-
10	***L. plantarum 24***	ВКЭ	60,6±1,8	52,7±2,5	**80,3±3,8**	44,7±1,6	**1,78±0,11**
		КЖ	**73,2±2,2**	**74,5±3,6**	**81,2±3,4**	39,0±1,5	-
11	*L. plantarum 1*	ВКЭ	52,0±1,7	53,1±1,2	73,7±3,2	32,2±1,4	0,67±0,18
		КЖ	34,2±1,5	69,0±1,2	79,2±3,5	30,5±1,2	-
12	***L. plantarum 21***	ВКЭ	43,8±1,8	51,8±1,2	**85,7±4,0**	39,2±1,7	0,54±0,20
		КЖ	56,1±1,6	**70,1±1,2**	**81,1±3,9**	36,7±1,6	-
13	*L. acidophilum 9*	ВКЭ	27,6±1,1	59,5±1,2	63,8±3,1	45,3±1,9	**1,22±0,32**
		КЖ	29,1±1,2	69,7±1,2	64,1±3,2	38,8±1,6	-
14	***L. bavaricus 6***	ВКЭ	**74,6±2,3**	63,3±1,2	**90,2±4,3**	**60,3±1,8**	0,41±0,10
		КЖ	63,1±1,9	**79,1±1,2**	**83,6±4,1**	**54,9±1,2**	-
15	*L. brevis 3*	ВКЭ	12,5±0,8	50,8±1,2	61,4±3,0	25,4±1,2	0,16±0,05
		КЖ	16,2±0,8	66,3±1,2	64,8±3,2	27,0±1,0	-

Примечание: ВКЭ – внутриклеточный экстракт, КЖ – культуральная жидкость, СОД – супероксиддисмутаза

Таким образом, исследуемые штаммы криорезистентных молочнокислых бактерий проявляют различные антиоксидантные свойства, что объясняется индивидуальными особенностями метаболизма исследуемых культур.

На следующем этапе работы было изучено влияние штаммов *L. casei 32*, *L. acidophilum 9* и *L. plantarum 24,* обладающих высоким антиоксидантным потенциалом на окислительные изменения липидов, протекающие в пищевом сырье. Следует подчеркнуть, что данные штаммы не проявляют липолитическую активность (рис. 3.15), что позволяет исключить влияние гидролитических процессов, протекающих в липидах с участием липаз, продуцируемых молочнокислыми бактериями.

При проведении экспериментальной работы в качестве пищевого сырья использовали говядину высшего сорта, свинину полужирную и грудные мышцы кур. Для проведения исследований были изготовлены опытные образцы модельно-фаршевых систем из мясного сырья с содержанием составляющего жира-сырца 25 %. В полученный фарш вносили молочнокислые закваски в количестве 10^7 КОЕ/г. Контрольные образцы готовили без молочнокислых бактерий.

О влиянии стартовых культур на химическую стабильность жиров мясного сырья судили по кислотному, перекисному, йодному и тиобарбитуровому числам липидов. Результаты исследований показателей окислительной порчи липидов модельно-фаршевых систем представлены в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Влияние молочнокислых бактерий на химическую стабильность липидов мясного сырья

Штамм	Перекисное число, 10^{-2} г/100 г			Кислотное число, мг КОН/г			Тиобарбитуровое число, мг МДА/кг		
	0 ч	24 ч	48 ч	0 ч	24 ч	48 ч	0 ч	24 ч	48 ч
Говядина									
Контроль	5,2	12,3	14,5	0,3	1,6	2,6	0,12	0,26	0,42
L. casei 32	5,0	9,9	11,1	0,2	0,4	1,4	0,12	0,14	0,28
L. acidophilum 9	4,8	10,8	12,8	0,3	1,0	1,7	0,10	0,19	0,31
L. plantarum 24	5,1	11,6	13,2	0,3	0,8	1,8	0,12	0,16	0,24
Свинина									
Контроль	5,6	12,9	15,3	0,7	1,3	2,8	0,14	0,39	0,56
L. casei 32	5,5	10,0	11,7	0,6	1,0	1,7	0,15	0,22	0,31
L. acidophilum 9	5,6	11,4	12,0	0,6	1,4	1,9	0,15	0,27	0,44
L. plantarum24	5,6	10,5	12,6	0,8	1,2	2,2	0,13	0,25	0,39
Курица									
Контроль	6,02	13,6	16,4	1,1	2,6	3,9	0,10	0,41	0,62
L. casei 32	5,8	10,2	12,6	1,0	2,0	2,5	0,11	0,18	0,35
L. acidophilum 9	5,9	11,5	13,1	1,1	1,9	2,4	0,10	0,33	0,49
L. plantarum 24	5,8	11,9	14,2	1,2	2,2	3,0	0,10	0,24	0,38

Начальный этап окисления липидов связан с образованием гидроперекисей, по изменению количества которых можно судить о глубине протекания данного процесса.

Анализ полученных данных по содержанию перекисей в опытных образцах показал, что процесс их образования протекает интенсивнее в первые часы хранения, так через 24 ч их количество в среднем увеличивается в 2 раза, тогда как при дальнейшем хранении кислотное число возрастает не столь интенсивно. Через 48 ч хранения модельных фаршевых систем при температуре 2±2 ^{0}С количество перекисей увеличилось в среднем в 2,4 раза от первоначальных значений, при этом внесение культур молочнокислых бактерий позволяет замедлить процесс образования перекисей. Кислотные числа опытных образцов через 48 ч хранения фаршей ниже контрольных на 15-21 % в зависимости от вида мясного сырья и вносимой культуры молочнокислых бактерий. Наименьшие значения кислотных чисел мясных фаршей из говядины, свинины и курицы были получены при использовании культуры *L. casei 32.*

О глубине гидролитических процессов, протекающих в модельно-фаршевых системах, судили по содержанию жирных кислот, которые характеризуется кислотным числом. По кислотному числу судят о гидролитическом распаде триглицеридов с образованием низкомолекулярных жирных кислот, именно с этими процессами специалисты связывают характерное изменение вкуса мясной продукции.

Результаты исследования показывают, что в контрольных модельно-фаршевых системах гидролитические процессы протекают интенсивнее, чем в опытных образцах, приготовленных с внесением культур молочнокислых бактерий *L. casei 32, L. acidophilum 9, L. plantarum 24,* при этом, в образцах из курицы данный процесс протекал интенсивнее, чем из свинины и говядины. Так, кислотные числа контрольных фаршей из говядины, свинины и курицы через 48 ч составили 2,6, 2,8 и 3,9 мг КОН/г, тогда как с применением заквасочных культур лактобактерий – 1,6, 1,9 и 2,0 мг КОН/г соответственно. Таким образом, при внесении культур молочнокислых бактерий в модельно-фаршевые системы существенно снижается интенсивность гидролитического распада липидов мяса (в 1,5-2,0 раза в зависимости от вида используемого мясного сырья).

По количеству вторичных продуктов окисления жира, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в первую очередь малонового диальдегида (МДА), судят об интенсивности протекания окислительных процессов в липидах пищевых продуктов.

Установлено, что первоначальное содержание малонового диальдегида в мясных фаршах составило 0,10-0,15 мг МДА/кг и существенно не зависело от вида применяемого сырья. Однако, уже через 24 ч хранения образцов в охлажденном виде, выявлено существенное снижение скорости процесса образования вторичных продуктов окисления липидов мяса в опытных образцах (с применением культур молочнокислых бактерий) по

сравнению с контрольными образцами. Количество малонового диальдегида в опытных образцах через 48 ч хранения в среднем на 35 % меньше по сравнению с контрольными. Показано, что применение лактобактерий *L. casei 32* и *L. plantarum 24* позволяет существенно снизить окислительные процессы в липидах говядины, свинины и птицы.

Изучение влияния молочнокислых бактерий *L. casei 32, L. acidophilum 9, L. plantarum 24* на химическую стабильность липидов говядины, свинины и курицы показало, что исследуемые культуры позволяют существенно снизить скорость гидролитических и окислительных процессов, протекающих в липидной фракции при хранении, что свидетельствует о высокой антиокислительной активности данных лактобактерий. Интересным является факт, что стартовые культуры молочнокислых бактерий позволяют существенно снизить количество в мясе вторичных продуктов окисления липидов, представляющих опасность для здоровья человека.

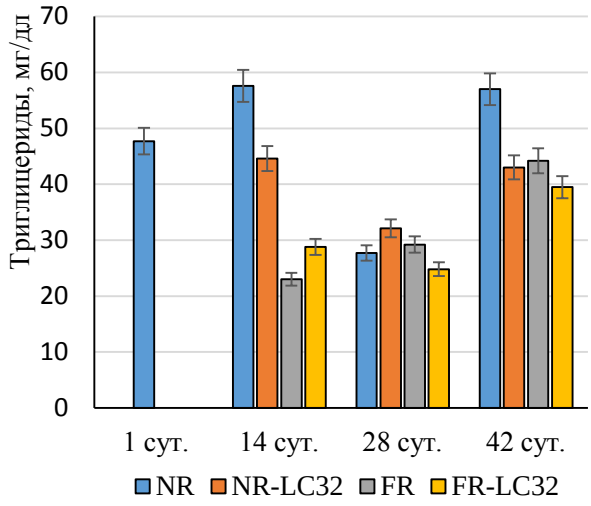
Таким образом, результаты исследования антиоксидантной активности криорезистентных молочнокислых бактерий показали, что штамм *L. casei 32* проявляет высокие антиокислительные свойства, способен эффективно подавлять окислительные и гидролитические процессы, протекающие в липидах при хранении пищевых продуктов.

3.5.2 Изучение антиоксидантной активности штамма *L. casei 32 in vivo*

В работе проводили оценку антиоксидантного потенциала штамма *L. casei 32* на лабораторных животных – белых крысах породы Вистар. Материалом для исследования служили кровь и ткань печени животных. Изучали показатели, отражающие состояние «структурного» антиоксиданта – активности аспартатаминотрансферазы (АЛТ) и аланинаминотрансферазы (АСТ), определяли содержание триглицеридов, холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов в клетках животных оценивали по перекисному и кислотному числам липидов печени, а также по концентрации субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в клетках печени и сыворотке крови.

Показано, что введение в рацион питания обезжиренного молока, сквашенного *L. casei 32* приводит к достоверному по сравнению с контролем снижению уровня холестерина и триглицеридов в крови животных на 14 сут. эксперимента на 49,9 % и 22,5 % соответственно, на 42 сут. на 30,7 % и 24,6 %, как в случае введения штамма в нормальный рацион, так и в жировой (рис. 3.19).

а) триглицериды



б) холестерин

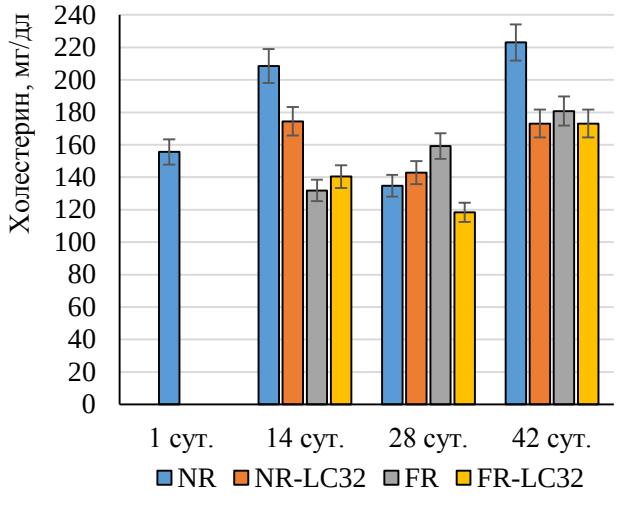
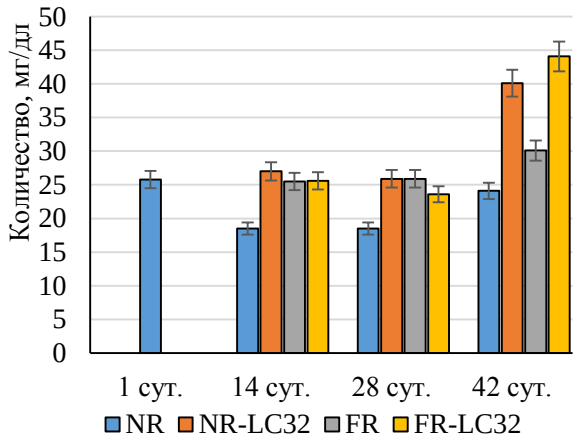


Рисунок 3.19 – Динамика концентрации триглициридов и холестерина в крови крыс

При изучении таких важнейших показателей липидного обмена в крови, как количество различных классов липопротеинов (рис. 3.20) было установлено, что в течение 28 сут. на фоне жирового рациона наблюдается увеличение в крови липопротеинов высокой и низкой плотности на 40,1 % и 50,0 % соответственно. Через 42 сут. эксперимента отмечается существенный положительный эффект введения в рацион питания животных *L. casei 32* – содержание липопротеинов высокой плотности увеличивается на 66,4 % и 46,5 % на фоне нормального и жирового рационов соответственно. Выявлено, что по окончании эксперимента наблюдаются также выраженные изменения содержания липопротеинов низкой плотности, так их количество уменьшается в крови белых крыс всех опытных групп на 25,2 %.

а) липопротеины высокой плотности



б) липопротеины низкой плотности

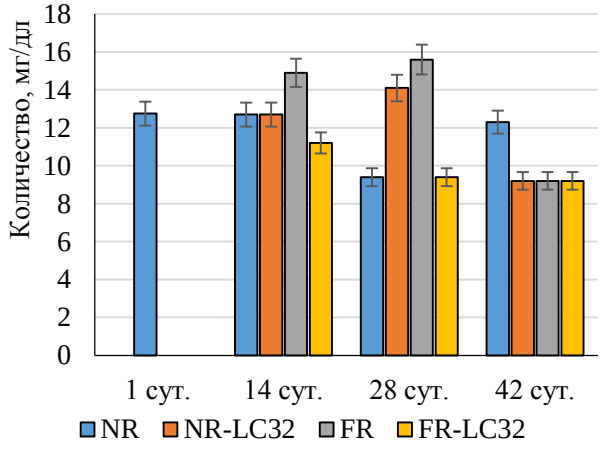


Рисунок 3.20 – Динамика содержания липопротеинов высокой и низкой плотности в крови белых крыс

Таким образом, экспериментально установлено, что введение в рацион питания штамма *L. casei 32* положительно влияет на индекс атерогенности (рис. 3.21), отражающий степень нарушения холестеринового обмена.

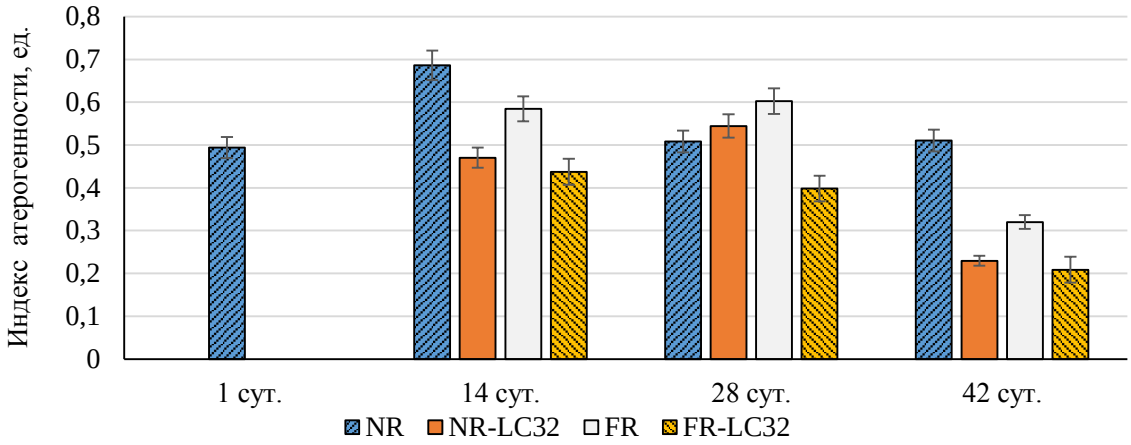


Рисунок 3.21 – Влияние различных рационов на индекс атерогенности

На протяжении всего периода исследований отмечается достоверное снижение индекса атерогенности, так в условиях стандартного рациона данный показатель снижается на 54,9 %, в условиях жирового рациона – на 34,4 % относительно контроля.

При изучении влияния рационов питания на концентрацию аминотрансфераз в плазме крови крыс было установлено, что жировой рацион не приводит к изменению уровня аланинаминотрансферазы, но вызывает увеличение концентрации аспартатаминотрансферазы на 28 сут. эксперимента на 40,7 %, на 42 сут. – на 19,3 % (рис. 3.22), что свидетельствует о ферментативной гипофункции печени животных на фоне жировой диеты.

Выявлено, что в группах, в которых животные получали дополнительно к рациону *L. casei 32* уровень аспартатаминотрансферазы достоверно снижался на фоне стандартного рациона (на 42 сутки эксперимента разница составила 25,7 %), однако данный факт не был достоверно подтверждён на опытной группе белых крыс, находившихся на жировой диете с добавлением ферментированного молока штаммом *L. casei 32.* Следует отметить, что добавление в рацион данного штамма позволяет достоверно снизить уровень аланинаминотрансферазы в плазме крови белых крыс на 49,5 % на фоне жировой диеты.

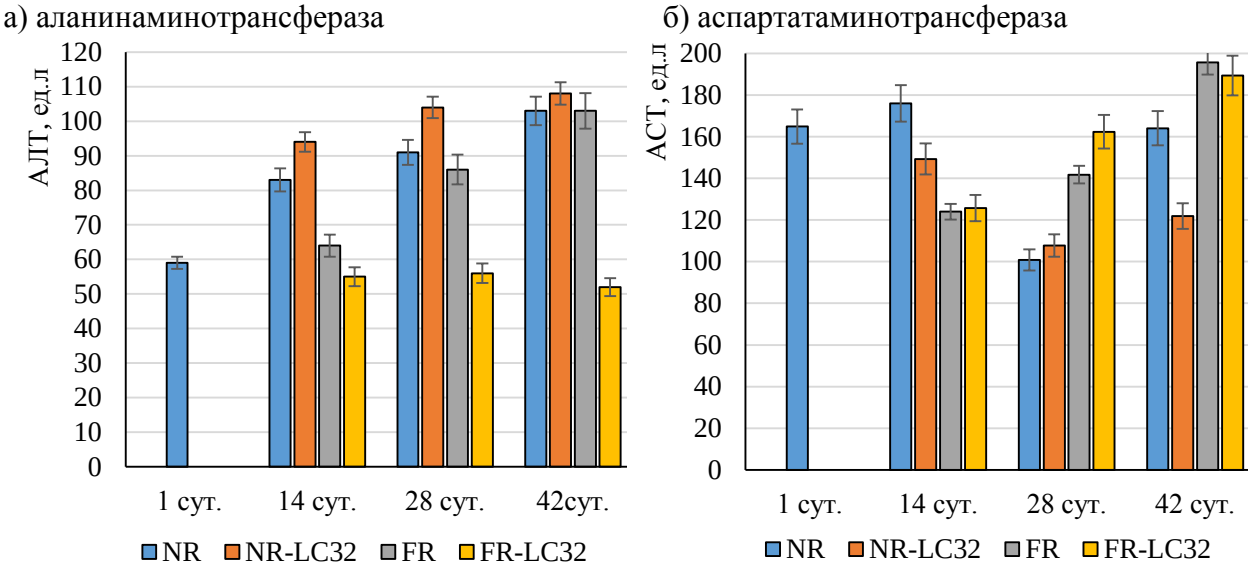


Рисунок 3.22 – Концентрация аминотрансфераз в плазме крови крыс

Установлено, что длительное потребление высоколипидной диеты приводит к изменениям, характерным для активизации процессов свободнорадикального окисления и снижения антиоксидантной защиты, доказательством чего было увеличение концентрации веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в клетках печени и сыворотке крови в 1,5 и 3,8 раза (рис. 3.23), а также перекисного и кислотных чисел клеток печени на 21,4 % и 14,7 % (рис. 3.24) соответственно по сравнению с показателями у животных в контрольной группе. Введение в рацион *L. casei 32* позволяет нормализовать процессы окисления в клетках печени белых крыс, вызываемые жировой диетой, а также снизить тиобарбитуровые числа липидов в клетках печени и сыворотке крови животных на 25,2 % и 29,8 % как при основном, так и при жировом рационе.

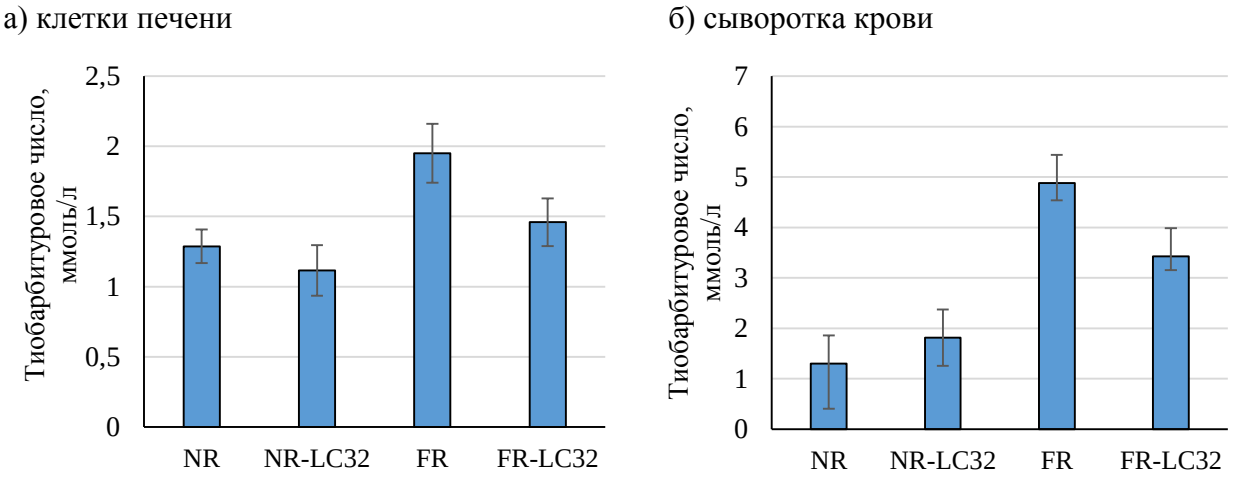


Рисунок 3.23 – Концентрация субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в клетках печени и сыворотке крови белых крыс

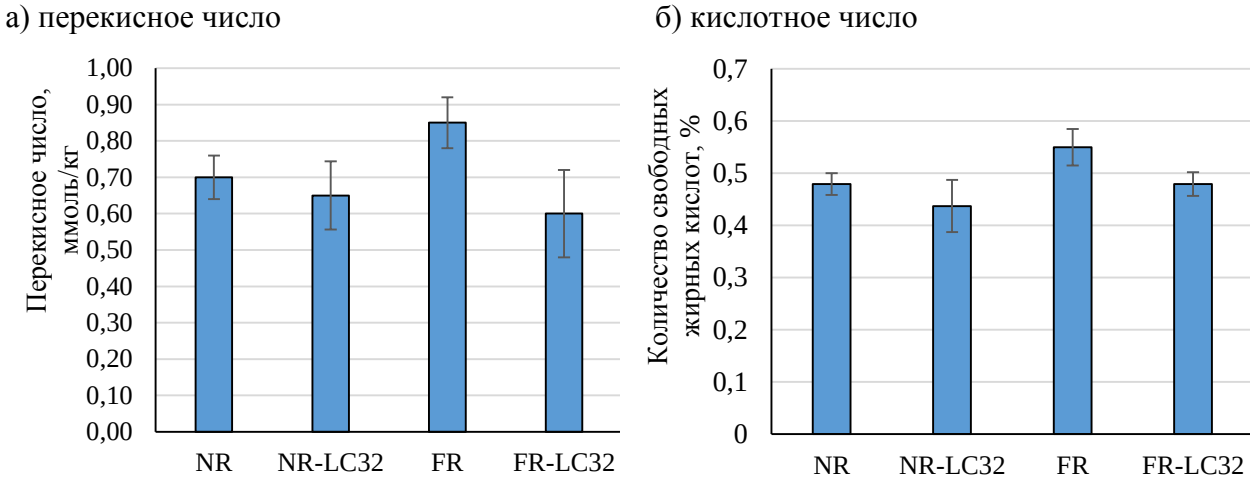


Рисунок 3.24 – Перекисные и кислотные числа липидов печени белых крыс

Анализ полученных результатов позволяет сделать заключение о том, что исследуемый криорезистентный штамм *L. casei 32* оказывает положительное действие в условиях экспериментальной жировой диеты у крыс, данный штамм обладает значительным антиоксидантным потенциалом, доказанным в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo.*

В таблице 3.16 представлены данные по изучению влияния рационов питания с включением штамма *L. casei 32* на количество микроорганизмов толстом кишечнике белых крыс через 42 сут. эксперимента.

Таблица 3.16 – Количество микроорганизмов в толстом кишечнике белых крыс

Группа микроорганизмов	Вариант эксперимента			
	NR	NR-LC32	FR	FR-LC32
Молочнокислые бактерии, Lg КОЕ/г	9,83±0,57	9,81±0,25	10,17±0,48	10,04±0,09
Дрожжи, Lg КОЕ/г	5,70±0,52	5,13±0,16	6,53±0,25	6,05±0,45
Бактерии группы кишечной палочки, Lg КОЕ/г	3,96±0,93	3,34±0,56	3,60±0,76	2,89±0,50
Staphilococcus sp. , Lg КОЕ/г	2,99±0,28	2,62±0,07	2,97±0,03	1,94±0,22
E. coli, КОЕ/г	30±8	14±4	5±1	3±1

Выявлено, что обогащение рациона лабораторных животных лактобактериями *L. casei 32* не приводит к достоверному увеличению количества клеток молочнокислых бактерий в составе их микробиоты, однако достоверно угнетает рост и развитие дрожжеподобных грибов, бактерий группы кишечной палочки и стафилококков на 10 %,

15,7 % и 12,4 % соответственно на фоне основного рациона по сравнению с показателями у животных в контрольной группе.

Следует отметить, что обозначенная тенденция сохраняется также и при использовании высоколипидного рациона, так на фоне жировой диеты количество клеток снижается на 7,4 %, 19,7 % и 34,7 % для дрожжей, бактерий группы кишечной палочки и бактерий *Staphilococcus spp.*

Полученные данные согласуются с результатами проведенных нами исследований по изучению антагонистической активности данного штамма (табл. 3.7).

Таким образом, результаты проведенных исследований доказывают положительное влияние *L. casei 32* на состояние липидного обмена у лабораторных животных как на фоне стандартной, так и жировой диеты, что свидетельствуют об антиоксидантной активности изучаемого штамма и указывает на целесообразность и перспективность его применения для производства продуктов питания повышенной пищевой ценности, а также пробиотических препаратов.

3.6 Генотипирование перспективных штаммов лактобактерий

Идентификация молочнокислых бактерий только на основании морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков в настоящее время является недостаточной, поскольку под воздействием различных факторов многие виды обладают высоким уровнем фенотипической изменчивости [244].

В результате секвенирования у исследованных штаммов молочнокислых бактерий были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена *16S рРНК* длиной 1437 последовательностей нуклеотидов. Полученные нуклеотидные последовательности были использованы при проведении филогенетического анализа. В качестве сравнения использовали нуклеотидные последовательности генов *16S рРНК* референтных штаммов основных видов рода *Lactobacillus*, полученных из базы данных GenBank (NCBI, США, https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Геномные последовательности штаммов (приложение Б) зарегистрированы в базе данных Genbank с присвоением учетных номеров OQ423483 (*L. plantarum 24*) и OQ423484 (*L. casei 32*). С помощью программного пакета BLAST NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) определены наиболее близкие штаммы, зарегистрированные в базе данных GenBank (табл. 3.17).

Таблица 3.17 – Сравнение идентичности генетических последовательностей исследуемых лактобактерий с базой данных NCBI

Исследуемый штамм	Штамм из базы данных GenBank	Номер GenBank	Гомология, %
L. casei 32	*Lactobacillus casei 2717*	MT 611730.1	100
	Lactobacillus casei 2526	MT 611558.1	100
	Lactobacillus casei 2436	MT 604861.1	100
L. plantarum 24	*Lactobacillus plantarum MBEL2167*	OL 518965.1	100
	Lactobacillus plantarumY1-6-2	OK 326538.1	100
	Lactobacillus plantarum W1-G-6	OK 326488.1	100

Изучена морфология клеток исследуемых штаммов лактобактерий с криорезистентными свойствами при помощи аппаратного комплекса просвечивающей электронной микроскопии атомарного разрешения Hitachi HT7700 Exalens (рис. 3.25).

а) *L. casei 32* б) *L. plantarum 24*

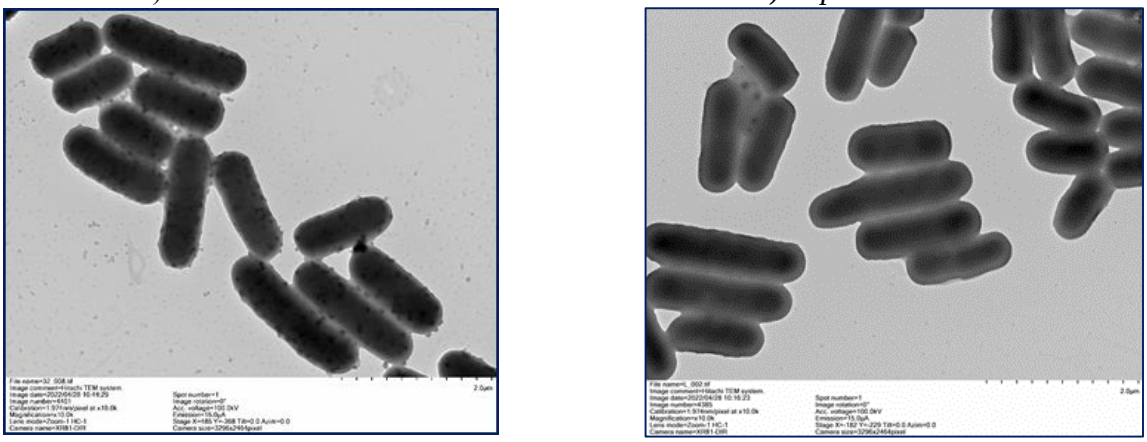


Рисунок 3.25 – Морфология клеток криорезистентных лактобактерий

Таким образом, анализ морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств исследуемых лактобактерий, а также результаты ДНК-секвенирования перспективных штаммов позволяют отнести *L. casei 32* к виду *Lactobacillus casei*, *L. plantarum 24* к виду *Lactobacillus plantarum.*

3.7 Заключение к третьей главе

Интенсивное внедрение в пищевой промышленности криогенных технологий требует новых подходов в разработке заквасочных культур, что обусловлено в первую

очередь снижением жизнеспособности клеток и изменением их функционально-технологических свойств при низкотемпературном воздействии.

В результате направленного отбора криорезистентных функционально-активных молочнокислых бактерий из различных пищевых источников растительного и животного происхождения нами было отобрано 15 перспективных штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus,* обладающих высокой устойчивостью к низкотемпературному воздействию (выживаемость клеток при различных низкотемпературных режимах не менее 80 %). Данные штаммы хорошо размножаются в широком диапазоне температур от 15 до 45 ^{0}C, температурный оптимум составляет 30-37 ^{0}C, оптимальное значение pH 5,5-6,2.

Результаты скрининга их функционально-технологических свойств показали, что все исследуемые штаммы могут быть использованы в пищевой промышленности, так как удовлетворяют главным технологическим требованиям к стартовым культурам ферментируемых продуктов питания – высокой кислотообразующей способностью и антагонистической активностью, устойчивостью к широкому спектру антибиотиков, способностью синтензировать протеолитические и амилолитические ферменты и др. Четыре штамма молочнокислых бактерий – *L. bavaricus 6, L. casei 32, L. plantarum 21* и *L. plantarum 24* характеризуются как наиболее устойчивые к неблагоприятным факторам среды (таким как низкое значение pH, высокие концентрации желчи, NaCl и фенола), что служит основой для прогнозирования их пробиотических свойств, то есть способности сохранения ферментативной активности при прохождении через желудочно-кишечный тракт и приживаемости в кишечнике; три из которых *L. bavaricus 6, L. casei 32* и *L. plantarum 24* проявляют наибольшую антибиотикоустойчивость и антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, что подтверждает их лечебно-профилактические свойства и делает перспективным их использование для создания новых продуктов питания с функциональными свойствами.

По уровню ферментативной активности наиболее эффективны для производства хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов штаммы криорезистентных молочнокислых бактерий *L. casei 32* и *L. fermentum 10,* отличающиеся высокой амилолитической и протеолитической активностью, а также штаммы, продуцирующие амилазы – *L. casei 36, L. acidophilum 9* и протеазы – *L. casei 16, L. plantarum 24, L. plantarum 1, L. plantarum 21*. Кроме того, данные штаммы отличаются низкой липолитической активностью, что позволяет их рекомендовать для производства широкого спектра хлебобулочных изделий, в том числе и сдобных, в рецептурах которых предусмотрено повышенное содержание жиров.

В результате изучения генопротекторной и антимутагенной активности метаболитов криорезистентных лактобактерий были отобраны штаммы *L. casei 32, L. fermentum 10, L. fermentum 13, L. bavaricus 6* и *L. plantarum 21*, метаболиты которых проявляют максимальный генопротекторный эффект против мутагена – фурациллина, а также антимутагенное действие против мутагенеза, индуцируемого нитритом натрия у *Salmonella typhimurium TA 100*. Данные штаммы демонстрируют генопротекторный и антимутагенный эффект на уровне 60-80 % и 75-85 % соответственно. Антимутагенная активность других криорезистентных штаммов составляет 40-45 %, за исключением штамма *L. brevis 3*, метаболиты которого, как показали исследования, не проявляют генопротекторную и антимутагенную активность.

При исследовании антиоксидантной активности криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий выявлено, что штаммы *L. casei 32, L. fermentum10, L. plantarum 21, L. acidophilum 9* и *L. plantarum 24* обладают высоким антиоксидантным потенциалом, причем антиоксидантные свойства проявляют как клетки, так и метаболиты лактобактерий.

Установлено, что наибольшей восстанавливающей силой (свыше 50 %) обладают молочнокислые бактерии *L. casei* 32 и *L. bavaricus 6.* Максимальную антирадикальную активность проявляют внутриклеточные экстракты *L. casei 32* (84,7 %), *L. bavaricus 6* (74,6 %) и культуральные жидкости штаммов *L. casei 32* (78,2 %) и *L. acidophilum 9* (73,2 %). Результаты исследования общей антиоксидантной активности, определяемой по продуктам окисления, реагирующими с 2-тиобарбитуровой кислотой, показали, что антиоксидантная активность культуральных жидкостей лежит в диапазоне 65-75%, внутриклеточных экстрактов 50-70 %. Максимальную антиоксидантную активность, определяемую по данному методу проявляют культуральные жидкости *L. casei 32, L. fermentum 10, L. acidophilum 9* и *L. bavaricus 6.* При исследовании антиоксидантной активности культур молочнокислых бактерий в β-каротин-H_2O_2-модели показано, что все исследуемые объекты обладают высоким антиоксидантным потенциалом, максимальную способностью тормозить процессы разрушения β-каротина под воздействием перекиси водорода (в пределах 80-95%) проявляют штаммы *L. casei 32, L. fermentum 10, L. plantarum 21, L. plantarum 24* и *L. bavaricus 6.*

Установлено, что штаммы молочнокислых бактерий *L. casei 32, L. acidophilum 9, L. plantarum 24* проявляют высокие антиокислительные свойства, активно подавляют окислительные и гидролитические процессы в липидах мясных фаршей.

По уровню активности супероксиддисмутазы можно выделить штаммы *L. casei 32*, *L. plantarum 24* и *L. fermentum 10,* отличающиеся максимальными значениями активности фермента антиоксидантной системы клеток.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что штаммы *L. casei 32, L. plantarum 24* и *L. fermentum 10* обладают устойчивостью к различным стрессовым воздействиям – замораживанию, изменению pH среды, наличию в среде желчи, NaCl, фенола, антибиотикам и окислительному стрессу. Высокая антиоксидантная активность метаболитов и клеток данных штаммов, в частности активность супероксиддисмутазы, вероятно и объясняет их устойчивость к различным стрессовым факторам, в том числе и к низкотемпературной обработке.

Следует особо отметить, что в результате проведенных исследований был установлен интересный факт – штаммы лактобактерий *L. casei 32, L. fermentum 10, L. plantarum 21* и *L. bavaricus 6* проявляют максимальную генопротекторную, антимутагенную и антиоксидантную активность, что свидетельствует о полифункциональном действии как клеток, так и метаболитов молочнокислых бактерий. Наиболее эффективным и перспективным штаммом в данном отношении является *L. casei 32,* проявляющий высокую актиоксидантную активность в системах *in vitro.*

Изучение антиоксидантного потенциала штамма *L. casei 32* на лабораторных животных – белых крысах породы Вистар показало, что введение в рацион питания экспериментальных животных обезжиренного молока, сквашенного исследуемым штаммом, способствует улучшению показателей периферической крови, достоверному по сравнению с контролем снижению в крови животных уровня холестерина, триглицеридов и липопротеинов низкой плотности на 30,7 % и 24,6 %, на 25,2 % соответственно, увеличению содержания липопротеинов высокой плотности на 46,5 % как на фоне нормального, так и жирового рационов. Выявлено, что добавление в рацион животных молока, сквашенного штаммом *L. casei 32* позволяет достоверно снизить уровень аланинаминотрансферазы в плазме крови белых крыс на 49,5 % на фоне жировой диеты. Введение данного штамма *L. casei 32* в рацион лабораторных животных позволяет нормализовать процессы окисления в клетках печени белых крыс, вызываемые жировой диетой, а также снизить тиобарбитуровые числа липидов в клетках печени и сыворотке крови животных на 25,2 % и 29,8 % соответственно. Продемонстрировано положительное воздействие обогащения рациона белых крыс штаммом *L. casei 32* на качественный и количественный состав микробиоты толстого кишечника лабораторных животных. Исследуемый штамм проявляет высокую антагонистическую активность по отношению к

санитарно-значимым микроорганизмам – дрожжеподобным грибам, бактериям группы кишечной палочки и стафилококкам как на фоне основного, так и высоколипидного рационов.

Таким образом, проведенные исследования по направленному отбору криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий и оценке их биотехнологического потенциала позволяют рекомендовать штаммы лактобактерий с расширенным спектром функциональных свойств – *L. casei 32* и *L. plantarum 24* для дальнейшего применения в пищевой промышленности, данные штаммы могут быть использованы для разработки биологически активных добавок для пищевой, фармацевтической, косметической промышленности и ветеринарии.

Проведены исследования по генотипированию перспективных штаммов лактобактерий. В результате секвенирования у штаммов *L. casei 32* и *L. plantarum 24* были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена *16S рРНК*, геномные последовательности штаммов зарегистрированы в базе данных Genbank с присвоением учетных номеров.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ КРИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ

Совершенствование способов замораживания и хранения микроорганизмов при отрицательных температурах с сохранением их биохимической и физиологической активности в значительной степени зависит от успехов в создании криозащитных сред, в которых микроорганизмы подвергаются замораживанию или предварительному культивированию перед замораживанием [14, 120, 122, 123, 299, 367]. Это обуславливает необходимость поиска эффективных компонентов среды, обладающих криопротекторными свойствами.

4.1 Разработка способа повышения криорезистентности лактобактерий

4.1.1 Исследование влияния янтарной кислоты и ее солей на криорезистентность молочнокислых бактерий

Согласно данным научно-технической литературы янтарная кислота и многие ее соли (сукцинаты) обладают широким спектром биологического действия в отношении микро- и макроорганизмов, обеспечивая физиологическую активность организмам при различных стрессовых воздействиях. Кроме того, эти соединения являются малотоксичными и не обладают мутагенным и тератогенным действием, в связи с чем они разрешены к применению в пищевой промышленности [21, 47, 49, 76, 77].

Янтарная кислота и ее соли обладают разносторонними проявлениями биологической активности, однако сфера их применения в микробиологической практике на сегодняшний день является достаточно узкой. Поэтому исследования, связанные с селекцией молочнокислых бактерий с заданными свойствами, в частности, устойчивых к низкотемпературному воздействию, с использованием янтарной кислоты и ее производных на сегодняшний день представляются весьма перспективными.

С целью выявления криопротекторного действия янтарной кислоты и ее солей – сукцината калия и сукцината аммония – в отношении молочнокислых бактерий, подвергаемых низкотемпературному стрессу, была проведена серия экспериментов с использованием различных концентраций этих добавок в качестве компонентов среды культивирования.

В качестве среды культивирования использовали жидкую капустную среду с содержанием 2 % глюкозы. Количество жизнеспособных клеток в среде на начальный период культивирования составляло $2\text{-}2{,}5 \cdot 10^6$ КОЕ/см^3. Молочнокислые бактерии культивировали в обогащенных добавками средах до достижения середины экспоненциальной

фазы роста: для *L. casei 16* и *L. casei 32* время культивирования составляло 4 ч, для *L. bavaricus 6* и *L. acidophilus 9* – 5 ч, для *L. plantarum* 21 и *L. fermentum 10* – 6 ч. Далее получали бактериальные концентраты, которые подвергали замораживанию при температуре минус 25-30 ^{0}C. Образцы хранили в замороженном виде в течение 2 ч.

Результаты исследования по влиянию янтарной кислоты на выживаемость клеток молочнокислых бактерий при низкотемпературной обработке представлены на рисунке 4.1.

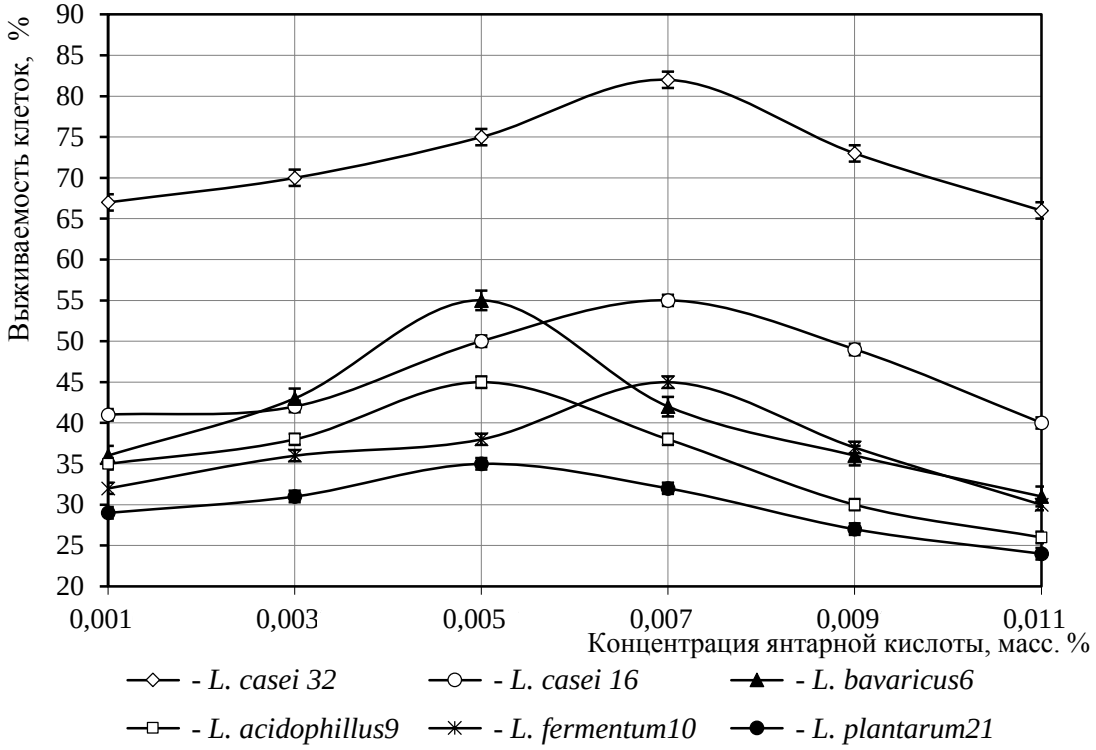


Рисунок 4.1 – Действие янтарной кислоты на криорезистентность лактобактерий

Как видно из полученных данных (рис. 4.1), янтарная кислота оказывает криопротекторное действие на молочнокислые бактерии в диапазоне концентраций в среде культивирования 0,001-0,009 масс. %.

Оптимальная концентрация янтарной кислоты в среде, при которой достигается максимальная выживаемость клеток, варьирует в пределах 0,005-0,007 масс. % в зависимости от вида микроорганизмов. Установлено, что для культур *L. bavaricus 6, L. acidophilus 9* и *L. plantarum 21*оптимальная концентрация добавки составляет 0,005 масс.%, при этом выживаемость клеток достигает 55 %, 45 % и 35 % соответственно; для культур *L. casei 32, L. casei 16* и *L. fermentum 10* оптимальная концентрация добавки в среде 0,007 масс.%, выживаемость клеток увеличивается до 82 %, 55 % и 45 % соответственно. Внесение в среду культивирования меньших количеств янтарной кислоты (менее 0,001 масс. %) не оказывает заметного криозащитного эффекта на микроорганизмы.

При использовании более высоких концентраций добавки (более 0,009 масс. %) выживаемость клеток достоверно ниже, чем в контрольных образцах. Эти результаты согласуются с теми представлениями, что янтарная кислота как промежуточный метаболит цикла трикарбоновых кислот, который функционирует в клетках молочнокислых бактерий, оказывает угнетающее действие на рост микроорганизмов; иными словами, происходит лимитирование роста культур собственным метаболитом.

Таким образом, нами показано, что использование янтарной кислоты в составе среды культивирования микроорганизмов позволяет повысить выживаемость клеток при криообработке на 12-22 % в зависимости от вида молочнокислых бактерий.

Возможным объяснением полученных результатов является определенная роль экзогенной добавки в процессах метаболизма клеток.

Во-первых, янтарная кислота может обладать криопротекторным действием благодаря химическому взаимодействию ее карбоксильных групп с молекулами воды с образованием водородных связей. В результате вода в клетках переводится в связанное состояние, и температура ее замерзания сдвигается в область более низких значений. Как известно, при криообработке именно формирование кристаллов льда является основной причиной гибели клеток [14, 120, 222, 299].

Во-вторых, в условиях криоанабиоза происходит инактивация одного из ключевых ферментов метаболизма микроорганизмов – сукцинатдегидрогеназы, осуществляющей окисление янтарной кислоты в цикле трикарбоновых кислот до фумаровой кислоты. В результате прерывания цикла трикарбоновых кислот клетка теряет свою активность [81]. Следует отметить, что молочнокислые бактерии являются факультативными анаэробами, и в путях их метаболизма обнаруживаются лишь фрагменты цикла трикарбоновых кислот. Предполагается, что янтарная кислота, вносимая в среду культивирования, накапливается в клетках микроорганизмов и активирует сукцинатдегидрогеназу после выхода клеток из состояния криоанабиоза, благодаря чему функционирование реакций цикла трикарбоновых кислот в клетке восстанавливается (происходит аллостерическая активация фермента предшественником).

В-третьих, устойчивость микро- и макроорганизмов к воздействию различных неблагоприятных факторов в первую очередь зависит от запасов, скорости и своевременности образования клетками энергии. Стадия окисление янтарной кислоты до фумаровой в цикле трикарбоновых кислот – энергетически выгодный процесс. Это единственная дегидрогеназная реакция цикла трикарбоновых кислот, в ходе которой осуществляется прямой перенос водорода с субстрата на флавопротеин без участия $НАД^+$. Фермент содержит $ФАД^+$ и железо-серный белок. Водород, выделяемый при

дегидрировании сукцината, переносится на $ФАД^+$, восстанавливающийся в $ФАДН_2$, который запасается в клетках [85]. Предполагается, что янтарная кислота запускает механизм образования энергии в клетках и восстанавливает их энергетический потенциал, благодаря чему выживаемость клеток при криоанабиозе увеличивается.

Полученные данные о влиянии сукцината калия и сукцината аммония на резистентность клеток молочнокислых бактерий к криообработке также указывают на положительный эффект этих добавок (рис. 4.2, 4.3).

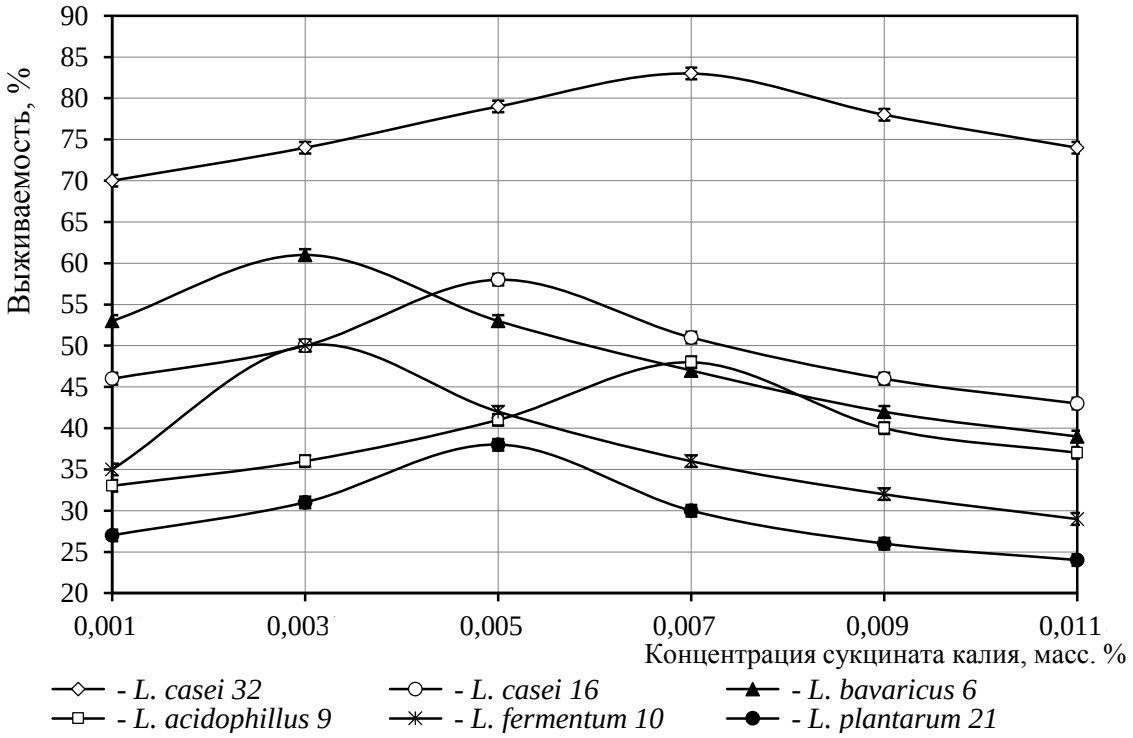


Рисунок 4.2 – Действие сукцината калия на криорезистентность молочнокислых бактерий

Установлено, что сукцинат калия оказывает достаточно выраженное защитное действие на микроорганизмы в диапазоне концентраций 0,001-0,009 масс. %, сукцинат аммония – в диапазоне концентраций 0,003-0,011 масс. %. При уменьшении дозировок сукцината калия и сукцината аммония в ростовой среде количество физиологически активных клеток в опытных и контрольных образцах находится примерно на одном уровне (т.е. заметный положительный эффект добавок отсутствует). При увеличении концентрации добавок в среде культивирования наблюдается замедление роста культур – количество физиологически активных клеток в опытных образцах ниже, чем в контрольных вариантах эксперимента.

Для каждого вида молочнокислых бактерий установлены оптимальные концентрации добавок, при использовании которых в качестве компонентов среды культивирования достигается максимальная выживаемость клеток.

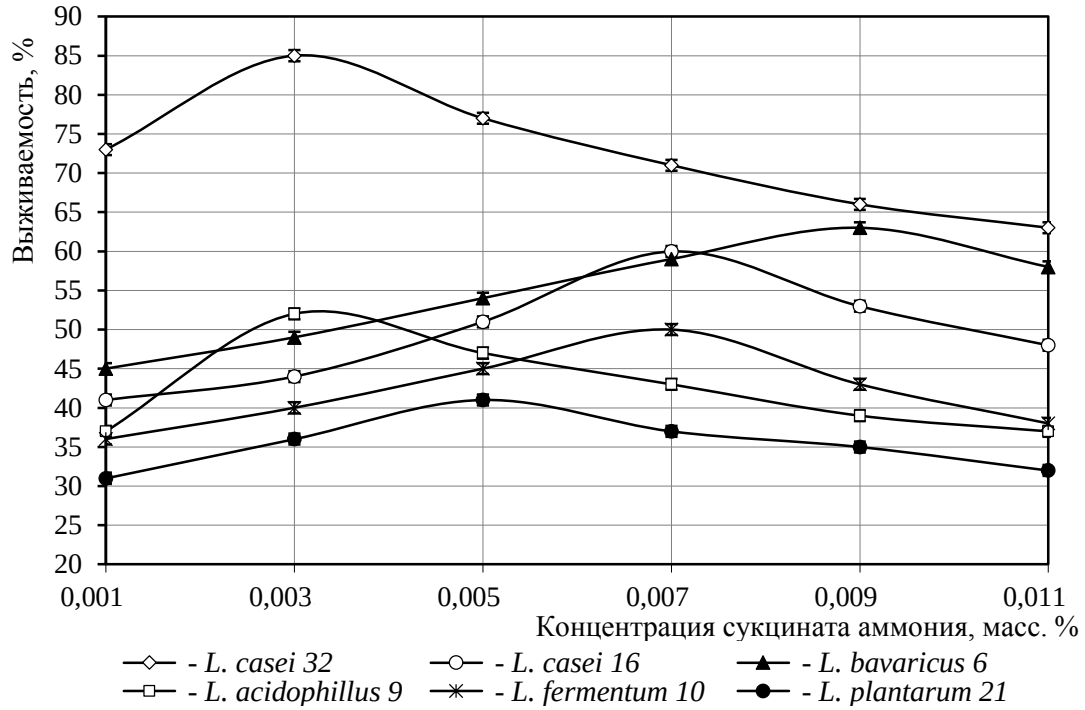


Рисунок 4.3 – Действие сукцината аммония на криорезистентность молочнокислых бактерий

Для культур *L. bavaricus 6* и *L. fermentum 10* оптимальная концентрация сукцината калия в среде культивирования составляет 0,003 масс. % (выживаемость достигает 61 % и 50 % соответственно), для *L. casei 16* и *L. plantarum 21* – 0,005 масс. % (выживаемость культур возрастает до 58 % и 38 % соответственно), для *L. casei 32* и *L. acidophilus 9* – 0,007 масс. % (выживаемость равна 83 % и 48 % соответственно).

Максимальный криопротекторный эффект достигается при концентрации сукцината аммония в ростовой среде 0,003 масс. % – у *L. casei 32* и *L. acidophilus 9* (выживаемость культур увеличивается до 85 % и 52 % соответственно); 0,0005 масс. % – у *L. plantarum 21* (выживаемость равна 41 %); 0,007 масс. % – у *L. casei 16* и *L. fermentum 10* (выживаемость достигает 60 % и 50 % соответственно); 0,009 масс. % – у *L. bavaricus 6* (выживаемость составляет 63 %). При использовании сукцинатов в качестве компонентов среды культивирования выживаемость клеток молочнокислых бактерий после выхода из криоанабиоза увеличивается на 16-28 %.

Предполагается, что в основе криопротекторного действия солей янтарной кислоты на микроорганизмы лежит ионная регуляция, которая является одним из важных механизмов управления внутриклеточными процессами. Изменение ионной силы или ионного состава в клетке влияют на функциональное состояние органелл, конформацию и взаимодействие биомакромолекул, изменяют активность и специфичность ферментов и мультиферментных систем.

В осуществлении регулирования различных метаболических процессов в клетке активное участие принимают, прежде всего, ионы металлов. В частности, одновалентные катионы, участвуют в регуляции внутриклеточного pH, являются кофакторами многих ферментов, обеспечивают электрические свойства клеточных мембран [85].

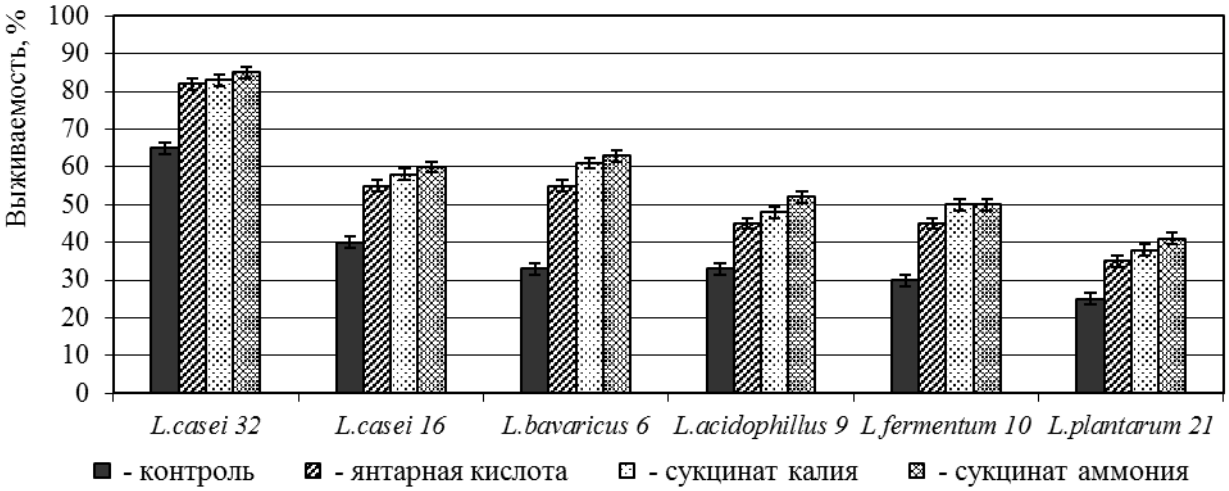
Установлено, что клетки бактерий и дрожжей могут экстагировать вещества из очень разбавленных растворов. У данных организмов обнаружены системы, способные избирательно концентрировать многие ионы, в том числе K^+, сульфаты и фосфаты [222]. Следует заметить, что в данной работе биологическое действие сукцинатов на клетки молочнокислых бактерий наблюдалось в диапазоне низких концентраций.

Многочисленные экспериментальные данные показывают, что ионная зависимость обусловлена белковыми компонентами белоксинтезирующей системы. В клетке ионы K^+ являются активаторами многих ферментативных процессов, и, прежде всего, таких как синтез белка на рибосомах, ДНК- и РНК-полимеразная реакции, фосфофруктозокиназная и пируваткиназная реакции. Кроме того, ионами K^+ цитоплазмы стимулируются гликолитические ферменты. Установлено, что ионы NH_4^+ также могут поддерживать активность некоторых ферментов, в частности малатдегидрогеназы [367].

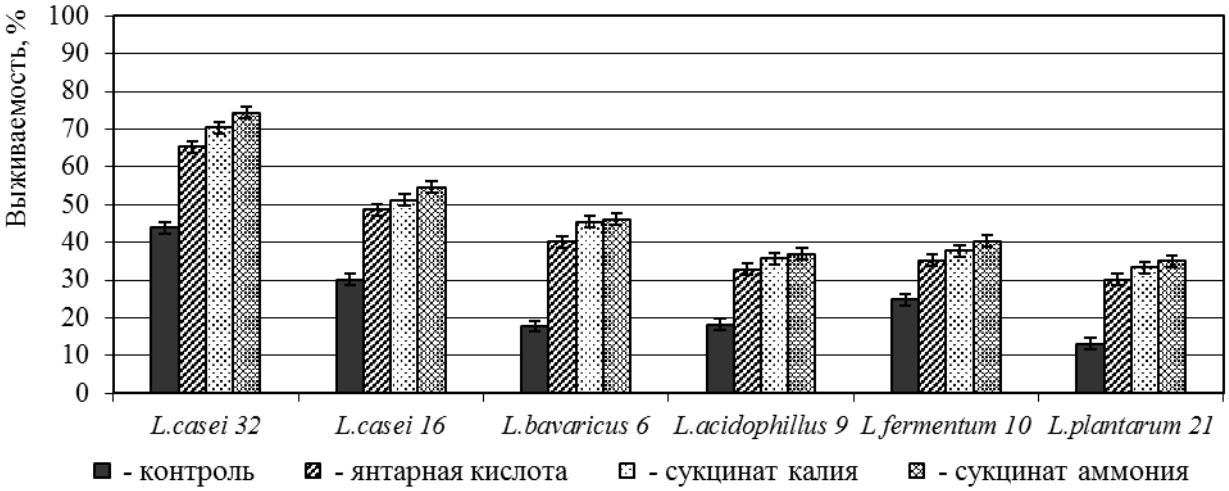
Согласно одной из гипотез, цитоплазма по своим свойствам напоминает ионообменные смолы, несущие фиксированные заряды. Ионообменные смолы с большим числом сшивок избирательно связывают определенные ионы: смолы, содержащие остатки сульфокислот, связывают калий, смолы, содержащие остаток фосфиновой кислоты, – натрий. В клетке ионы Na^+ и K^+ распределены неравномерно: ионы натрия выбрасываются из клетки, а ионы калия накапливаются в ней. В результате на клеточной мембране создается разность концентраций одновалентных ионов. Первично-активный транспорт ионов, осуществляющийся с использованием энергии АТФ или окислительно-восстановительных реакций, происходит с участием транспортных аденозинтрифостотаз. Однако градиент концентраций одновалентных ионов необходим и для функционирования систем вторично-активного транспорта (в том числе сахаров и аминокислот). Различные концентрации ионов Na^+ и K^+ по разные стороны от мембраны обеспечивают существование легкодоступного источника энергии для многих связанных с функционированием мембран процессов [75]. Таким образом, использование ионов K^+ и NH_4^+ в комплексе с янтарной кислотой, по видимому, позволяет активировать обменные процессы в клетках микроорганизмов после выхода их из состояния криоанабиоза.

Результаты исследований, отражающие влияние продолжительности низкотемпературной обработки на выживаемость клеток лактобактерий при оптимальных концентрациях исследуемых добавок в среде культивирования, представлены на рисунке 4.4.

а) продолжительность замораживания 2 ч



б) продолжительность замораживания 1 нед.



в) продолжительность замораживания 4 нед.

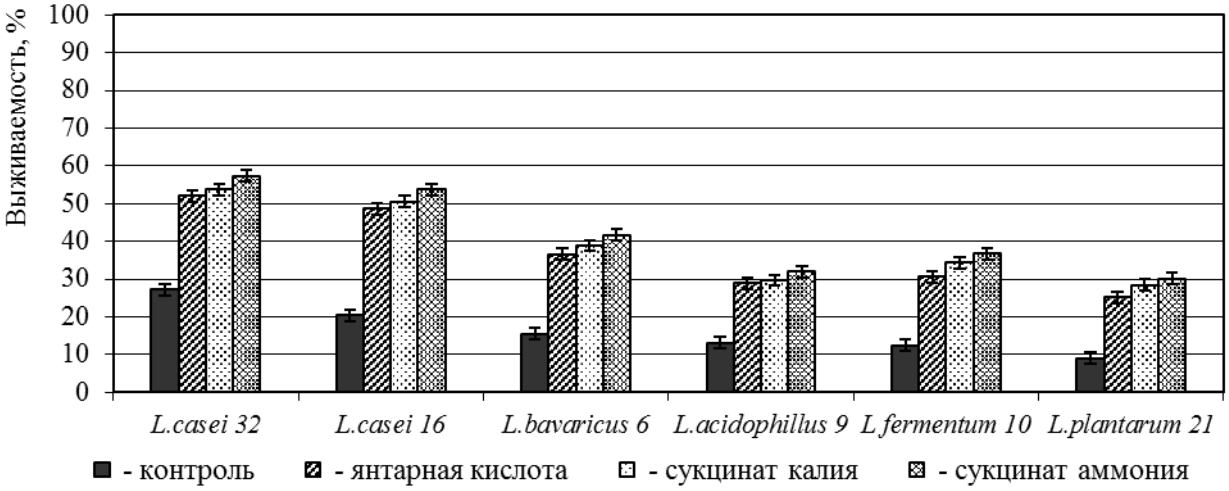


Рисунок 4.4 – Влияние оптимальных концентраций янтарной кислоты и ее солей на криорезистентность молочнокислых бактерий

Установлено, что янтарная кислота и ее соли обладают криопротекторным действием в различной степени выраженности, эффект положительного действия сукцинатов на криорезистентность микроорганизмов незначительно превосходит действие янтарной кислоты.

Применение оптимальных концентраций янтарной кислоты в среде культивирования позволяет увеличить выживаемость клеток после низкотемпературного воздействия в среднем на 15-20 %, использование сукцината калия и сукцината аммония – на 20-25 % и 25-30 % соответственно в зависимости от вида лактобактерий, при чем при увеличении продолжительности хранения клеточной суспензии в замороженном виде отмечается более выраженный криопротекторный эффект янтарной кислоты и ее солей.

Методом атомно-силовой микроскопии показано положительное влияние криопротектора (янтарной кислоты) на АМС-характеристики клеток лактобактерий после низкотемпературной обработки (рис. 4.5).

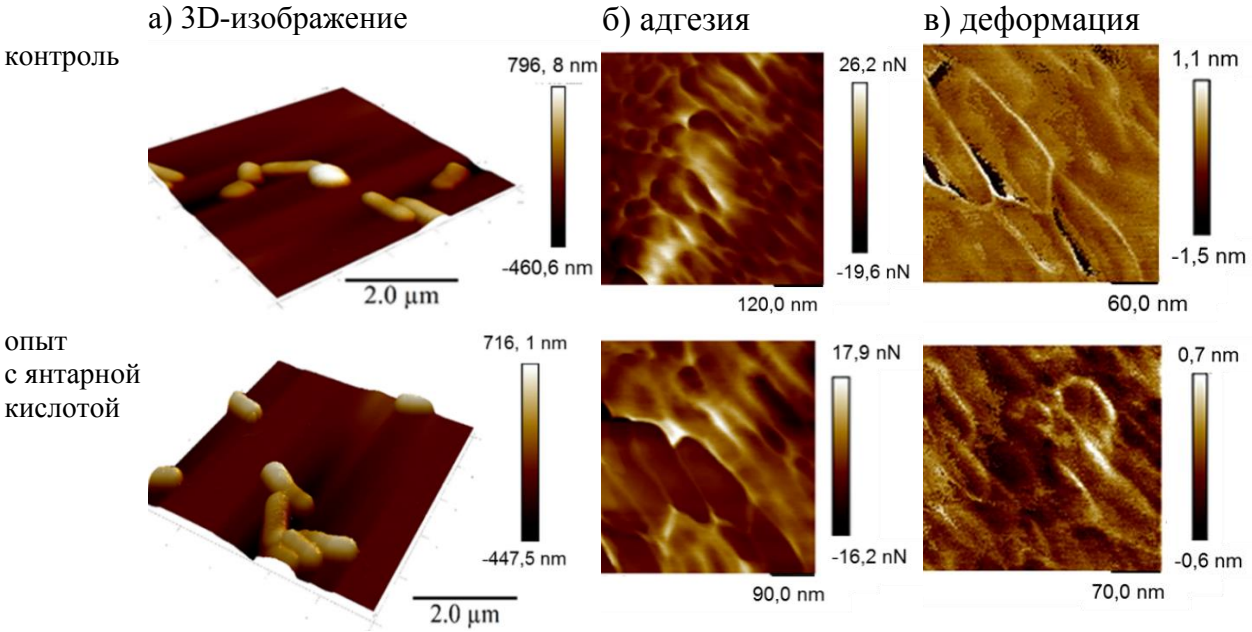


Рисунок 4.5 – Влияние янтарной кислоты на АСМ-характеристики клеток *L.casei 32* после низкотемпературной обработки

Установлено, что при культивировании лактобактерий в среде с добавлением янтарной кислоты отмечается изменение морфологических параметров клеток: уменьшение их длины на 12 %, увеличение ширины на 10 %, при этом происходит увеличение силы адгезии клеток на 31 %, снижение их деформации на 53%.

Таким образом, результаты исследований позволяют сделать вывод об эффективности использования янтарной кислоты, сукцинатов калия и аммония в качестве криопротекторов и рекомендовать исследуемые добавки для использования в качестве

компонентов среды культивирования молочнокислых бактерий, подвергающихся в дальнейшем процессам замораживания, хранения и дефростации.

4.1.2 Изучение влияния янтарной кислоты и сукцинатов на биотехнологические свойства лактобактерий

Общая направленность этапа сбраживания заквасок заключается в закономерном нарастании суммарной кислотности, что связано с накоплением ряда продуктов метаболизма молочнокислых бактерий.

Накопление в тесте органических кислот (прежде всего молочной) оказывает положительное влияние на процесс созревания и структурно-механические свойства теста. При недостаточной кислотности ржаного и ржано-пшеничного теста мякиш хлеба имеет повышенную липкость и заминаемость, что обусловлено повышенным содержанием в тесте декстринов [8, 75, 90].

В следующей серии экспериментов было исследовано влияния янтарной кислоты и сукцинатов на изменение активности кислотообразования молочнокислых бактерий. Для этого культуры микроорганизмов предварительно выращивали на жидкой капустной среде, содержащей оптимальные концентрации добавок, до достижения середины экспоненциальной фазы роста. Далее клетки микроорганизмов пересевали на свежие питательные среды, не содержащих добавок. Инкубацию посевов осуществляли в течение 24 ч и 3 сут. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.1.

Среди исследуемых штаммов микроорганизмов можно выделить такие активные кислотообразователи, как *L. plantarum 21* и *L. acidophilus 9* (титруемая кислотность среды через 3 сут. культивирования составляет 134 ^{0}Т и 126 ^{0}Т соответственно в контрольных вариантах эксперимента), наименее активный кислотообразователь – штамм *L. bavaricus 6.*

Через 24 ч культивирования в свежей питательной среде молочнокислых бактерий, предварительно выращенных в средах с исследуемыми добавками, уровень суммарной кислотности ростовой среды по сравнению с контрольными вариантами возрастает на 9-10 % – при развитии *L. acidophilus 9*, на 12-14 % – *L. casei 16, L. plantarum 21* и *L. fermentum 10,* на 13-20 % – *L. casei 32* и *L. bavaricus 6.* В дальнейшем интенсивность кислотонакопления в средах существенно снижается: через 72 ч культивирования разница между титруемой кислотностью среды контрольных и опытных образцов составляет 7-9 %. Нарастание суммарной кислотности происходит при одновременном изменении активной кислотности в область кислых значений pH.

Таблица 4.1 – Изменения кислотности среды при культивировании молочнокислых бактерий

Штаммы	Добавки	Время культивирования			
		24 ч		72 ч	
		Активная кислотность, pH	Титруемая кислотность, °Т	Активная кислотность, pH	Титруемая кислотность, °Т
L. casei 16	контроль	4,95	84	4,69	106
	янтарная кислота	4,85	94	4,59	116
	сукцинат калия	4,83	96	4,61	114
	сукцинат аммония	4,85	96	4,58	116
L. casei 32	контроль	4,99	80	4,65	108
	янтарная кислота	4,88	90	4,55	116
	сукцинат калия	4,86	94	4,58	118
	сукцинат аммония	4,83	92	4,60	118
L. plantarum 21	контроль	4,72	105	4,47	126
	янтарная кислота	4,65	116	4,32	134
	сукцинат калия	4,62	118	4,30	136
	сукцинат аммония	4,61	120	4,31	136
L. acidophilus 9	контроль	4,74	108	4,42	126
	янтарная кислота	4,66	118	4,33	134
	сукцинат калия	4,62	120	4,30	136
	сукцинат аммония	4,63	120	4,28	138
L. fermentum 10	контроль	4,96	84	4,72	104
	янтарная кислота	4,83	94	4,64	112
	сукцинат калия	4,85	92	4,61	114
	сукцинат аммония	4,80	96	4,61	112
L. bavaricus 6	контроль	5,05	78	4,76	100
	янтарная кислота	4,95	90	4,67	108
	сукцинат калия	4,93	90	4,66	108
	сукцинат аммония	4,90	92	4,62	110

Таким образом, предварительное культивирование молочнокислых бактерий в средах с содержанием янтарной кислоты и ее солей благоприятно отражается на их активности кислотообразования, т.е. при последующем культивировании данных микроорганизмов в свежих питательных средах наблюдаются повышение скорости накопления основных продуктов их метаболизма.

Нами установлено, что последствием процессов замораживания, хранения и последующей дефростации хлебопекарных полуфабрикатов является существенная инактивация амилолитических и протеолитических ферментов, осуществляющих гидролиз сложных углеводов и белковых веществ теста [66, 139]. На наш взгляд альтернативой применению ферментных препаратов в криотехнологии хлебобулочных изделий является подбор штаммов микроорганизмов, в частности молочнокислых бактерий, обладающих высоким уровнем гидролитических ферментов и высокими показателями интенсивности биосинтетических процессов.

Следующим этапом работы было исследование влияния янтарной кислоты и сукцинатов на активность амилолитических ферментов исследуемых микроорганизмов.

При изучении влияния янтарной кислоты и сукцинатов на уровень активности амилолитических ферментов молочнокислых бактерий культуры выращивали до достижения стационарной фазы роста на жидкой капустной среде, обогащенной соответствующими добавками в оптимальной концентрации. Клетки, отобранные в стационарной фазе роста, пересевали на свежую капустную среду, не содержащей добавок, и изучали динамику изменения амилолитической активности в процессе культивирования. Активность амилаз оценивали по уменьшению концентрации крахмала в реакционной смеси. Для исследований использовали культуральную жидкость с микроорганизмами, которую отбирали из ростовой среды через каждый час культивирования.

Важнейшими физико-химическими характеристиками фермента является оптимальные для действия значения pH среды и температуры. Известно, что амилазы бактерий по величине pH-оптимума относятся к слабокислым или нейтральным ферментам. Поэтому исследования активности ферментов проводили при значении pH реакционной смеси на уровне 4,8. Процесс гидролиза крахмала проводили при 32 ^{0}C при исследовании амилолитической активности у штаммов *L. casei 16, L. casei 32, L. bavaricus 6* и *L. plantarum 21*, при 37 ^{0}C – у *L. acidophilus 9* и *L. fermentum*. Результаты исследований приведены на рисунке 4.6-4.11.

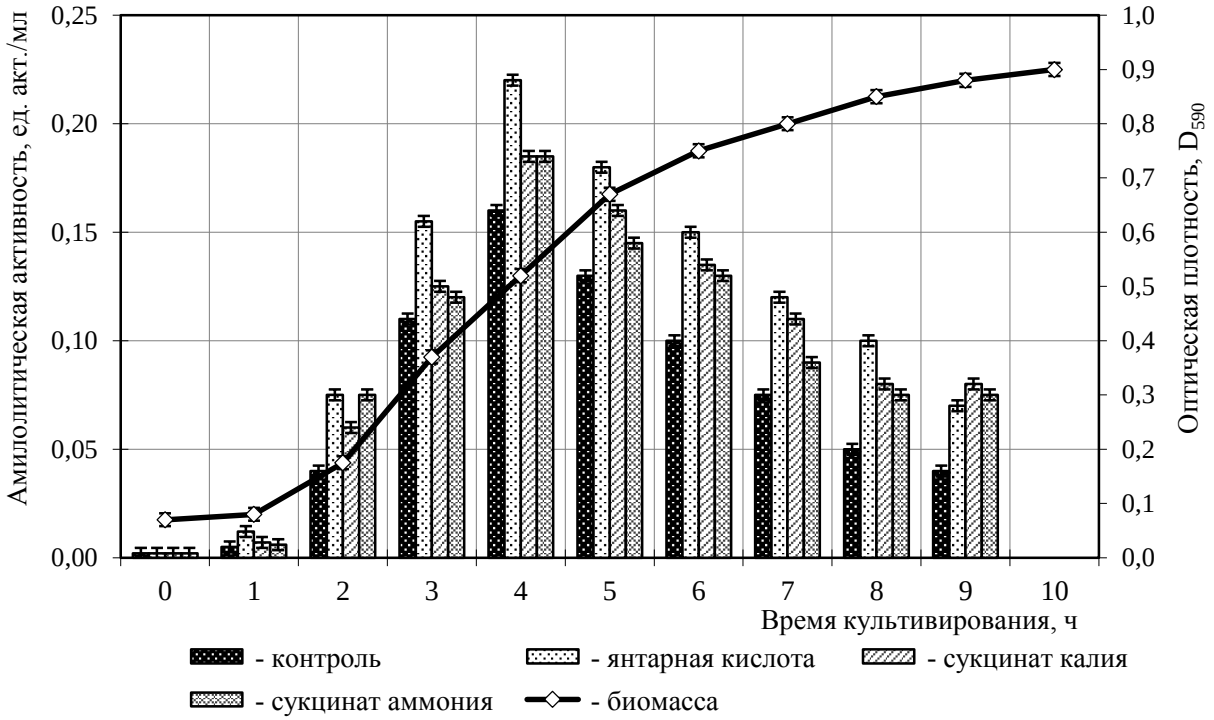


Рисунок 4.6 – Динамика амилолитической активности штамма *L. casei 16* при периодическом культивировании на жидкой среде

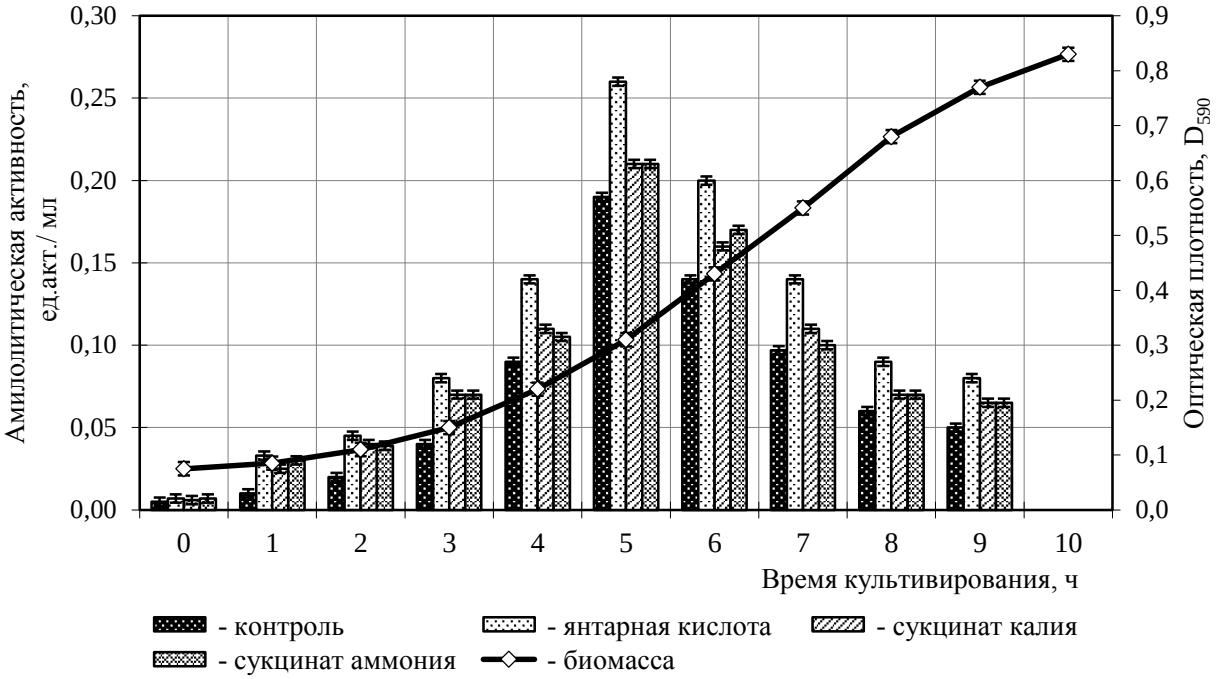


Рисунок 4.7 – Динамика амилолитической активности штамма *L. casei 32*

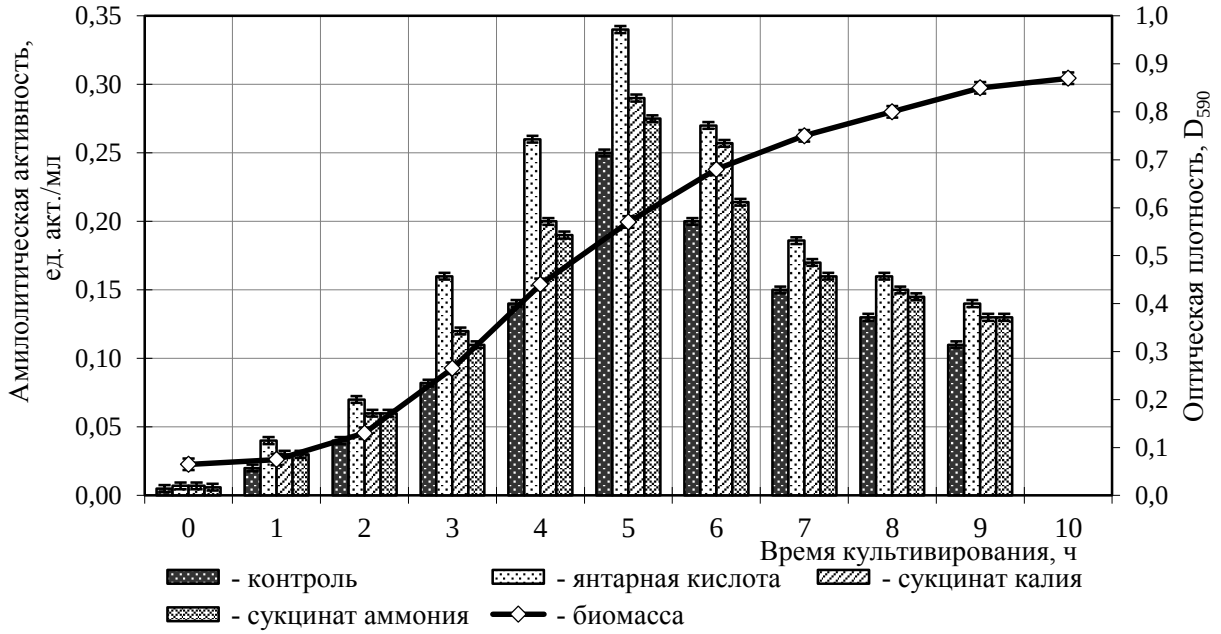


Рисунок 4.8 – Динамика амилолитической активности штамма *L. bavaricus 6*

Как показывают результаты проведенных исследований, максимальная амилолитическая активность отмечается в экспоненциальной фазе роста культур и составляет 0,16-0,25 ед.акт./мл в контрольных образцах. Это объясняется высокой интенсивностью процессов метаболизма микроорганизмов в данный период.

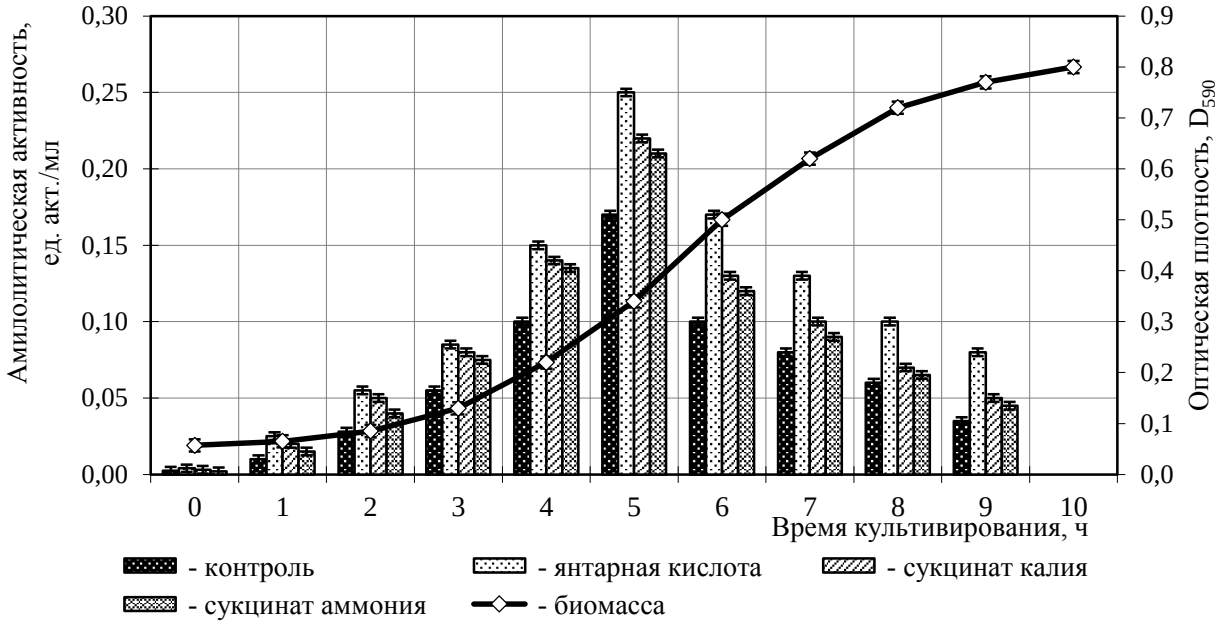


Рисунок 4.9 – Изменение амилолитической активности штамма *L. acidophilus 9*

К моменту перехода культур в стационарную фазу активность амилолитических ферментов заметно снижается и на 9 часов культивирования составляет 0,04-0,06 ед.акт./мл у всех исследуемых штаммов, кроме *L. bavaricus 9*. У данного штамма амилолитическая активность остается на достаточно высоком уровне даже на поздних этапах культивирования, и через 8-9 часов роста культуры составляет 0,11-0,13 ед. акт/мл.

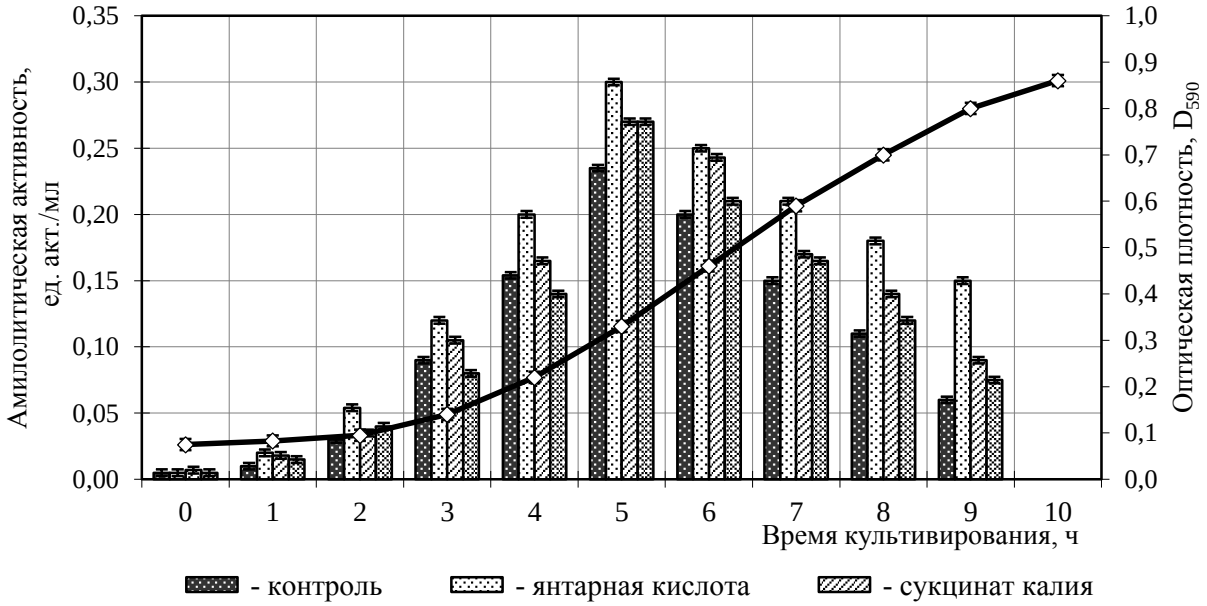


Рисунок 4.10 – Динамика амилолитической активности штамма *L. fermentum 10*

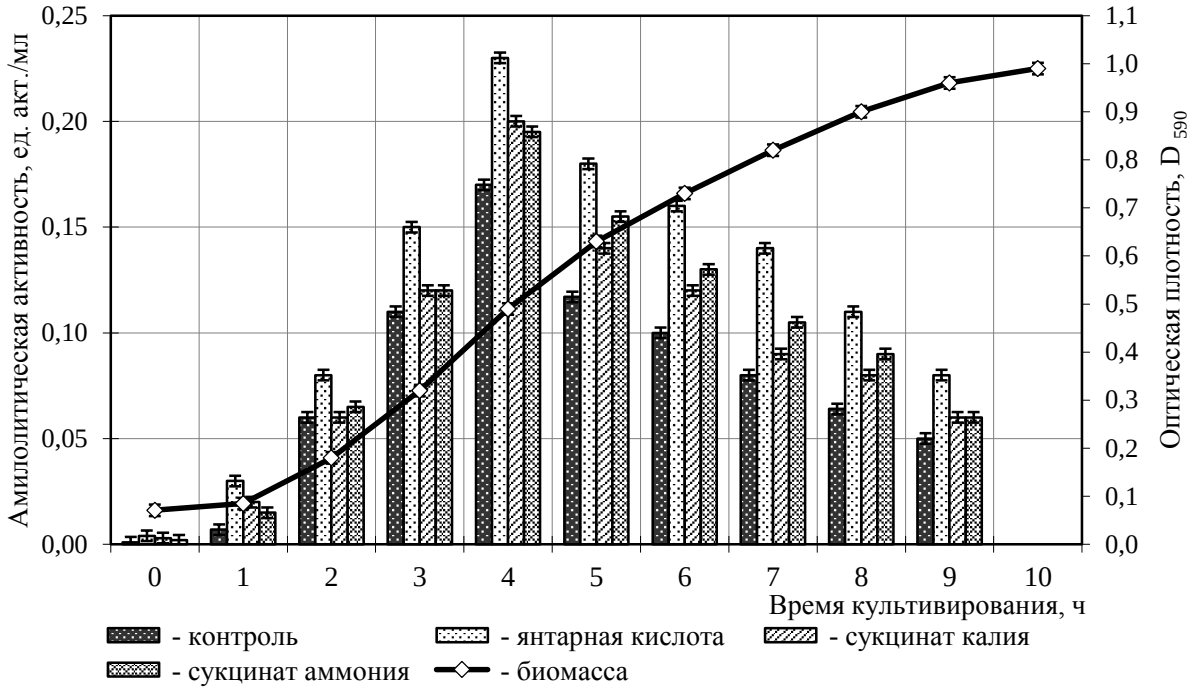


Рисунок 4.11 – Динамика амилолитической активности культуры *L. plantarum 21*

Таким образом, внесение добавок в среду предварительного культивирования повышает активность амилаз лактобактерий, при этом наиболее ярко выражен эффект положительного действия янтарной кислоты.

На рисунке 4.12 приведены данные, отражающие максимальный уровень амилолитической активности у всех исследованных культур (активность ферментов приведена в ед. в расчете на lg КОЕ).

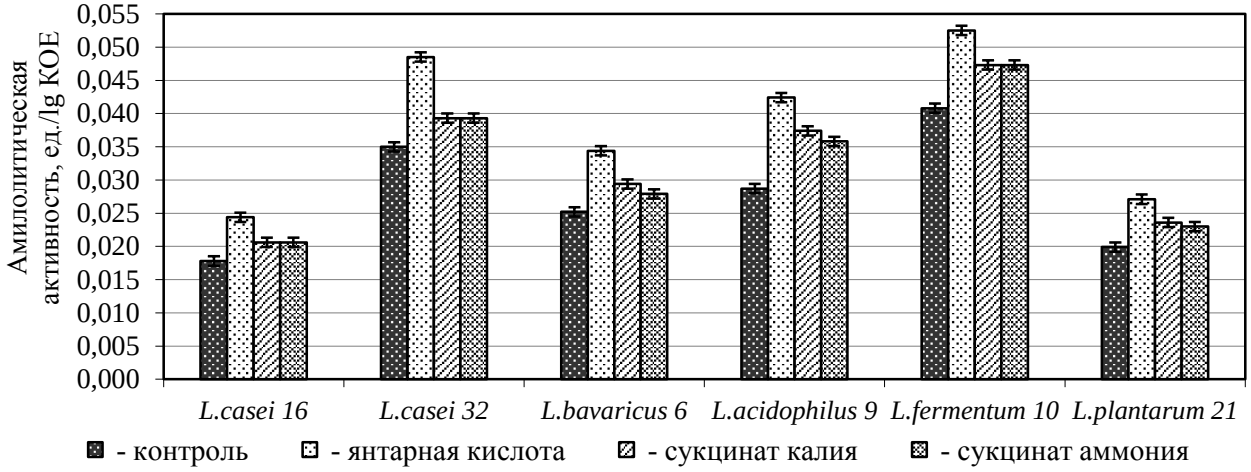


Рисунок 4.12 – Удельная активность амилолитических ферментов лактобактерий

Как видно из данных, представленных на рисунке 4.12, самая высокая активность амилолитических ферментов отмечается у штаммов *L. fermentum 10* и *L. casei 32* – 0,041 и

0,035 ед./lg КОЕ в контрольных образцах соответственно. У молочнокислых бактерий *L. plantarum 21* и *L. casei 16* наблюдается наименьшая амилолитическая активность (0,018 и 0,020 ед./lg КОЕ соответственно). Включение добавок в среду в период предварительного культивирования позволяет повысить амилолитическую активность у микроорганизмов на 30-45 % при использовании янтарной кислоты и на 15-20 % – при использовании сукцинатов.

Возможным объяснением активации амилаз в присутствии янтарной кислоты является образование ковалентных связей между имидной группой пептида (фермента) и карбоксильной группы кислоты, в результате чего происходит возрастание уровня энергии фермента.

Известно, что для каталитической активности многих ферментов необходим дополнительный химический компонент – кофактор, роль которого могут играть ионы металлов [85]. Установлено, что большинство белков активируется калием; функциональная активность некоторых подавляется натрием. Ионы K^+ необходимы для функционирования многих внутриклеточных ферментов, к их числу относятся ферменты, катализирующие фосфолирирование карбоксильных групп или енольных анионов, а также реакции элиминирования с образованием енолов [85]. Известно, что ионы NH_4^+ могут поддерживать активность некоторых ключевых ферментов метаболизма [85]. Наряду с интенсификацией обменных процессов в клетках за счет дополнительного введения в среду ионов K^+ и NH_4^+, возможно, происходит активация и амилаз.

Таким образом, в данной серии экспериментов показан положительный эффект янтарной кислоты и ее солей на уровень амилолитической активности лактобацилл.

Полученные данные позволяют говорить об эффективности использования янтарной кислоты и ее солей в отношении молочнокислых бактерий. Применение данных добавок в составе среды предварительного культивирования положительно влияет на дальнейшее развитие молочнокислых бактерий: происходит активация ферментов амилолитического комплекса и повышается их кислотообразующая активность.

4.2 Влияние янтарной кислоты и сукцинатов на выживаемость и биотехнологические свойства клеток дрожжей при криообработке

С целью изучения влияния янтарной кислоты и ее солей на выживаемость клеток дрожжей, была проведена серия экспериментов с добавлением различных концентраций этих добавок в жидкую питательную среду (среда Сабуро) перед низкотемпературной обработкой. Аналитически был определен диапазон исследуемых концентраций добавок, который составил для янтарной кислоты от 0,001 до 0,01 мас.%; для сукцинатов от 0,005 до 0,05 мас.%.

Клетки дрожжей, отобранные в экспоненциальную фазу роста, подвергали замораживанию при температуре минус 25-30 ^{0}С в течение 4 ч.

На рисунке 4.13 представлены данные по изменению выживаемости клеток дрожжей при культивировании их в среде с янтарной кислотой перед замораживаем. Выживаемость клеток при использовании данной добавки достигает от 61 до 73 %. Возможно, это связано с усилением метаболизма клеток, повышением активности ферментов под действием янтарной кислоты как энергетического стимулятора [81], в связи с чем клетки более устойчивы к повреждающему действию отрицательных температур.

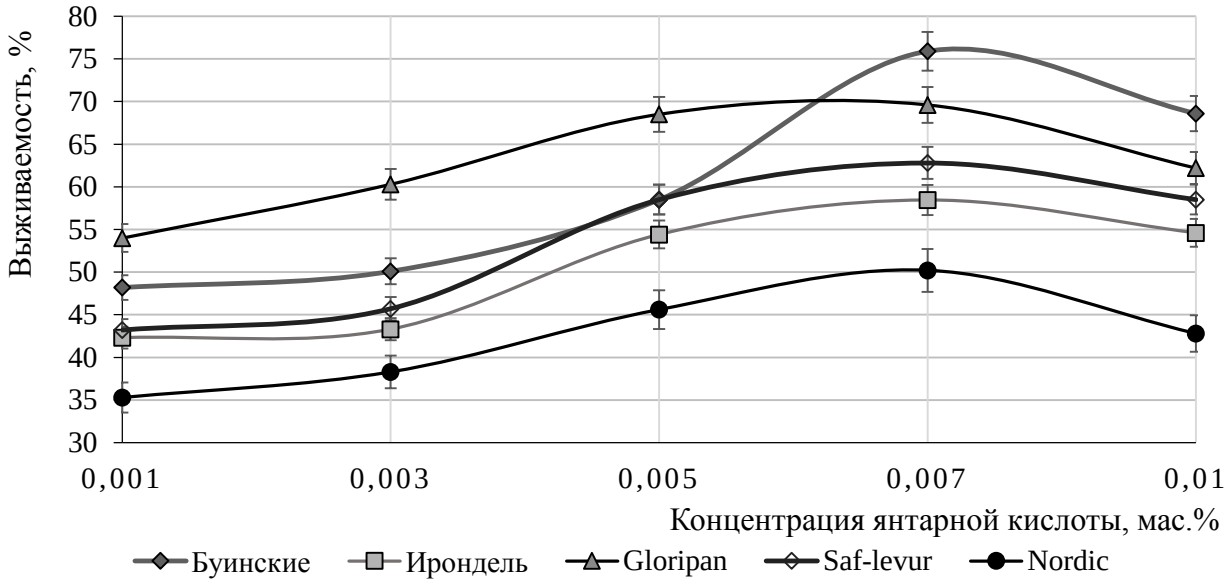


Рисунок 4.13 – Влияние янтарной кислоты на выживаемость клеток дрожжей

Максимумы представленных кривых наблюдаются при внесении оптимальной концентрации янтарной кислоты 0,007 мас.%, при которой отмечается высокая выживаемость дрожжевых клеток. Показано, что дальнейшее увеличение концентрации добавки приводит к ингибированию жизнедеятельности дрожжей, что, по-видимому, объясняется изменением pH среды и проницаемостью клеточной мембраны.

Культивирование дрожжевых клеток в среде с солями янтарной кислоты также приводит к повышению количества жизнеспособных клеток дрожжей после низкотемпературной обработки. Так, внесение в питательную среду сукцината калия и сукцината кальция в количестве 0,002-0,003 мас.% повышает выживаемость клеток дрожжей после низкотемпературной обработки до 64-76 % (рис. 4.14, 4.15). Повышение концентрации солей также ингибирует рост исследуемых культур дрожжей.

Следует отметить, что при использовании солей в качестве компонентов питательной среды отмечается более высокий процент выживаемости клеток дрожжей

после выхода их из криоанабиоза, так количество жизнеспособных клеток увеличивается на 16-28 % относительно данных, полученных в опытах с янтарной кислотой.

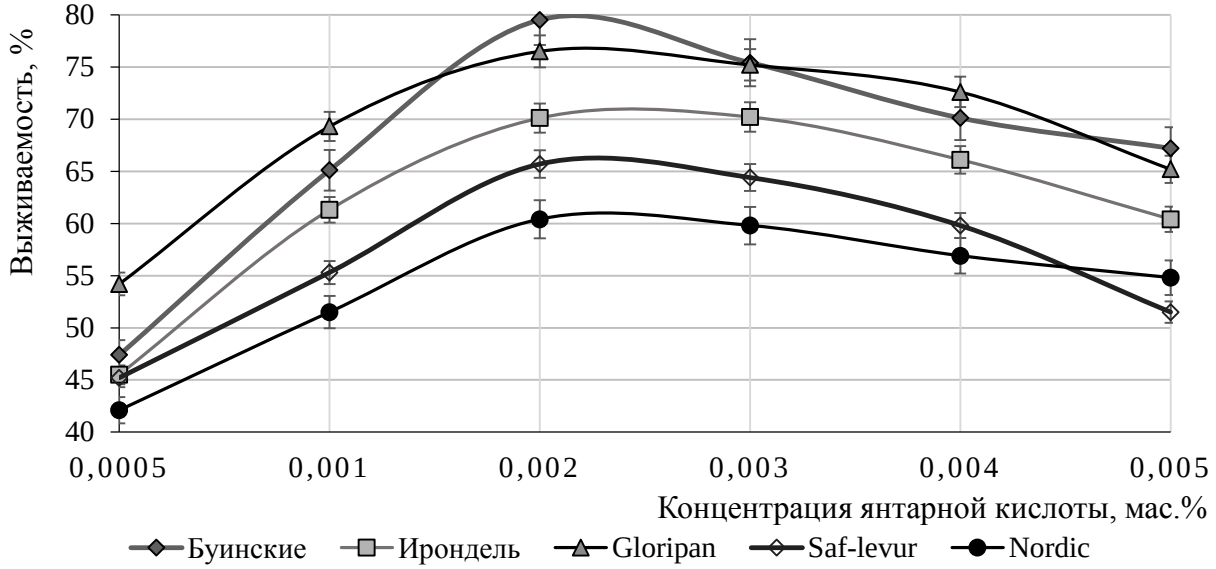


Рисунок 4.14 – Выживаемость клеток дрожжей при воздействии сукцината аммония

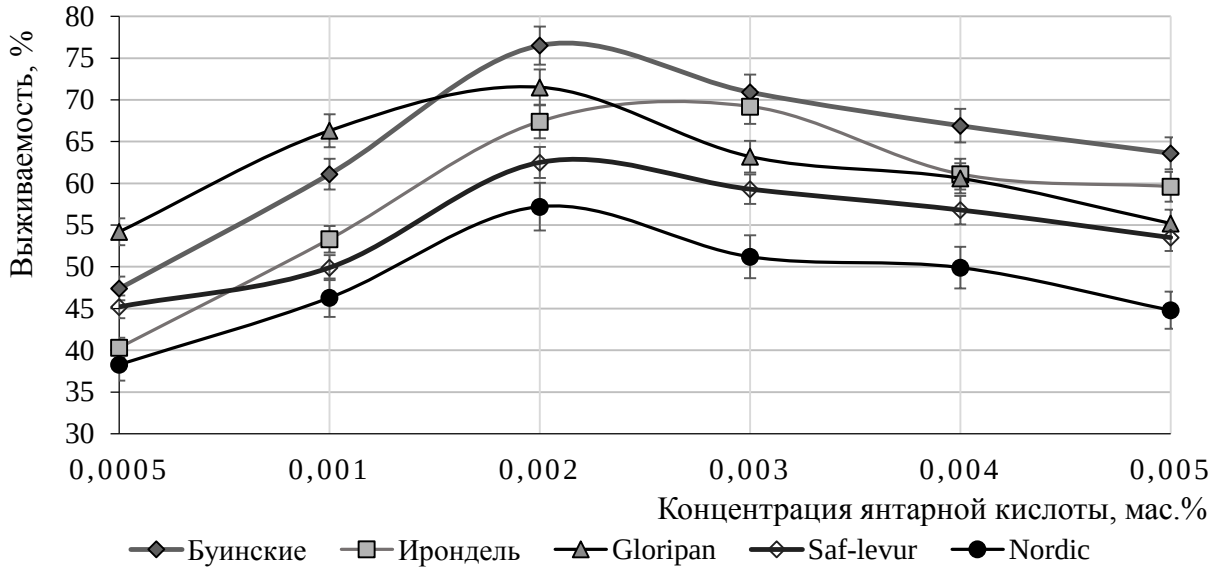
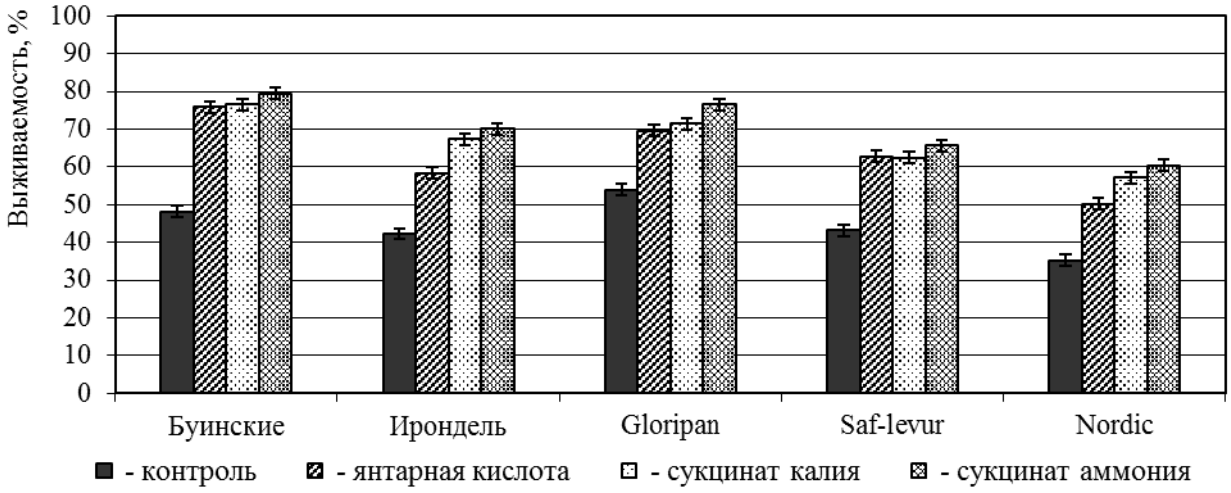


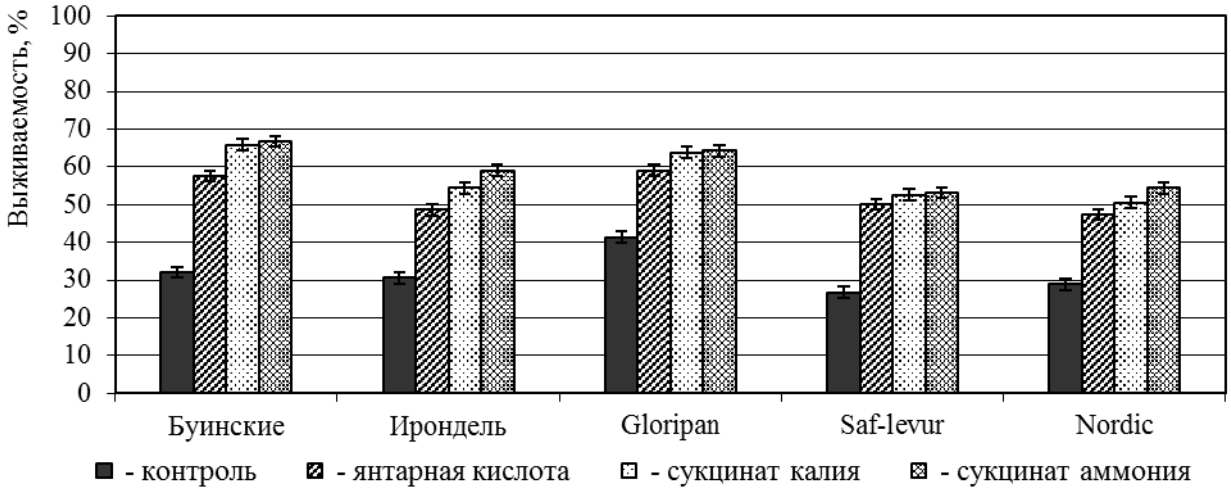
Рисунок 4.15 – Воздействие сукцината калия на резистентность клеток дрожжей к низкотемпературной обработке

Результаты исследований, отражающие влияние продолжительности низкотемпературного хранения клеточной суспензии (при температуре минус 25-30 ^{0}C) на выживаемость клеток дрожжей с применением оптимальных концентраций исследуемых добавок в среде культивирования, представлены на рисунке 4.16.

а) продолжительность замораживания 4 ч



б) продолжительность замораживания 1 нед.



в) продолжительность замораживания 4 нед.

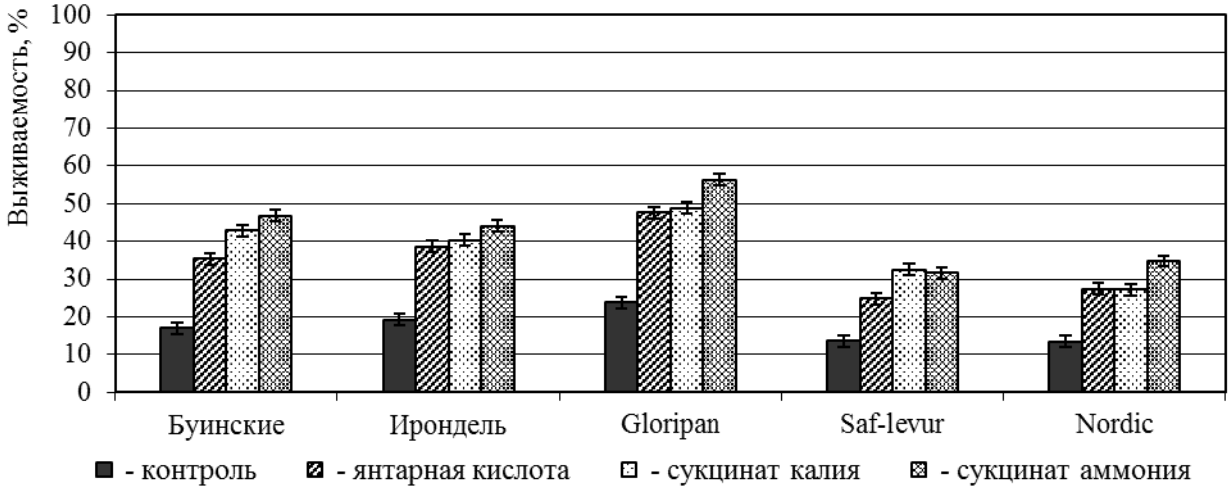


Рисунок 4.16 – Влияние оптимальных концентраций янтарной кислоты и ее солей на криорезистентность дрожжей

Результаты проведенных исследований показывают, что при использовании янтарной кислоты и ее солей в качестве компонентов среды культивирования наблюдается

увеличение количества жизнеспособных клеток дрожжей после низкотемпературного хранения в течение 4 нед. в 1,8-2 раза по сравнению с контролем.

Функционально-технологическая роль дрожжей состоит в биологическом разрыхлении тестовых полуфабрикатов диоксидом углерода, который выделяется при спиртовом брожении, придании им определенных реологических свойств, а также образовании этанола и других продуктов реакции, участвующих в формировании вкуса и аромата хлебобулочных изделий. Наиболее важным биотехнологическим свойством дрожжей является активность их ферментативного комплекса, в первую очередь сахаролитических ферментов – мальтазы и зимазы, в связи с чем были проведены исследования по изучению влияния янтарной кислоты и сукцинатов на мальтазную и зимазную активности дрожжей.

На рисунке 4.17 представлено изменение мальтазной активности дрожжей при внесении добавок в питательную среду (температура замораживания минус 25-30 ^{0}C, продолжительность – 4 нед.).

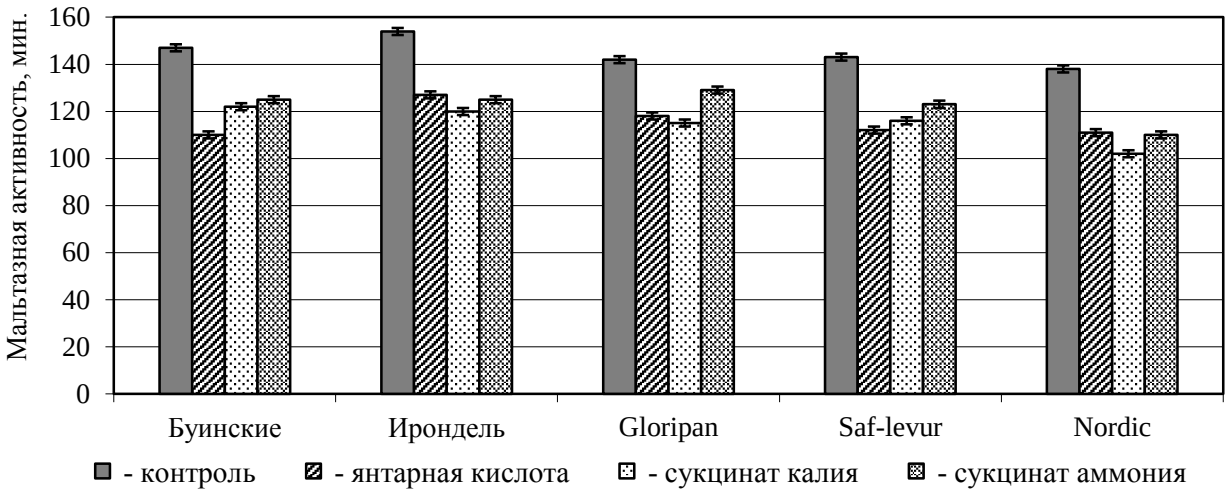


Рисунок 4.17 – Влияние янтарной кислоты и ее солей на мальтазную активность дрожжей после низкотемпературной обработки

Результаты исследования показали, что применение янтарной кислоты и сукцинатов в качестве компонентов питательной среды увеличивает скорость сбраживания мальтозы всех исследуемых образцов хлебопекарных дрожжей после длительной низкотемпературной обработки в среднем на 15,5-22,4 % по сравнению с контролем.

Установлено, что применение янтарной кислоты и ее солей также оказывает положительное влияние на зимазную активность дрожжей при длительном хранении клеток в замороженном виде (рис. 4.18), исследуемые добавки позволяют увеличить

скорость сбраживания клетками глюкозы на 18,8-29,6 % в зависимости от вида хлебопекарных дрожжей.

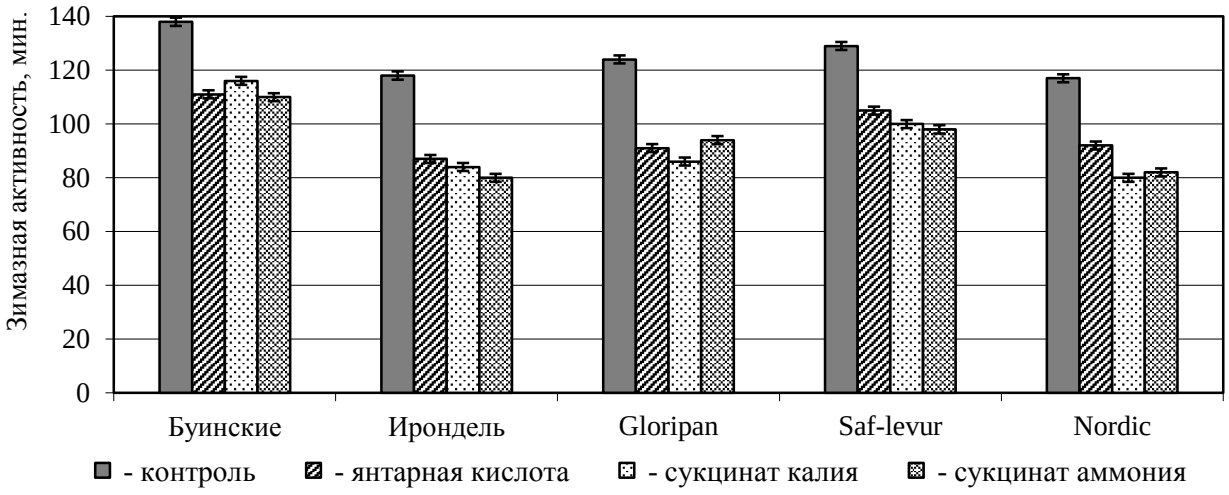


Рисунок 4.18 – Изменение зимазной активности дрожжей после низкотемпературной обработки при использовании янтарной кислоты и ее солей

Таким образом, полученные результаты подтверждают целесообразность применения янтарной кислоты и ее солей в качестве криопротекторной добавки, применяемой на стадии культивирования клеток дрожжей в жидкой питательной среде.

4.3 Оптимизация питательной среды для повышения криорезистентности лактобактерий с использованием полного факторного эксперимента

Для культивирования бактерий рода *Lactobacillus* используются среды, богатые питательными веществами (дрожжевой экстракт, гидролизат обезжиренного молока, пептон, твин-80), различными солями, в том числе ацетатом натрия и др., и имеющие низкий уровень pH (4,5-6,2). Данная группа бактерий относится к микроорганизмам, имеющим сложные питательные потребности. Так, для роста большинства лактобактерий необходимы органические формы азота, которые они сами не синтезируют, и витамины никотиновая кислота, пантотенат и рибофлавин [10, 12]. Этим объясняется значительное влияние на их рост добавок к питательной среде различных экстрактов, например, дрожжевого, кукурузного и др. Результаты исследований показывают, что наличие солей железа и марганца в питательной среде препятствует автолизу клеток и необходимо для нормальных процессов жирового обмена.

В качестве источника азота большинство молочнокислых микроорганизмов используют его органические формы – пептиды, аминокислоты. При недостатке

органического азота лактобактерии для синтеза ряда органических соединений могут использовать минеральные соединения азота, чаще всего аммонийные соли.

Из специальных питательных сред наиболее широкое распространение получила среда MRS, которая богата питательными веществами и ростовыми факторами; содержит дрожжевой и мясной экстракты, глюкозу, пептон, ацетат натрия, цитрат аммония и твин-80 (источник жирных кислот, необходимых для метаболизма лактобактерий). Данная среда применяется для выделения молочнокислых бактерий из различных источников и их культивирования.

Оптимизацию количества компонентов питательной среды проводили с использованием полного факторного эксперимента по показателям уровня накопления биомассы *L. casei 32* (Y_1) и выживаемости клеток (Y_2) после низкотемпературной обработки (продолжительность замораживания при температуре минус 18-20 ^{0}С составила 1 нед.).

Проводили оптимизацию модифицированной питательной среды MRS, спланированной по схеме полного факторного эксперимента, в которой для выбранного числа уровней составляли матрицу для всех возможных при данном количестве уровней комбинаций факторов. Варьируемыми факторами являлись концентрации компонентов питательной среды: глюкозы, источника азота, солей марганца и магния. При двухуровневом варьировании число проводимых опытов составило 32.

Исходный состав среды (pH 6,2-6,4): пептон из казеина 10,0 г, мясной экстракт 10,0 г, дрожжевой экстракт 5,0 г, глюкоза 20,0 г, K_2HPO_4 5,0 г, аммоний лимоннокислый 2,0 г, натрий уксуснокислый 5,0 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 г, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,05 г, твин-80 1,0 г. Выход 1 л.

Концентрации компонентов питательной среды при проведении полного факторного эксперимента варьировались следующим образом: X_1 – концентрация глюкозы от10 до 30 г/л; X_2 – концентрация дрожжевого экстракта от 2 до 10 г/л; X_3 – концентрация сукцината аммония от 0,01 до 0,08 г/л; X_4 – концентрация $MgSO_4$ от 0,075 до 0,125г/л; X_5 – концентрация $MnSO_4$ от 0,025 до 0,075 г/л.

Матрица планирования эксперимента представлена в приложении В (таблица 1).

На основании данных, полученных при культивировании, была построена модель, функцией отклика в которой является выживаемость клеток после низкотемпературной обработки. Далее проводили исключение незначимых коэффициентов с использованием критерия Стьюдента на основании трех параллельных опытов по культивированию молочнокислых бактерий в центре плана, после чего уравнение приняло вид:

$$Y_1 = 1{,}26 + 0{,}24X_1 + 0{,}16X_2 + 0{,}95X_3 - 0{,}31X_4 + 0{,}12X_5 + 0{,}55X_1X_3 - 1{,}02X_1X_4 - 0{,}38X_2X_4 + 0{,}18X_2X_5 - 0{,}74X_3X_5 - 0{,}3X_1X_2X_3 + 0{,}97X_2X_3X_5 + 0{,}53X_1X_2X_3X_5 \quad (4.1)$$

$$Y_2 = 46{,}28 + 4{,}13X_1 + 6{,}81X_2 + 4{,}33X_3 - 1{,}52X_4 + 0{,}54X_5 + 6{,}74X_1X_3 - 1{,}93X_1X_4 - 1{,}81X_2X_4 + 2{,}34X_2X_5 - 1{,}63X_3X_5 - 1{,}09X_1X_2X_3 + 0{,}76X_2X_3X_5 + 1{,}98X_1X_2X_3X_5 \quad (4.2)$$

Результаты полученных данных подтвердили предположение о существенном влиянии концентраций глюкозы, дрожжевого экстракта, сукцината аммония, концентрации ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} на выживаемость клеток молочнокислых бактерий.

Поверхности отклика представляют собой трехмерную модель, поэтому для анализа пяти переменных было построено несколько поверхностей отклика, чередуя три параметра, принимаемых за константу (рис.4.19).

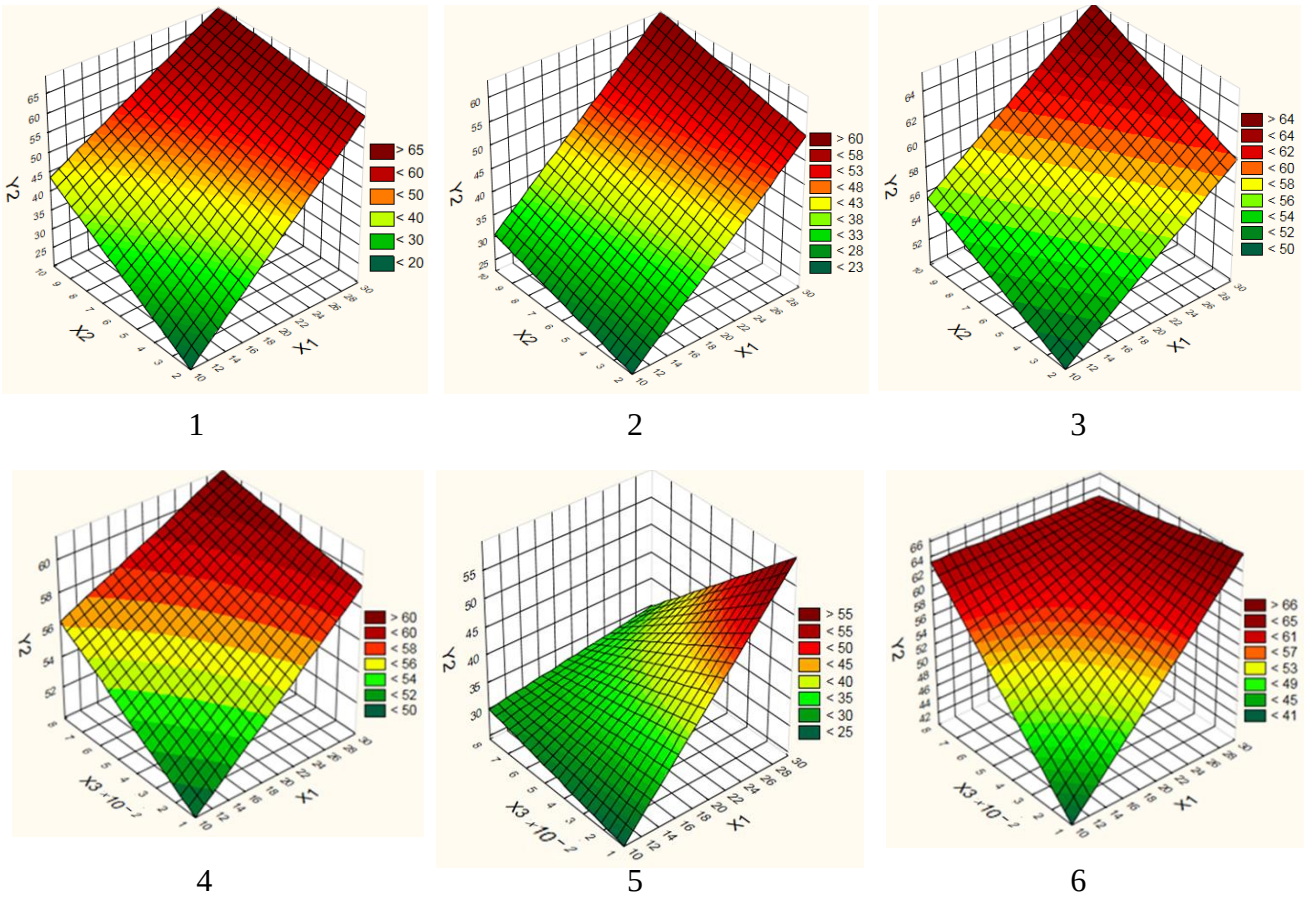


Рисунок 4.19 – Полученные поверхности отклика

1. X_1, X_2 – переменные, X_3, X_4, X_5 = const = 0
2. X_1, X_2 – переменные, X_3, X_4, X_5 = const = -1
3. X_1, X_2 – переменные, X_3, X_4, X_5 = const = 1
4. X_1, X_3 – переменные, X_2, X_4, X_5 = const = 0
5. X_1, X_3 – переменные, X_2, X_4, X_5 = const = -1
6. X_1, X_3 – переменные, X_2, X_4, X_5 = const = 1

Используя полученные поверхности отклика определили оптимальные значения концентраций компонентов питательной среды: глюкозы 24 г/л, концентрация дрожжевого экстракта – 10 г/л, сукцината аммония – 0,06 г/л, MgSO4 – 0,1 г/л, MnSO4 – 0,075 г/л (табл. 4.2).

Таблица 4.2 – Состав оптимизированной питательной среды для лактобактерий

Компоненты	Количество, г
Пептон из казеина	10,0
Мясной экстракт	10,0
Дрожжевой экстракт	8,0
Глюкоза	24
Калий фосфорнокислый двузамещенный	5,0
Сукцинат аммония	0,06
Натрий уксуснокислый	5,0
Сульфат магния	0,1
Сульфат марганца	0,075
Твин-80	1,0
Выход, мл	1000

Установлено, что при использовании оптимизированной по составу питательной среды увеличивается количество биомассы всех исследуемых криорезистентных молочнокислых бактерий относительно контроля (рис. 4.20), максимальный прирост биомассы через 24 ч культивирования при температуре 37 ^{0}C на разработанной среде демонстрируют штаммы *L. casei 32* (19,70 %), *L. bavaricus 6* (20, 82 %) и *L. fermentum 10* (20,19 %).

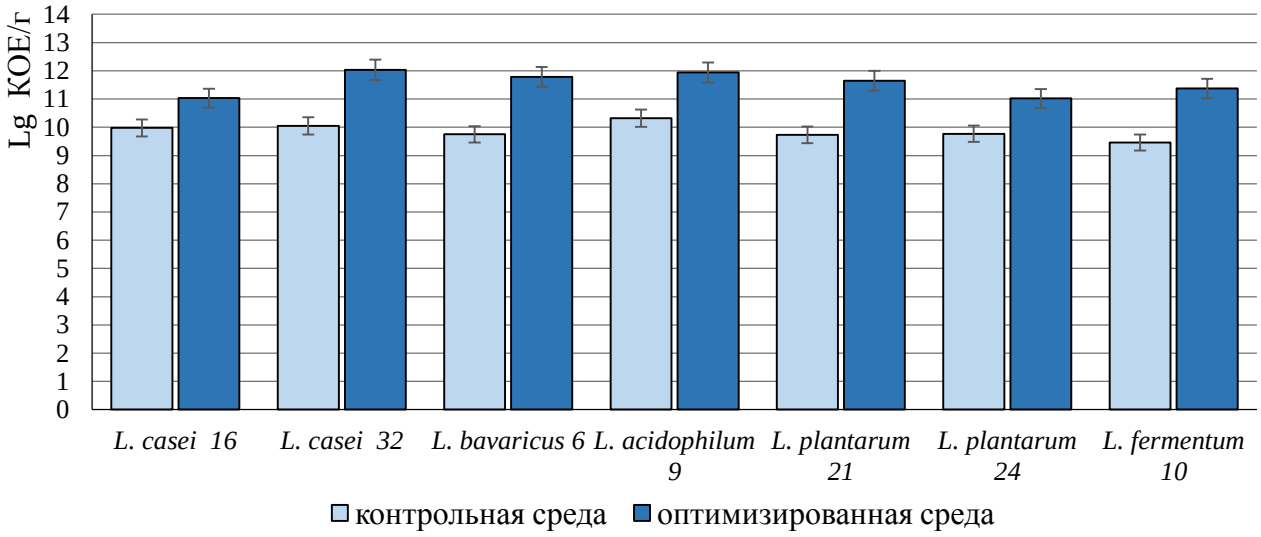


Рисунок 4.20 – Количество биомассы молочнокислых бактерий

Анализ кинетических показателей роста лактобактерий (табл. 4.3), а также результаты экспериментальных исследований по изучению влияния длительного низкотемпературного хранения клеточной суспензии в замороженном виде на количество жизнеспособных клеток (рис. 4.4 в) подтвердили эффективность разработанной оптимизированной питательной среды, применение которой позволяет в среднем увеличить удельную скорость роста молочнокислых бактерий на 16,3 %, выживаемость клеток в 2,5 раза по сравнению с контрольными значениями.

Таблица 4.3 – Кинетические параметры роста криорезистентных лактобактерий (логарифмическая фаза)

Штамм	Контрольная среда			Оптимизированная среда		
	Константа скорости деления, $ч^{-1}$	Время генерации, ч	Удельная скорость роста, $ч^{-1}$	Константа скорости деления, $ч^{-1}$	Время генерации, ч	Удельная скорость роста, $ч^{-1}$
L. casei 16	1,01±0,14	0,64±0,05	0,28±0,08	1,11±0,12	0,58±0,05	0,33±0,09
L. casei 32	1,09±0,10	0,69±0,05	0,34±0,08	1,17±0,15	0,62±0,05	0,39±0,07
L. bavaricus 6	0,82±0,07	0,91±0,06	0,20±0,05	0,91±0,11	0,95±0,07	0,24±0,06
L. acidophilum 9	1,13±0,12	0,48±0,05	0,39±0,06	1,28±0,14	0,41±0,05	0,46±0,10
L. plantarum 21	0,96±0,12	0,87±0,05	0,22±0,05	1,16±0,11	0,74±0,06	0,25±0,08
L. plantarum 24	1,56±0,16	0,72±0,06	0,25±0,05	1,71±0,21	0,67±0,06	0,29±0,06
L. fermentum 10	1,45±0,10	0,70±0,06	0,31±0,06	1,54±0,15	0,61±0,05	0,36±0,07

В результате проведенных исследований предложен способ повышения выживаемости лактобактерий, применяемых в криогенных технологиях хлебобулочных изделий, на стадии культивирования их в питательной среде перед низкотемпературной обработкой.

4.4 Разработка криорезистентной закваски лактобактерий для пищевой промышленности

В настоящее время объем производства российских заквасок для пищевой промышленности по оценкам аналитикой группы «Деловой профиль» не превышает 10 % от общего объёма их потребления, 90 % рынка представлено бактериальными заквасками зарубежных производителей, таких как «Danisco» (Франция) и «Chr. Hansen» (Дания), «MARINO», «Centro sperimentale latte», «ChemiFerm», «SACCO» (Италия), «EKOKOM групп» (Болгария), «CSK food enrichment» (Нидерланды) и др., что свидетельствует о высокой импортозависимости отечественных производителей ферментированных продуктов питания.

В России производством бактериальных заквасок занимаются ограниченное число компаний: цех заквасок ФГАНУ «ВНИМИ» («Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности»), ФГБНУ «Угличская экспериментальная биофабрика», ООО «Зелёные линии», ООО «Барнаульская биофабрика». На предприятиях НПО «Бифилайф», ЗАО «Вектор БиАльГАМ», ЗАО «БиоВеста», ООО «Пропионикс» налажен выпуск пробиотических микроорганизмов для молочной промышленности.

Активная политика импортозамещения последних лет и выраженный дефицит отечественных заквасок требуют модернизации и строительства российских производств

бактериальных препаратов, а также проведения исследований в области селекции и разработки новых заквасок микроорганизмов для пищевой промышленности, отвечающих современному уровню развития науки и техники, и способных придавать продуктам питания функциональные свойства за счет синтеза биологически активных соединений.

При выборе заквасок производители пищевых продуктов отдают предпочтение замороженным и сухим бактериальным препаратам, обладающими неоспоримыми преимуществами – высокой растворимостью, удобным способом внесения и быстрой активацией на производстве, стабильным качеством готовой продукции.

Нами разработана нормативно-техническая документация на криорезистентную закваску лактобактерий для пищевой промышленности (ТУ 10.89.19.300–007–02069639–2023) (приложение Г), при этом предусмотрено производство как сухой, так и замороженной закваски.

Показатели качества разработанной криорезистентной закваски молочнокислых бактерий представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Характеристика криорезистентной закваски

Наименование показателя	Характеристика	
	сухая закваска	замороженная закваска
Внешний вид	порошкообразная масса	столбик замороженной суспензии
Вкус и запах	чистый, кисловатый, без посторонних привкусов и запахов	
Цвет	от светло-кремового до светло-коричневого	
Массовая доля влаги, не более	6,0	52
Количество клеток КОЕ/г, не менее	2×10^{12}	1×10^{11}
Предельные значения pH	5,2-5,4	5,4-5,6
Активность ферментации, ч	5-6	6-8
Количество дрожжей и плесневых грибов, КОЕ/г	отсутствуют	отсутствуют
БГКП (колиформы)	отсутствуют	отсутствуют
Патогенные, в том числе *Salmonella spp.*	отсутствуют	отсутствуют
Коагулазоположительные стафилококки *S. aureus*	отсутствуют	отсутствуют

Технологическая схема производства криорезистентной закваски включает в себя такие операции, как подготовка оптимизированной питательной среды, внесение 5 % инокулята *L. casei 32* или *L. plantarum 24* и наращивание биомассы, выделение и концентрирование лактобактерий, лиофильное высушивание (или замораживание при

температуре минус 18-25 ^{0}С) и хранение. Разработанная технология не предусматривает существенных изменений в технологической схеме приготовления бактериальных заквасок, помимо стадии подготовки оптимизированной по составу питательной среды (табл. 4.2), что не создаст сложностей при налаживании производства данной закваски на действующих предприятиях по выпуску бактериальных препаратов молочнокислых бактерий.

В таблицах 4.5 и 4.6 представлены данные по изучению влияния продолжительности хранения разработанной закваски на ее качественные характеристики.

Таблица 4.5 – Изменение качественных характеристик сухой закваски при хранении

Наименование показателя	*L. plantarum 24*				*L. casei 32*			
	Продолжительность хранения, мес.							
	3	6	9	12	3	6	9	12
Количество клеток КОЕ/г	$3{,}4\times10^{12}$	$3{,}4\times10^{12}$	$3{,}4\times10^{12}$	$3{,}4\times10^{12}$	$4{,}2\times10^{12}$	$4{,}2\times10^{12}$	$4{,}2\times10^{12}$	$4{,}2\times10^{12}$
Предельные значения pH	4,77	4,77	4,79	4,79	4,59	4,59	4,59	4,59
Активность ферментации, ч	6	6	6	6	4	4	4	4

Таблица 4.6 – Изменение качественных характеристик замороженной закваски при хранении

Наименование показателя	*L. plantarum 24*				*L. casei 32*			
	Продолжительность хранения, мес.							
	1	2	3	4	1	2	3	4
Количество клеток КОЕ/г	$3{,}1\times10^{11}$	$3{,}0\times10^{11}$	$2{,}8\times10^{11}$	$2{,}8\times10^{11}$	$3{,}6\times10^{11}$	$3{,}5\times10^{11}$	$3{,}3\times10^{11}$	$3{,}2\times10^{11}$
Предельные значения pH	4,79	4,79	4,79	4,79	4,59	4,59	4,59	4,59
Активность ферментации, ч	7	7	7	7	5	5	5	5

Согласно требованиям нормативной документации, количество молочнокислых микроорганизмов в закваске должно быть не менее 10^{10} КОЕ/г. Анализ представленных данных свидетельствует о высокой биохимической активности и хранимоспособности разработанной криорезистентной закваски.

Условия и сроки хранения криорезистентной закваски, в течение которых сохраняются ее функционально-технологические свойства и высокое количество жизнеспособных клеток, для сухой закваски составляют 12 мес. при температуре хранения 2-4 ^{0}С, для замороженной – 4 мес. при температуре хранения минус 18 ^{0}С.

Реализация предлагаемых технологических решений позволит расширить ассортимент заквасочных культур для пищевых промышленности, решить проблему

импортозамещения заквасок молочнокислых бактерий на отечественном рынке и отсутствия биопрепаратов с криорезистентными свойствами.

4.5 Экономическая эффективность разработанной криорезистентной закваски молочнокислых бактерий

На данном этапе работы был проведен расчет экономического эффекта реализации предлагаемой биотехнологии криорезистентной закваски молочнокислых бактерий. Экономический эффект – это обобщенный показатель, который характеризует полезный результат реализации разработанной технологии или продукта для предприятия и общества от их внедрения. Экономический эффект производства криорезистентной закваски молочнокислых бактерий оценивали на основе результатов расчета плановой калькуляции и проекта оптовой цены продукции [152]. В таблицах 4.7 и 4.8 представлены результаты расчета затрат на основное сырье и проектной калькуляции себестоимости 1 кг сухой криорезистентной закваски *L. casei 32* (в ценах на 1.12.2022 г.), производимой на контрольной и оптимизированной среде (опыт).

Таблица 4.7 – Смета затрат на основное сырье и материалы на 1 кг закваски

Наименование	Норма расхода, кг		Оптовая цена, руб.	Затраты, руб.	
	контроль	опыт		контроль	опыт
Пептон из казеина	0,833	0,667	1562,65	1301,69	1042,29
Дрожжевой экстракт	0,417	0,534	1588,47	661,60	847,61
Мясной экстракт	0,833	0,667	2269,20	1890,24	1513,56
Глюкоза	1,666	1,601	1034,16	1722,91	1655,48
K_2HPO_4	0,417	0,334	1806,68	752,48	602,53
Сукцинат аммония	0	0,004	268,00	0	1,07
Цитрат аммония	0,167	0	1428,48	237,98	0
Натрий уксуснокислый	0,417	0,334	1804,82	751,71	601,91
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,008	0,007	1291,46	10,76	8,61
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,004	0,005	2559,98	10,66	12,81
Твин-80	0,083	0,067	3515,40	292,83	234,48
Вода	78,469	62,498	3,6	282,49	224,99
Итого				7915,35	6745,33

Анализ представленных данных свидетельствует о том, что сумма затрат на основное сырье при производстве закваски в опытном варианте ниже на 14,8 % по сравнению с контрольным, что объясняется увеличением выхода биомассы на 19,7 % при выращивании лактобактерий на оптимизированной среде.

Таблица 4.8 – Результаты расчета плановой калькуляции 1 кг разработанной закваски

Статьи калькуляции	Затраты на 1 кг продукции, тыс. руб.	
	контроль	опыт
Сырье и основные материалы	7,91	6,75
Вспомогательные материалы	1,58	1,35
Транспортные расходы	1,27	1,08
Расходы на тепло и электроэнергию	1,74	1,49
Расходы на заработную плату	1,19	1,01
Отчисления на соцстрахование	0,36	0,30
Расходы на содержание помещений, оборудования и инвентаря	0,40	0,34
Общехозяйственные расходы	0,40	0,34
Производственная себестоимость	14,83	12,66
Внепроизводственные расходы	0,74	0,63
Полная себестоимость	15,57	13,29
Рентабельность, %	20,00	20,00
Прибыль	3,11	2,66
Оптовая цена	18,69	15,95
НДС	3,74	3,19
Отпускная цена	22,42	19,14
Цена за 1 шт. продукта массой 10 г, руб.	224,25	191,36

Результаты проведенных экономических расчетов (табл. 4.8) показывают, что цена опытных образцов закваски ниже на 17,5 % по сравнению с контрольным вариантом, цена за 1 шт. закваски массой 10 г, выработанной на оптимизированной питательной среде, составит 191,36 руб. Установлено, что экономический эффект от реализации 1 кг криорезистентной закваски лактобактерий для пищевой промышленности составит 2,28 тыс. руб.

С целью обоснования экономической эффективности разработанной криорезистентной закваски, был проведен анализ рынка заквасок и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий отечественных производителей (табл. 4.9).

Таблица 4.9 – Обзор рынка заквасок и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий российского производства

Производитель	Наименование	Фасовка	Цена 1 шт., руб.	Цена 1 кг (л), тыс. руб.
1	2	3	4	5
ООО «БакЗдрав», г. Москва	«Нарине»	Пакет 3 г	56,0	18,67
	«Casei»	Пакет 3 г	51,5	17,17
	«Йогурт»	Пакет 3 г	116,0	38,67
	«Здоровье»	Пакет 3 г	58,0	19,33
ООО «Каприна», г. Москва	«Биомикс»	Пакет 3 г	98,0	32,67
	«Його»	Пакет 3 г	82,0	27,33

продолжение таблицы 4.9

1	2	3	4	5
ООО «НПФ Пробиотика», г. Москва	«Эвиталия»	Флакон 300 мг	62,0	206,66
ООО «Фермент», г. Красногорск	«Нарине»	Флакон 250 мг	35,0	140,00
ФГБНУ «Угличская экспериментальная биофабрика», г. Углич	«БК-Углич-К»	Пакет 1,05 г	232,0	220,95
	«БК-Углич-№4»	Пакет 1,05 г	232,0	220,95
	«БК-Углич-7К»	Пакет 1,05 г	232,0	220,95
ООО «Зеленые линии», г. Красногорск	«Profiline»	Пакет 50 г	733,0	14,67
	«Goldenline»	Пакет 50 г	1597,0	31,94
	«Probiline»	Пакет 50 г	1264,0	25,28
НПФ «ГРИММ Н», г. Москва	«Эвита»	Флакон 2 г	240,0	120,00
ЗАО «Вектор БиАльГАМ», р.п. Кольцово, Новосибирская обл.	«Бифацил»	Пакет 2 г	52,0	26,00
	«Биойогурт»	Пакет 2 г	52,0	26,00
	«Бифатоник»	Пакет 2 г	61,0	30,50
	«Трилакт»	Флакон 12 мл	116,0	9,67
ООО «Пропионикс», г. Москва	«Концентрат бифидобактерий»	Флакон 12 мл	106,0	8,83
ЗАО «Био-Веста», г. Новосибирск	БК «Биовестин-лакто»	Флакон 12 мл	48,5	4,04
	БК «Бифилин-экс»	Флакон 12 мл	76,0	6,33
ФГАНУ «ВНИМИ», г. Москва	Закваска бактериальная лактококков Лс -	Флакон 0,65 г	252,0	387,69
	Бактериальный концентрат термофильных молочнокислых палочек КА	Пакет 10 г	308,0	30,80
	Концентрат бактериальный лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков КЛТ	Флакон 1 г	268,0	268,00
АО НПО «Микроген» г. Пермь	«Лактобактерин» сухой	Флакон 300 мг	20,9	69,67
ООО «Био Лонг ,Лайф», г. Ростов-на-Дону	«Лактобактерин+» жидкий	Флакон 10 мл	68,0	6,80
	«Ацидофиллин+» жидкий	Флакон 10 мл	109,0	10,90

Установлено, что цена бактериальных препаратов в жидком виде колеблется в диапазоне от 4,04 до 10,90 тыс. руб./л; цена сухих заквасок и биопрепаратов значительно

выше, так минимальный ценовой диапазон составляет 14,67-38,67 тыс руб./кг, максимальный – 206,66-387,69 тыс. руб./кг. Расчетная цена криорезистентной закваски составляет 19,14 тыс руб./кг, что сопоставимо со стоимостью коммерческих аналогов, присутствующих на рынке.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ стоимости заквасок и бактериальных концентратов свидетельствует о том, что производство криорезистентной закваски молочнокислых бактерий для пищевой промышленности является прибыльным, что говорит об его экономической эффективности и целесообразности.

4.6 Заключение к четвертой главе

Большой научный и практический интерес представляет поиск специальных веществ – криопротекторов, способных прямо или косвенно защищать клетки микроорганизмов от необратимых повреждений в процессах низкотемпературной обработки и последующей дефростации тестовых полуфабрикатов, что ведет к сохранению их физиологической и биохимической активности в размороженных полуфабрикатах. Следует отметить, что при использовании криопротектора в отношении микроорганизмов, применяемых в пищевых технологиях, основным требованием является его абсолютная безвредность не только для клеток микроорганизмов, но и организма человека в целом.

Изучение влияния процессов замораживания, хранения и последующей дефростации культур показало, что в период экспоненциального роста молочнокислые бактерии являются крайне чувствительными к таким стрессовым воздействиям.

Впервые показана возможность использования янтарной кислоты и ее солей в качестве криопротекторов в отношении молочнокислых бактерий, применяемых в составе заквасок для криогенной технологии хлеба. Установлено, что криорезистентность молочнокислых бактерий увеличивается при их предварительном культивировании в средах, содержащих различные концентрации данных добавок.

Показано, что криорезистентность молочнокислых бактерий увеличивается при их предварительном культивировании в средах, содержащих различные концентрации янтарной кислоты, сукцината калия и сукцината аммония. Янтарная кислота и ее соли оказывают криопротекторное действие на молочнокислые бактерии в диапазоне концентраций в среде 0,001–0,0011 масс. %.

Выявлено, что при добавлении янтарной кислоты происходит увеличение силы адгезии клеток молочнокислых бактерий на 31 %, снижение их деформации на 53 %.

Установлено, что включение янтарной кислоты и сукцинатов в среду в период предварительного культивирования позволяет повысить активность амилолитических ферментов молочнокислых бактерий на 30-45 % и 15-20 % соответственно, а также интенсифицировать процесс кислотообразования на 10-20 % в зависимости от вида молочнокислых бактерий.

Установлено, что культивирование дрожжевых клеток в среде с янтарной кислотой и ее солями также приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток дрожжей после низкотемпературной обработки до 64-76 %, а также повышению их биотехнологических свойств. Максимальный криопротекторный эффект достигается при введении сукцинатов аммония и калия в питательную среду в количестве 0,002-0,003 масс.%, янтарной кислоты – 0,007 мас.%,

Следует отметить, что при использовании солей в качестве компонентов питательной среды отмечается более высокий процент выживаемости клеток дрожжей после выхода их из криоанабиоза, так количество жизнеспособных клеток увеличивается на 16-28 % относительно данных, полученных в опытах с янтарной кислотой.

Такое стимулирующее воздействие исследованных добавок на микроорганизмы позволит управлять интенсивностью и направленностью микробиологических и биохимических процессов в полуфабрикатах хлебопекарного производства и в конечном итоге прогнозировать стабильное качество готовой продукции.

Исследованные добавки можно рекомендовать для использования в качестве компонентов среды культивирования молочнокислых бактерий, применяемых в криогенной технологии хлеба и хлебобулочных изделий.

Проведены комплексные исследования по разработке состава питательной среды с этапом оптимизации для повышения криорезистентности молочнокислых бактерий.

Получены математические зависимости изменения количества биомассы лактобактерий и процента выживаемости клеток от количества глюкозы, дрожжевого экстракта, сукцината аммония, концентрации ионов Mn^{2+} и Mg^{2+}; в результате анализа полученных зависимостей были определены оптимальные дозировки компонентов питательной среды.

В результате проведенных исследований предложен способ повышения криозащитных свойств молочнокислых бактерий и дрожжей, применяемых в криогенных технологиях хлебобулочных изделий, на стадии культивирования их в питательных средах перед низкотемпературной обработкой. Разработан состав оптимизированной питательной среды для лактобактерий, позволяющий увеличить их выживаемость после

низкотемпературной обработки в 2,5 раза по сравнению с контрольными значениями, повысить удельную скорость роста клеток на 16,3 %.

Разработана нормативно-техническая документация на криорезистентную закваску лактобактерий для пищевой промышленности (ТУ 10.89.19.300–007–02069639–2023), представляющей собой жизнеспособные клетки *L. casei 32* или *L. plantarum 24*, предназначенную для производства пищевых продуктов, вырабатываемых с применением криогенных технологий. В результате проведенных расчетов установлено, что экономический эффект от реализации 1 кг разработанной криорезистентной закваски составит 2,28 тыс. руб.

Реализация предлагаемых технологических решений позволит расширить ассортимент заквасочных культур для пищевой промышленности, а также решить проблему импортозамещения заквасок и ограниченного ассортимента биопрепаратов молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами.

ГЛАВА 5. РЕАЛИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КРИОРЕЗИСТЕНТНЫХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ РЖАНО-ПШЕНИЧНОГО ХЛЕБА НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

Основной проблемой в применяемых криогенных технологиях хлебопекарного производства многие ученые считают ухудшение качества готовой продукции: снижение показателей удельного объема и формоустойчивости, отделение корки от мякиша, ее хрупкость, а также ограниченные сроки хранения полуфабрикатов в замороженном виде. Для совершенствования существующих научных разработок в области криотехнологии хлебобулочных изделий необходимы комплексные исследования, направленные на изучение микробиологических, физико-химических и биохимических процессов, происходящих при низкотемпературном воздействии на тестовые полуфабрикаты.

Знание о степени влияния процессов замораживания и хранения на биотехнологические процессы в тесте позволит прогнозировать реологические свойства тестовых полуфабрикатов, структурно-механические и органолептические характеристики готовой продукции, а также более обоснованно и грамотно подойти к разработке рецептур и технологических параметров тестоприготовления нового ассортимента хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов.

5.1 Влияние низкотемпературной обработки на биотехнологические процессы в тестовых полуфабрикатах

5.1.1 Изучение выживаемости дрожжей и молочнокислых бактерий

В основе производства хлебобулочных изделий лежит совокупность сложнейших изменений сырья под воздействием микроорганизмов. Разнообразие микрофлоры сырья и полуфабрикатов хлебопекарного производства обусловливает сложность процессов брожения, которые определяются видом, количеством, чистотой применяемых культур бродильных микроорганизмов, параметрами процесса, обеспеченности субстратом для сбраживания [90]. Помимо спиртового и молочнокислого брожения в ржаных заквасках и тесте встречаются пропионовокислое, бутиленгликолевое, масляное, ацетонобутиловое, ацетоноэтиловое и другие типы брожения [75, 90].

Результаты исследований показывают, что доминирующими микроорганизмами заквасок и теста из ржаной муки являются молочнокислые бактерии (табл. 5.1). Установлено, что соотношение молочнокислых бактерий и дрожжей в густой закваске и тесте составляет 78:1 и

60:1, в жидкой – 35:1 и 38:1. В исследуемых образцах обнаружены также пропионовокислые бактерии. Уксуснокислые бактерии обнаружены только в ржаной густой закваске.

Таблица 5.1 – Состав микрофлоры полуфабрикатов из ржаной муки

Микроорганизмы	Количество, КОЕ/г			
	Жидкая закваска	Тесто на жидкой закваске	Густая закваска	Тесто на густой закваске
Дрожжи	(25±4))×10 ^{7}	(29±6))×10 ^{8}	(56±6)×10 ^{8}	(94±6)×10 ^{8}
Молочнокислые бактерии	(87±9)×10 ^{8}	(109±7)×10 ^{9}	(44±3) ×10 ^{10}	(15±4)×10 ^{10}
Пропионовокислые бактерии	(21±5)×10 ^{2}	804±12	(54±9) ×10 ^{2}	(17±8)×10 ^{2}
Уксуснокислые бактерии	не обнаружены	не обнаружены	(27±4) ×10 ^{2}	не обнаружены

Изучение состава молочнокислых бактерий ржано-пшеничных полуфабрикатов, показало, что молочнокислые бактерии *р. Lactobacillus* существенно превышают количество клеток молочнокислых бактерий *р. Pediococcus* и *Leuconostoc* (табл. 5.2), молочнокислые бактерии *р. Streptococcus* в образцах не обнаружены.

Таблица 5.2 – Молочнокислые бактерии полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба КОЕ/г

Род молочнокислых бактерий	Количество, КОЕ/г			
	Жидкая закваска	Тесто на жидкой закваске	Густая закваска	Тесто на густой закваске
Lactobacillus	(87±9)×10 ^{8}	(101±9)×10 ^{9}	(44±3)×10 ^{10}	(14±8)×10 ^{10}
Pediococcus	(43±6)×10 ^{3}	(31±6)×10 ^{2}	(36±10)×10 ^{4}	(12±4)×10 ^{2}
Leuconostoc	(58±6)×10 ^{5}	(23±5)×10 ^{5}	(42±4)×10 ^{6}	(63±9)×10 ^{5}

Результаты исследований показали, что в тестовых полуфабрикатах из ржаной муки преобладают гомоферментативные виды молочнокислых бактерий *L. plantarum* и *L. delbruckii*, количество которых в 2,5-3 раза выше, чем молочнокислых бактерий, осуществляющих гетероферментативное молочнокислое брожение, таких как *L. brevis, L. fermentum, L. buchneri* (табл. 5.3).

Таблица 5.3 – Состав молочнокислых бактерий *р. Lactobacillus* в полуфабрикатах

Вид молочнокислых бактерий	Количество, КОЕ/г			
	Жидкая закваска	Тесто на жидкой закваске	Густая закваска	Тесто на густой закваске
L. plantarum	(37±6)×10 ^{8}	(39±5)×10 ^{9}	(231±3)×10 ^{9}	(74±7)×10 ^{9}
L. delbruckii	(108±7)×10 ^{7}	(65±7)×10 ^{8}	(101±5)×10 ^{9}	(36±3)×10 ^{9}
L. brevis	(14±4)×10 ^{7}	(58±6)×10 ^{8}	(51±3)×10 ^{9}	(141±4)×10 ^{8}
L. fermentum	(36±5)×10 ^{8}	(44±8)×10 ^{9}	(56±6)×10 ^{9}	(133±5)×10 ^{8}
L. buchneri	(22±4)×10 ^{7}	(38±4)×10 ^{8}	(91±2)×10 ^{8}	(38±4)×10 ^{8}

Результаты исследования качественного состава дрожжей в производственных закваска и тесте подтверждают сведения о том, что в исследуемых образцах доминирующим видом дрожжей (95-98 % от общего их количества) является *S. cerevisiae*. В полуфабрикатах ржано-пшеничного хлеба обнаружены также дрожжи, принадлежащие к виду *S. minor,* содержание которых составило 2-5 % от общего количества дрожжей, участвующих в процессах брожения.

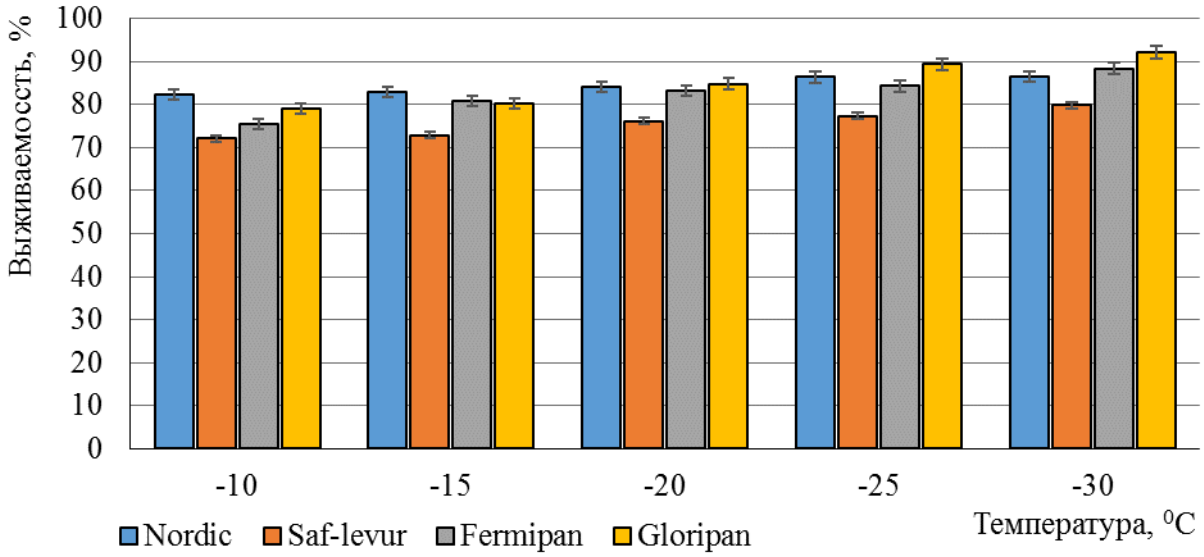
Поскольку основной причиной снижения качества готовой продукции на основе замороженных полуфабрикатов многие исследователи связывают с гибелью клеток микрофлоры, осуществляющей процессы брожения, актуальными являются исследования, направленные на изучение влияния низкотемпературной обработки полуфабрикатов из ржаной муки на жизнеспособность клеток дрожжей и молочнокислых бактерий. Выживаемость клеток микроорганизмов при воздействии отрицательных температур зависит от многих факторов, в частности от вида и штамма микроорганизма, условий культивирования клеток, скорости замораживания дефростации, продолжительности низкотемпературного воздействия, наличия в среде криопротекторов и др. [63, 127, 148].

Результаты, характеризующие изменение количества жизнеспособных клеток дрожжей в зависимости от температуры замораживания тестовых полуфабрикатов, представлены на рисунке 5.1 (продолжительность замораживания 3 сут.).

Установлено, что жизнеспособность дрожжей зависит от температуры замораживания тестовых заготовок и от исходного состояния клеток. Так выживаемость сухих дрожжей при температуре минус 10 ^{0}С в среднем составляет 77,3 %, прессованных – 68,5 %, тогда как при температуре минус 30 ^{0}С – 86,4 % и 84,3 % соответственно. Следует отменить, что низкотемпературная обработка оказывает губительное влияние на сухие дрожжи в меньшей степени, чем на прессованные, поскольку дрожжевые клетки в них находятся в состоянии анабиоза и, следовательно, наиболее устойчивы к неблагоприятным условиям внешней среды.

Выявлено, что кратковременное низкотемпературное воздействие на дрожжевые клетки в тестовой среде не вызывает изменений в морфологии изучаемых клеток и их колоний: колонии дрожжей имели развитую пленку-покров; отдельные клетки, выявляемые по краям колоний, не изменяли своей морфологии.

а) сухие дрожжи



б) прессованные дрожжи

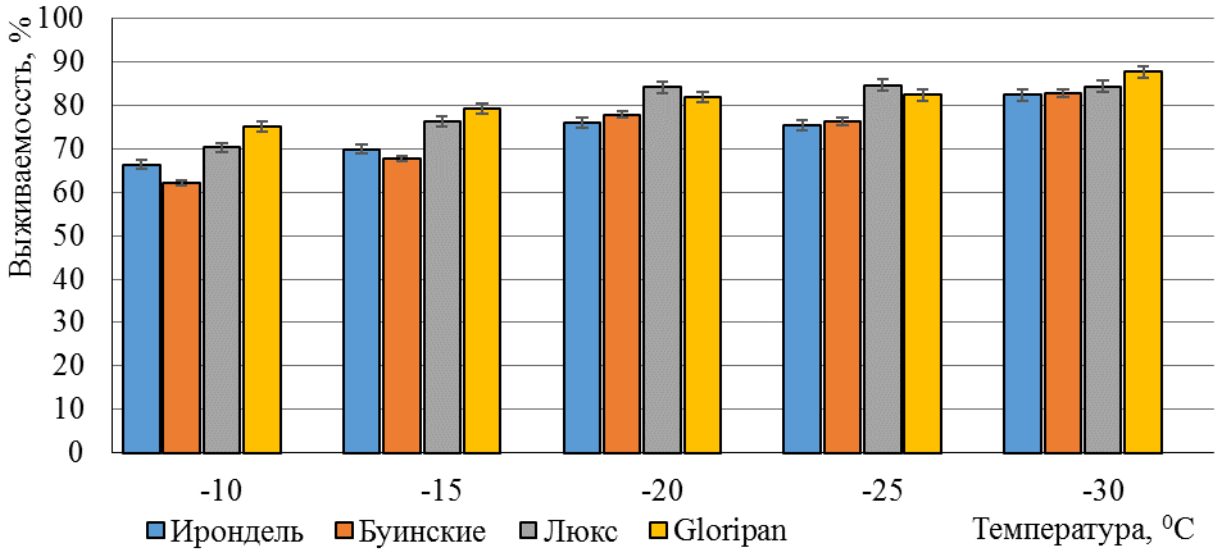


Рисунок 5.1 – Выживаемость клеток дрожжей в тесте при различных температурных режимах замораживания

Результаты исследования выживаемости дрожжевых клеток при длительном низкотемпературном воздействии (температура замораживания минус 30 ^{0}C) показывают, что количество жизнеспособных клеток через 180 дней хранения колеблется в диапазоне от 56,4 % до 65,6 % (табл. 5.4) и существенно не зависит от вида используемых дрожжей, при чем существенное снижение количества жизнеспособных клеток (30 % и более) наблюдается после трех месяцев хранения полуфабрикатов в замороженном виде.

Таблица 5.4 – Количество жизнеспособных клеток дрожжей в тестовых полуфабрикатах, подвергавшихся длительному низкотемпературному хранению, %

Срок хранения, сут.	Прессованные дрожжи				Сухие дрожжи			
	Буинские	Иронделъ	Люкс	Gloripan	Nordic	Saf-levur	Fermipan	Gloripan
30	82,5	82,0	83,4	87,3	86,3	79,1	87,6	91,5
60	80,7	80,3	78,8	84,5	77,4	74,5	82,3	84,7
90	79,1	79,6	73,6	76,9	70,9	71,6	75,1	80,3
120	71,8	71,5	68,2	70,6	65,4	64,8	69,1	76,8
150	66,9	66,6	64,7	68,9	62,9	60,2	64,4	72,4
180	62,1	58,8	56,7	63,2	59,8	56,4	57,6	65,6

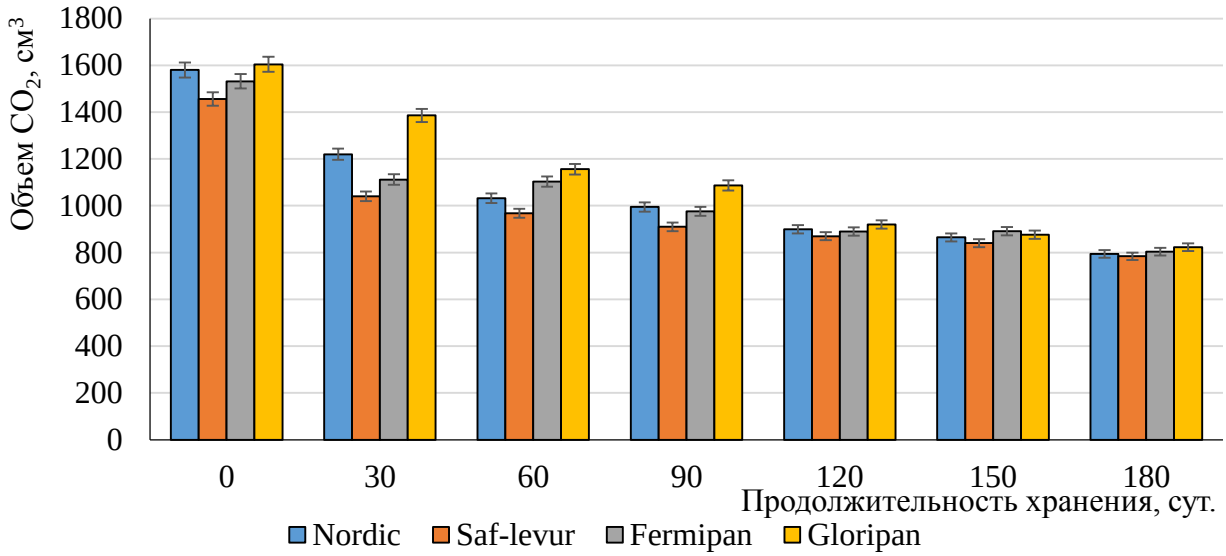
Поскольку в научно-технической литературе [222] имеются данные о том, клетки дрожжей могут терять способность к воспроизводству при низкотемпературной обработке, но при этом сохранять газообразующую способность целесообразным представлялось провести оценку активности дрожжей по изменению скорости газообразования в тестовых полуфабрикатах. Чтобы исключить влияние газообразующей способности муки на полученные результаты, для проведения эксперимента на данном этапе использовали одну и ту же пробу муки.

Необходимо отметить, что газообразующая способность ржано-пшеничного теста постепенно уменьшается на протяжении всего периода хранения замороженных полуфабрикатов (рис.5.2). Так, после 180 сут. хранения замороженных полуфабрикатов газообразующая способность тестовых заготовок при использовании прессованных и сухих дрожжей снизилась на 41 % и 48 % соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в результате процессов замораживания, хранения и размораживания тестовых заготовок наблюдается уменьшение числа жизнеспособных клеток дрожжей, снижается их газообразующая способность, что необходимо учитывать при разработке технологических параметров приготовления замороженных тестовых полуфабрикатов.

Известно, что развитие любой периодической культуры микроорганизмов происходит в несколько фаз, из которых наибольшее значение с точки зрения исследования процесса брожения тестовых полуфабрикатов имеет фаза логарифмического роста. Именно в этот период происходит максимальное накопление биомассы и максимальное выделение продуктов жизнедеятельности во внешнюю среду. Определенный интерес с точки зрения криотехнологии хлебопечения представляет также фаза адаптации микроорганизмов к условиям окружающей среды (лаг-фаза роста).

а) сухие дрожжи



б) прессованные дрожжи

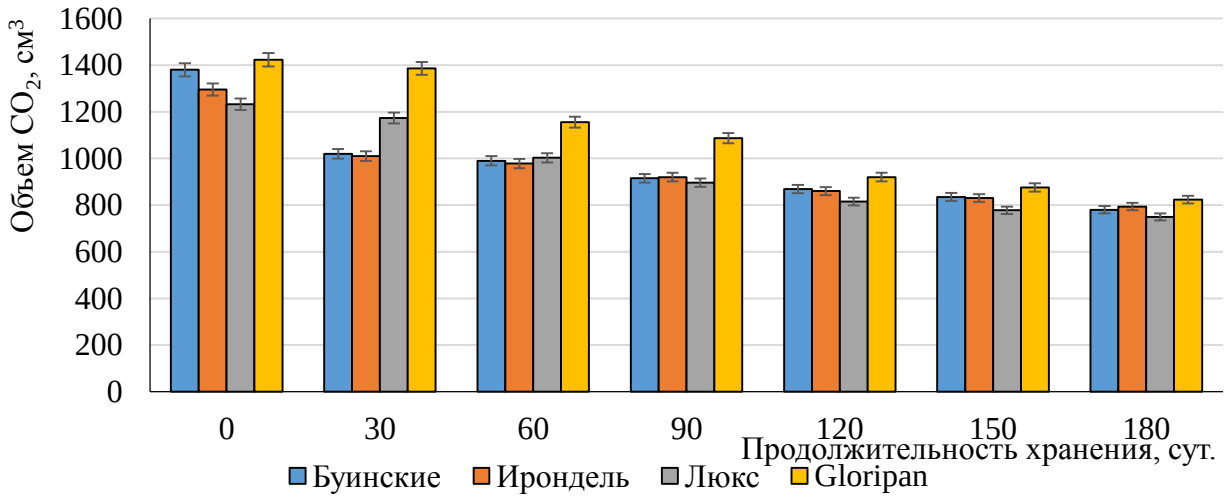


Рисунок 5.2 – Изменение газообразующей способности ржано-пшеничного теста при низкотемпературном хранении в зависимости от используемых дрожжей

В целях определения степени воздействия низких температур на клетки дрожжей, находящихся в лаг- и лог-фазах роста, а также выявления температуры замораживания клеточной суспензии, позволяющей сохранить активность дрожжей в наибольшей степени, клеточную суспензию дрожжей отбирали в соответствующую фазу роста и замораживали при минимальных (минус 5-10 ^{0}C) и максимальных (минус 25-30 ^{0}C) температурах, используемых в хлебопечении.

Проведенные нами исследования показали, что обработка клеточной суспензии при температуре минус 5-30 ^{0}C в различной степени влияет на выживаемость клеток дрожжей (рис. 5.3). Клетки *Saccharomyces cerevisiae,* выделенные из промышленных дрожжей Gloripan, Nordic и буинские, отобранные в лаг-фазу роста, отличаются наибольшей

жизнеспособностью (75,9; 65,8 и 54,4% соответственно). Наименьшее количество жизнеспособных клеток (34,%) отмечается для дрожжей Saf-levur.

Существенное различие между количеством жизнеспособных клеток, отобранных в лаг- и лог-фазу роста, наблюдается у дрожжей *S. cerevisiae* Gloripan и Nordic. У дрожжей Буинских и Saf-levur разница в выживаемости клеток, отобранных в указанные фазы роста, была менее значительна и составляет в среднем 15 % (рис.5.3).

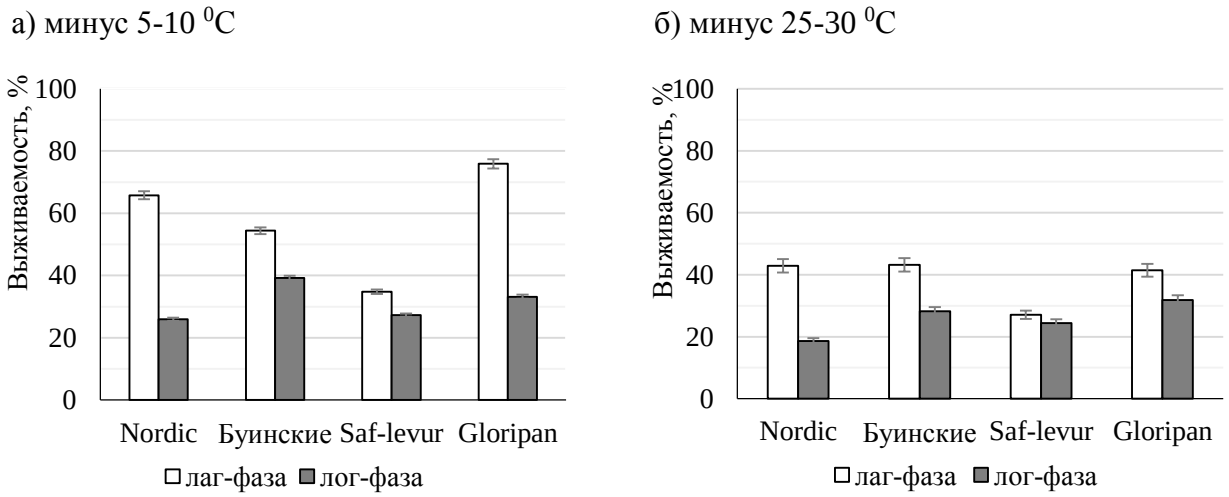


Рисунок 5.3 – Выживаемость дрожжей при замораживании клеточной суспензии в течение 1 сут.

Установлено, что при воздействии отрицательных температур наблюдается увеличение мальтазной активности всех исследуемых дрожжей, причем при температуре замораживания минус 25-30 ^{0}C этот эффект проявляется сильнее (рис.5.4).

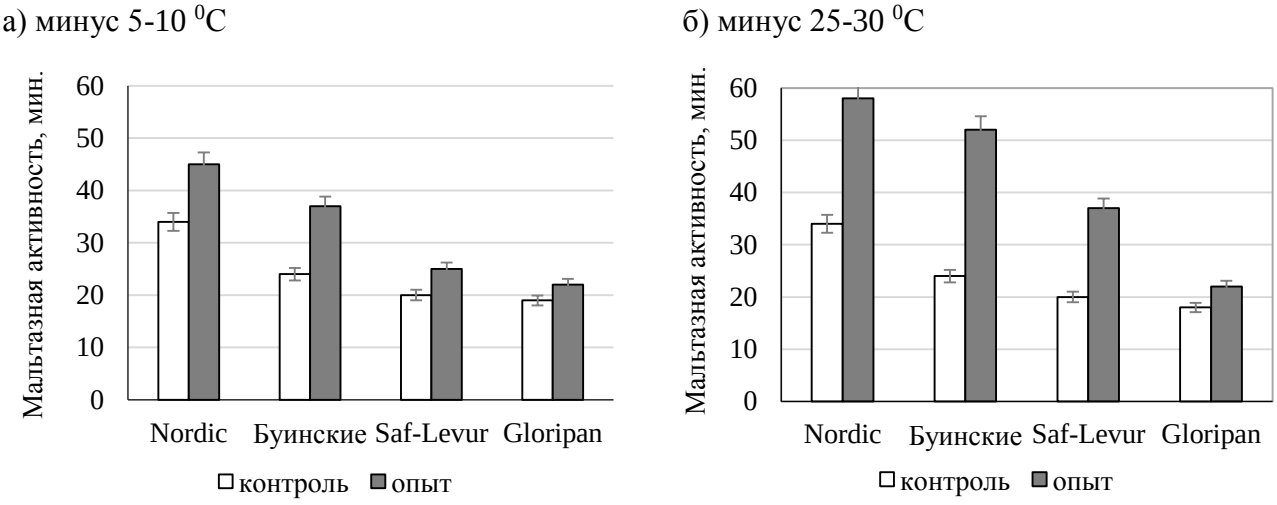
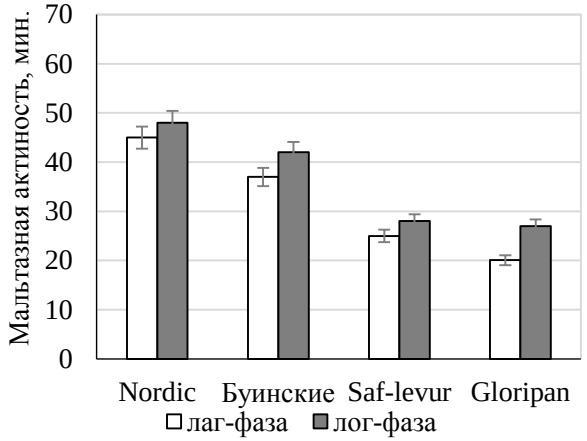


Рисунок 5.4 – Мальтазная активность дрожжей после суточного замораживания биомассы

Замороженные клетки, отобранные в лаг-фазу, имеют более высокую мальтазную активность по сравнению с таковыми, отобранными в фазу логарифмического роста (рис. 5.5). Аналогичные закономерности прослеживаются и при изучении зимазной активности дрожжей (рис. 5.6).

а) минус 5-10 ^{0}C



б) минус 25-30 ^{0}C

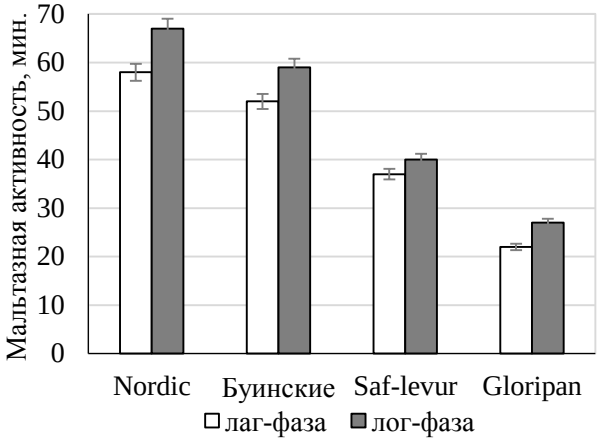
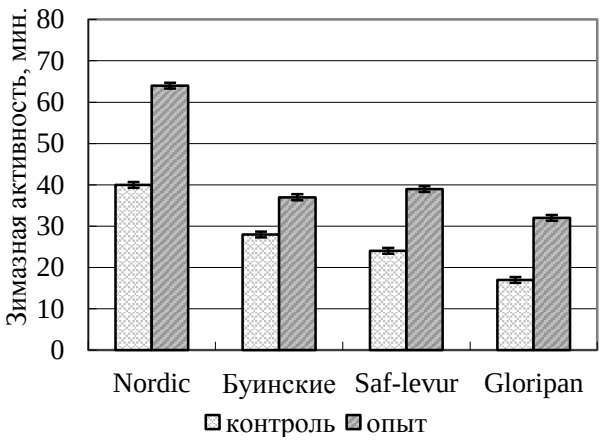


Рисунок 5.5 – Изменение мальтазной активности дрожжей в зависимости от фазы роста после суточного замораживания

а) минус 5-10 ^{0}C



б) минус 25-30 ^{0}C

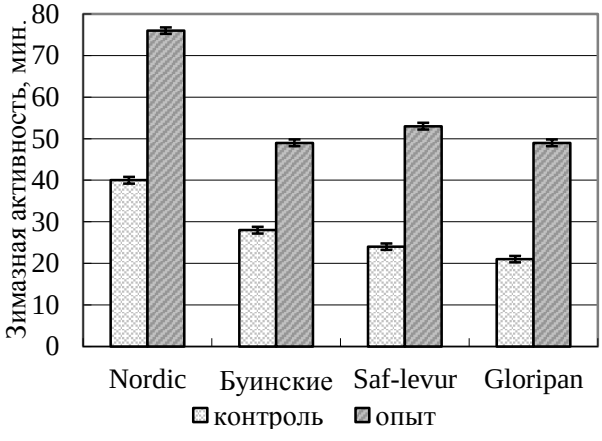
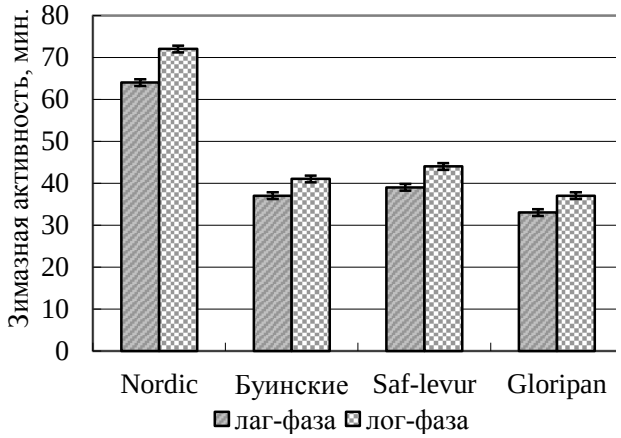


Рисунок 5.6 – Зимазная активность дрожжей после суточного замораживания биомассы при различных температурных режимах

Поскольку криотехнология хлебобулочных изделий предполагает длительное низкотемпературное воздействие на клетки микроорганизмов, нами было исследовано изменение выживаемости дрожжей при хранении клеточной суспензии в течение 3 нед. при температурах минус 5-10 ^{0}C и минус 25-30 ^{0}C (рис. 5.7).

а) минус 5-10 ^{0}C



б) минус 25-30 ^{0}C

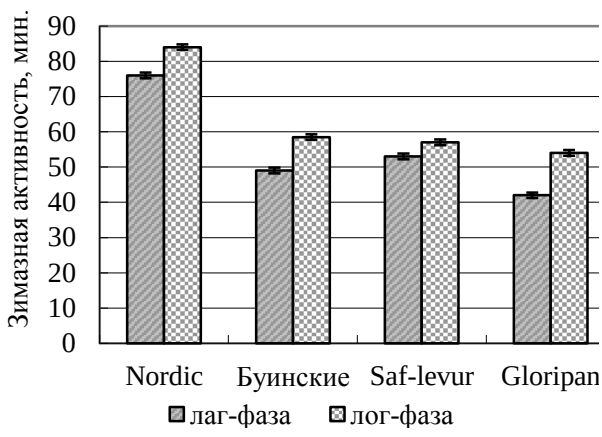
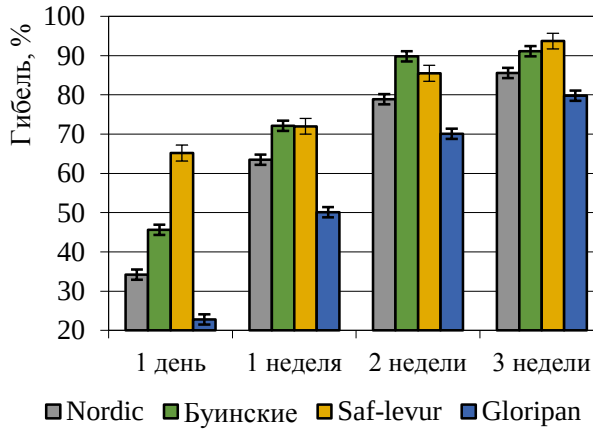


Рисунок 5.7 – Изменение зимазной активности дрожжей в зависимости от фазы роста после суточного замораживания

Установлено, что количество мертвых клеток всех исследуемых штаммов дрожжей значительно возрастает по мере увеличения срока хранения клеточной суспензии в замороженном виде при температуре минус 5-10^{0}C и к концу срока хранения составляет 80,0-96,0 и 90,0-98,3 % для дрожжей, отобранных в лаг- и лог-фазу роста соответственно (рис. 5.8). Наименьший процент гибели наблюдали у дрожжей *S. cerevisiae* Nordic и Gloripan, отобранных в лаг-фазу роста.

а) лаг-фаза роста дрожжей



б) лог-фаза роста дрожжей

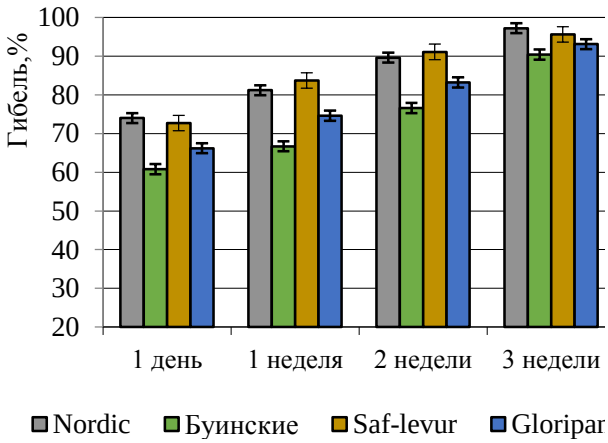


Рисунок 5.8 – Выживаемость клеток дрожжей в зависимости от фазы роста при температуре минус 5-10 ^{0}C

Выявлено, что количество мертвых клеток в клеточной суспензии, отобранных в лог-фазу роста перед замораживанием в 2-2,5 раза выше у всех исследуемых штаммов по сравнению с лаг-фазой. Аналогичные данные были получены для режима замораживания при температуре минус 25-30 ^{0}C (рис. 5.9).

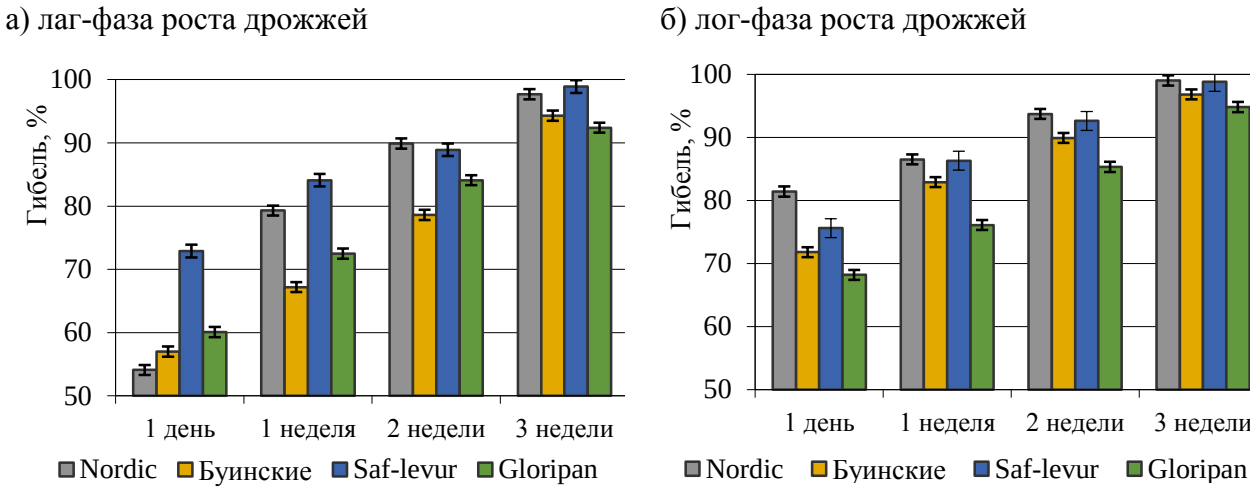


Рисунок 5.9 – Выживаемость клеток дрожжей в зависимости от фазы роста при температуре минус 25-30 ºС

Выявлено, что на протяжении всего срока хранения замороженной суспензии исследуемых штаммов наблюдалось снижение скорости сбраживания мальтозы (рис. 5.10) и, напротив, увеличение скорости сбраживания сахарозы (рис. 5.11).

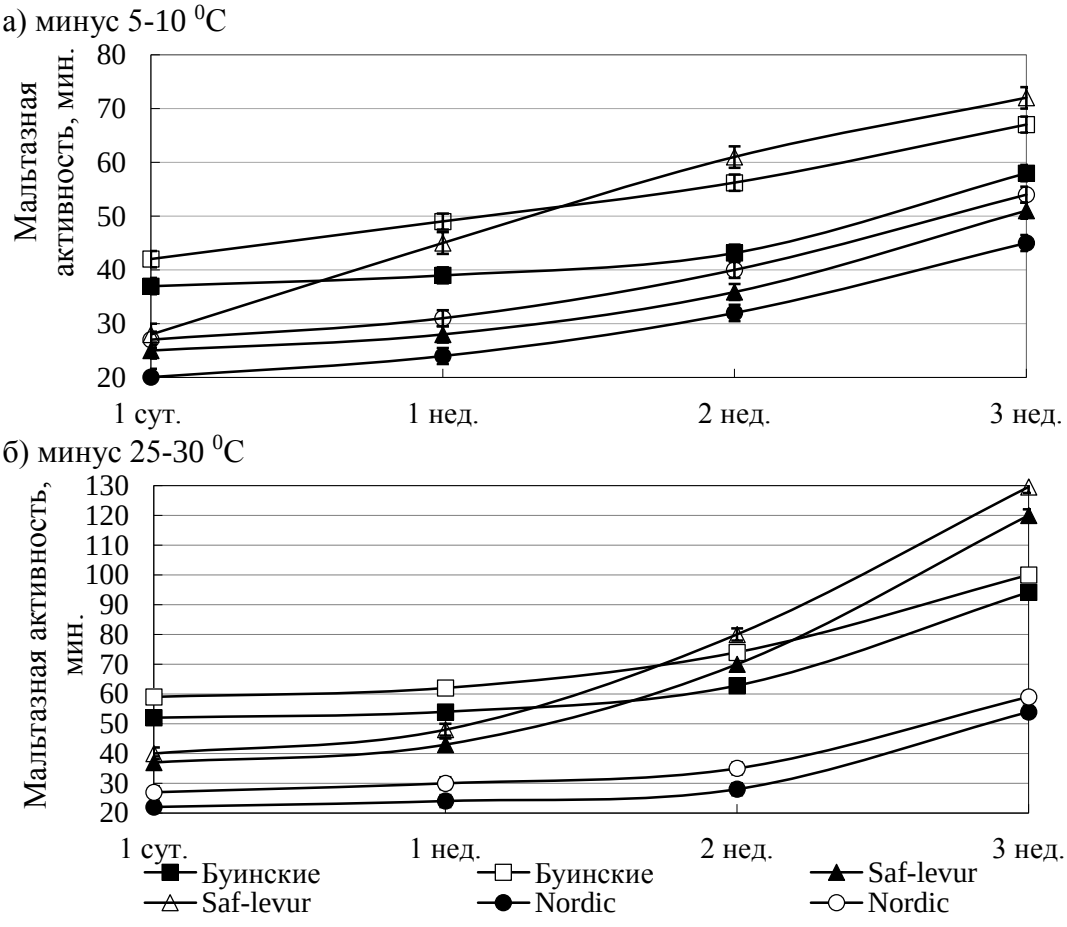
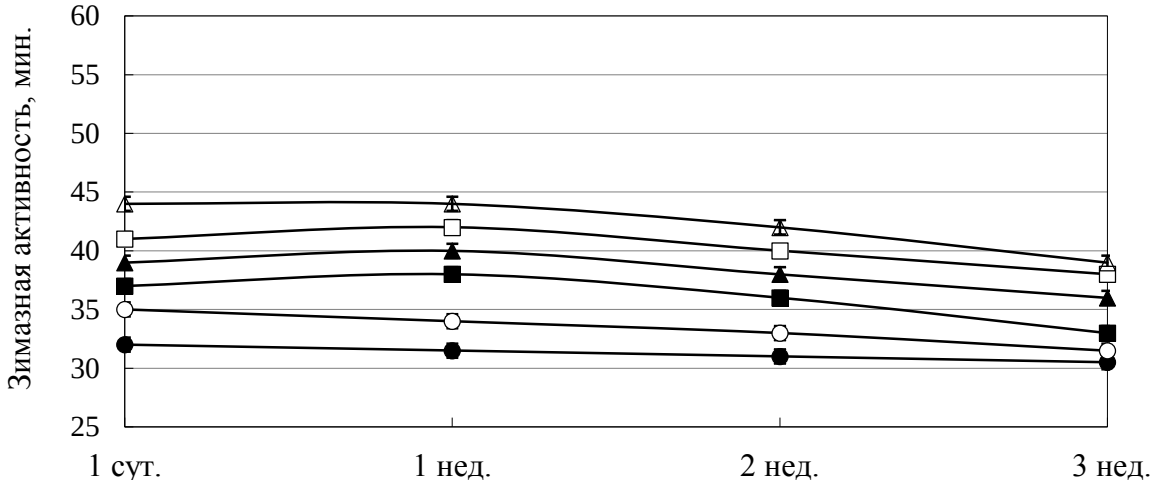


Рисунок 5.10 – Изменение мальтазной активности дрожжей при хранении биомассы при длительном низкотемпературном воздействии

Существенно, что дрожжевые клетки, отобранные перед замораживанием в лаг-фазу роста, имели лучшие показатели мальтазной и зимазной активностей при замораживании клеточной суспензии как при температуре минус 5-10 ^{0}С, так и при температуре минус 25-30 ^{0}С.

а) минус 5-10 ^{0}С



б) минус 25-30 ^{0}С

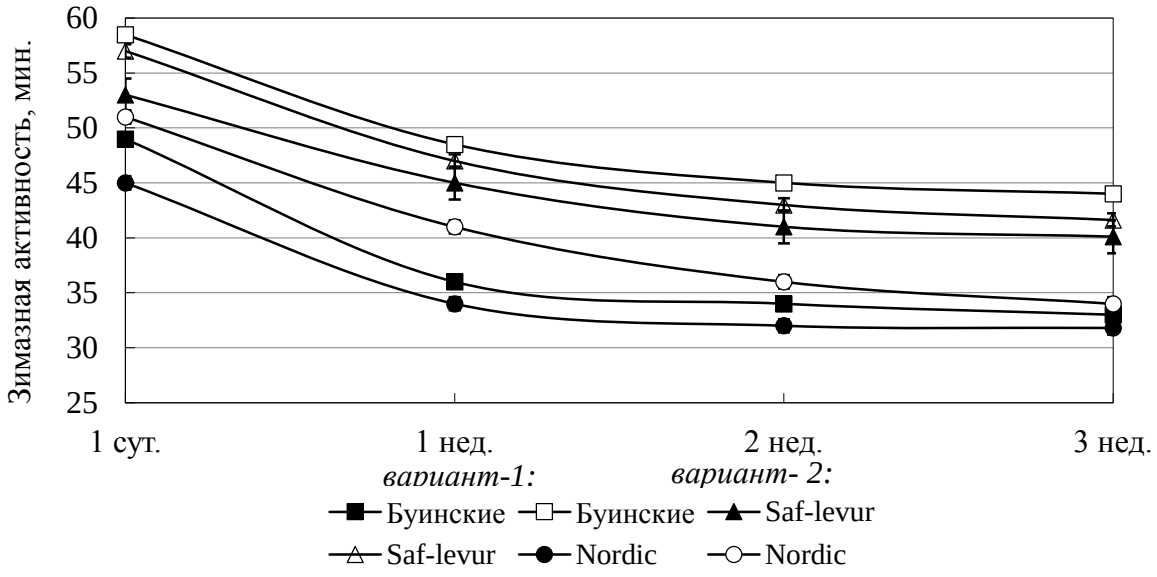


Рисунок 5.11 – Изменение зимазной активности дрожжей при хранении биомассы в зависимости от длительности замораживания

Таким образом, результаты исследования влияния процессов замораживания на выживаемость дрожжевых клеток в клеточной суспензии и тестовых полуфабрикатах позволяют сделать выводы о том, что клетки дрожжей, находящиеся перед замораживанием в лаг-фазе, проявляют большую устойчивость к низкотемпературной обработке по сравнению с клетками, находящимися в фазе активного роста (лог-фаза), кроме того температурный режим замораживания минус 5-10 ^{0}С оказывает на дрожжевые клетки меньшее отрицательное воздействие, чем режим минус 25-30 ^{0}С.

Результаты, характеризующие изменение количества жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий в тестовых полуфабрикатах после низкотемпературной обработки (продолжительность замораживания 1 сут.) представлены в таблице 5.5.

Таблица 5.5 – Влияние режимов низкотемпературной обработки на жизнеспособность клеток молочнокислых бактерий в тесте

Температура, ^{O}C	Количество жизнеспособных клеток, %		
	p.Lactobacillus	*p.Pediococcus*	*p.Leuconostoc*
-10	56,9	56,1	54,7
-15	68,2	44,9	49,0
-20	80,8	37,3	46,2
-25	83,9	29,9	38,5
-30	87,7	20,8	32,1

Установлено, что с понижением температуры замораживания снижается жизнеспособность клеток молочнокислых бактерий *p. Pediococcus* и *Leuconostoc*, являющихся загрязнителями хлебопекарного производства, и, напротив, для *p. Lactobacillus* – чем ниже была температура замораживания среды, тем выше сохранялась жизнеспособность активных кислотообразователей теста.

Анализ данных об изменении видового состава *p. Lactobacillus* теста (рис. 5.12) показал, что наименее чувствительными к отрицательным температурам являются клетки *L. plantarum* и *L. fermentum*.

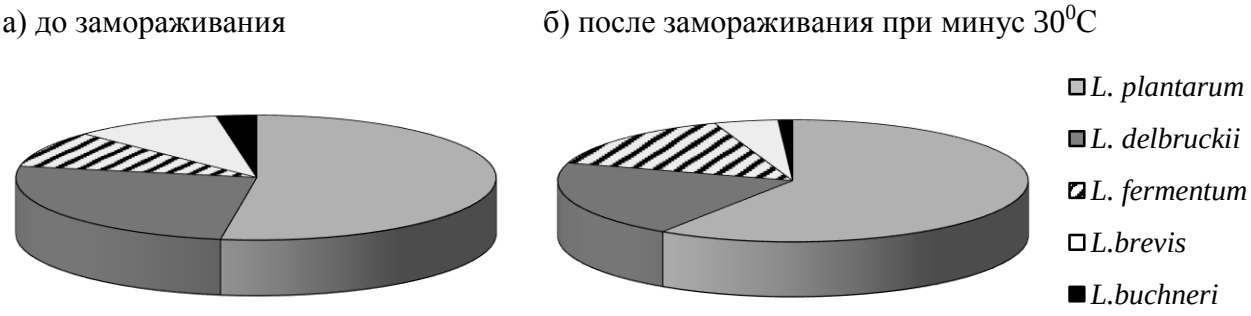


Рисунок 5.12 – Соотношение видов *p. Lactobacillus* в тесте

При изучении длительного низкотемпературного воздействия на выживаемость молочнокислых бактерий в ржано-пшеничном тесте (рис. 5.13) установлено, что через 180 сут. хранения полуфабрикатов в замороженном виде происходит существенное снижение количества жизнеспособных клеток – гибель клеток молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus, p. Pediococcus* и *p. Leuconostoc* составляет 52,6 %, 94,2 % и 73,7 % соответственно, что

свидетельствует о высокой чувствительности исследуемых групп микроорганизмов к данному стрессовому воздействию.

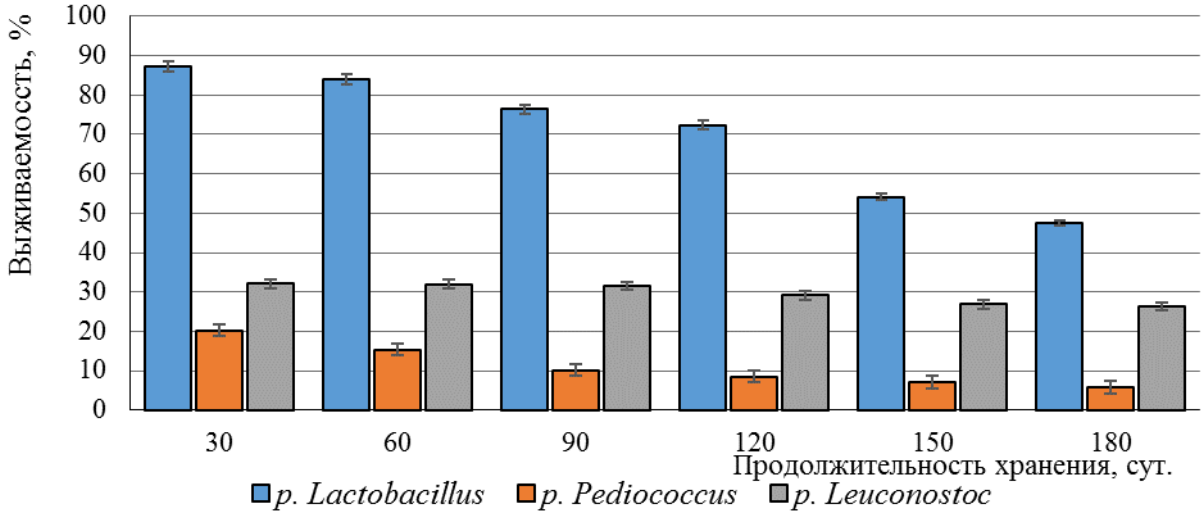


Рисунок 5.13 – Изменение выживаемости молочнокислых бактерий в зависимости от продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде

Результаты исследования влияния низкотемпературного воздействия на выживаемость ключевой микрофлоры ржано-пшеничного теста показывают, что в результате длительной низкотемпературной обработки в полуфабрикатах происходит существенное изменение соотношения клеток дрожжей и молочнокислых бактерий (рис. 5.14): гибель клеток молочнокислых бактерий *p.Lactobacillus* составляет 53 %, дрожжей *p. Saccharomyces* – 41 %.

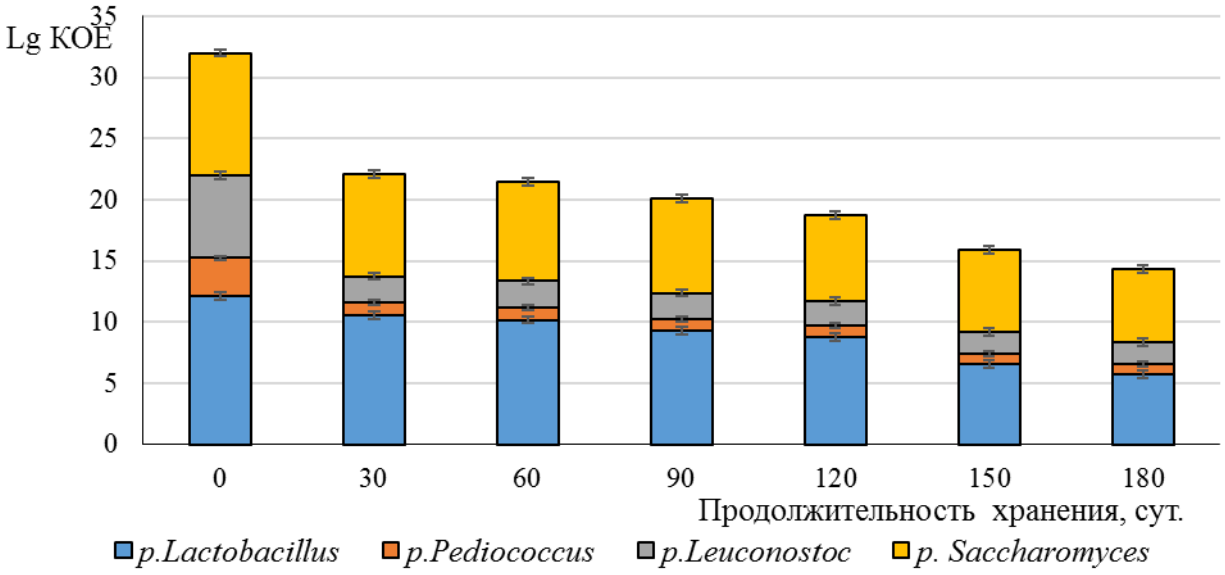


Рисунок 5.14 – Изменение соотношения микрофлоры тестовых полуфабрикатов при длительном низкотемпературном хранении

Таким образом, длительное низкотемпературное хранение приводит к значительному изменению биоценоза полуфабрикатов хлебопекарного производства, что в свою очередь приводит к существенным изменениям протекания биотехнологических процессов при их созревании.

Подготовка клеток микроорганизмов к замораживанию должна проводиться с учетом их физиологического состояния. Криорезистентность микроорганизмов может варьировать в зависимости от стадии их развития в результате изменения свойств клеток, связанных с метаболизмом, структурной организацией и составом клеточных мембран [16, 41, 222, 367].

Установлено, что клетки, находящиеся в стационарной фазе роста, более устойчивы к повреждающему действию низкотемпературной обработки, чем клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста. Это объясняется тем, что в период экспоненциального роста в клетках активируются процессы метаболизма: превалируют клетки, редуплицирующие свою ДНК, увеличивается количество РНК, интенсифицируется синтез белка, активируется транспорт веществ через мембраны**.** В этот период снижается модуль упругости клеточных стенок, повышается проницаемость мембран. Более высокая криоустойчивость бактерий в стационарной фазе роста объясняется снижением интенсивности обменных процессов, функциональной активности клеток.

Поэтому далее изучение влияния процесса замораживания проводили на культурах молочнокислых бактерий, достигших середины экспоненциальной фазы развития – это период их наибольшей чувствительности к воздействию неблагоприятных факторов.

Лактобактерии в виде суспензии с титром клеток 2,0-2,5×10^9 КОЕ/$см^3$ подвергали замораживанию в диапазоне температур от минус 10 до минус 30 ^{0}С, продолжительность низкотемпературного хранения составила от 2 ч до 3 нед.

Полученные результаты свидетельствуют о неустойчивости клеток молочнокислых бактерий к низким температурам. Установлено, что повреждение клеток и инактивация части микробной популяции происходит не только во время замораживания, но и в процессе хранения (табл. 5.6). При хранении замороженных образцов в течение 2 ч выживаемость клеток колеблется в диапазоне 25-78 %, в течение 24 ч 16-57 %, в течение 3 нед. 5-27 % в зависимости от вида и штамма молочнокислых бактерий.

Возможным объяснением этого является наличие ассоциированных с клетками экзополимеров – белков и полисахаридов, синтезируемых микроорганизмами на всех стадиях развития и используемых в стрессовых условиях в качестве внутреннего источника резервного питания для поддержания жизнедеятельности. Кроме того, данные научно-технической литературы свидетельствуют о том, что экзополимеры, в частности полисахариды, обладают криопротекторным действием и непосредственно через

физические и химические взаимодействия с клеточными структурами и макромолекулами защищают клетки от повреждающего воздействия отрицательных температур [283, 318]. С течением времени запасы экзополимеров в среде постепенно исчерпываются, что ведет к инактивации части микробной популяции.

Таблица 5.6 – Выживаемость лактобактерий при низкотемпературном хранении клеточной суспензии, %

Штамм	Температура, ^{0}C	Продолжительность хранения в замороженном виде				
		2 ч	24 ч	1 нед.	2 нед.	3 нед.
L.casei-1	-15	60,7	39,2	19,6	17,1	14,5
	-20	65,9	42,1	21,7	18,3	16,8
	-30	78,1	57,7	43,9	34,5	27,3
L.casei-2	-15	40,8	28,2	22,7	12,4	11,6
	-20	50,2	37,9	25,4	15,1	13,2
	-30	56,9	39,2	30,1	23,5	20,2
L. bavaricus	-15	32,2	24,1	14,7	12,6	10,2
	-20	33,4	21,2	13,1	11,5	9,8
	-30	38,9	26,5	17,8	17,0	15,7
L. acidophilus	-15	29,4	20,6	11,5	8,9	7,0
	-20	33,1	22,6	11,8	9,6	7,3
	-30	37,2	29,6	18,3	16,8	13,4
L. fermentum	-15	26,2	17,1	8,7	6,8	5,4
	-20	30,7	21,8	13,6	10,1	6,9
	-30	38,6	32,5	24,9	16,1	12,7
L. plantarum	-15	25,2	16,0	10,1	8,3	5,9
	-20	25,8	17,6	11,4	10,1	8,6
	-30	29,2	18,7	13,2	10,8	9,1

Установлено, что при понижении температуры воздействия на клеточную суспензию с минус 15 до минус 30 ^{0}C наблюдается увеличение числа жизнеспособных клеток лактобактерий в среднем на 10 %. С увеличением времени хранения бактериальных концентратов в замороженном состоянии количество физиологически активных клеток бактерий постепенно снижается. Следует заметить, что вид молочнокислых бактерий *L. casei* показывает более высокую криорезистентность по сравнению с видами *L. bavaricus, L. acidophilus, L. fermentum* и *L. plantarum.*

Таким образом, изучение влияния низкотемпературного воздействия на клетки молочнокислых бактерий показало, что данные микроорганизмы являются крайне чувствительными к такому стрессовому воздействию. На основании полученных данных установлено, что при разработке криотехнологии хлебобулочных изделий из ржаной и пшеничной муки следует обратить особое внимание на технологические параметры процесса, учитывающие сохранность активности не только клеток дрожжей, но и молочнокислых бактерий.

5.1.2 Влияние криообработки на активность ферментов в тесте

При созревании теста в результате биохимических превращений, обусловленных действием ферментов муки и метаболитов бродильной микрофлоры, состав и свойства теста непрерывно изменяются. Специалисты в данной области утверждают, что замораживание тестовых полуфабрикатов следует производить сразу же после замеса и разделки, исключая при этом стадию брожения. Основанием для подобных выводов практически во всех работах служила сравнительная оценка качественных характеристик размороженных полуфабрикатов и выпеченных изделий. Однако данные исследования объясняют причины, вызывающие ухудшение качества изделий, подвергающихся процессам брожения до стадии замораживания, только гибелью дрожжевых клеток [331-333, 344], и не рассматривают изменений активности ключевых ферментов муки – протеаз и амилаз.

Протеолитические ферменты муки играют важную роль в процессах созревания тестовых полуфабрикатов, в частности, оказывают влияние на протекание биохимических процессов при брожении теста, определяют его реологические свойства, структурно-механические и органолептические характеристики хлебобулочных изделий.

В научно-технической литературе практически отсутствует информация о влиянии отрицательных температур на активность ферментов муки и тестовых полуфабрикатов, вырабатываемых на основе криотехнологии, за исключением работ отечественных ученых, где представлены данные об изменении активности протеолитических ферментов в замороженных полуфабрикатах для булочных изделий из пшеничной муки [139].

Активность протеолитических ферментов муки во многом зависит от вида зерна, из которого она получена, способа получения, сорта муки, значений pH среды, наличия в тесте активаторов и ингибиторов и др. [8, 75, 90]. Результаты исследования низкотемпературного воздействия (от минус 25 до 30^{o}C в течение 1 мес.) на активность протеаз пшеничной и ржаной муки в зависимости от pH среды представлены в таблице 5.7. Протеолитические ферменты ржаной муки проявляют большую активность по сравнению с протеазами пшеничной муки высшего и первого сортов. Следует отметить, что активность протеаз в ржаной муке из цельного зерна выше на 14,5% по сравнению с обойной и обдирной. При этом активность протеолитических ферментов ржаной муки зависит от pH среды, наиболее высокую активность протеазы проявляют в кислой среде. В тесте из ржаной муки вследствие способности ее белков неограниченно набухать и переходить в коллоидный раствор, а также высокого содержания альбуминов и глобулинов, атакуемость белков протеолитическими ферментами значительно возрастает [75].

Таблица 5.7 – Активность протеолитических ферментов муки в зависимости от pH и продолжительности хранения, мкмоль тирозина за 1 ч в расчете на 1 мг белка

Объект исследования	Продолжительность низкотемпературного хранения				
	0 (контроль)	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.
pH 3,0					
Пшеничная высшего сорта	0,382	0,373	0,325	0,340	0,322
Пшеничная 1 сорта	0,571	0,528	0,517	0,484	0,472
Пшеничная обойная	1,447	1,248	1,066	1,091	1,067
Пшеничная цельнозерновая	1,511	1,509	1,399	1,377	1,414
Ржаная обойная	1,575	1,509	1,514	1,447	1,123
Ржаная обдирная	1,556	1,466	1,378	1,393	1,302
Ржаная цельнозерновая	1,792	1,756	1,578	1,621	1,557
pH 5,5					
Пшеничная высшего сорта	0,378	0,371	0,329	0,337	0,422
Пшеничная 1 сорта	0,615	0,568	0,547	0,538	0,478
Пшеничная обойная	1,510	1,299	1,158	1,146	1,177
Пшеничная цельнозерновая	1,566	1,536	1,347	1,308	1,290
Ржаная обойная	1,559	1,755	1,743	1,808	1,863
Ржаная обдирная	1,513	1,472	1,464	1,664	1,704
Ржаная цельнозерновая	1,759	1,628	1,727	1,771	1,843
pH 8,0					
Пшеничная высшего сорта	0,386	0,371	0,349	0,367	0,355
Пшеничная 1 сорта	0,698	0,672	0,689	0,712	0,731
Пшеничная обойная	1,616	1,127	1,200	1,410	1,491
Пшеничная цельнозерновая	1,694	1,514	1,529	1,537	1,522
Ржаная обойная	1,469	1,601	1,620	1,655	1,679
Ржаная обдирная	1,475	1,681	1,614	1,733	1,719
Ржаная цельнозерновая	1,733	1,712	1,782	1,793	1,838

Установлено, что после низкотемпературного хранения теста из пшеничной муки в течение 1 недели отмечается снижение протеолитической активности у всех исследуемых образцов вне зависимости от сортовой принадлежности (табл. 5.7). Наибольшее понижение активности протеолитических ферментов наблюдается у пшеничной обойной муки в слабощелочной среде (выявлено понижение активности на 30 %). Дальнейшее увеличение продолжительности замораживания не приводит к существенным изменениям активности протеолитических ферментов пшеничной муки в кислой среде при значениях pH 3,0 и 5,5. Однако по мере увеличения хранения полуфабрикатов в замороженном виде отмечается прирост активности слабощелочных протеаз пшеничной обойной муки.

При изучении влияния отрицательных температур на протеолитическую активность сортов ржаной муки установлено, что активность кислых протеаз в обойной и обдирной муке снижается в среднем на 5-10%, тогда как в слабокислой и слабощелочной реакциях среды отмечается увеличение активности на 12,5 и 8,5 % соответственно. При дальнейшем увеличении длительности хранения теста в замороженном виде в образцах из ржаной муки происходит постепенное снижение активности протеаз в кислой среде на 26-28%, в слабокислой и слабощелочной средах наблюдается прирост ферментативной активности (увеличение содержания в пробах продуктов гидролиза белков при pH 5,5 и 8,0 составляет: для ржаной обойной муки – 19,3 и 14,3% соответственно, для обдирной – 12,6 и 16,5%).

Таким образом, на активность протеолитических ферментов пшеничной и ржаной муки после низкотемпературной обработки значительное влияние оказывает pH среды.

Следует отметить, что низкотемпературная обработка образцов из цельнозерновых видов пшеничной и ржаной муки приводит к несущественному снижению активности протеолитических ферментов при низких значениях pH среды (табл. 5.7). При хранении образцов в замороженном виде наблюдается снижение активности в слабокислой среде (при pH 5,5) у пшеничной муки на 15,9 %, тогда как у образцов из цельнозерновой ржаной муки отмечается прирост активности слабокислых протеаз в процессе хранения образцов в замороженном виде на 13,2 %.

Известно, что оптимум активности протеолитических ферментов зерна пшеницы и ржи лежит в диапазоне pH 4,0-5,5 и существенно зависит от наличия в среде активаторов или ингибиторов реакции протеолиза. По-видимому, в процессе низкотемпературного хранения ржаной цельнозерновой муки происходит высвобождение веществ – активаторов протеолиза, чем и объясняется прирост протеолитической активности данных образцов в слабокислой среде.

В присутствии соединений восстанавливающего действия, в частности, содержащих сульфгидрильную группу (-SH), например, таких как цистеин, глютатион, активность

протеолитических ферментов муки возрастает. Следует отметить, что данные соединения содержатся преимущественно в периферической части зерна и зародыше, которые не удаляются при помоле зерна при получении цельнозерновой муки в отличие от других рассматриваемых сортов.

Результаты проведенных нами исследований не подтвердили предполагаемый прирост активности при изучении влияния низкотемпературных воздействий на активность протеиназ пшеничной муки из цельного зерна при оптимальных значениях pH среды. По-видимому, процессы дезагрегации и дегидратирования молекулы фермента, а также механическое разрушение его структуры крупными кристаллами льда, образующимися при длительном хранении образцов из пшеничной цельнозерновой муки в замороженном виде, преобладают над процессами высвобождения соединений – активаторов протеолиза, в результате чего наблюдается снижение активности протеаз на протяжении всего периода исследований [370, 371].

Результаты исследования показали, что щелочные протеазы пшеничной и ржаной цельнозерновой муки демонстрируют стабильность к низкотемпературному воздействию. Установлено, что показатель активности протеолитических ферментов данных видов муки при pH 8,0 существенно не зависит от продолжительности хранения образцов в замороженном виде.

Понижение активности протеаз при низкотемпературной обработке может быть вызвано несколькими причинами, одной из которых является денатурация белковых молекул муки, а также декстринизация и деструкция крахмала при низкотемпературном хранении, вследствие чего происходит накопление низкомолекулярных сахаристых веществ и декстринов, которые увеличивают эффект ингибирования активности протеолитических ферментов [374].

Характер и степень изменения активности протеаз в муке при низкотемпературной обработке могут быть обусловлены также гидролитическим расщеплением белков и разрушением отдельных аминокислот. Известно, что во время замораживания и дефростации тестовых полуфабрикатов происходит денатурация белка, наблюдается декарбоксилирование и дезаминирование свободных аминокислот [76]. Данное обстоятельство может привести к повышению кислотности в тесте, что и обусловливает электростатическую неустойчивость белков. Кроме того, замораживание тестовых заготовок приводит к дезагрегации и дегидратированию белковых компонентов муки [370, 371], в том числе и ферментов.

В течение длительного хранения кристаллы льда со временем могут претерпевать рекристаллизацию (оствальдовское созревание) [370, 371], вследствие чего образуются

более крупные кристаллы, которые способны механически нарушать целостность белков, что может привести к изменению конформации молекулы фермента, вследствие чего его активность резко снижается.

Повышение активности протеолитических ферментов муки под воздействием отрицательных температур можно объяснить обратимостью денатурации протеаз в слабокислой и слабощелочной средах [229, 260], а также накоплением в тесте при длительном хранении в замороженном виде веществ восстановительного действия – активаторов протеолиза.

С целью объективной оценки влияния процессов замораживания на характер поведения протеолитических ферментов с учетом исключения влияния рецептурных компонентов исследовали образцы теста подвергавшееся и не подвергавшееся брожению перед низкотемпературным хранением.

Анализ данных об изменении активности протеаз в образцах из пшеничной и ржаной муки при кратковременной низкотемпературной обработке (рис.5.15 и 5.16) показывает, что уже через 3 сут. происходит резкое снижение протеолитической активности в исследуемых образцах вне зависимости от вида и сорта муки.

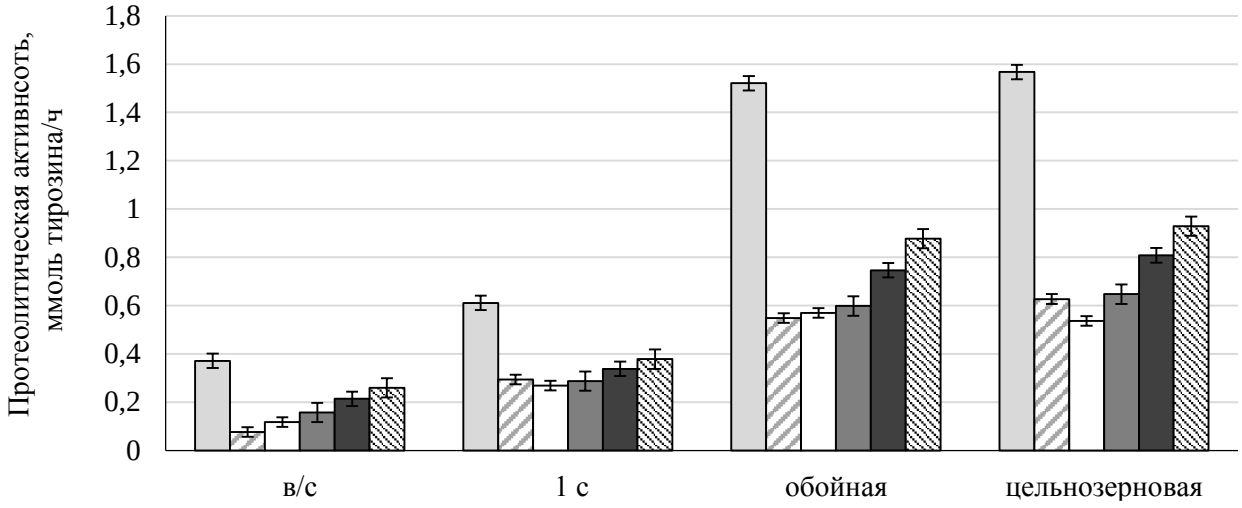
Полученные данные, вероятно, можно объяснить гипотезой [148, 227], в которой предполагается, что в результате механического воздействия кристаллов льда происходит разрыв дисульфидных поперечных связей в макромолекулах белка. Это может привести к изменению конформации молекулы фермента, вследствие чего его активность резко снижается. При этом наибольшее уменьшение активности наблюдалось у образцов теста, подвергшегося брожению (из пшеничной муки – на 77,3 %; из ржаной муки – на 78,2 %).

Из полученных данных следует, что у образцов из ржаной муки протеазы активнее, чем у образцов из пшеничной муки как перед замораживанием, так и после дефростации, то есть влияние низких температур губительнее действовало на активность протеаз пшеничной муки.

Установлено, что в процессе длительного хранения теста в замороженном виде во всех исследуемых образцах наблюдалось увеличение протеолитической активности. Следует отметить, что наиболее интенсивный рост активности протеаз происходил в образцах, приготовленных с использованием дрожжей (в тесте бродившем и не бродившем) по сравнению с образцами модельного теста, приготовленного только из муки и воды (табл. 5.7). Так к концу срока хранения полуфабрикатов в замороженном виде активность протеаз в дрожжевом тесте в 3 раза была выше активности протеаз модельного теста. Полученные результаты объясняются гибелью значительного количества дрожжевых клеток при

действии низких температур [222] и высвобождением из них глютатиона – активатора протеолиза, обладающего восстанавливающими свойствами.

а) полуфабрикаты, не подвергавшиеся брожению



б) полуфабрикаты, подвергавшиеся брожению

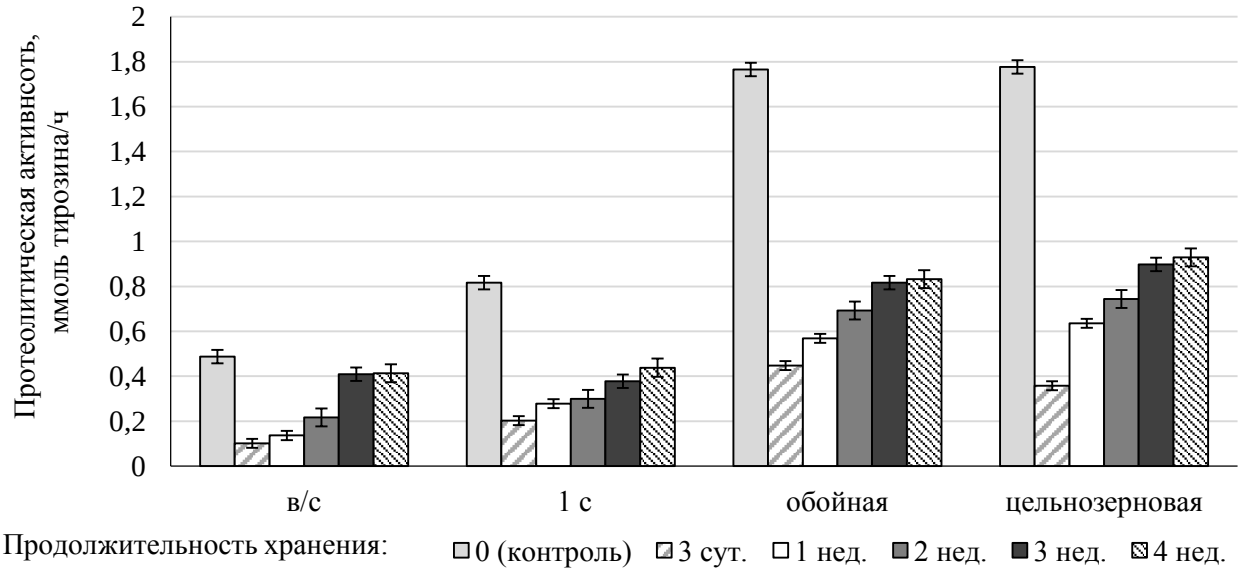
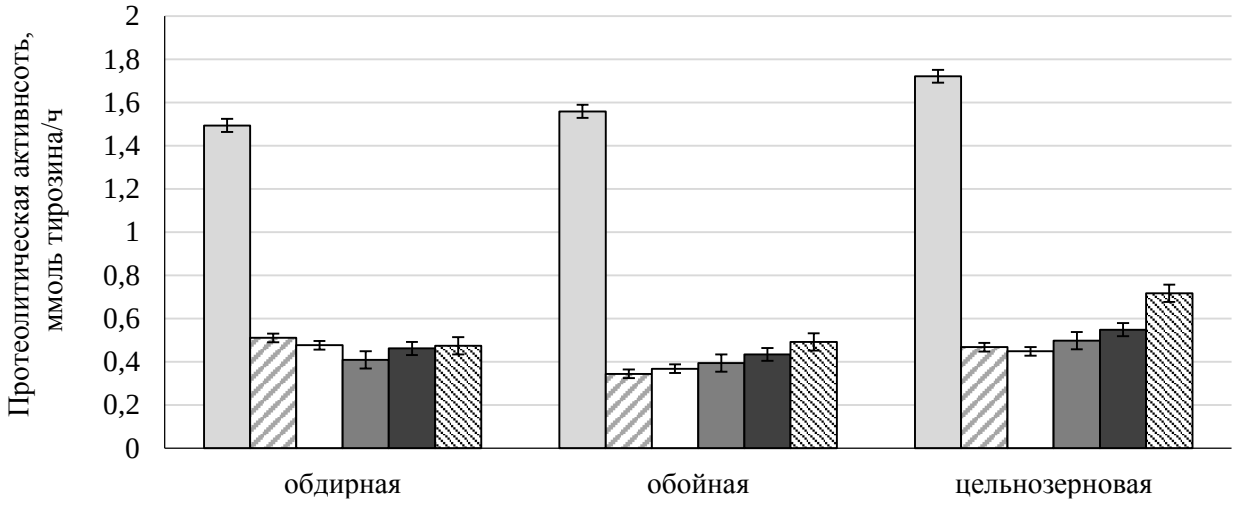


Рисунок 5.15 – Динамика активности протеаз в полуфабрикатах из пшеничной муки при низкотемпературном хранении

Однако, полученные данные свидетельствуют также о том, что и в модельном тесте, приготовленном без использования дрожжей, происходило незначительное увеличение протеолитической активности при длительной низкотемпературной обработке полуфабрикатов.

а) полуфабрикаты, не подвергавшиеся брожению



б) полуфабрикаты, подвергавшиеся брожению

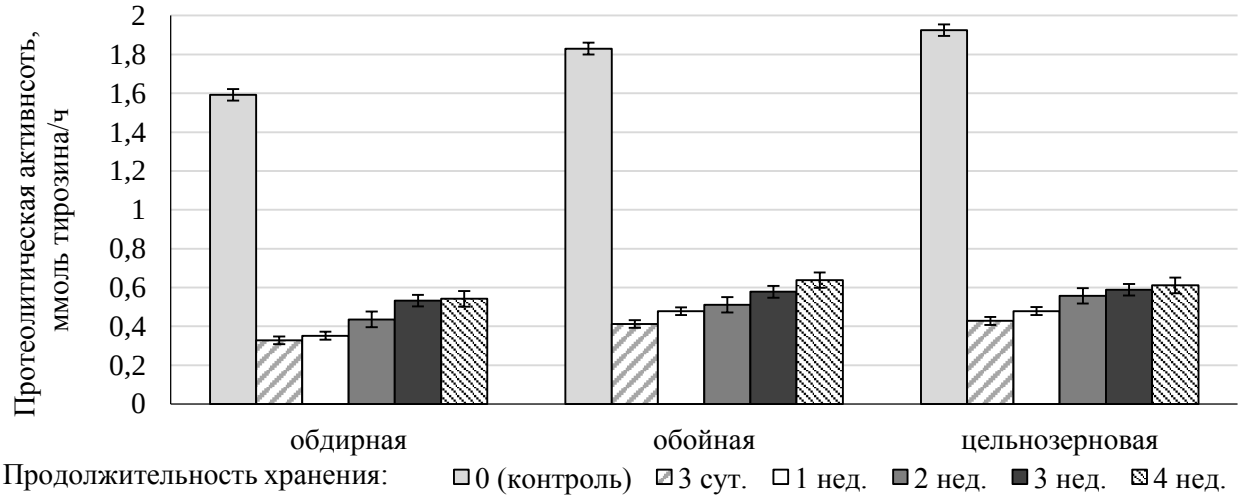


Рисунок 5.16 – Изменение активности протеаз в полуфабрикатах из ржаной муки при низкотемпературном хранении

Таким образом, результаты исследования влияния криообработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки показали, что исследуемый параметр зависит от pH среды и от видовой принадлежности муки. При кратковременном замораживании тестовых полуфабрикатов активность протеаз в тесте резко снижается, тогда как при продолжительном хранении тестовых полуфабрикатов в замороженном виде протеолитическая активность собственных ферментов муки увеличивается.

Активность амилолитических ферментов муки, преимущественно α- и β-амилаз, существенно зависит от вида зерна, из которого она получена, способа помола, сорта муки, влажности, значений pH среды, присутствия активаторов и ингибиторов и др. Амилазы муки оказывают специфическое влияние на субстрат: α-амилаза воздействует на крахмал, гликоген, а также родственные поли- и олигосахариды, гидролизуя α-1,4-глюкановые связи

в полисахаридах, содержащих три или более остатков глюкозы, соединенных α-1,4 связями; β-амилаза оказывает воздействие на крахмал и родственные полисахариды, гидролизуя 1,4-глюкановые связи в полисахаридах и совершая последовательное отщепление остатков мальтозы от нередуцирующих концов цепей. Таким образом, крахмал под действием амилолитических ферментов разлагается до низкомолекулярных декстринов, а в конечном итоге до мальтозы и глюкозы, которые являются дополнительным источником питания для клеток дрожжей и молочнокислых бактерий. Декстрины препятствуют образованию новых водородных связей между цепочками олигосахаридов и возникновению поперечных связей между молекулами крахмала и белков клейковины, ведущих к черствению хлеба.

Активность амилолитических ферментов муки определяли при pH среды 5,5, поскольку успешнее всего процесс осахаривания крахмала протекает в слабокислой среде, при понижении pH амилазы инактивируются.

Результаты исследования активности амилолитических ферментов различных сортов пшеничной и ржаной муки (рис. 5.17), показывают, что наибольшей амилолитической активностью обладает ржаная мука, в которой помимо β-амилазы в весьма активной форме присутствует α-амилаза, что согласуется с литературными данными [75]. Кроме того, цельнозерновые виды муки отличаются высокой амилолитической активностью по сравнению с другими сортами, выработанными из пшеницы и ржи, что объясняется высоким содержанием оболочек и периферийных частей зерна в цельно смолотой муке.

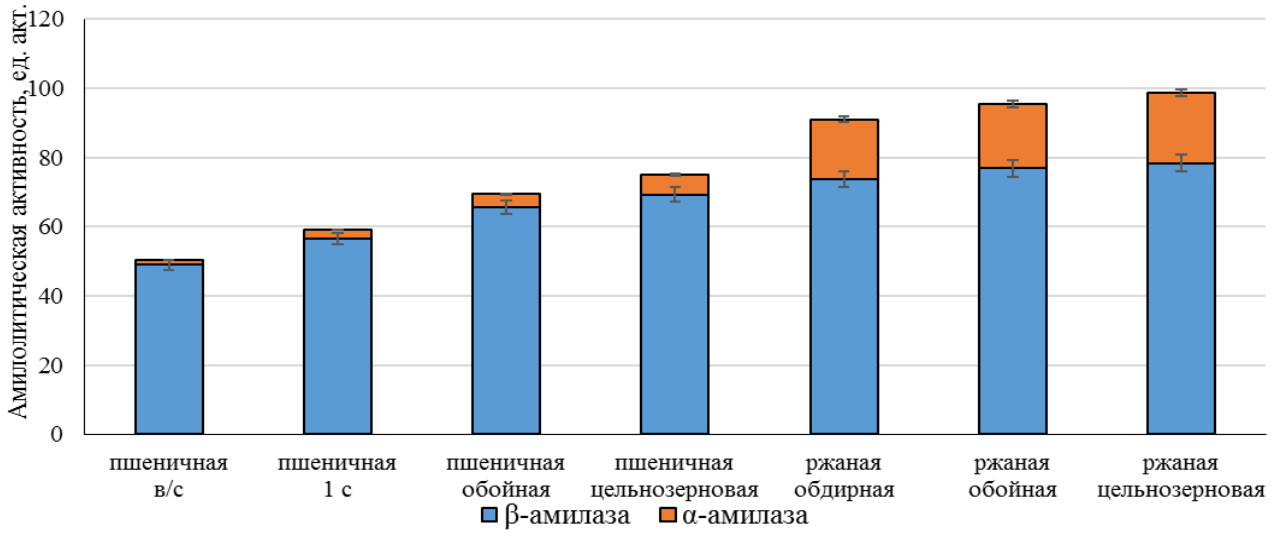


Рисунок 5.17 – Активность собственных амилаз пшеничной и ржаной муки

Результаты исследования влияния низкотемпературной обработки на активность α-амилазы показывают, что ферментативная активность снижается на протяжении всего периода исследований независимо от вида и сорта муки, так активность α-амилазы пшеничной муки уменьшается в среднем на 60,6 %, ржаной на 32,4 % (рис.5.18 и 5.19).

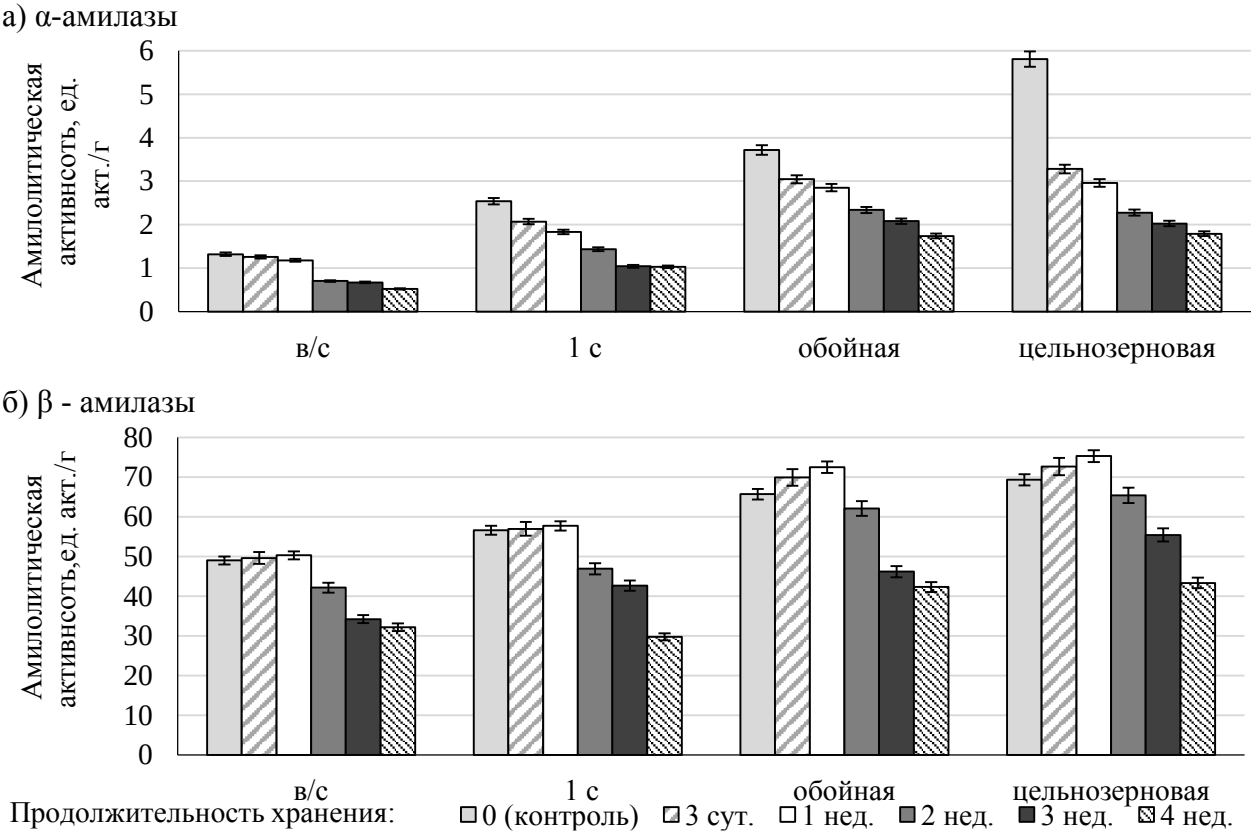


Рисунок 5.18 – Влияние процессов замораживания и хранения на активность α- и β-амилаз в пшеничной муке различных сортов

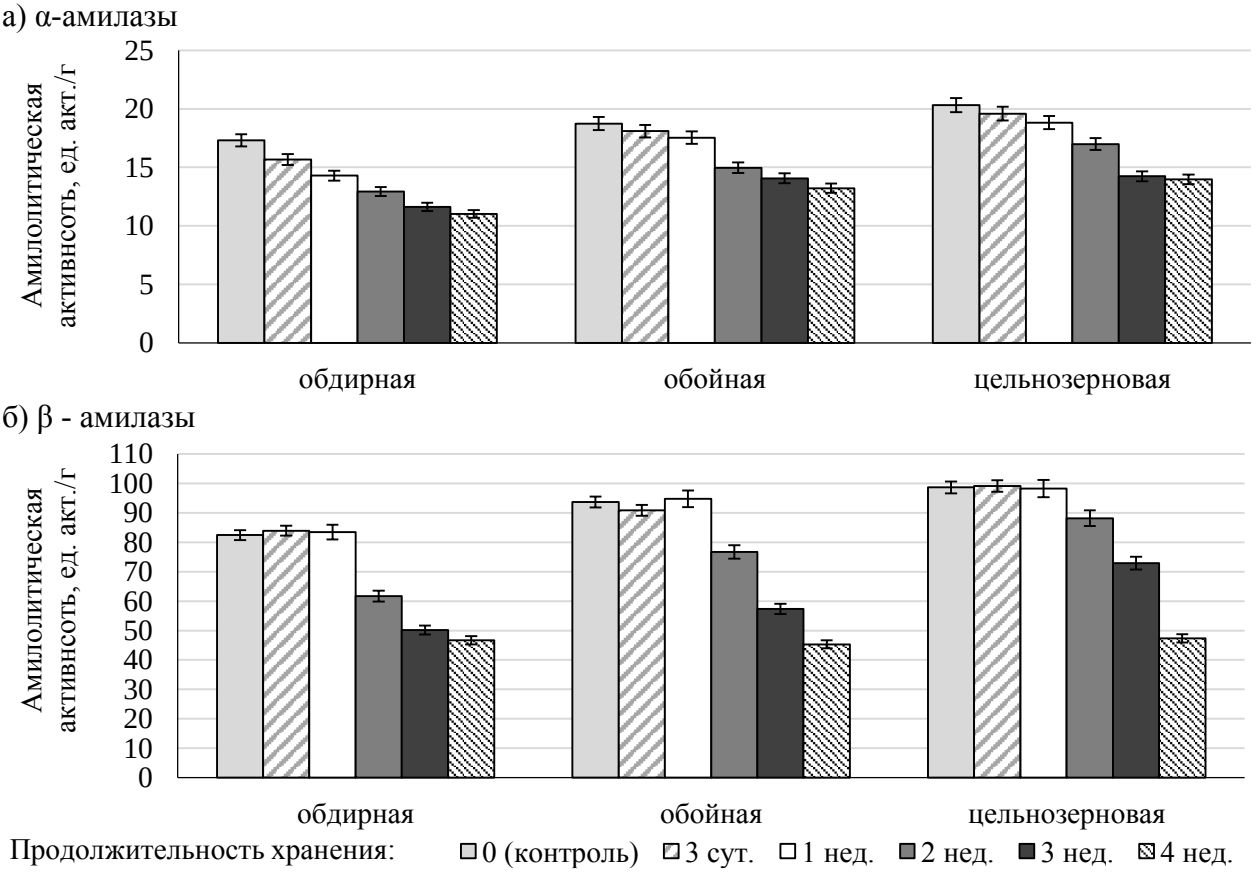


Рисунок 5.19 – Активность амилаз в ржаной муке после низкотемпературной обработки

Выявлено, что в результате кратковременного воздействия отрицательных температур от минус 25 до 30 ^{0}С в течение 1 нед. активность β-амилазы муки практически не изменяется, тогда как при более длительном воздействии процессов замораживания и хранения активность данного фермента снижается. Наибольшим изменениям подвергаются β-амилазы ржаной муки, амилолитическая активность которых снижается на 43,3 %, 51,6 % и 47,9 % от первоначальных значений для обойной, обдирной и цельнозерновой соответственно.

При изучении влияния процессов замораживания и низкотемпературного хранения на активность амилолитических ферментов в тесте, подвергавшегося и не подвергавшегося брожению до стадии замораживания, выявлены аналогичные тенденции по изменению активности амилаз при увеличении продолжительности хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде (рис. 5.20 и 5.21). Установлено, что наибольшее снижение суммарной активности происходит в образцах теста как из пшеничной, так и из ржаной муки, прошедших стадию брожения. Так, в полуфабрикатах из пшеничной и ржаной муки, подвергавшихся брожению после 4 недельного хранения при температуре минус 25-30 ^{0}С амилолитическая активность снижается на 38,7 % и 22,5 % соответственно, тогда как в тесте не подвергавшемуся брожению значения выше в среднем на 10-15 % .

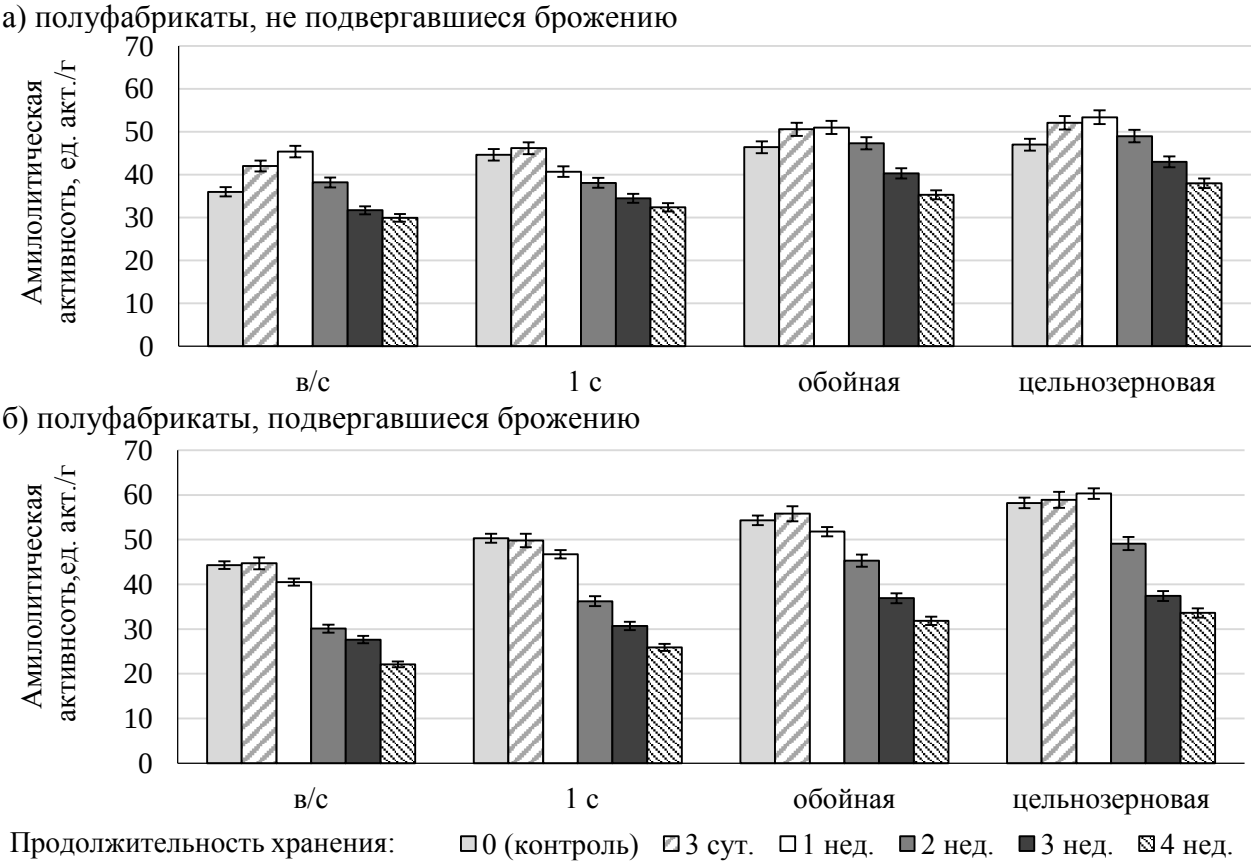


Рисунок 5.20 – Динамика амилолитической активности в полуфабрикатах из пшеничной муки при низкотемпературном хранении

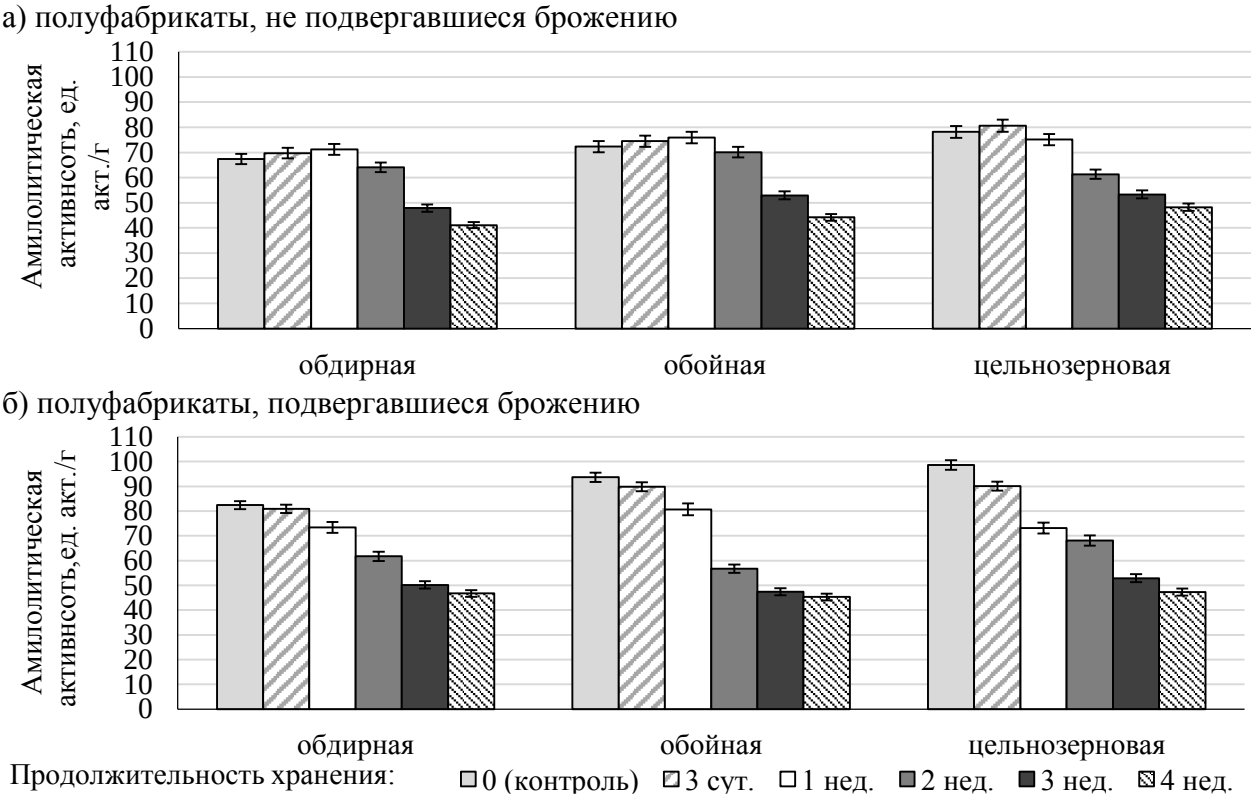


Рисунок 5.21 – Изменение амилолитической активности в полуфабрикатах из ржаной муки при низкотемпературном хранении

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что под воздействием низких температур происходит существенное снижение активности α- и β-амилаз пшеничной и ржаной муки, соответственно скорость ферментативного осахаривания крахмала снижается, в результате чего клетки дрожжей и молочнокислых бактерий могут лишиться дополнительного питания в процессе брожения теста.

5.2 Влияние низкотемпературной обработки на процессы созревания тестовых полуфабрикатов и качество готовых изделий

О характере изменения процессов брожения, вызываемого молочнокислыми бактериями и дрожжами, после низкотемпературных воздействий на ржано-пшеничные полуфабрикаты в течение сут. судили по динамике кислотонакопления в тесте (рис.5.22).

Замораживание приводит к замедлению процессов кислотообразования в тесте и, следовательно, к увеличению продолжительности процесса брожения. Так, кислотонакопление во всех исследуемых образцах размороженного теста, протекало медленнее по сравнению с образцами, не подвергавшимися низкотемпературной обработке. Следует отметить, что чем ниже температура замораживания тестовых полуфабрикатов, тем быстрее протекали процессы накопления кислотности в исследуемых образцах ржано-пшеничного теста.

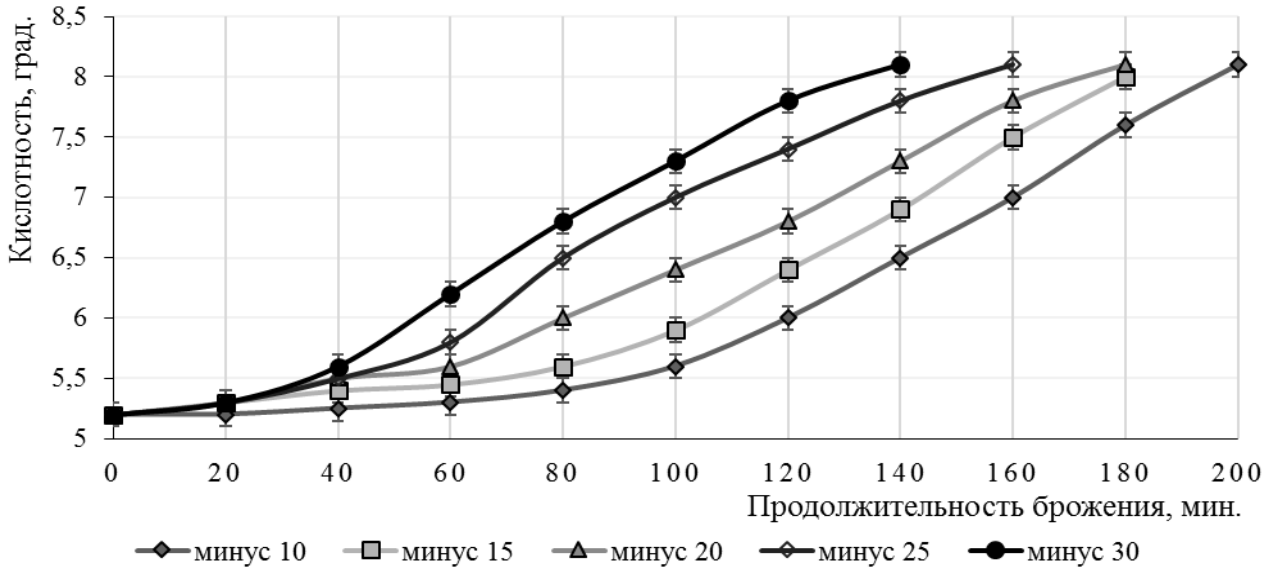


Рисунок 5.22 – Динамика накопления кислотности тестовых полуфабрикатов

Установлено, что процессы замораживания и хранения значительно влияют на активность микроорганизмов теста и скорость кислотонакопления тестовых заготовок. Так, продолжительность брожения размороженных образцов увеличивается на 60 минут по сравнению с незамороженным тестом, что объясняется гибелью кислотообразующей микрофлоры при низкотемпературной обработке.

На рисунке 5.23 представлены данные по влиянию низкотемпературной обработки на подъемную силу и бродильную активность полуфабрикатов, определяемых жизнеспособностью и активностью микроорганизмов теста [150].

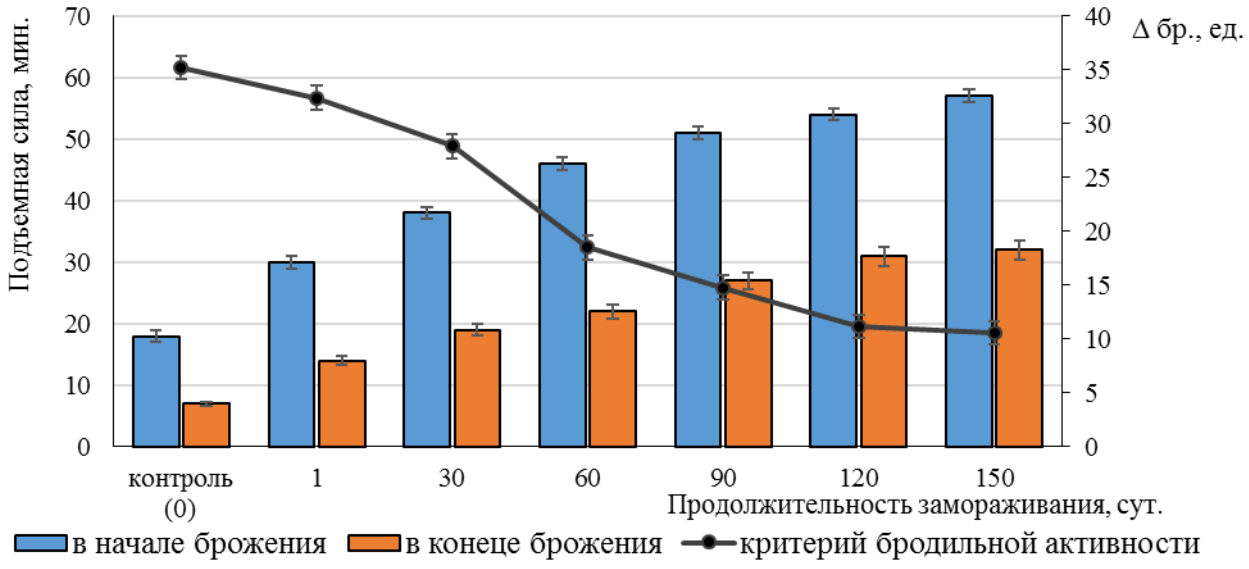


Рисунок 5.23 – Влияние низкотемпературной обработки на биотехнологические свойства теста

На примере сухих и прессованных дрожжей одного производителя (дрожжи «Gloripan», Россия) показано (рис 5.24), что после замораживания (при температуре минус 30 ^{0}C) тестовых полуфабрикатов скорость газообразования снижается по сравнению с первоначальными значениями (незамороженное тесто). При этом наблюдается смещение максимума скорости газообразования в тесте с 180 мин. от начала брожения до 210-240 мин. для образцов, подвергавшихся замораживанию, причем характер изменения скорости газообразования в ржаных полуфабрикатах был одинаков при использовании как сухих, так и прессованных дрожжей. Следует отметить, что максимальная скорость выделения CO_2 в тесте, выработанном на прессованных дрожжах снижается на 29,2 %, на сухих на 27,3 % по истечении 180 сут. его хранения в замороженном виде.

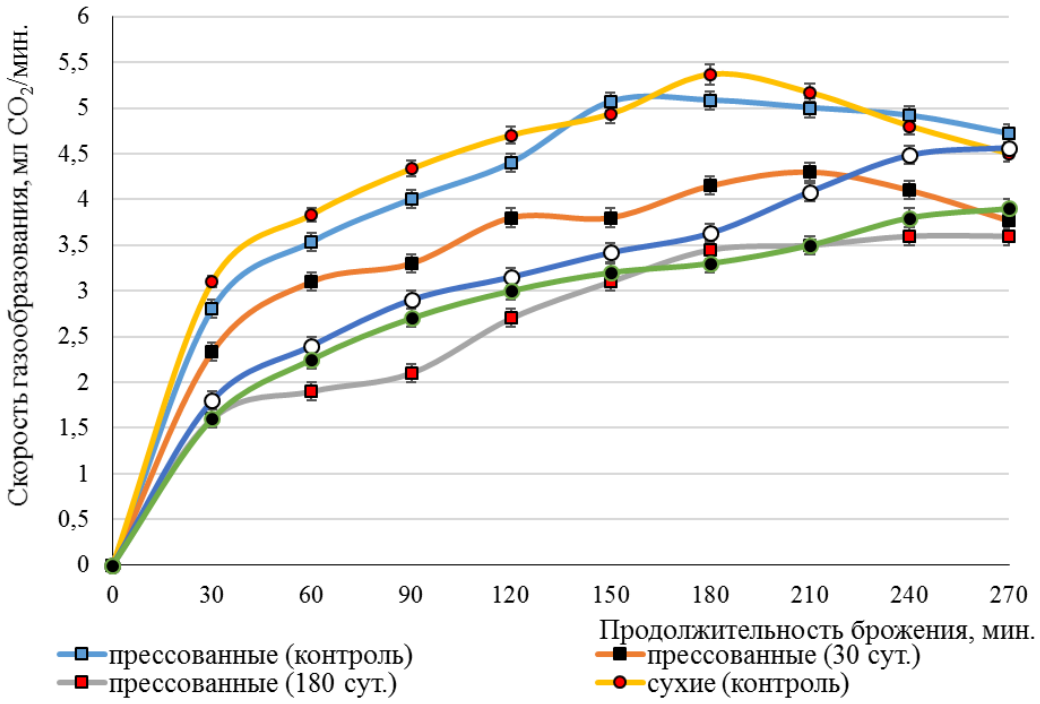


Рисунок 5.24 – Изменение скорости газообразования ржано-пшеничных полуфабрикатов

Смещение экстремума скорости газообразования на более позднее время брожения связано, по-видимому, с увеличением продолжительности лаг-фазы роста дрожжей, что, в свою очередь, связано с изменением активности ферментов муки и дрожжей, происходящим при низкотемпературной обработке тестовых полуфабрикатов.

Необходимо отметить, что газообразующая способность ржано-пшеничного теста постепенно снижалась на протяжении всего периода хранения замороженных полуфабрикатов (рис.5.25). Так, после 150 сут. хранения замороженных полуфабрикатов газообразующая способность тестовых заготовок снизилась на 40-45 %, независимо от вида применяемых дрожжей.

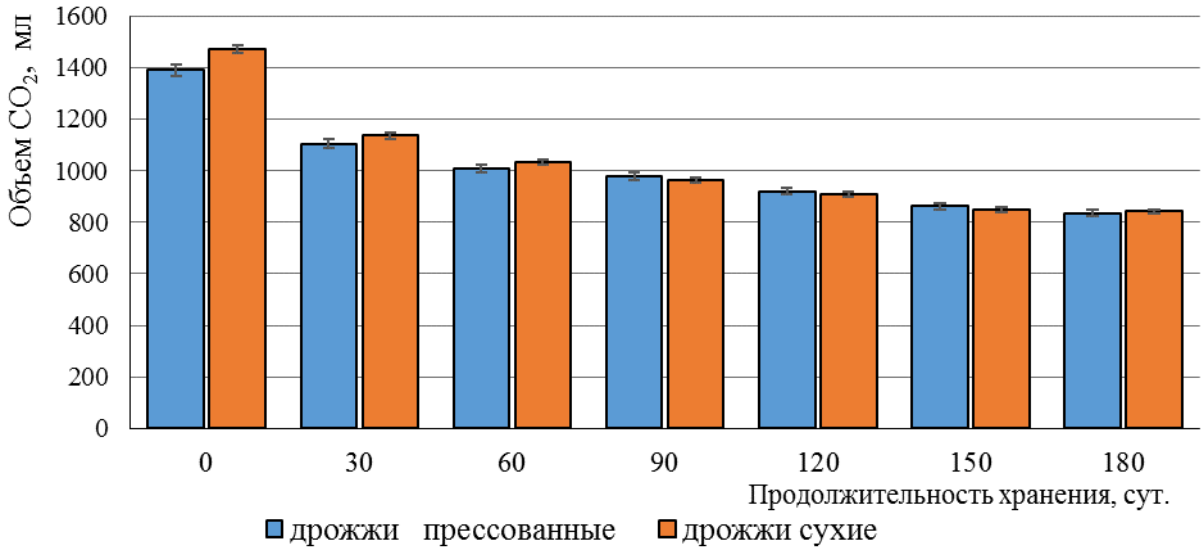
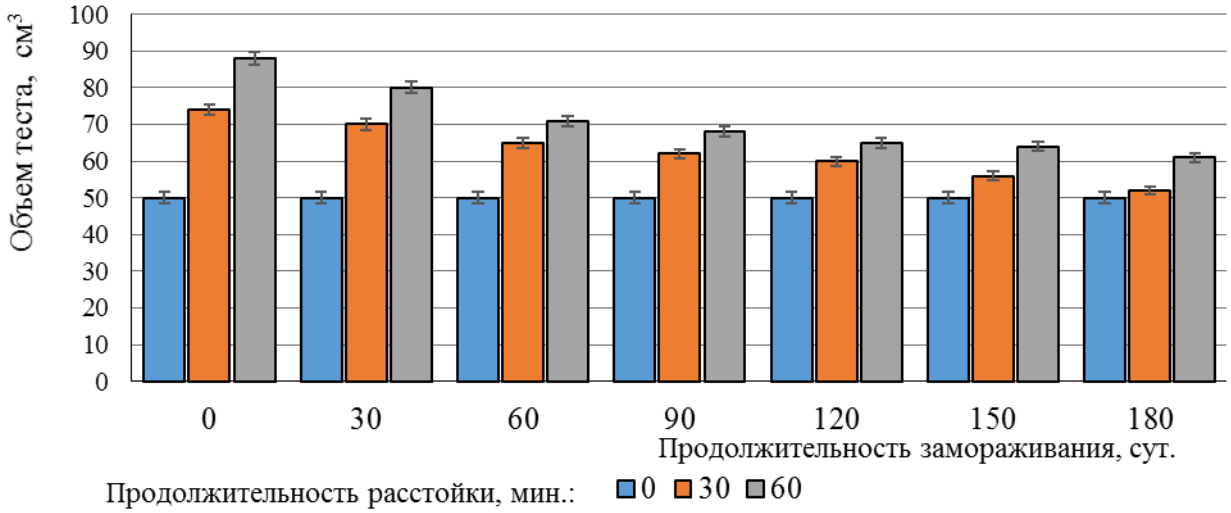


Рисунок 5.25 – Изменение газообразующей способности ржано-пшеничного теста после низкотемпературной обработки в зависимости от вида дрожжей

Установлено, что при увеличении продолжительности хранения ржано-пшеничных полуфабрикатов в замороженном виде снижается также газоудерживающая способность теста при использовании как прессованных, так и сухих дрожжей (рис. 5.26), так газоудерживающая способность опытных образцов, подвергавшихся низкотемпературной обработке в течение 60 сут. в среднем ниже на 19,5 %, через 180 сут. – на 30,9 % относительно контрольных значений (образцов, выработанных по традиционной технологии).

В результате дальнейших исследований было установлено, что по мере увеличения продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде уменьшается диаметр контура расплывшегося шарика теста в процессе расстойки (рис. 5.27). В начальный момент расстойки контрольный образец имеет диаметр шарика теста 57 мм, что на 12,3 % больше, чем у образцов, подвергавшихся низкотемпературному хранению в течение 30 сут., при увеличении продолжительности хранения теста, данный показатель существенно снижается и через 180 сут. на 26,3 % меньше исходных значений. Через 60 мин. расстойки полуфабрикатов данная разница составляет 12,1 % и 31,86 % через 30 сут. и 180 сут. соответственно по сравнению с контролем.

а) тесто с применением прессованных дрожжей



б) тесто с применением сухих дрожжей

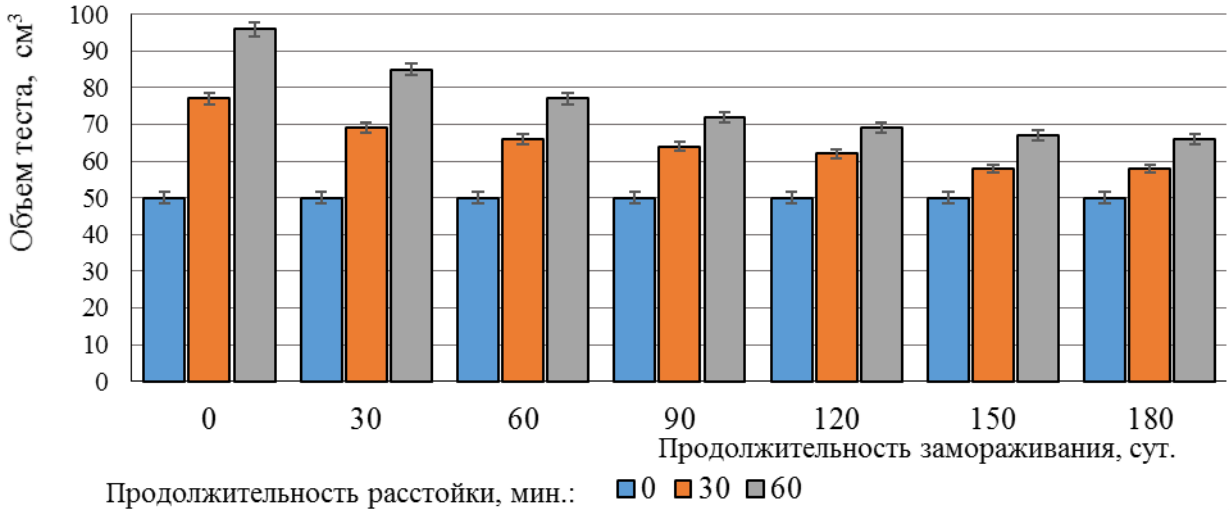


Рисунок 5.26 – Изменение газоудерживающей способности теста после низкотемпературного хранения

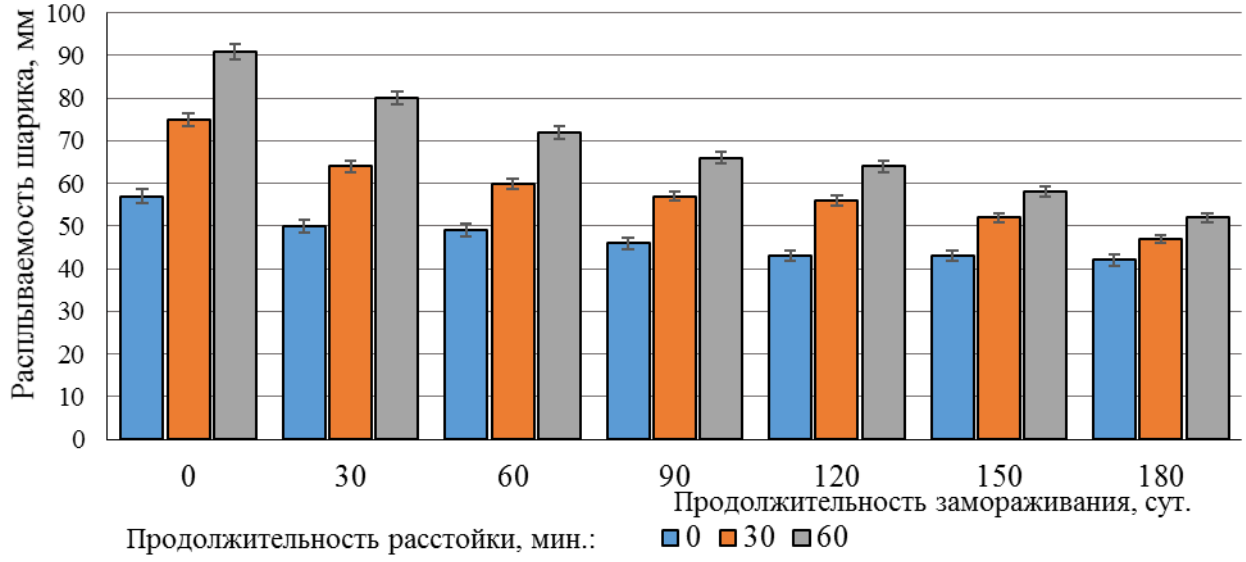


Рисунок 5.27 – Изменение расплываемости шарика теста в процессе расстойки

Суммарным критерием изменения процессов брожения тестовых полуфабрикатов при низкотемпературном воздействии явились качественные характеристики готовых изделий (табл. 5.8 и 5.9). На данном этапе исследований продолжительность хранения тестовых заготовок составила от 1 до 150 сут., температура замораживания минус 30 ^{0}С.

Таблица 5.8 – Показатели качества ржано-пшеничного хлеба

Продолжительность хранения теста, сут.	Кислотность, град.	Влажность, %	Пористость %	Удельный объем, см^3/100 г	Крошковатость	Удельная набухаемость, см^3
0 (контроль)	7,6	46,9	62,2	212	0,7	231
1	7,6	46,8	57,9	187	0,7	232
30	7,4	46,1	57,3	180	0,8	235
60	7,2	45,7	56,0	169	0,9	239
90	7,4	45,4	54,4	154	0,9	242
120	7,4	45,1	50,1	143	1,1	246
150	7,2	45,1	-	127	1,3	249

Таблица 5.9 – Деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением криотехнологии через 24 ч хранения

Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.	Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %
0 (контроль)	2,2	1,9	4,1	53,7	46,3
1	2,0	2,4	4,4	45,5	54,5
30	2,0	2,6	4,6	43,5	56,5
60	3,1	1,6	4,7	66,0	34,0
90	3,4	1,3	4,7	72,3	27,7
120	3,8	0,9	4,8	79,2	18,8
150	3,9	1,1	5,0	78,0	22,0

Выявлено, что низкотемпературная обработка приводит к снижению значений таких важнейших характеристик готовой продукции как пористость и удельный объем на 4,3 % и 11,8 % соответственно, не оказывая существенного влияния на такие показатели качества как влажность, кислотность, крошковатость и удельная набухаемость мякиша. Однако увеличение продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде приводит к изменению всех снимаемых характеристик ржано-пшеничного хлеба, так через 150 сут. хранения теста в морозильной камере кислотность изделий снижается на 5,3 %, влажность 1,8 %, удельный объем на 40 %, тогда как крошковатость и удельная набухаемость мякиша увеличивается на 57,1 % и 7,8 % соответственно.

Следует отметить, что значения пористости не представляется возможным измерить из-за плотного и заминающегося мякиша, что подтверждают также данные по изучению влияния процессов замораживания и хранения на деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба (табл. 3.8). Низкотемпературная

обработка приводит к ухудшению структурно-механических свойств мякиша хлеба из смеси ржаной и пшеничной муки, по мере увеличения продолжительности хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде снижается относительная упругость мякиша ржано-пшеничного хлеба. Так, к концу эксперимента общая деформация мякиша увеличивается на 21,9 %, при этом уменьшается упругая деформация на 42,1 %, относительная пластичность мякиша достигает значений 78 %.

Полученные выводы подтверждают также результаты анализа микроструктуры образцов хлебобулочных изделий (рис. 5.28).

а) контроль б) опыт

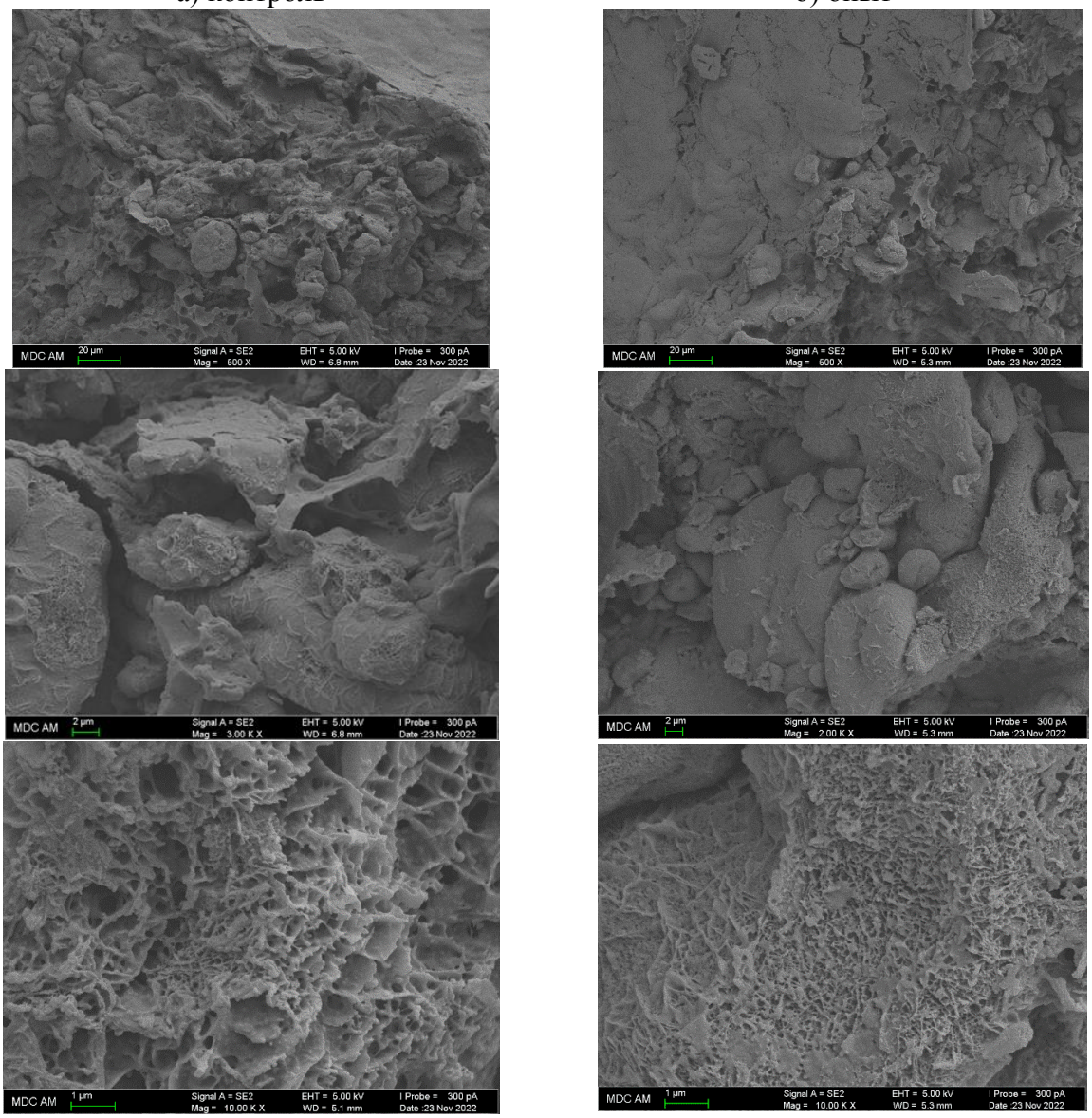


Рисунок 5.28 – Микроструктура ржано-пшеничного хлеба, приготовленного а) по традиционной технологии, б) по криотехнологии (продолжительность замораживания теста 30 сут.)

Методом электронной сканирующей микроскопии выявлено, что контрольные образцы хлеба, приготовленные по традиционной технологии, отличаются более пористой структурой, имеют крупные поры (0,5-1,0 мкм), расположенные равномерно по всему объему; тогда как образцы, выработанные с применением криотехнологии, имеют более плотную и мало разрыхленную структуру (размер пор 0,1-0,2 мкм).

Установлено, что при хранении полуфабрикатов в течение 30 сут. качество готовых изделий по показателям пористости и удельного объема, отвечало требованиям нормативной документации на хлебобулочные изделия. При увеличении срока хранения от 30 до 150 сут. ржано-пшеничные изделия, приготовленные с использованием криотехнологии, были низкого качества, что связано с нарушением процесса брожения тестовых ржано-пшеничных полуфабрикатов.

Результаты исследования содержания связанной влаги при хранении ржано-пшеничного хлеба в зависимости от продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде представлены на рисунке 5.29. Установлено, что количество связанной влаги в образцах снижается на 25,0 % относительно контроля в свежевыпеченных изделиях и на 29,2 % через 72 ч хранения изделий, упакованных в полиэтиленовые пакеты.

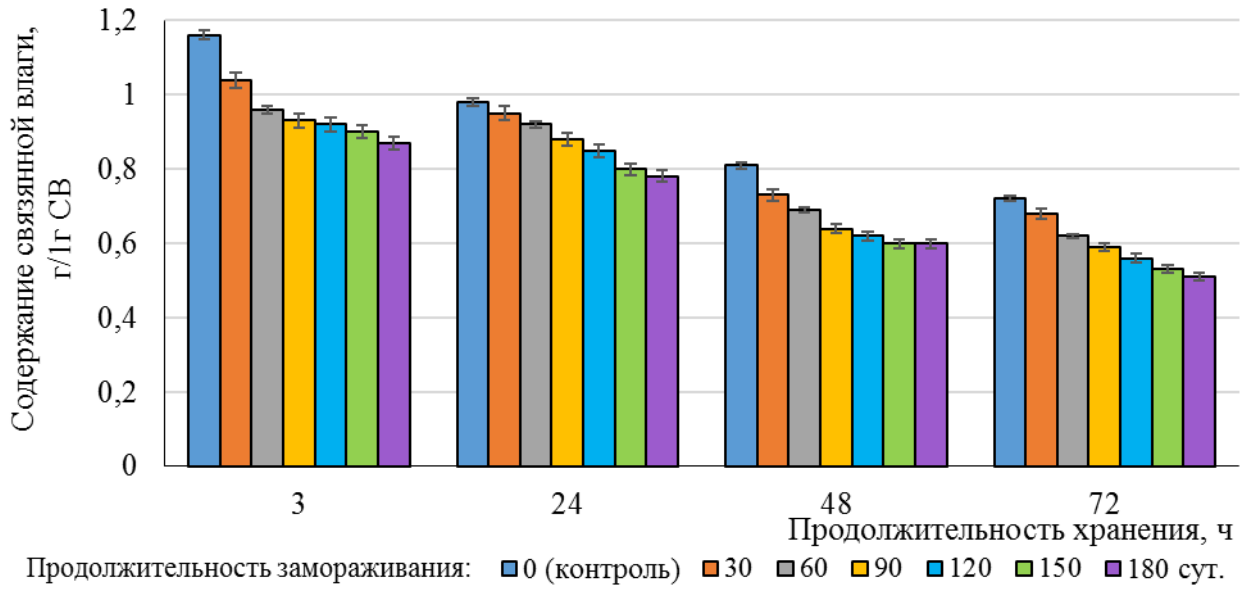


Рисунок 5.29 – Содержание связанной влаги в ржано-пшеничном хлебе при хранении в зависимости от продолжительности замораживания теста

В результате анализа органолептических показателей ржано-пшеничного хлеба (рис. 5.30, табл. 5.10) выявлено, что длительное низкотемпературное воздействие на тестовые полуфабрикаты приводит к снижению объема изделий, ухудшению текстуры и пористости мякиша.

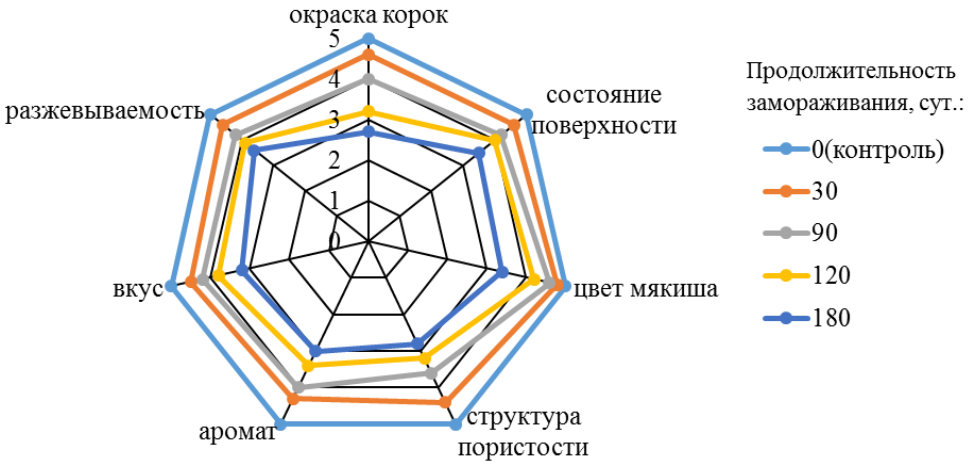


Рисунок 5.30 – Влияние продолжительности хранения теста на органолептические характеристики ржано-пшеничного хлеба

Таблица 5.10 – Органолептические показатели ржано-пшеничного хлеба

Показатель	Контроль (традиционная технология)	Опыт (криотехнология, срок хранения 180 сут.)
Внешний вид:		
- форма	правильная, соответствующая хлебопекарной форме, в которой проводилась выпечка	
- поверхность	слегка шероховатая, без подрывов и трещин	слегка шероховатая, имеются трещины длинной до 3 см
-цвет	коричневый	светло-коричневый
Состояние мякиша:		
- пористость	развитая, без пустот и уплотнений	не развитая, не равномерная
- пропеченность	мякиш не липкий, практически не заминающийся	мякиш плотный, заминающийся
Вкус и запах	приятный, выраженный, соответствующий ржано-пшеничному хлебу, без постороннего привкуса и запаха	не выраженный, пресный, без постороннего привкуса и запаха

Установлено, в результате низкотемпературной обработки тестовых полуфабрикатов ухудшаются цветовые характеристики готовой продукции, при длительном хранения полуфабрикатов в замороженном виде наблюдается снижение интенсивности окраски корки ржано-пшеничного хлеба (табл. 5.11).

Таблица 5.11 – Результаты оценки цветности ржано-пшеничного хлеба, выработанного на основе криотехнологии

Параметр	Мякиш		Корка	
	контроль	опыт	контроль	опыт
L	62,6	63,7	61,1	60,4
a	3,12	3,3	4,2	3,2
b	21,4	25,4	26,5	22,5
C	21,62	25,6	26,83	22,7
DW	51,79	48,8	45,82	49,1

Таким образом, установлено, что низкотемпературная обработка полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба отрицательно влияет на созревание тестовых заготовок и качество готовых изделий, что в свою очередь связано с нарушением биохимических и микробиологических процессов, протекающих при брожении. В связи с вышеизложенным, актуальной задачей экспериментальной работы является изучение выживаемости ключевых микроорганизмов, а именно дрожжей и молочнокислых бактерий, при длительном воздействии отрицательных температур.

5.3 Разработка технологических параметров процесса приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

В криотехнологии хлебобулочных изделий главное внимание необходимо уделять технологическим параметрам процессов приготовления полуфабрикатов и замораживания-размораживания, обеспечивающим сохранение клеток бродильной микрофлоры в активном состоянии и хорошее качество продукции. Существуют различные мнения об оптимальных режимах процесса замораживания-дефростации полуфабрикатов хлебобулочных изделий. В нашей стране и за рубежом проводятся многочисленные исследования по определению оптимальных режимов замораживания, размораживания и хранения тестовых полуфабрикатов хлебопекарного производства.

Один из наиболее спорных вопросов в криотехнологии хлебопечения – в каком состоянии должны находится дрожжи до замораживания (в активном или нет). Ряд исследователей [131, 358] считают, что брожение теста до замораживания обусловливает меньшую криорезистентность дрожжевых клеток, поэтому предлагается замораживать тесто до брожения, когда дрожжи находятся в неактивном состоянии. Однако, существует и противоположная точка зрения. Результаты исследований, приведенные в работах [331, 333], свидетельствуют о том, что из теста, полностью выброженного перед замораживанием, получали хлеб более высокого качества, чем из теста, бродившего не более 20 мин. до замораживания.

В мировой практике хлебопечения замораживание тестовых заготовок осуществляют в интервале температур ниже минус 18 ^{0}С [33].

Неоднозначно мнение специалистов и об оптимальном ведении дефростации тестовых заготовок хлебобулочных изделий. Так, некоторые отечественные исследователи рекомендуют вести размораживание в обычных условиях при температуре 22-25 ^{0}С или при более высоких температурах, например, при 36 ^{0}С и 45 ^{0}С, другие считают оптимальным двухстадийный режим дефростации, т.е. проведение размораживания при 0 ^{0}С до

достижения данной температуры в центре заготовки с последующим размораживанием при 30 ^{0}С. По данным зарубежных специалистов лучше всего совмещать повышенные температуры в интервале 30-40 ^{0}С с обдувом воздухом (скорость 1-2 м/с) [33, 63, 84].

Противоречивость результатов и выводов обусловлены, во-первых, тем, что объектами исследований служили сложные системы – тесто и закваски, приготовленные по различным рецептурам, различающиеся по количеству и качеству сырья, добавок и т.п., во-вторых, широким диапазоном используемых технологических параметров получения замороженных ржано-пшеничных полуфабрикатов.

Нами были проведены исследования по унификации рецептуры, способа тестоприготовления и технологических режимов производства ржано-пшеничного хлеба.

На каждом отдельном этапе эксперимента исследовали влияние одного изменяющегося параметра, сохраняя остальные неизменными (табл. 5.12). Во всех экспериментах использовали тестовые заготовки цилиндрической формы (длиной 10-15 см, диаметром 2-3 см), массой 100 г.

В качестве интегрального критерия при выборе технологических параметров приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов использовали оценку активности микрофлоры, участвующей в процессах брожения (дрожжей и молочнокислых бактерий), и общепринятые показатели качества готовых изделий, такие как пористость и удельный объем.

Таблица 5.12 – Последовательность и условия проведения эксперимента

№ серии эксперимента	Изменяемые параметры	Неизменяемые параметры
1	этап тестоприготовления, на котором осуществляли замораживание	рецептура теста, способ тестоприготовления, условия замораживания и хранения, условия размораживания, параметры расстойки и выпечки
2	температура замораживания и хранения тестовых заготовок	рецептура теста, способ тестоприготовления, условия дефростации, параметры расстойки и выпечки
3	условия дефростации	рецептура теста, способ тестоприготовления, условия замораживания и хранения, параметры расстойки и выпечки

В первой серии эксперимента производили определение продолжительности брожения полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба до замораживания, при которой лучше сохраняется активность бродильной микрофлоры и выше качество готовых изделий.

На данном этапе исследований замораживание тестовых заготовок осуществляли при температуре минус 25-30 ^{0}С, дефростацию при комнатной температуре до достижения температуры в центральных слоях теста 18-20 ^{0}С. Количество жизнеспособных клеток дрожжей и молочнокислых бактерий ржано-пшеничного теста в зависимости от активности их перед замораживанием представлено на рисунке 5.31.

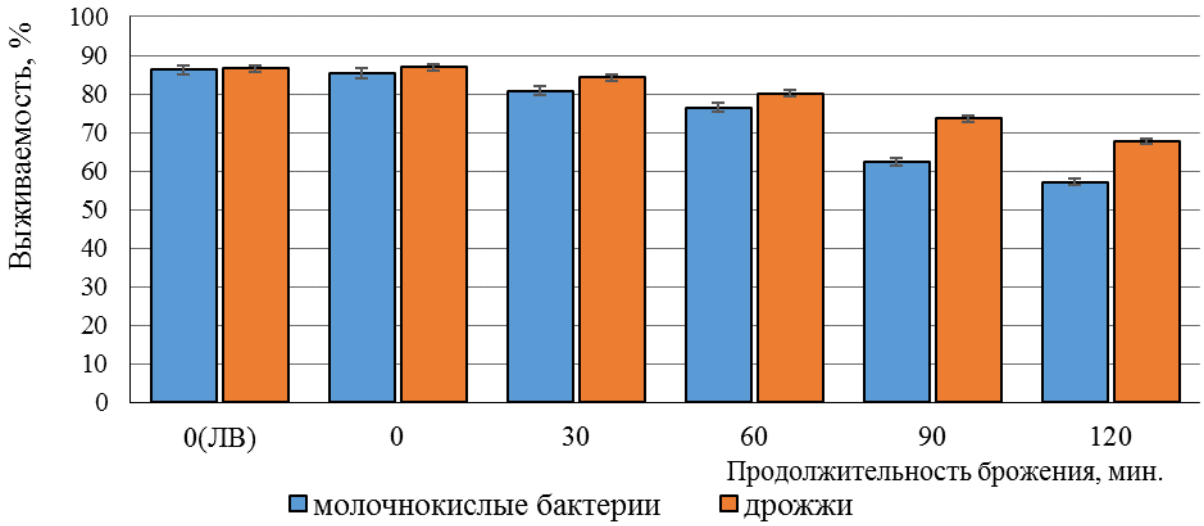


Рисунок 5.31 – Выживаемость молочнокислых бактерий и дрожжей в зависимости от продолжительности брожения теста перед замораживанием

Анализ полученных данных показывает, что замес ржано – пшеничного теста на ледяной воде (ЛВ) с немедленным формованием и замораживанием тестовых заготовок позволяет максимально сохранить жизнеспособность клеток дрожжей и молочнокислых бактерий.

Полученные данные положительно коррелируют с показателями качества готовых изделий (табл. 5.13 и 5.14).

Таблица 5.13 – Качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба в зависимости от продолжительности брожения теста перед замораживанием

Продолжительность брожения, мин.	Кислотность, град.	Влажность, %	Пористость %	Удельный объем, см^3/100 г	Крошковатость	Удельная набухаемость, см^3
0 (ЛВ)	7,8	46,9	57,4	186,3	0,7	234
0	7,8	46,8	56,7	179,8	0,7	236
20	7,4	46,9	56,3	173,1	0,8	239
40	7,0	46,7	55,5	166,2	0,8	241
60	6,8	46,8	54,7	161,4	0,8	243
80	6,8	46,8	53,6	149,5	0,9	247

Таблица 5.14 – Деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба в зависимости от продолжительности брожения теста перед замораживанием

Продолжительность брожения, мин.	Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %	Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%
0 (ЛВ)	2,1	2,0	4,1	51,2	48,8
0	2,3	2,2	4,5	51,1	48,9
20	2,6	2,2	4,8	54,2	45,8
40	2,7	2,1	4,8	56,3	43,8
60	2,7	2,3	5,0	54,0	46,0
80	2,9	2,7	5,6	51,8	48,2

Таким образом, наилучшие результаты получены в условиях, когда клетки, как дрожжей, так и молочнокислых бактерий находятся в неактивном состоянии перед низкотемпературной обработкой.

В следующей серии исследований было изучено влияние режима замораживания тестовых заготовок ржано-пшеничного хлеба на выживаемость клеток бродильной микрофлоры и качество готовых изделий. На данном этапе продолжительность брожения сводилась к минимуму. Замес теста производили на ледяной воде с температурой 2-5 ^{0}С. Дефростацию осуществляли так же, как и на предыдущем этапе эксперимента. Выбор температурных режимов замораживания был обусловлен техническими возможностями современного хлебопекарного производства и результатами собственных исследований.

На рисунке 5.32 представлены данные по влиянию различных режимов замораживания ржано-пшеничного теста на жизнеспособность молочнокислых бактерий и дрожжей.

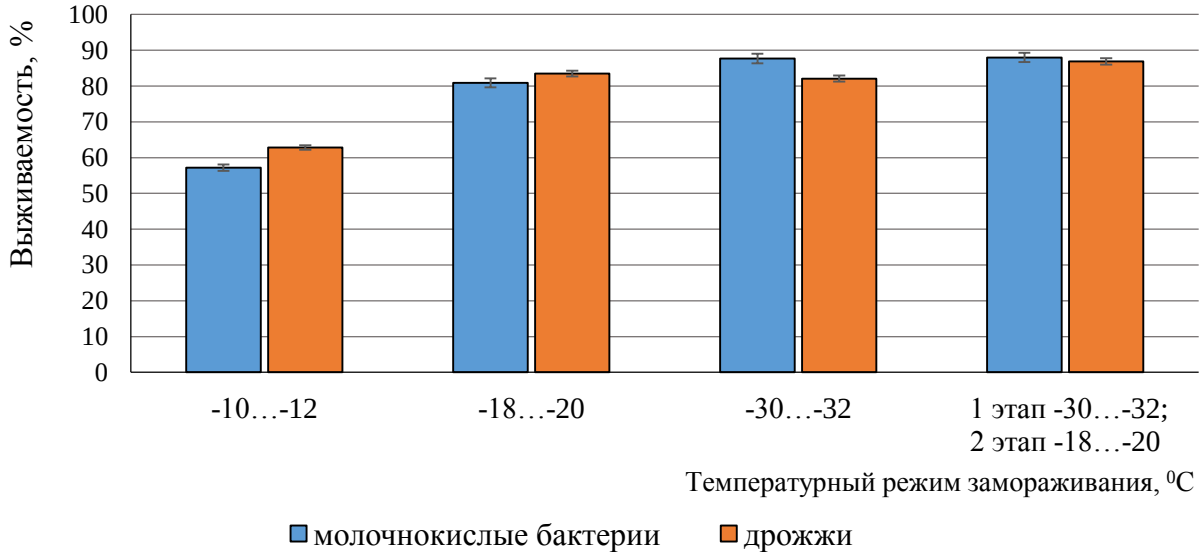


Рисунок 5.32 – Количество жизнеспособных клеток дрожжей и молочнокислых бактерий в зависимости от режима замораживания полуфабрикатов

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на выживаемость молочнокислых бактерий и дрожжей в ржано-пшеничном тесте существенно влияет температурный режим замораживания тестовых заготовок. Двухэтапный режим замораживания позволил сохранить максимальное количество клеток молочнокислых бактерий и дрожжей в активном состоянии по сравнению с другими режимами данного процесса. Анализ физико-химических показателей качества и деформационных характеристик готовых изделий (табл. 5.15 и 5.16) также показывает, что лучшие результаты получены при быстром замораживании тестовых заготовок при температуре минус 30-32 ^{0}С в течение 1,5-2 ч с последующей выдержкой их при температуре минус 18-20 ^{0}С (двухэтапный режим замораживания).

Таблица 5.15 – Качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба в зависимости от режима замораживания полуфабрикатов

Режим замораживания, ^{0}С	Кислотность, град.	Влажность, %	Пористость %	Удельный объем, см^3/100 г	Крошковатость	Удельная набухаемость, см^3
-18…-20	7,2	46,7	56,2	179,2	0,8	239
-30…-32	7,6	46,8	57,4	186,4	0,6	234
1 этап: -30…-32; 2 этап: - 18.. -20	7,8	46,8	58,2	192,1	0,6	231

Таблица 5.16 – Деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба в зависимости от режима замораживания полуфабрикатов

Режим замораживания, ^{0}С	Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %
-18…-20	2,7	2,3	5,0	54,0	46,0
-30…-32	2,1	2,0	4,1	51,2	48,8
1 этап: -30…-32; 2 этап: - 18.. -20	2,0	1,9	3,9	51,3	48,7

В третьей серии экспериментов определяли оптимальные параметры процесса размораживания тестовых полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба.

Замес теста производили на ледяной воде температурой 2-5 ^{0}С, замораживание осуществляли при температуре минус 30 ^{0}С в течение 2 ч, хранили тестовые заготовки в течение сут. при температуре минус 18-20 ^{0}С. Для исследований нами были выбраны режимы дефростации полуфабрикатов, рекомендуемые специалистами при производстве хлебобулочных изделий с применением криотехнологии (табл. 5.17).

Таблица 5.17 – Влияние различных условий дефростации на жизнеспособность бродильной микрофлоры ржано-пшеничного теста

Режим дефростации	Выживаемость микроорганизмов, %	
	дрожжи	молочнокислые бактерии
t=22-25^{0}C	86,2	85,8
СВ-лучи	87,1	85,7
t_1=0^{0}C; t_2=30^{0}C	80,0	83,6
t=36-38^{0}C	86,8	85,2
t=40-45^{0}C	88,3	88,5
t=30^{0}C с обдувом*	87,9	88,0
t=40^{0}C с обдувом*	82,4	82,9

Примечание: * - скорость подачи воздуха 1-2 м/с

Анализ данных по влиянию различных режимов размораживания на выживаемость бродильной микрофлоры тестовых заготовок показал, что сохранить клетки молочнокислых бактерий и дрожжей в активном состоянии позволили следующие режимы дефростации:

1) при температуре 40-45 ^{0}C без обдува воздухом;
2) при температуре 30 ^{0}C с обдувом (скорость подачи воздуха 1-2 м/с);
3) при комнатной температуре (температура 22-25 ^{0}C без обдува воздухом);
4) в СВ-печи.

Оптимальным, на наш взгляд, является режим размораживания тестовых заготовок при температуре 40-45 ^{0}C, поскольку при этом режиме дефростации не требуется дополнительного оборудования (микроволновая печь, обдув воздухом) и может проводиться в расстоечном шкафу, а также при комнатной температуре.

Анализ показателей качества ржано-пшеничного хлеба (табл. 5.18), выработанного на основе замороженного теста, также подтвердил, что оптимальным является размораживание при температуре 40-45 ^{0}C. При данном режиме размораживания готовые изделия имели наилучшие показатели качества.

Таблица 5.18 – Параметры технологического процесса и показатели качества хлеба при различных условиях дефростации

Наименования режимов и показателей	Режим дефростации						
	t=22-25 ^{0}C	СВ-лучи	t_1=0 ^{0}C; t_2=30 ^{0}C	t=36 ^{0}C	t=40-45^{0}C	t=30 ^{0}C с обдувом воздухом	t=40 ^{0}C с обдувом воздухом
продолжительность технологического процесса, мин.							
Дефростация	240	4	300	180	90	70	90
Расстойка	170	150	205	190	150	150	150
Выпечка	55	60	60	55	55	55	55
физико-химические показатели качества готового изделия							
Влажность, %	47,4	47,1	47,9	47,8	47,3	47,8	47,5
Кислотность, град.	7,8	7,6	8,1	7,5	7,9	7,6	7,9
Пористость, %	59,1	59,0	58,2	58,5	59,1	58,7	59,0
Удельный объем, см^3/100г	195,4	195,9	193,6	194,2	196,3	195,0	196,1
Упек, %	8,7	8,9	9,4	9,1	8,7	9,0	8,8
Усушка, %	3,3	3,6	4,0	3,5	3,2	3,6	3,7
Крошковатость	0,7	1,1	0,9	0,8	0,7	0,9	1,0
Удельная набухаемость, см^3	234	247	241	236	232	240	244
деформационные характеристики мякиша							
$\Delta H_{упр.}$	1,9	2,0	2,4	2,0	1,8	2,2	2,1
$\Delta H_{плас.}$	2,0	2,5	2,2	1,9	2,0	2,5	2,0
$\Delta H_{общ.}$	3,9	4,5	4,6	3,9	3,8	4,7	4,1
$\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %	48,7	44,4	52,2	51,3	47,4	46,8	51,2
$\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	51,3	55,6	47,8	48,7	52,6	53,2	48,8

Таким образом, нами были установлены оптимальные параметры процессов замораживание и дефростация при производстве ржано-пшеничного хлеба с использованием замороженных полуфабрикатов:

1) время брожения полуфабрикатов перед замораживанием должно быть минимальным, т.е. при замесе следует использовать ледяную воду температурой 2-4 ^{0}C; после замеса формовать, упаковывать и немедленно замораживать тестовые заготовки;

2) замораживание полуфабрикатов необходимо производить при температуре минус 30-32 ^{0}C в течение 1,5-2 ч с последующей выдержкой при температуре минус 18-20 ^{0}C;

3) дефростацию тестовых заготовок целесообразно вести при 40-45 ^{0}C до достижения температуры в центре тестовой заготовки 18-20 ^{0}C.

Соблюдение указанных параметров технологического процесса позволяет сохранить клетки молочнокислых бактерий и дрожжей в активном состоянии и получить качественные готовые изделия, вырабатываемые на основе замороженных полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба.

5.4 Подбор эффективных заквасок молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что клетки молочнокислых бактерий являются более чувствительными к воздействию отрицательных температур по сравнению с клетками дрожжей, поэтому необходимо было подобрать закваски молочнокислых бактерий, устойчивые к низкотемпературной обработке.

Подбор заквасок для криотехнологий хлебопечения производили по двум критериям:

1) высокая выживаемость клеток молочнокислых бактерий после низкотемпературного хранения тестовых полуфабрикатов;

2) благоприятное воздействие на процесс брожения дефростированных полуфабрикатов и качественные характеристики готовой продукции.

В исследованиях использовали пять видов сухих заквасок (табл. 5.19), содержащих лиофилизированные штаммы молочнокислых бактерий в количестве 10^8 КОЕ/г и муку в качестве наполнителя.

Таблица 5.19 – Закваски молочнокислых бактерий

Условное обозначение	Состав штаммов	Источник
Закваска 1	*Lactobacillus casei* ТМБ-Д	МГУПП, каф. ЗХКТ
Закваска 2	*Lactobacillus casei* ТМБ-Д; *Streptococcus faecium* М	МГУПП, каф. ЗХКТ
Закваска 3	*Lactobacillus acidophilus var. Coccoileus* М; *Lactobacillus brevis*	МГУПП, каф. ЗХКТ
Закваска 4	*L. casei 32*	КНИТУ, каф. ТПП
Закваска 5	*L. plantarum 24*	КНИТУ, каф. ТПП

Применение сухих заквасок молочнокислых бактерий при производстве ржаных сортов хлеба имеет ряд существенных преимуществ и позволяет:

- обеспечить приготовление заквасок высокого качества в наиболее короткий период времени и создать возможность направленного управления процессом брожения;
- гарантировать подавление посторонней микрофлоры;
- сократить технологический процесс приготовления полуфабрикатов (устранение разводочного цикла);
- обеспечить высокие показатели качества готовой продукции;
- получать продукты функциональной направленности, используя специфические свойства отдельных штаммов молочнокислых бактерий.

На рисунке 5.33 представлены данные по изменению содержания жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий при использовании сухих заквасок под влиянием длительной низкотемпературной обработки ржано-пшеничного теста (температура замораживания минус 30 ^{0}С).

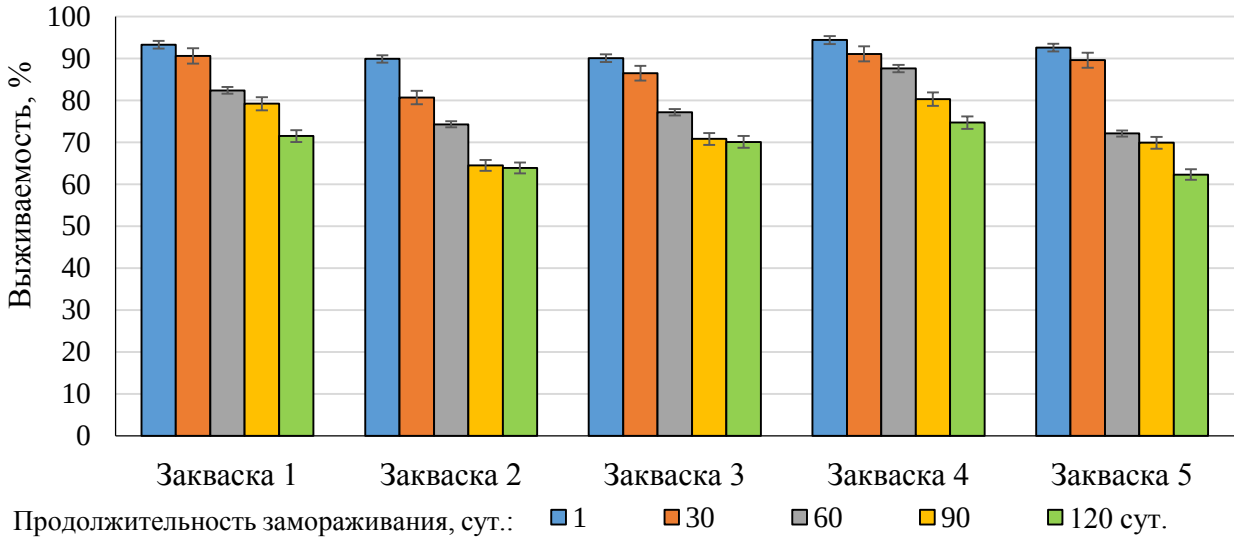


Рисунок 5.33 – Выживаемость молочнокислых бактерий в тестовых полуфабрикатах при использовании заквасок

Установлено, что после замораживания, хранения, дефростации тестовых полуфабрикатов жизнеспособность молочнокислых бактерий снижается по сравнению с первоначальными значениями в зависимости от вида молочнокислых бактерий, входящих в состав сухих заквасок.

Результаты исследований показали, что выживаемость молочнокислых бактерий всех исследуемых заквасок после суточного хранения тестовых полуфабрикатов превышает 90 %, тогда как через 120 сут. процент жизнеспособных клеток у заквасок 1, 3 и 4 составляет 70,5-74,7 %, у заквасок 2 и 5 снижается до значений 64,5 % и 62,3 % соответственно. Максимальную криорезистентность в тестовой среде демонстрируют штаммы *L. casei TMB-D* и *L. casei 32* (закваски 1 и 4).

Важно было изучить степень влияния исследуемых заквасок молочнокислых бактерий на скорость процессов брожения и созревания тестовых полуфабрикатов, оценку которых проводили по кислотонакоплению, критерию бродильной активности полуфабрикатов, газообразующей и газоудерживающей способностям теста. На данном этапе эксперимента продолжительность хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде при температуре минус 18-20 ^{0}С составила 30 сут.

Выявлено, что в процессе созревания ржано-пшеничного теста с внесением исследуемых заквасок (рис. 5.34) происходит интенсификация кислотонакопления в тестовых заготовках по сравнению с контролем, что указывает на криоустойчивость штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав сухих молочнокислых заквасок. Кроме того, при использовании заквасок 1 и 4 отмечается сокращение продолжительности брожения полуфабрикатов на 40 мин. по сравнению с контролем.

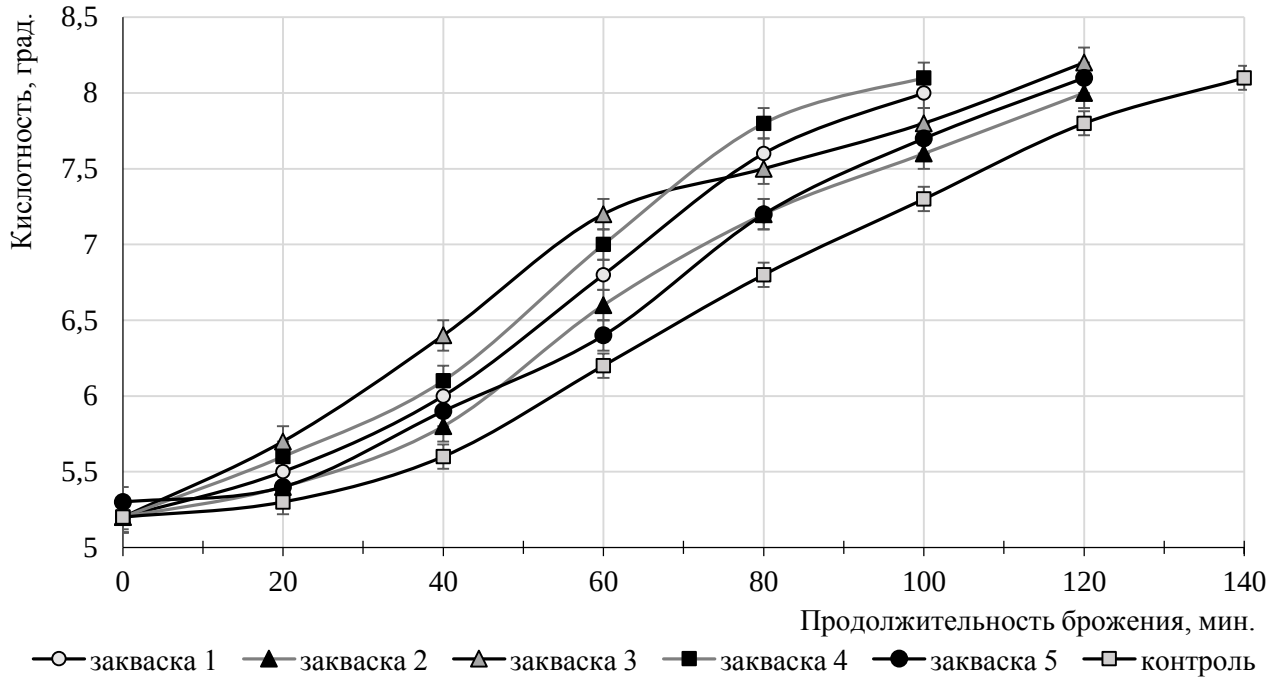


Рисунок 5.34 – Влияние сухих заквасок молочнокислых бактерий на динамику кислотонакопления тестовых заготовок

О биологическом влиянии исследуемых заквасок молочнокислых бактерий на клетки дрожжей судили по скорости газообразования тестовых заготовок в процессе брожения. Анализ кривых, представленных на рисунке 5.35 показывает, что сухие закваски молочнокислых бактерий позволяют интенсифицировать процессы газообразования в ржано-пшеничном тесте.

Максимальное значение скорости газообразования (4,08-4,87 мл CO_2/мин.) размороженного ржано-пшеничного теста отмечается на 180-240 мин. брожения при внесении в тестовые заготовки заквасок 1, 3 и 4.

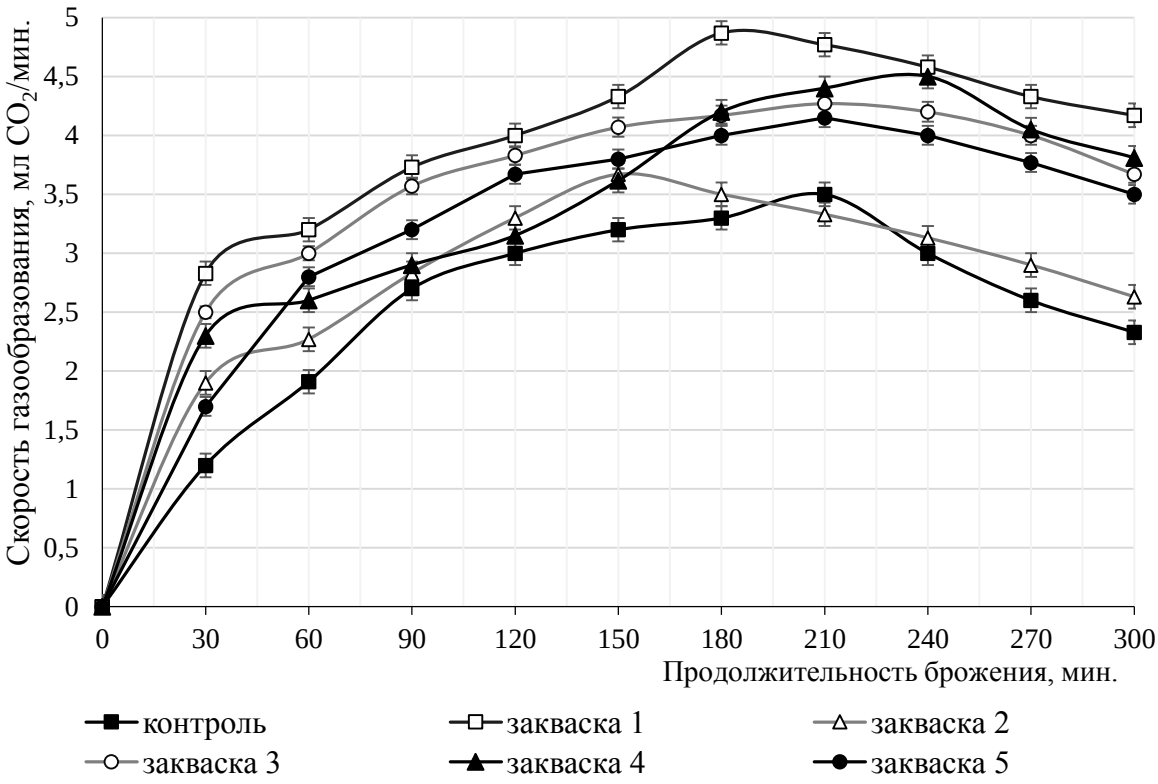


Рисунок 5.35 – Изменение скорости газообразования дефростированных полуфабрикатов

Установлено, что применение заквасок молочнокислых бактерий позволяет увеличить газообразующую способность дефростированного ржано-пшеничного теста от 10,2 до 52,6 % в зависимости от их состава, максимальной газообразующей способностью 1224 мл CO_2 отличаются образцы с применением сухой закваски 1 (рис. 5.36).

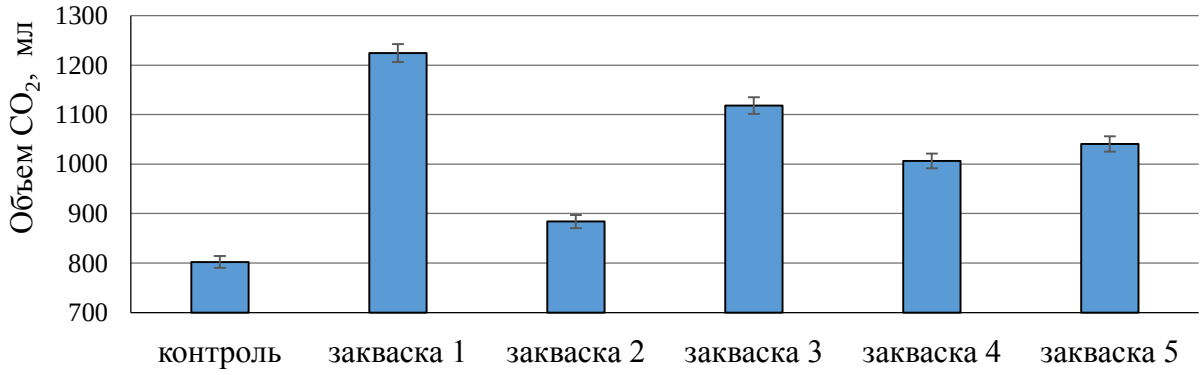


Рисунок 5.36 – Изменение газообразующей способности ржано-пшеничного теста при использовании заквасок

Установлено, что внесение сухих заквасок молочнокислых бактерий приводит к улучшению газоудерживающей способности ржано-пшеничных полуфабрикатов, выработанных с применением криотехнологии (рис. 5.37), так газоудерживающая

способность опытных образцов с закваскаами, подвергавшимися низкотемпературной обработке в течение 30 сут., выше относительно контрольных значений в среднем на 20,9 % и 18,6 % через 30 мин. и 60 мин. соответственно.

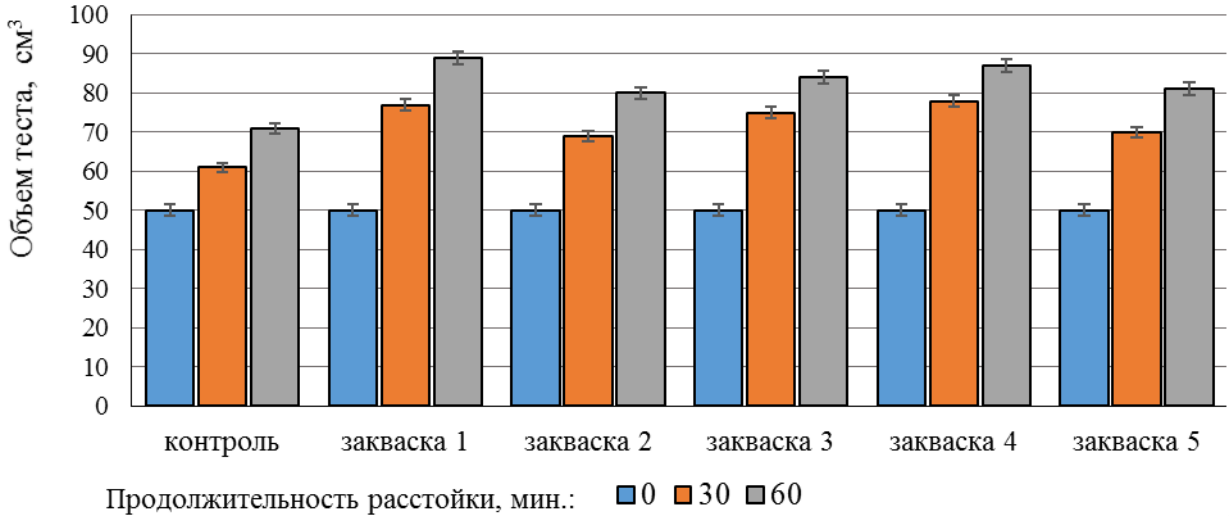


Рисунок 5.37 – Изменение газоудерживающей способности полуфабрикатов под воздействием сухих заквасок

Полученные результаты согласуются с данными по влиянию исследуемых заквасок на подъемную силу и бродильную активность полуфабрикатов (рис. 5.38).

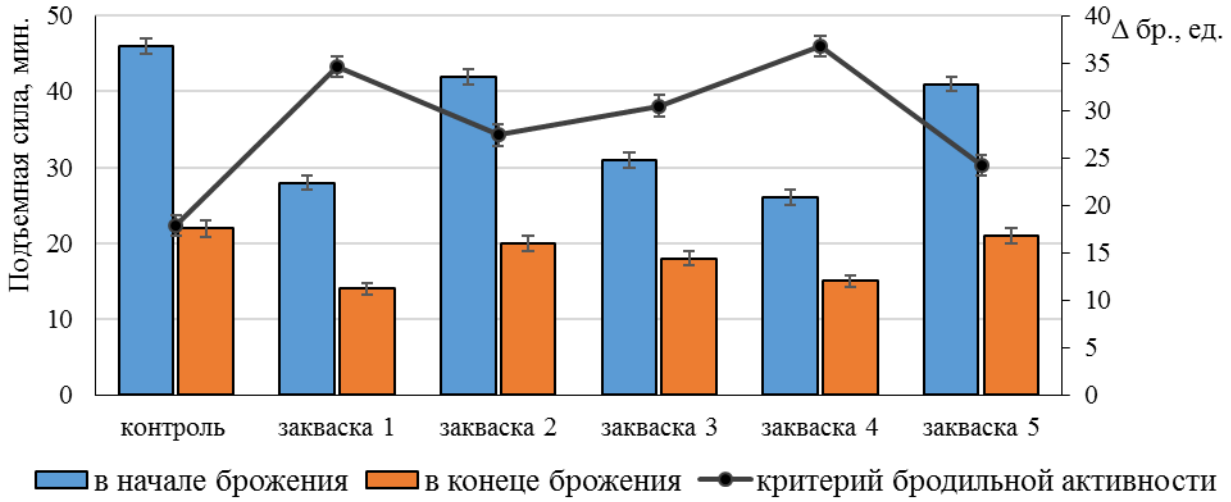


Рисунок 5.38 – Влияние заквасок на биотехнологические свойства ржано-пшеничного теста

Наилучшими показателями подъемной силы полуфабрикатов и бродильной активности обладали образцы тестовых полуфабрикатов с внесением заквасок молочнокислых бактерий 1, 3 и 4 в начальной и конечной точках процесса брожения.

В результате исследования влияния заквасок на расплываемость шарика во время расстойки теста выявлено, что введение сухих заквасок молочнокислых бактерий в рецептуру ржано-пшеничного хлеба приводит к разжижению дефростированного теста и увеличению диаметра шарика в среднем на 14,1 % и 15,5 % через 30 мин. и 60 мин. расстойки полуфабрикатов соответственно (рис. 5.39).

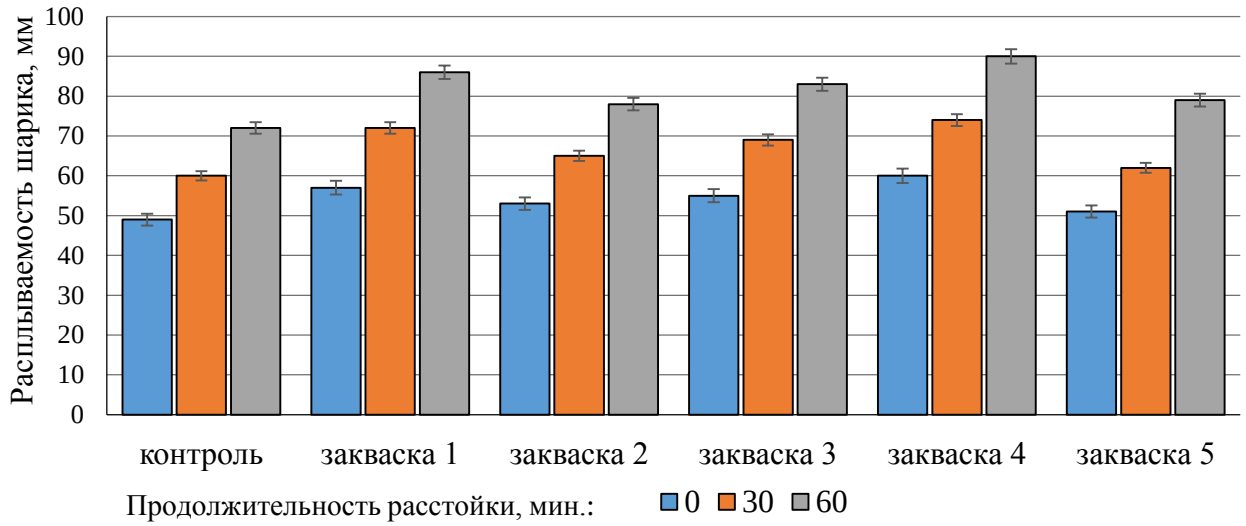


Рисунок 5.39 – Влияние заквасок на расплываемость шарика теста при расстойке

Положительное влияние заквасок на расплываемость ржано-пшеничного теста при расстойке, вероятно, обусловлено способностью криорезистентных штаммов лактобактерий продуцировать гидролитические ферменты, в частности протеолитического и амилолитического действия, в процессе их роста и развития в тестовой среде, что подтверждается результатами изучения активности протеаз (рис. 5.40) и амилаз (рис. 5.41) в начале и в конце брожения теста с различными закваскаами.

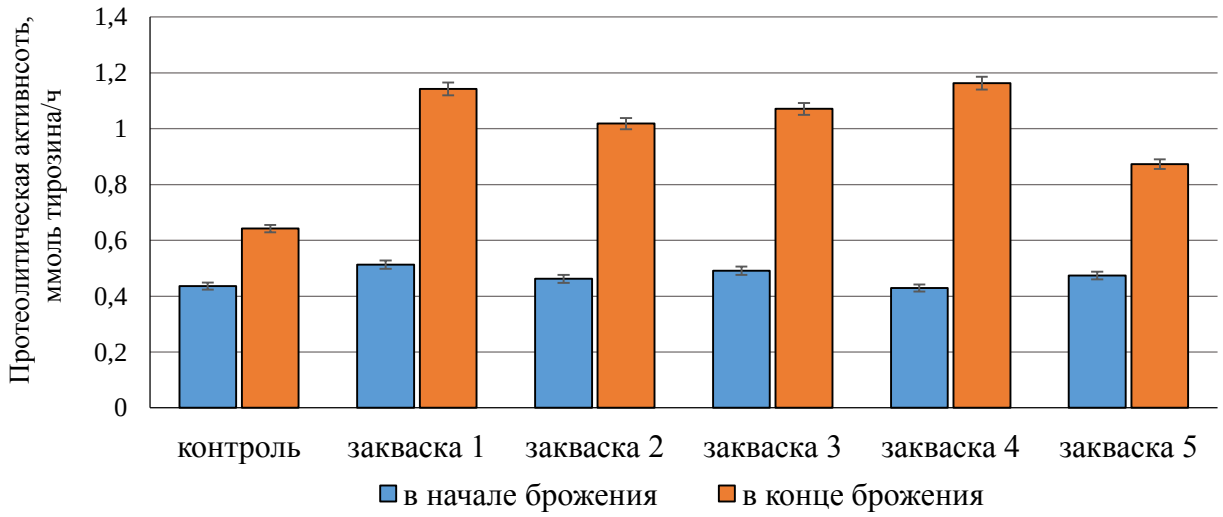
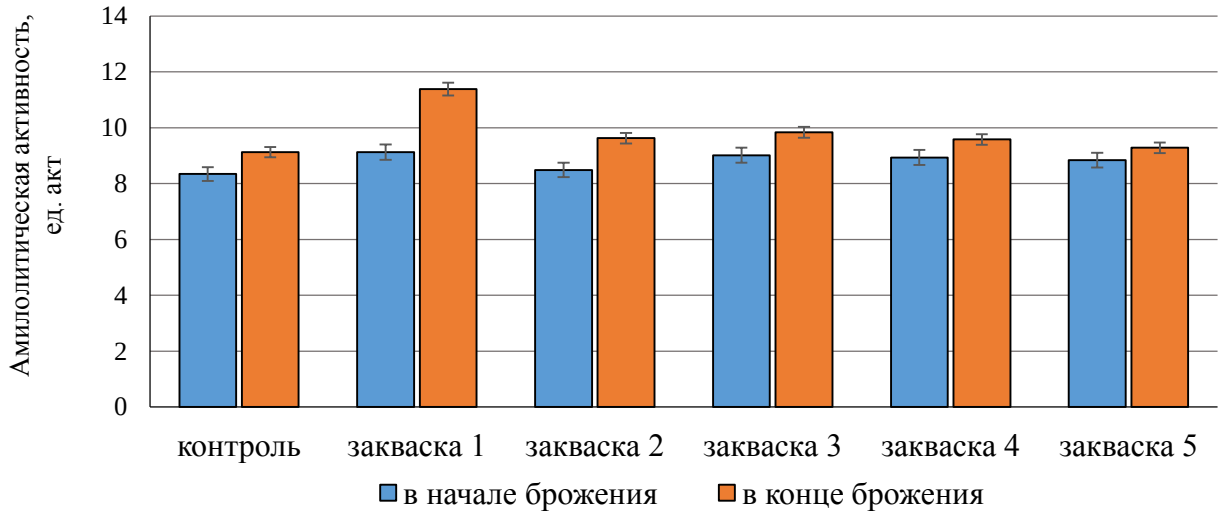


Рисунок 5.40 – Протеолитическая активность ржано-пшеничного теста с закваскаами

Так, все исследуемые закваски проявляют протеолитическую активность, что позволяет увеличить активность протеаз на 58-66 % к концу брожения ржано-пшеничного теста по сравнению с контрольными значениями. Введение заквасок в рецептуру замороженных полуфабрикатов не приводит к существенным изменениям активности α-амилазы (за исключением закваски 1), однако позволяет увеличить активность β-амилазы на 32,8 % при применении заквасок.

а) α-амилазы



б) β-амилазы

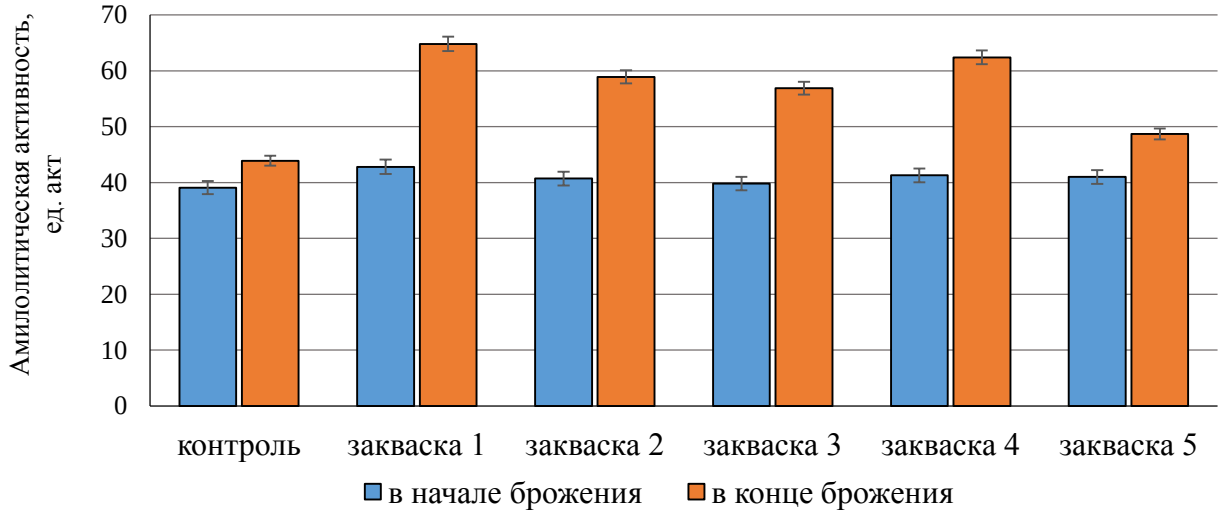
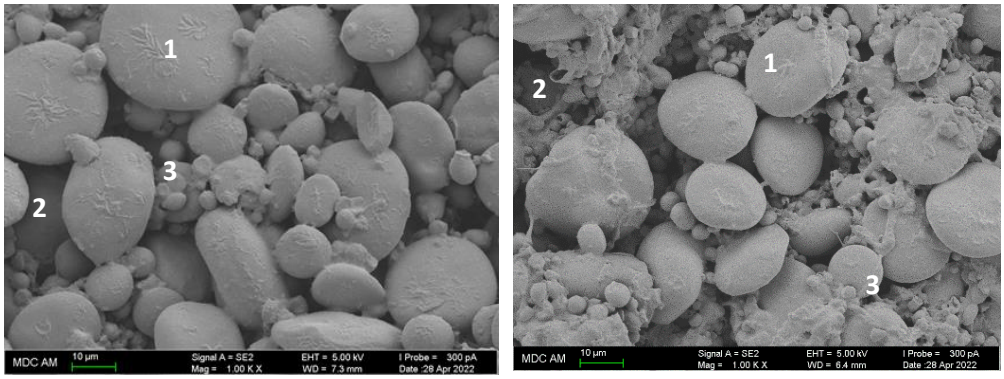


Рисунок 5.41 – Амилолитическая активность ржано-пшеничного теста с заквасками

Методом электронной микроскопии выявлено, что при использовании заквасок в ржано-пшеничных полуфабрикатах отмечается большее количество воздушных полостей, тесто отличается меньшими размерами крахмальных зерен и наличием следов воздействия амилолитических ферментов (рис. 5.42).

а) контроль б) опыт



1 – крахмальное зерно;
2 – воздушная полость;
3 – следы воздействия амилаз

Рисунок 5.42 – Микроструктура ржано-пшеничного теста

Таким образом, анализ полученных данных позволяет сделать выводы о целесообразности использования сухих заквасок молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами в технологии ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с целью интенсификации процессов брожения и созревания теста после низкотемпературных воздействий.

Данные выводы подтверждают также результаты исследования влияния заквасок на качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением криотехнологии (табл. 5.20).

Таблица 5.20 – Влияние сухих заквасок молочнокислых бактерий на показатели качества ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением криотехнологии

Образцы	Кислотность, град.	Влажность, %	Пористость, %	Удельный объем, $см^3$/100 г	Крошковатость	Удельная набухаемость, $см^3$
Контроль	7,2	47,4	57,9	187,4	1,0	246
Закваска 1	7,9	47,6	61,5	204,2	0,7	230
Закваска 2	7,6	47,4	56,5	180,3	0,8	238
Закваска 3	7,6	47,8	57,9	198,1	0,8	234
Закваска 4	7,8	47,6	60,6	201,8	0,6	232
Закваска 5	7,8	47,6	59,8	197,2	0,7	238

Анализ полученных данных показывает, что внесение в рецептуру замороженных полуфабрикатов сухих заквасок молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами позволяет повысить пористость готовых изделий до 61,5 %, удельный объем до 204,2 $см^3$/100 г. Кроме того, применение заквасок оказывает положительное влияние на крошковатость и удельную набухаемость мякиша ржано-пшеничного хлеба, так данные показатели улучшаются на 20-40 % и 3,3-6,5 % соответственно относительно контрольных значений в зависимости от состава закваски. Следует отметить, что показатели кислотности и влажности всех исследуемых образцов готовой продукции соответствуют требованиям нормативной документации на ржано-пшеничный хлеб и не превышают 8 град. и 48 % соответственно.

Выявлено, что ржано-пшеничный хлеб с добавлением криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий в составе сухих заквасок отличается наилучшими реологическими характеристиками мякиша по сравнению с контрольной пробой (табл. 5.21).

Таблица 5.21 – Деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением заквасок

Образцы	Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %
Контроль	2,6	2,0	4,6	56,5	43,5
Закваска 1	1,8	1,9	3,7	48,6	51,4
Закваска 2	2,2	2,1	4,3	51,2	48,8
Закваска 3	1,8	1,3	3,1	58,1	41,9
Закваска 4	1,8	2,4	4,2	42,9	57,1
Закваска 5	2,0	2,5	4,5	44,4	55,6

В результате анализа органолептических показателей ржано-пшеничного хлеба выявлено, что введение в рецептуру замороженного теста сухих заквасок, содержащих криорезистентные штаммы молочнокислых бактерий, приводит к повышению объема изделий, улучшению текстуры и пористости мякиша, вкуса и аромата изделий (рис. 5.43), при этом также отмечается положительное влияние заквасок на окраску корок и мякиша готовой продукции (табл. 5.22).

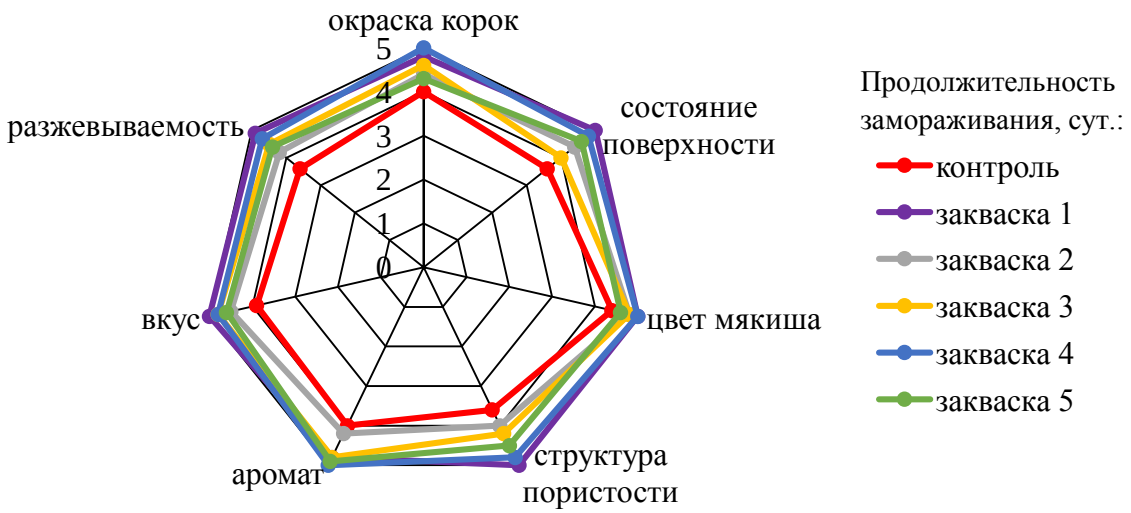


Рисунок 5.43 – Влияние сухих заквасок на органолептические характеристики ржано-пшеничного хлеба

Таблица 5.22 – Результаты оценки цветности ржано-пшеничного хлеба с заквасками

Экспериментальные образцы	Параметр цветности				
	L	a	b	C	DW
мякиш изделий					
Контроль	63,7	3,3	25,4	25,6	48,8
Закваска 1	61,3	3,1	21,7	21,92	50,51
Закваска 2	62,1	3,4	22,1	22,36	50,76
Закваска 3	61,9	3,6	23,7	23,97	49,13
Закваска 4	62,8	3,8	21,9	22,23	51,45
Закваска 5	63,1	4,5	22,5	22,95	51,07
корка изделий					
Контроль	60,4	3,2	22,5	22,7	49,1
Закваска 1	61,8	5,6	26,8	27,38	45,90
Закваска 2	62,0	4,8	24,4	24,87	48,45
Закваска 3	61,5	5,2	25,9	26,42	46,61
Закваска 4	61,1	5,9	25,2	25,88	46,91
Закваска 5	60,7	4,6	24,8	25,22	47,13

Примечание: L – насыщенность оттенка; a – интенсивность красного оттенка; b – интенсивность желтого оттенка; C – цветность; DW – степень белизны

Таким образом, результаты проведенных исследований доказывают необходимость подбора заквасок молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами, применение которых позволяет исключить ключевые проблемы при реализации криотехнологии ржано-пшеничных сортов хлебобулочных изделий, связанные, в первую очередь, с нарушением биохимических и микробиологических процессов, протекающих при брожении дефростированных полуфабрикатов.

Результаты исследований показали, что наиболее криоустойчивыми являются молочнокислые бактерии *L. casei TMB-D*, входящие в состав закваски 1 процент выживаемости лактобактерий при использовании данного препарата составил 93,3%. Установлено, что образцы ржано-пшеничного хлеба с внесением *L. casei TMB-D* в составе сухой молочнокислой закваски, обладали наилучшими физико-химическими и органолептическими показателями качества изделий, выработанных с применением криотехнологии.

Методом электронной сканирующей микроскопии показано, что образцы хлеба, приготовленные с применением сухой закваски, отличаются более губчатой структурой и имеют крупные поры по сравнению с контролем (рис. 5.44).

Результаты проведенных исследований показали перспективность использования криорезистентного штамма молочнокислых бактерий *L. casei TMB-D*, в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба с целью интенсификации процессов брожения полуфабрикатов и улучшения качественных характеристик готового продукта.

а) контроль б) опыт

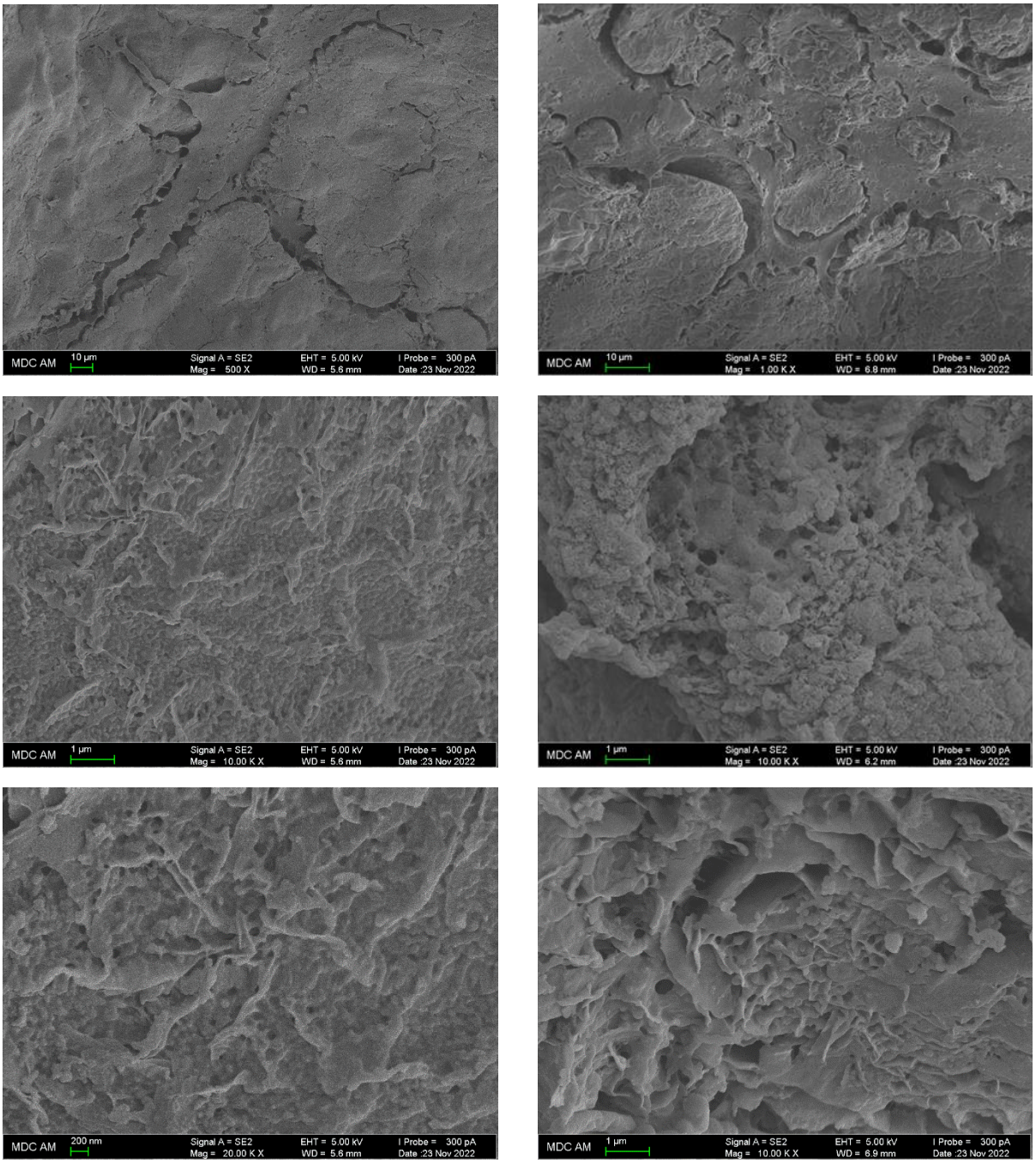


Рисунок 5.44 – Микроструктура хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов а) контроль, б) с применением сухой закваски *L. casei TMB-D*

На основании изложенных фактов очевидна актуальность проведения комплексных исследований, направленных на разработку эффективных способов стабилизации физиологической активности и жизнеспособности дрожжей и лактобактерий и улучшению качества замороженных полуфабрикатов, что позволит наряду с сохранением высоких потребительских свойств, расширить ассортимент хлебобулочных изделий, приготовленных на основе криотехнологии.

5.5 Поиск эффективных пищевых криопротектов и моделирование рецептур ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Специалисты в области криотехнологии хлебобулочных изделий сходятся во мнении, что особое внимание при производстве замороженного теста необходимо уделять правильному подбору рецептурных компонентов полуфабрикатов. Это связано с низкими технологическими возможностями известных криотехнологий в хлебопечении, невозможностью длительного хранения полуфабрикатов вследствие снижения их свойств и качества выпускаемого хлеба.

Многие исследователи, изучающие стабильность замороженных полуфабрикатов, сходятся во мнении, что именно благодаря изменениям в рецептуре можно достичь существенного улучшения качества готовых изделий. Для приготовления замороженного теста рекомендуется использовать улучшители различных групп и принципа действия, применение которых обусловлено необходимостью стабилизации свойств теста в процессе его низкотемпературного хранения и повышения качественных характеристик готовой продукции [17, 58, 74, 91, 138, 140, 174, 175, 270, 286, 306, 307, 329, 374, 387].

Целью дальнейших исследований явилась оптимизация рецептурного состава ржано-пшеничного хлеба, выработанного на основе замороженных полуфабрикатов.

5.5.1 Разработка рецептуры ржано-пшеничного хлеба с сухими молочными продуктами на основе замороженных полуфабрикатов

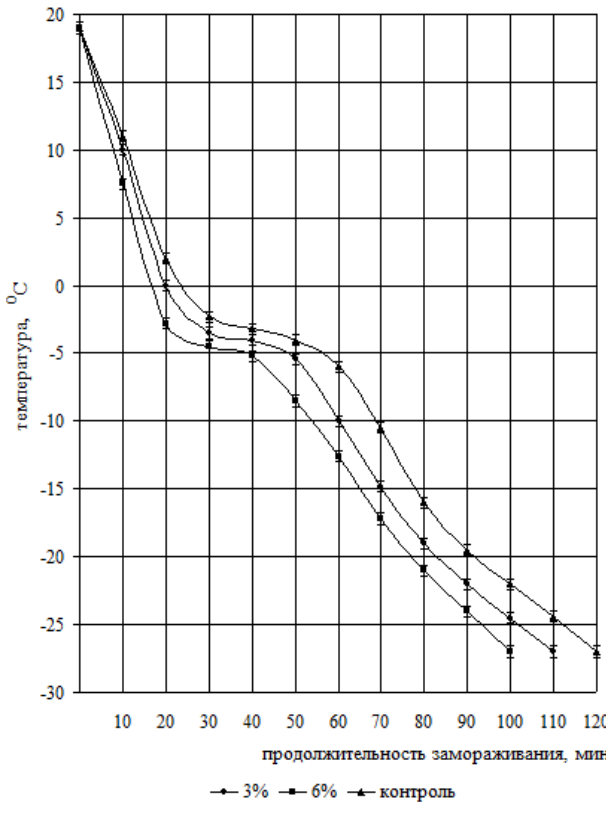
Одним из простых способов повышения выживаемости дрожжей и молочнокислых бактерий в замороженных тестовых полуфабрикатах является снижение содержания вне- и внутриклеточной влаги микроорганизмов. Использование в рецептурах гидрофильных и осмотически активных веществ является эффективным способом поддержания постоянного соотношения между содержанием вне- и внутриклеточной влаги за счет выделения части клеточной воды во внеклеточное пространство, что способствует частичному обезвоживанию клеток микроорганизмов. К таким веществам, в частности, относятся сухие молочные продукты. Следует отметить, что молочные продукты служат дополнительным питанием для клеток молочнокислых бактерий, непосредственных участников процесса брожения теста, и которые, как показали наши исследования, более восприимчивы к низкотемпературным воздействиям, чем дрожжи.

Для изучения степени влияния исследуемой добавки на характер изменения скорости замораживания и дефростации в тестовой среде были построены температурные

кривые (рис. 5.45). Выявлено, что характер изменения температурных кривых при внесении сухого молока существенно не отличается от контрольного образца. Введение добавки не влияет на период максимального кристаллообразования, который для всех вариантов составляет 16-20 мин. Однако, показано, что с увеличением концентрации сухого молока возрастает скорость замораживания тестовых заготовок. Так, для контрольных образцов скорость замораживания составила 0,8 ^{0}С/мин., для опытных – 1,1 ^{0}С/мин.

При изучении температурных кривых размораживания тестовых заготовок выявлено, что при внесении сухого молока в концентрации 3 % к массе муки зона постоянных температур сокращается с 40 мин. до 12 мин., для образцов с внесением добавки в концентрации 6 % к массе муки данная зона не выявлена. Таким образом, установлено, что использование сухого молока позволяет сократить продолжительность процесса дефростации полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба.

а) замораживание



б) дефростация

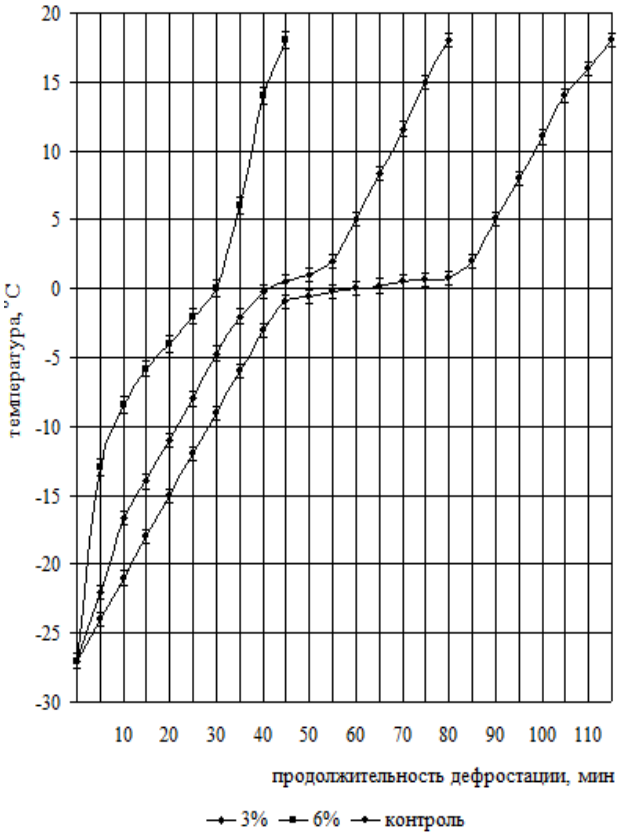


Рисунок 5.45 – Изменение температуры в центре тестовой заготовки при добавлении сухого молока

Далее были проведены исследования по разработке оптимизированной рецептурной композиции ржано-пшеничного хлеба, вырабатываемого на основе замороженных полуфабрикатов, с применением закваски и молочных продуктов – сухого молока и сыворотки.

С целью компенсации гибели части дрожжей и потери ими газообразующей способности при длительном хранении теста в замороженном виде рекомендуется увеличить дозировку дрожжей, при этом количество дрожжей в рецептурах замороженного теста в основном зависит от вида продукции и может быть увеличено до 20 %. Поскольку концентрации вносимых дрожжей, сухой закваски молочнокислых бактерий, сухого молока предопределяют количество активных клеток микроорганизмов, участвующих в процессах брожения полуфабрикатов, а, следовательно, и качество готовых изделий, эти факторы были выбраны в качестве переменных для многофакторного эксперимента.

Количество прессованных дрожжей варьировали в интервале 0,5-1,0 вес. % к массе муки; концентрацию сухой закваски молочнокислых бактерий (закваска 1) в диапазоне 0-0,3 вес. % к массе муки; количество сухого молока в интервале 0-6 вес. % к массе муки. Пределы варьирования параметров выбирали с учетом реально возможных изменений каждого фактора. Тестовые полуфабрикаты упаковывали во влагонепроницаемую пленку, замораживали при температуре минус 25 ^{0}С и хранили в замороженном виде в течение 1 мес.

Исследования проводили в соответствии с композиционным униформ-ротатабельным планом, где концентрации дрожжей (X_1, %), сухой закваски (X_2, %) и сухого молока (X_3, %) были выбраны качестве переменных; а пористость (Y_1, %) и удельный объем (Y_2, %) готовых изделий приняты в качестве искомых функций. Математические модели исследуемых процессов были построены на основе многоуровневого многофакторного анализа, на матрице экспериментальных данных (приложение В, таблица 2).

Соответствие полученной модели эксперименту контролировали по следующим критериям: величина абсолютных ошибок отклонения средних экспериментальных данных от полученных на основании модели (с погрешностью определения самих экспериментальных данных); критерий Дюрбина-Ватсона; доверительная вероятность, коэффициент корреляции и стандартная ошибка отклонения. При получении математической модели и построении уравнений регрессии был рассчитан доверительный интервал, включающий не менее 99 % всех значений, полученных экспериментальным путем.

Установлено, что значительное влияние на качество хлеба оказывает количество вносимой сухой закваски молочнокислых бактерий. Установлено, что при варьировании концентрации сухой закваски *L. casei ТМБ-Д* в диапазоне 0-0,15 % к массе муки при постоянной дозировке прессованных дрожжей - 0,7 %, происходит увеличение пористости и удельного объема ржано-пшеничного хлеба на 6 и 8,5 % соответственно.

При дальнейшем повышении концентрации исследуемой закваски от 0,15 до 0,3 % происходит снижение исследуемых показателей качества хлеба. Повышение дозировки прессованных дрожжей с 0,5 до 0,7 % к массе муки приводит к увеличению на 10 % пористости хлеба, при этом колебания исследуемого показателя зависят также от концентраций других рецептурных компонентов теста – закваски и сухого молока.

Использование сухого молока в количестве от 1 до 5 % позволяет повысить качественные характеристики готовой продукции, выработанной на основе криотехнологии – увеличить пористость на 11 % и удельный объем ржано-пшеничного хлеба на 14 %. В результате математической обработки результатов получены регрессионные уравнения зависимости пористости (Y_1) и удельного объема (Y_2) изделий от концентраций рецептурных компонентов ржано-пшеничного хлеба.

Для показателя пористость ржано-пшеничного хлеба (Y_1) получено уравнение регрессии вида:

$$Y_1 = 50{,}51 + 38{,}87X_1^2 - 33{,}86X_1^3 + 741{,}05X_2 + 16{,}63X_3 - 2362{,}67X_1X_2 + 16{,}36X_2X - 23{,}05X_1X_3 - \\ - 269{,}31X_1X_2^2 - 4{,}33nX_2X_3^2 + 1958{,}13X_2X_1^2 \quad (5.1)$$

Доверительная вероятность полученной зависимости – 92,25 %, коэффициент корреляции составляет 87,70 %; величина критерия Дюрбина-Ватсона 2,077; стандартная ошибка отклонения 0,376.

Экстремум расположен при следующих значениях варьируемых параметров: дозировка прессованных дрожжей 0,75 %, концентрация сухой закваски 0,14 %, количество сухого молока 4,4 %, при этом максимальное значение пористости составляет 65,4607 %.

Для удельного объема готовых изделий (Y_2) получено уравнение регрессии вида:

$$Y_2 = 153{,}34 + 197{,}75X_1^2 - 174{,}99X_1^3 - 399{,}58X_2 + 10071{,}6X_2^2 - 63549{,}5X_2^3 + 113356{,}01X_2^3 + \\ + 1{,}44X_2^3 + 0{,}21X_3^2 + 99{,}39X_2X_3 - 25{,}06X_2X_3^2 \quad (5.2)$$

Доверительная вероятность полученной зависимости – 90,12 %, коэффициент корреляции составляет 84,30 %; величина критерия Дюрбина-Ватсона 2,4219; стандартная ошибка отклонения 0,657.

Экстремум расположен при следующих значениях исследуемых параметров: количество прессованных дрожжей 0,75 %, количество сухой закваски 0,14 %, дозировка сухого молока 4,0 %, при этом значение удельного объема ржано-пшеничного хлеба составляет 219,24031 %.

Установлено, что пористость и удельный объем готовых изделий в наибольшей степени зависят от концентрации прессованных дрожжей и сухой закваски молочнокислых

бактерий, графическая зависимость исследуемых показателей качества ржано-пшеничного хлеба от данных факторов представлена на рис 5.46.

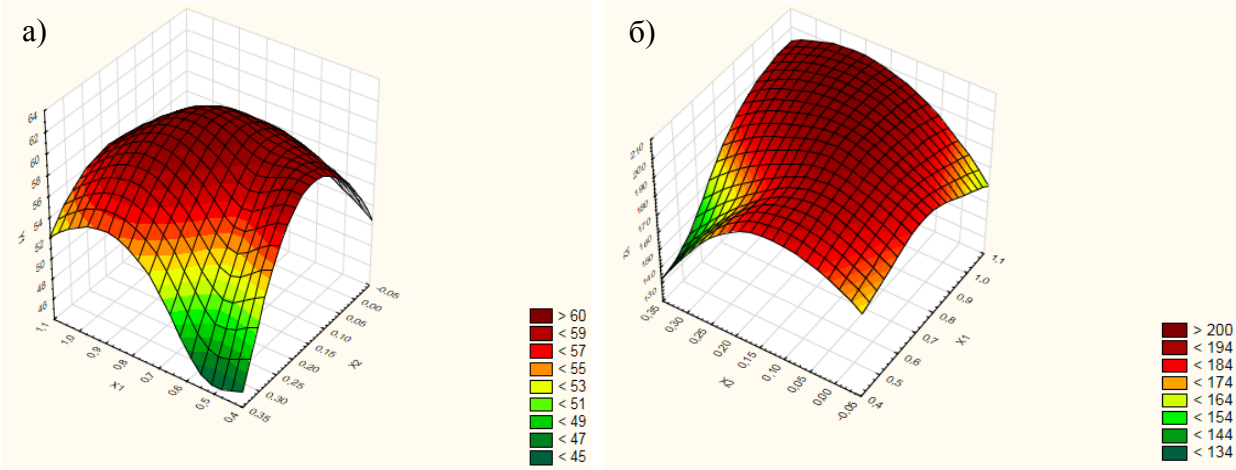


Рисунок 5.46 – Влияние факторов оптимизации на пористость (а) и удельный объем (б) готовых изделий

Графические интерпретации выявленных зависимостей пористости (а) и удельного объема (б) ржано-пшеничного хлеба от концентрации исследуемых компонентов теста представлены на рисунке 5.47. Адекватность полученной математической модели подтверждает также симметричность расположения экспериментальных точек (данных, полученных экспериментальным путем) относительно прямых (данных, предсказанных при моделировании рецептуры).

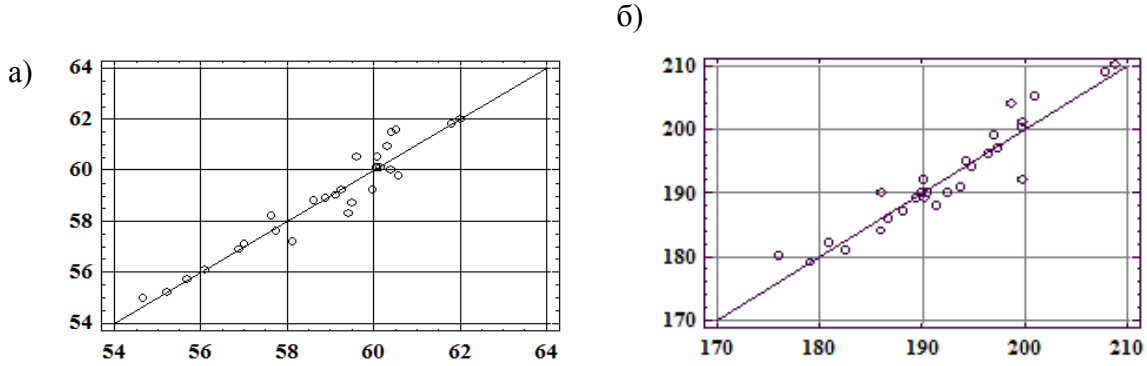


Рисунок 5.47 – Расположение экспериментальных данных относительно прямой соответствия пористости (а) и удельного объема (б) хлебобулочных изделий

В результате анализа полученных уравнений выявлена зависимость удельного объема (Y_2) от пористости хлеба (Y_1), регрессионное уравнение имеет вид:

$$Y_2 = 36660{,}2 + 1905{,}1Y_1 - 32{,}87Y_1^2 + 0{,}19Y_1^3 \qquad (5.3)$$

Доверительная вероятность полученной зависимости – 89,93 %, коэффициент корреляции составляет 88,67 %; величина критерия Дюрбина-Ватсона 0,905; стандартная ошибка отклонения 2,80591. Уравнения адекватно описывают влияние различных дозировок рецептурных компонентов ржано-пшеничного хлеба на исследуемые показатели качества – пористость и удельный объем готовых изделий.

В результате анализа приведенных зависимостей были получены оптимальные дозировки следующих компонентов ржано-пшеничных замороженных полуфабрикатов: прессованных дрожжей 0,7 %; сухой закваски молочнокислых бактерий 0,1 %; сухого молока 4 % к массе муки.

Показана целесообразность использования сухого молока (4 % к массе муки) в качестве криопротектора, позволяющего стабилизировать микробиологические и биотехнологические процессы при производстве ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. Установлено, что применение сухого молока позволяет сократить продолжительность технологического процесса на стадии дефростации тестовых полуфабрикатов. Выявлен положительный эффект при совместном использовании сухого молока (4 % к массе муки) и сухой закваски молочнокислых бактерий *L. casei TMB-D* (1% к массе муки), позволяющий интенсифицировать процессы созревания полуфабрикатов, улучшить качество готовых изделий, а также повысить пищевую и биологическую ценность ржано-пшеничного хлеба.

Далее были проведены исследования по оптимизации рецептуры ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением сухой молочной сыворотки взамен сухого молока.

Путем применения центрального композиционного ротатабельного планирования исследовали взаимодействие следующих основных факторов, воздействующих на качество хлеба: дозировка сухой закваски (X_1, %) и сухой молочной сыворотки (X_2, %). В качестве критерия оценки влияния условий использовали пористость (Y_1, %) и удельный объем хлеба (Y_2, $см^3$/100 г). Количество прессованных дрожжей составило 0,7 % к массе муки. Тестовые полуфабрикаты упаковывали во влагонепроницаемую пленку, замораживали при температуре минус 30 ^{0}С в течение 3 ч и хранили в замороженном виде при температуре минус 18-20 ^{0}С в течение 1 мес.

Матрица планирования эксперимента представлена в приложении В (таблицы 3 и 4). При статистической обработке результатов эксперимента были получены уравнения регрессии, которые адекватно описывают исследуемый процесс под действием выбранных факторов:

$$Y_1 = 53{,}10 + 21{,}22X_1 + 3{,}42X_2 - 3{,}56X_1X_2 - 2{,}16X_1^2 - 0{,}42X_2^2 - 1476{,}51X_1^3 - 0{,}12X_2^3, \quad (5.4)$$

$$Y_2 = 175{,}48 + 70{,}29X_1 + 11{,}37X_2 - 12{,}01X_1X_2 - 7{,}03X_1^2 - 1{,}41X_2^2 - 3261{,}22X_1^3 - 0{,}05X_2^3 \quad (5.5)$$

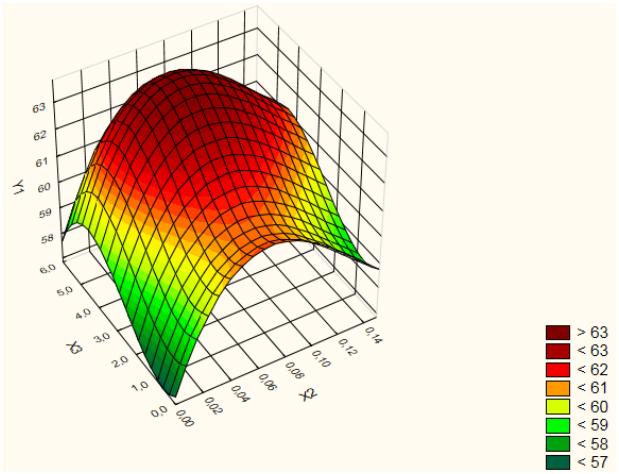
При анализе коэффициентов линейных членов уравнения установлено, что на удельный объем и пористость хлеба значительное влияние оказывает дозировка сухой закваски криорезистентных лактобактерий.

На основе указанного уравнения была получена поверхность отклика, отражающая зависимость качества хлеба от выбранных основных факторов (рис. 5.48).

При анализе коэффициентов уравнения регрессии и поверхности отклика были выбраны оптимальные значения: дозировка сухой закваски (X_1) – 0,11 % и сухой молочной сыворотки (X_2) – 3,4% к массе муки, при которых пористость и удельный объем хлеба составляет 61,5 % и 205 см$^{3/}$100 г соответственно.

Полученные оптимальные значения были положены в основу разработки рецептуры и технологии ржано-пшеничного хлеба «Морозко» на основе замороженных полуфабрикатов (РЦ-001-13981212-2004, ТИ-001-13981212-2004).

а) пористость



б) удельный объем

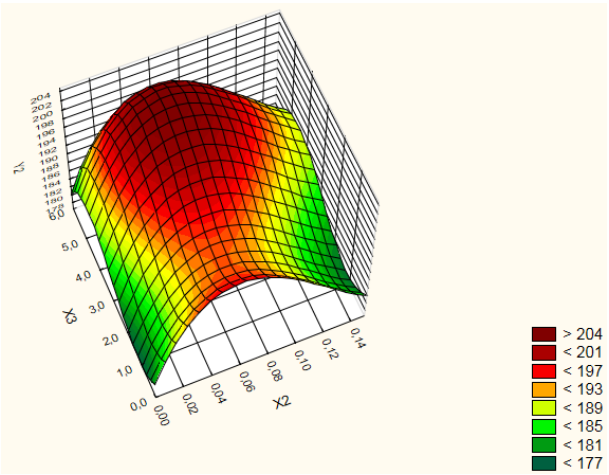


Рисунок 5.48 – Влияние дозировки сухой закваски и сухой молочной сыворотки на пористость (а) и удельный объем (б) ржано-пшеничного хлеба

Одной из проблем в технологии приготовления изделий на основе замороженных полуфабрикатов является сравнительно короткий срок их хранения. При хранении замороженных тестовых заготовок происходят изменения состава компонентов теста, микрофлоры, участвующей в процессах брожения, и как следствие, снижение качества готовых изделий.

Для подтверждения расчетных данных, были проведены исследования по влиянию длительного хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде на свойства теста и

качественные характеристики ржано-пшеничного теста. Результаты исследований, представлены на рисунке 5.49 и в таблице 5.23.

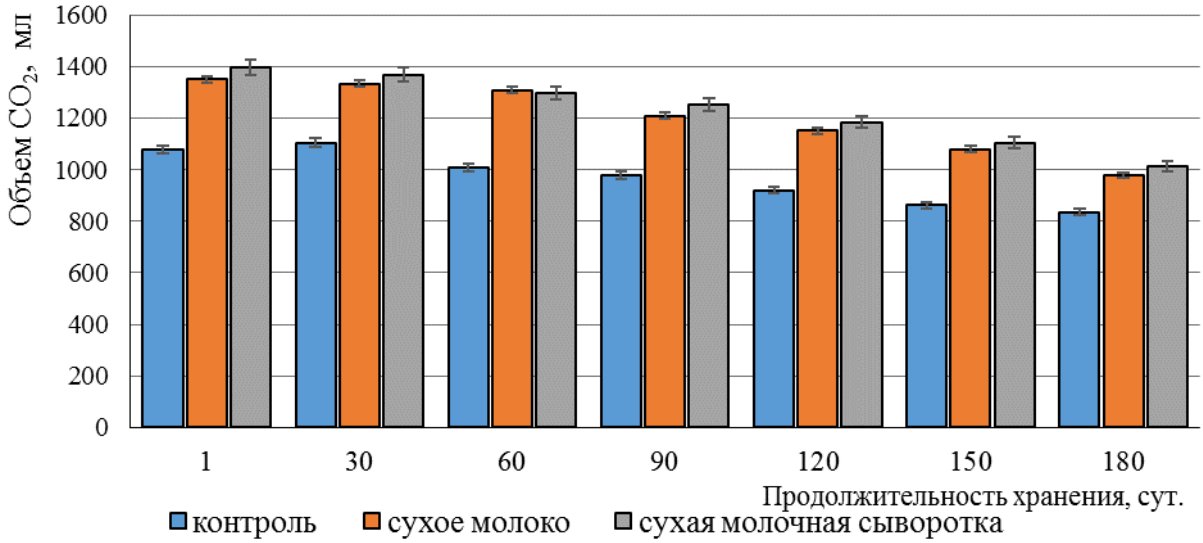


Рисунок 5.49 – Изменение скорости газообразования тестовых полуфабрикатов при применении сухих молочных продуктов

Таблица 5.23 – Сравнительная оценка показателей качества ржано-пшеничного хлеба с применением сухих молочных продуктов

Наименование показателей	Образцы без добавок (контроль)		Образцы с добавлением 4% сухого молока		Образцы с добавлением 3,4 % сухой молочной сыворотки	
	90 сут.	150 сут.	90 сут.	150 сут.	90 сут.	150 сут.
Влажность, %	45,4	45,1	45,6	45,4	45,6	45,5
Кислотность, град.	7,4	7,2	7,8	7,8	7,8	7,8
Пористость, %	54,4	-	60,3	59,2	60,8	59,9
Удельный объем, $см^3$/100г	154	127	188	180	190	185
Крошковатость	0,9	1,3	0,8	1,0	0,8	0,9
Удельная набухаемость, $см^3$	242	249	236	240	234	239
Внешний вид: - форма	правильная, без боковых выплывов; хлеб с плоской верхней коркой		правильная, без боковых выплывов; хлеб с выпуклой верхней коркой			
- поверхность	достаточно гладкая, имеются крупные трещины и подрывы		достаточно гладкая, без подрывов и трещин			
-цвет	светло-коричневый		темно-коричневый			
Состояние мякиша: - пористость	поры различной величины, распределены неравномерно		поры мелкие и средние, тонкостенные, распределены достаточно равномерно			
- пропеченность	пропеченный, с липким, заминающимся мякишем		пропеченный, не заминающийся			
Вкус и запах	свойственный хлебу из смеси ржаной и пшеничной муки					

Установлено, что при увеличении срока хранения полуфабрикатов в замороженном виде с 60 до 150 сут. снижается газообразующая способность всех исследуемых образцов. Совместное использование сухого молока и молочнокислой закваски позволяет стабилизировать газообразующую способность ржано-пшеничного теста и увеличить продолжительность хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде до 150 сут. Дальнейшее увеличение сроков хранения полуфабрикатов в замороженном виде, на наш взгляд, является нецелесообразным из экономических соображений.

Анализ качественных показателей хлебобулочных изделий, приготовленных по криотехнологии, показывает, что ржано-пшеничный хлеб, приготовленный с применением сухой молочнокислой закваски 1, сухого молока и сухой молочной сыворотки имеет более высокие физико-химические и органолептические показатели, чем контрольный образец.

Так, удельный объем хлеба больше в 1,45 раза, пористость мякиша – на 6,4 %, изделия имеют правильную форму, изделия отличаются выпуклой верхней коркой, мягким, не заминающимся мякишем, а также развитой пористостью.

5.5.2 Биотехнологические основы применения модифицированных крахмалов в криотехнологии хлебобулочных изделий

На сегодняшний день актуальными являются исследования, направленные на поиск специальных веществ – криопротекторов, способных прямо или косвенно защищать клетки микроорганизмов от необратимых повреждений в процессах низкотемпературной обработки и последующей дефростации тестовых полуфабрикатов, что ведет к сохранению их физиологической и биохимической активности в размороженных полуфабрикатах. Следует отметить, что при использовании криопротектора в отношении микроорганизмов, применяемых в пищевых технологиях, основным требованием является его абсолютная безвредность для организма человека.

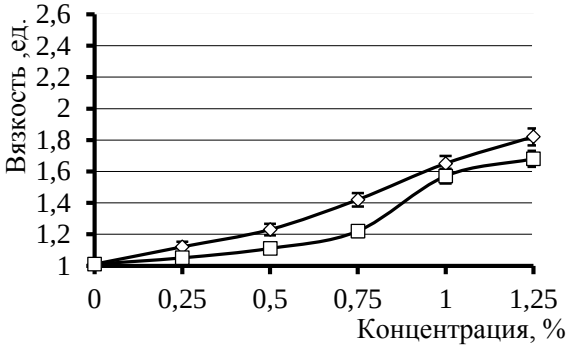
Задачей настоящего этапа работы явилось исследование возможности использования модифицированных крахмалов в качестве криопротекторных агентов в отношении дрожжей и молочнокислых бактерий, применяемых в криогенной технологии хлеба. В работе исследовали кукурузные нативный и модифицированные крахмалы: фосфатный крахмал; амиллаацетат С26; набухающий крахмал; экструзионный крахмал.

В практике приготовления хлебобулочных изделий модифицированные крахмалы вносятся на стадии замеса теста в количестве 1-4 % к массе муки. Однако сведения об использовании данных препаратов в криотехнологии хлебобулочных изделий практически отсутствуют. Общеизвестно, что при увеличении температуры происходит набухание

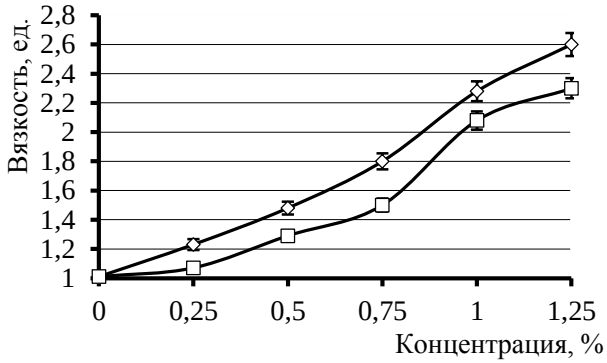
крахмальных зерен, что способствует резкому увеличению вязкости крахмальной суспензии, по мере разрыва крахмальных зерен происходит падение вязкости. Однако в научно-технической литературе практически отсутствуют данные об изменениях свойств модифицированных крахмалов при низкотемпературной обработке. В связи с чем, вызвана необходимость проведения экспериментов по определению степени воздействия процессов замораживании, хранении и дефростации на свойства модифицированных крахмалов.

Графики, представленные на рисунке 5.50, свидетельствуют о снижении вязкости крахмальных суспензий после замораживания независимо от природы происхождения модифицированных крахмалов, что можно объяснить разрушением крахмальных зерен.

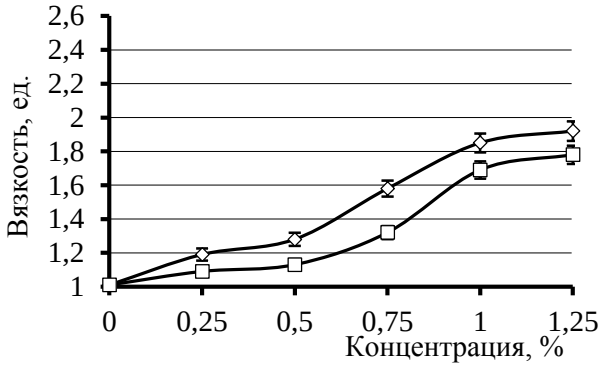
а) нативный крахмал



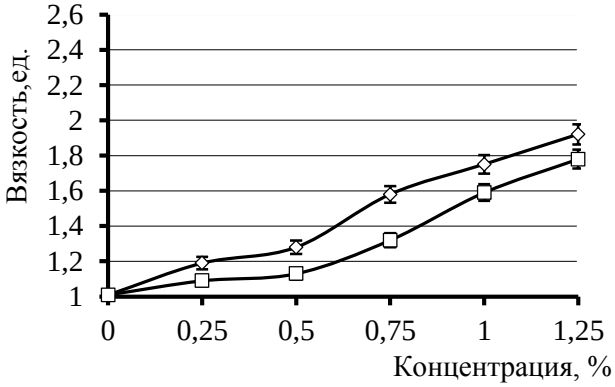
б) фосфатный крахмал



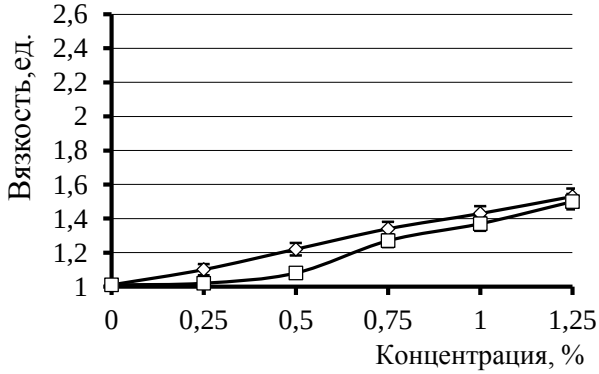
в) экструзионный крахмал



г) амилацетатный крахмал



д) набухающий крахмал



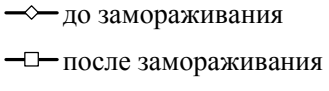


Рисунок 5.50 – Изменение вязкости крахмальных суспензий после криообработки

При производстве замороженного теста, в котором крахмал выполняет роль загустителя, необходимо считаться с возможность ретроградации амилозы в процессе дефростации. В результате данного процесса изделия приобретают волокнистую и зерноподобную структуру.

Наибольшим изменениям подвергается фосфатный кукурузный крахмал. Вязкость крахмальных суспензий на основе исследуемых препаратов снижается в среднем на10-15% от исходных значений независимо от концентрации крахмала в среде. Следует отметить, что наименьшим изменениям подвергается набухающий кукурузный крахмал.

Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о снижении вязкости 1 % крахмальных суспензий после замораживания независимо от природы происхождения модифицированных крахмалов в среднем на 10-15 % от исходных значений (рис. 5.51), что, по-видимому, объясняется частичным разрушением крахмальных зерен. С увеличением продолжительности низкотемпературной обработки уменьшается вязкость всех исследуемых суспензий независимо от вида применяемых крахмалов.

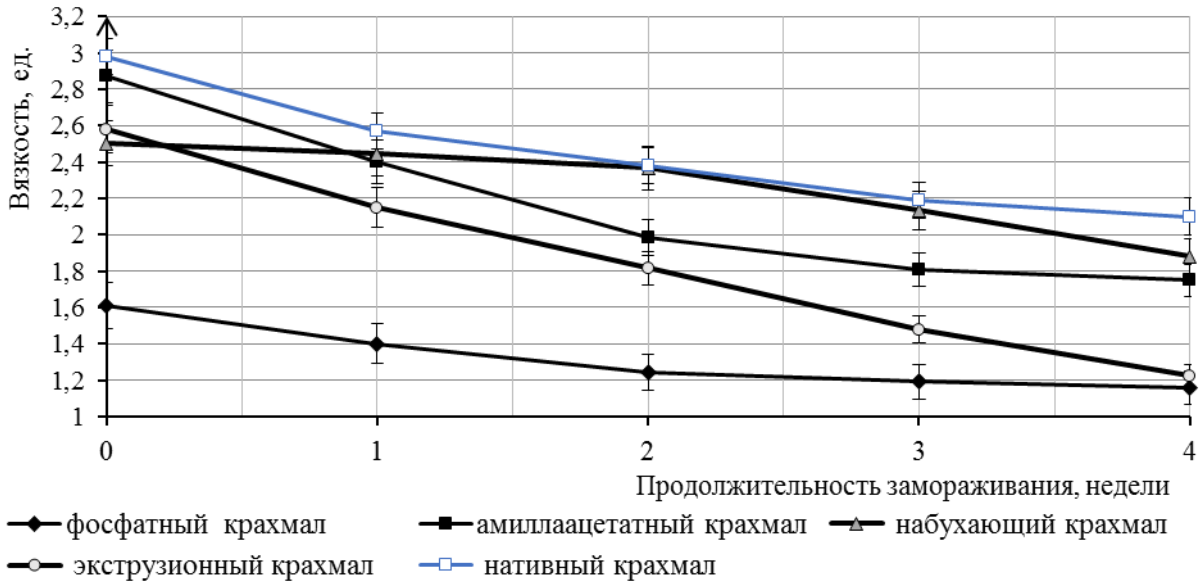


Рисунок 5.51 – Изменение вязкости 1 % крахмальных суспензий в зависимости от длительности воздействия отрицательных температур

Наибольшим изменениям подвергаются крахмальные суспензии экструзионного и аммилаацетатного крахмалов на протяжении всего периода экспериментальных исследований (рис. 5.52). Следует отметить, что наименьшим изменениям подвергается набухающий крахмал.

Одной из возможных причин снижения вязкости крахмальных суспензий является деструкция крахмала с образованием декстринов и свободных сахаров. Сахара – необходимый компонент в хлебопечении. Собственных сахаров муки для этого часто

недостаточно. Внесение требуемого количества сбраживаемых сахаров в тесто достигается с помощью улучшителей. Высокие содержания свободных сахаров уменьшают скорость клейстеризации крахмала, снижают пик вязкости. Дисахариды являются более эффективными с точки зрения замедления клейстеризации и снижения пика вязкости, чем моносахариды. Кроме того, сахара уменьшают силу крахмальных гелей, играя роль пластификатора и вмешиваясь в образование зон связывания [8].

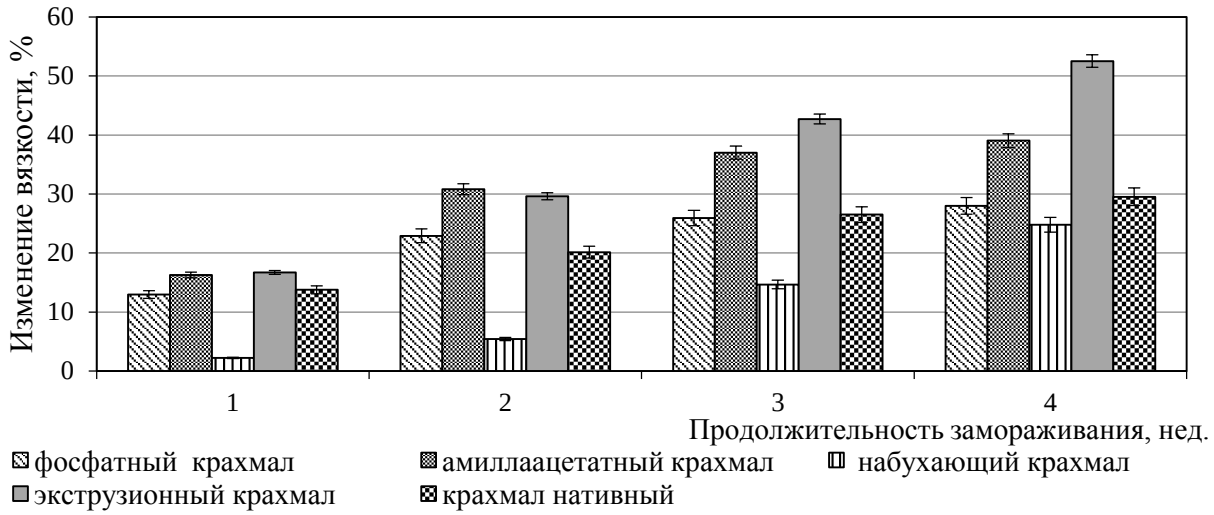


Рисунок 5.52 – Снижение вязкости 1 % крахмальных суспензий при низкотемпературном хранении

Результаты исследований влияния процессов замораживания, хранения, дефростации на содержание свободных сахаров в крахмальных суспензиях, представлены на рисунке 5.53.

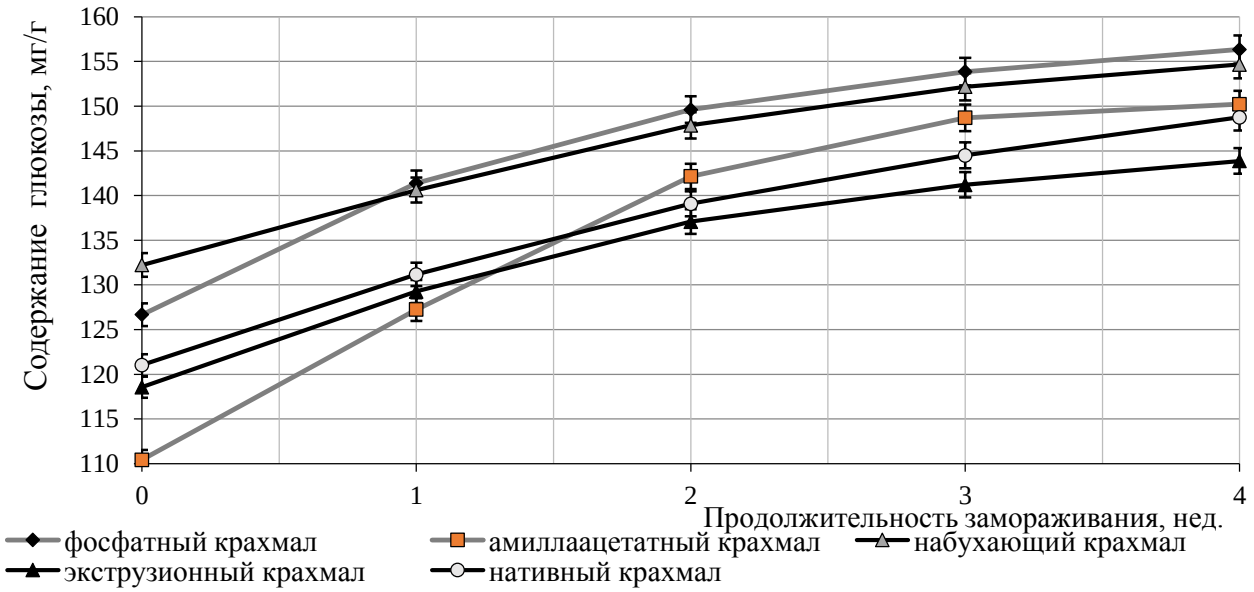


Рисунок 5.53 – Содержание свободных сахаров в 1 % крахмальных суспензиях после низкотемпературной обработки

Установлено, что при увеличении продолжительности замораживания в крахмальных суспензиях образуются свободные сахара в результате деструкции под воздействием низких температур. После четырехнедельного хранения содержание свободных сахаров увеличивается в среднем на 20-25 % от первоначального их количества в суспензии (рис. 5.54). Наиболее устойчив к низкотемпературному воздействию набухающий крахмал.

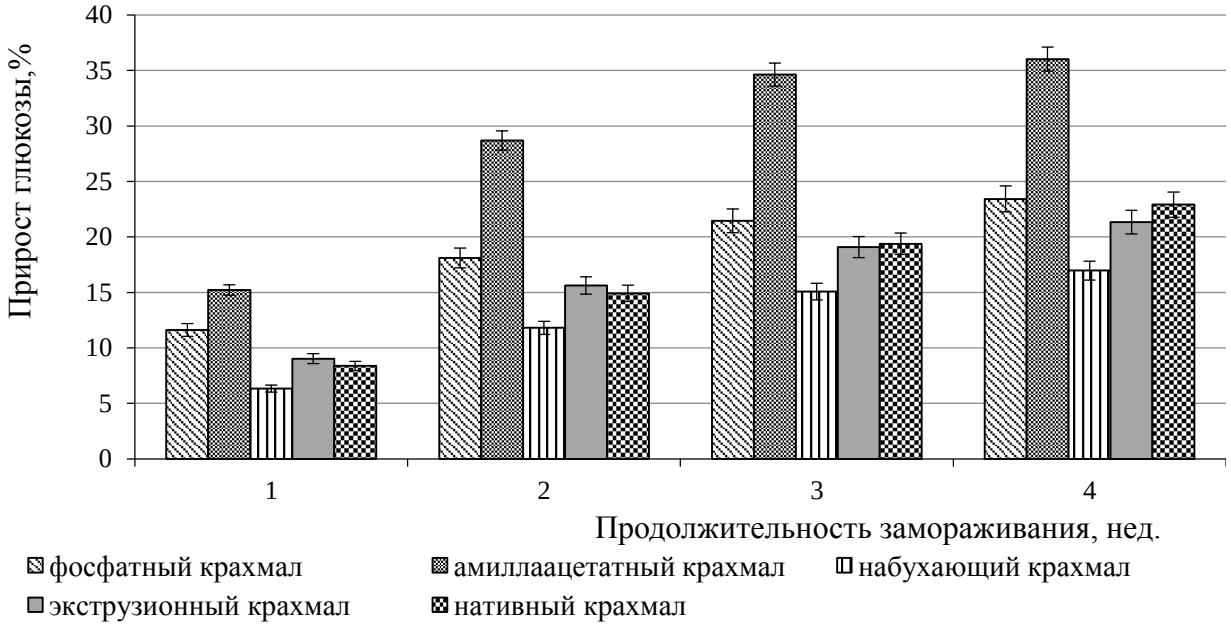


Рисунок 5.54 – Прирост глюкозы в крахмальных суспензиях при криообработке

Результаты проведенных экспериментальных исследований по изучению резистентности модифицированных крахмалов к низкотемпературному воздействию свидетельствуют о том, что наиболее устойчивым к отрицательным температурам является набухающий кукурузный крахмал с повышенным содержанием Са и Р.

Образовавшиеся результате деструкции крахмала свободные сахара могут служить дополнительным источником питания для бродильной микрофлоры дефростированных полуфабрикатов (клеток дрожжей и молочнокислых бактерий). Особенно важен этот фактор при производстве низкокалорийных хлебобулочных изделий, в рецептуре которых отсутствуют сахаросодержащие продукты.

Выявлено, что применение модифицированных крахмалов позволяет увеличить выживаемость клеток дрожжей после низкотемпературной обработки. Установлена прямопропорциональная зависимость между количеством жизнеспособных клеток и концентрациями крахмалов в среде: чем больше дозировка препаратов, тем выше выживаемость дрожжевых клеток. Однако жизнеспособность клеток дрожжей зависит от природы вносимых препаратов. Наибольшее количество жизнеспособнособных клеток

сохраняется при внесении в среду экструзионного кукурузного крахмала. Применение данного препарата в концентрации 1 % позволяет увеличить выживаемость хлебопекарных дрожжей Saf-levur, Nordic, Буинские и Gloripan на 76,9 %, 51,5 %, 46,7 % и 56,3 % соответственно (рис. 5.55).

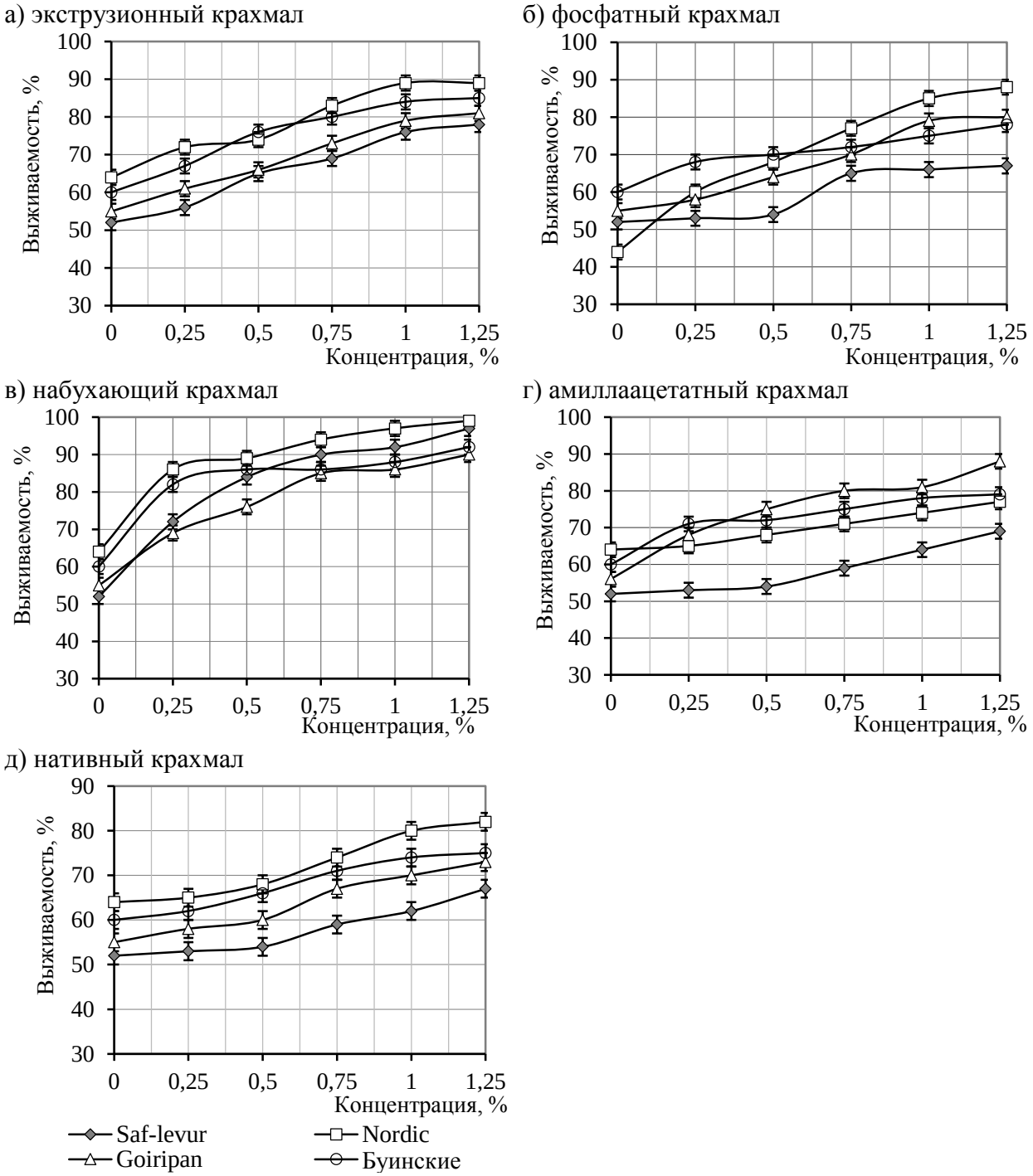


Рисунок 5.55 – Влияние модифицированных крахмалов на выживаемость дрожжей

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о перспективности использования модифицированных крахмалов в качестве криопротекторов при производстве продуктов питания с применением криотехнологии, в частности, при

производстве хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов. Использование модифицированных крахмалов позволяет увеличить выживаемость дрожжевых клеток при низкотемпературной обработке, повысить количество свободных сахаров в среде.

Далее была поставлена серия экспериментальных исследований по изучению влияния модифицированных крахмалов на качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов.

Исследования проводили в соответствии с композиционным униформ-ротатабельным планом (приложение В, таблицы 5 и 6), где концентрации модифицированного крахмала (X_1, %) и сухой закваски молочнокислых бактерий (X_2, %) были выбраны качестве переменных; а пористость (Y_1, %) и удельный объем (Y_2, %) готовых изделий приняты в качестве искомых функций. В результате математической обработки результатов получены регрессионные уравнения зависимости пористости (Y_1) и удельного объема (Y_2) ржано-пшеничного хлеба от концентраций рецептурных компонентов.

Для показателя пористость хлеба (Y_1) получено уравнение регрессии вида:

$$Y_1 = 57{,}36 + 24{,}36X_1 + 2{,}23X_2 + 76{,}74X_1^2 - 1{,}28X_2^2 - 888{,}60X_1^3 + 0{,}18X_2^3 \quad (5.6)$$

Для удельного объема хлебобулочных изделий (Y_2) получено уравнение регрессии вида:

$$Y_2 = 187{,}57 - 56{,}45X_1 + 3{,}48X_2 + 1463{,}80X_1^2 - 1{,}80X_2^2 - 5782{,}79X_1^3 + 0{,}06X_2^3 \quad (5.7)$$

Установлено, что пористость и удельный объем готовых изделий в наибольшей степени зависят от концентрации сухой закваски, графическая зависимость исследуемых показателей качества ржано-пшеничного хлеба от данных факторов представлена на рис 5.56.

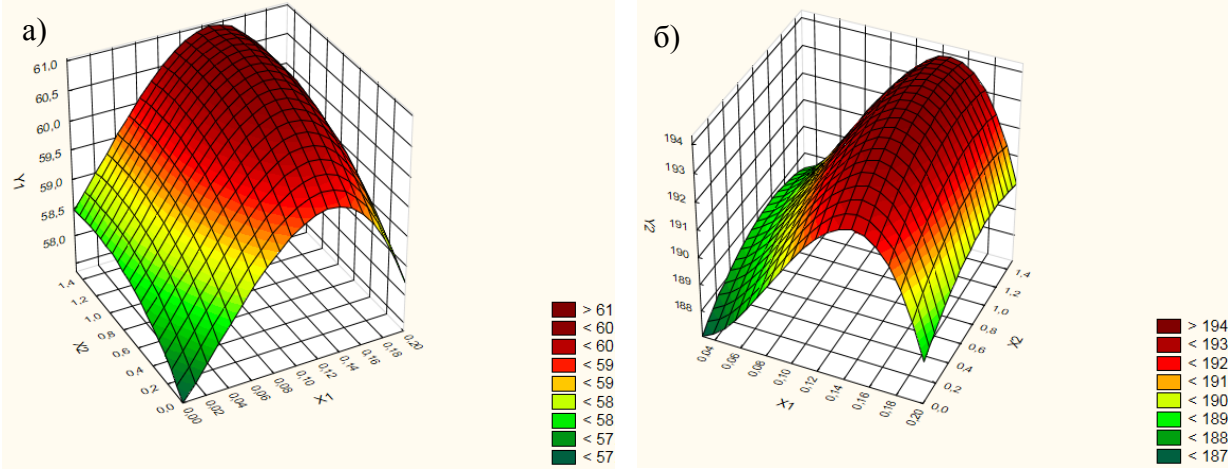


Рисунок 5.56 – Влияние дозировки сухой закваски и набухающего кукурузного крахмала на пористость (а) и удельный объем (б) ржано-пшеничного хлеба

В результате анализа приведенных зависимостей были получены оптимальные дозировки следующих компонентов замороженных полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба: сухой закваски – 0,12 %; набухающего кукурузного крахмала – 1,3 % к массе муки.

Полученные оптимальные значения были положены в основу разработки рецептуры и технологии ржано-пшеничного хлеба «Морозко новый» на основе замороженных полуфабрикатов с применением модифицированных крахмалов (ТУ, ТИ, РЦ 10.72.19–011 –2003968806–2022).

На следующем этапе эксперимента было изучено влияние длительного низкотемпературного хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде на качество ржано-пшеничного хлеба с добавлением сухой закваски и набухающего кукурузного крахмала в оптимальных концентрациях. В таблице 5.24 представлены данные по изучению влияния длительного низкотемпературного хранения полуфабрикатов на показатели качества готовой продукции.

Таблица 5.24 – Показатели качества ржано-пшеничного хлеба с применением модифицированных крахмалов (при хранении полуфабрикатов в замороженном виде в течение 90 и 150 сут.)

Наименование показателей	Образцы без добавок (контроль)		Образцы с добавлением 1,3 % набухающего крахмала	
	90 сут.	150 сут.	90 сут.	150 сут.
Влажность, %	45,4	45,1	45,8	45,8
Кислотность, град.	7,4	7,2	7,4	7,4
Пористость, %	54,4	-	59,9	59,0
Удельный объем, $см^3/100г$	154	127	185	177
Крошковатость	0,9	1,3	0,9	1,1
Удельная набухаемость, $см^3$	242	249	238	240
Внешний вид:	правильная, без боковых выплывов; хлеб с плоской верхней коркой		правильная, без боковых выплывов; хлеб с выпуклой верхней коркой	
- форма				
- поверхность	достаточно гладкая, имеются крупные трещины и подрывы		достаточно гладкая, без подрывов и трещин	
-цвет	светло-коричневый		темно-коричневый	
Состояние мякиша:	поры различной величины, распределены неравномерно		поры мелкие и средние, распределены равномерно	
- пористость				
- пропеченность	пропеченный, с липким, заминающимся мякишем		пропеченный, не заминающийся	
Вкус и запах	свойственный хлебу из смеси ржаной и пшеничной муки			

Анализ качественных показателей хлебобулочных изделий, приготовленных по криотехнологии, показывает, что ржано-пшеничный хлеб, приготовленный с применением модифицированного кукурузного крахмала имеет более высокие физико-химические и

органолептические показатели, чем контрольные образцы: удельный объем больше на 20,1 %, пористость – на 5,5 %.

Следует отметить, что эти образцы хлеба, обладают лучшими структурно-механическими свойствами мякиша, о чем свидетельствуют значение общей деформации и относительной пластичности (табл. 5.25).

Таблица 5.25 – Деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением модифицированного крахмала

Наименование показателей	Образцы без добавок (контроль)		Образцы с добавлением 1,3 % набухающего крахмала	
	90 сут.	150 сут.	90 сут.	150 сут.
Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	2,6	2,8	3,8	2,7
Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	2	3,2	1,1	3
Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	4,6	6	4,9	5,7
Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	56,52	46,67	77,55	47,37
Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$,%	43,48	53,33	22,45	52,63

Сенсорная оценка показала, что данные образцы хлеба обладали улучшенными вкусовыми качествами: изделия без трещин и подрывов, имели темно-коричневый цвет корки, более светлый мякиш, более тонкостенную и равномерную пористость, обладали ярко выраженным вкусом и ароматом.

Данные представленные в таблице 5.24 показывают, что внесение модифицированного крахмала в качестве рецептурного компонента позволило усилить реакцию цветообразования верхней корки изделий, тогда как мякиш изделий приобретает более светлый оттенок.

Результаты исследований показали целесообразность использования модифицированных крахмалов на стадии замеса теста при приготовлении замороженных полуфабрикатов длительного хранения в качестве криопротекторов. Использование добавок позволяет целенаправленно применять их в технологии ржано-пшеничного хлеба и прогнозировать сохранение стабильности тестовых полуфабрикатов в процессах замораживания, хранения и размораживания, а также получать готовые изделия с высокими потребительскими характеристиками.

5.5.3 Разработка технологических решений применения янтарной кислоты и ее солей в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба

При производстве замороженных полуфабрикатов широкое распространение получило применение аскорбиновой кислоты и ее солей [138, 270, 307], внесение данных добавок в количестве 0,01-0,1 % к массе муки укрепляет клейковину, способствует отбеливанию мякиша и увеличению формоустойчивости тестовых заготовок при расстойке и выпечке, приводит к улучшению структурно-механических свойств теста. Однако в научно-технической литературе отсутствуют данные по влиянию янтарной кислоты и ее солей на качественные характеристики замороженных тестовых полуфабрикатов и хлебобулочных изделий на их основе. Как показало настоящее исследование, важными добавками, способствующими адаптации клеток дрожжей и молочнокислых бактерий после низкотемпературной обработки (холодового шока) и повышающими их жизнеспособность, являются янтарная кислота и ее калиевая и аммонийная соли.

Задачей настоящего этапа экспериментальной работы было изучение возможности применения янтарной кислоты и её солей в качестве добавок к основному сырью в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба.

Разработка технологических решений применения янтарной кислоты и ее солей в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба базировалась на изучении закономерностей изменений качественных характеристик готовой продукции в зависимости от вида и концентрации добавок. Количество янтарной кислоты варьировали в интервале от 0,03 % до 0,25 % к массе муки; сукцинатов калия и аммония от 0,05%, до 0,5 % к массе муки.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 5.26.

В результате анализа пробных лабораторных выпечек было установлено, что янтарная кислота и ее соли положительно влияют на физико-химические и органолептические показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. Так, внесение янтарной кислоты в количестве 0,07 % к массе муки позволяет увеличить пористость до 63,1 %, удельный объем до 201,3 $см^3$/100г. Наибольшую эффективность демонстрируют сукцинаты калия и аммония в дозировке 0,1-0,25 % к массе муки, применение которых приводит к увеличению пористости и удельного объема ржано-пшеничного хлеба на 4,9-9,8 % и 5,6-13,9 % соответственно по отношению к контролю.

Таблица 5.26 – Влияние янтарной кислоты и ее солей на качество ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Добавка	Концентрация, % к массе муки	Показатели качества			
		Кислотность, град.	Пористость, %	Удельный объем,см^3/100г	Органолептическая оценка, балл
Янтарная кислота	0 (контроль)	7,1	57,8	187,2	66,4
	0,03	7,2	58,9	186,7	72,4
	0,05	7,6	61,8	191,8	75,9
	0,07	7,8	63,1	201,3	84,5
	0,1	8,1	62,3	199,0	80,6
	0,25	8,6	57,7	180,8	70,2
Сукцинат калия	0,05	7,2	59,1	189,5	74,6
	0,07	7,4	60,8	194,2	77,5
	0,1	7,4	62,7	197,6	80,5
	0,25	7,9	61,4	197,0	78,3
	0,5	8,2	59,2	192,6	74,8
Сукцинат аммония	0,05	7,3	61,3	194,9	77,5
	0,07	7,7	63,2	205,5	81,3
	0,1	7,9	64,6	213,4	85,7
	0,25	7,9	63,7	209,2	84,2
	0,5	8,1	62,5	199,8	79,4

На следующем этапе работы были проведены исследования по разработке оптимизированной рецептурной композиции ржано-пшеничного хлеба, вырабатываемого на основе замороженных полуфабрикатов, с применением сухой закваски и янтарной кислоты, а также сукцинатов калия и аммония.

В качестве факторов принимали количество закваски молочнокислых бактерий *L. casei 32* и количество янтарной кислоты (или сукцинатов). Концентрацию сухой закваски молочнокислых бактерий (X_1) варьировали в диапазоне 0-0,15 %; количество янтарной кислоты (X_2) в интервале от 0,05 % до 0,15 %; сукцинатов калия (X_3) и аммония (X_4) от 0,1 % до 0,3 % к массе муки. Пределы варьирования параметров выбирали с учетом реально возможных изменений каждого фактора. Исследования проводили в соответствии с композиционным униформ-ротатабельным планом двухфакторного эксперимента (приложение В, таблица 7 и 8). Тестовые полуфабрикаты упаковывали во влагонепроницаемую пленку, замораживали при температуре минус 30 ^{0}С и хранили в замороженном виде при температуре минус 18 ^{0}С в течение 1 мес. Решение задачи оптимизации изучаемых факторов проводили путем нахождения экстремально-максимального значения полученной математической зависимости пористости и удельного объема ржано-пшеничного хлеба.

Для показателя пористость ржано-пшеничного хлеба (Y_1) получены уравнения регрессии вида:

- при использовании янтарной кислоты:

$$Y_1 = 57{,}78 + 11{,}32X_1 + 110{,}52X_2 + 142{,}73X_1^{\,2} - 820{,}72X_2^{\,2} - 954{,}25X_1^{\,3} + 1508{,}68X_2^{\,3} \quad (5.8)$$

- сукцината калия:

$$Y_1 = 58{,}16 + 0{,}04X_1 + 56{,}98X_2 + 238{,}41X_1^{\,2} - 267{,}94X_2^{\,2} - 1218{,}77X_1^{\,3} + 316{,}35X_2^{\,3} \quad (5.9)$$

- сукцината аммония:

$$Y_1 = 58{,}87 + 26{,}30X_1 + 83{,}30X_2 + 525{,}41X_1^{\,2} - 391{,}91X_2^{\,2} - 2148{,}97X_1^{\,3} + 479{,}88X_2^{\,3} \quad (5.10)$$

Для удельного объема хлебобулочных изделий (Y_2) получены уравнения регрессии вида:

- при использовании янтарной кислоты:

$$Y_2 = 186{,}39 - 66{,}16X_1 + 172{,}26X_2 + 1644{,}46X_1^{\,2} - 432{,}11X_2^{\,2} - 6317{,}91X_1^{\,3} - 1389{,}79X_2^{\,3} \quad (5.11)$$

- сукцината калия:

$$Y_2 = 187{,}47 - 113{,}58X_1 + 141{,}90X_2 + 2209{,}40X_1^{\,2} - 670{,}58X_2^{\,2} - 8149{,}62X_1^{\,3} + 815{,}24X_2^{\,3} \quad (5.12)$$

- сукцината аммония:

$$Y_2 = 191{,}35 - 213{,}15X_1 + 258{,}27X_2 + 2949{,}10X_1^{\,2} - 1152{,}46X_2^{\,2} - 10204{,}64X_1^{\,3} + 1340{,}27X_2^{\,3}. \quad (5.13)$$

Результаты влияния исследуемых факторов на пористость мякиша и удельный объем хлебобулочных изделий представлены на рисунке 5.57.

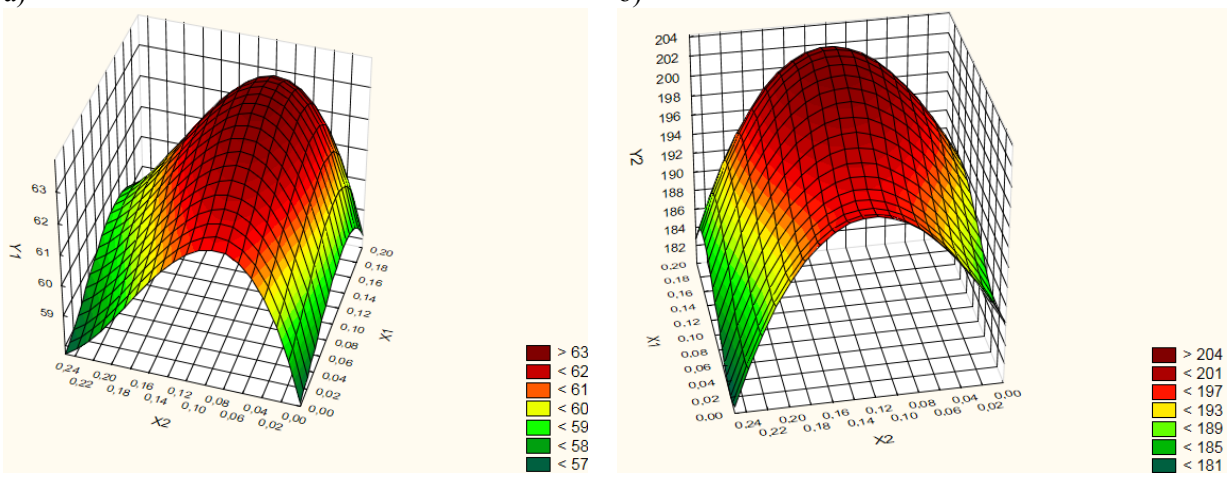
В результате математического анализа определены оптимальные концентрации сухой закваски молочнокислых бактерий, составляющая 0,12 %; янтарной кислоты – 0,08 %, сукцината калия – 0,17 % и сукцината аммония – 0,15 % к массе муки.

Далее была поставлена серия экспериментальных исследований по изучению влияния длительного низкотемпературного хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде на процессы созревания теста и качество ржано-пшеничного хлеба при совместном введении в рецептуру сухой закваски молочнокислых бактерий *L. casei* 32 и янтарной кислоты/сукцинатов.

Установлено, что янтарная кислота и ее соли интенсифицируют процесс кислотонакопления дефростированных полуфабрикатов, что позволяет сократить продолжительность брожения теста от 30 до 40 мин. по сравнению с контролем даже после 150-суточного хранения полуфабрикатов в замороженном виде (рис. 5.58).

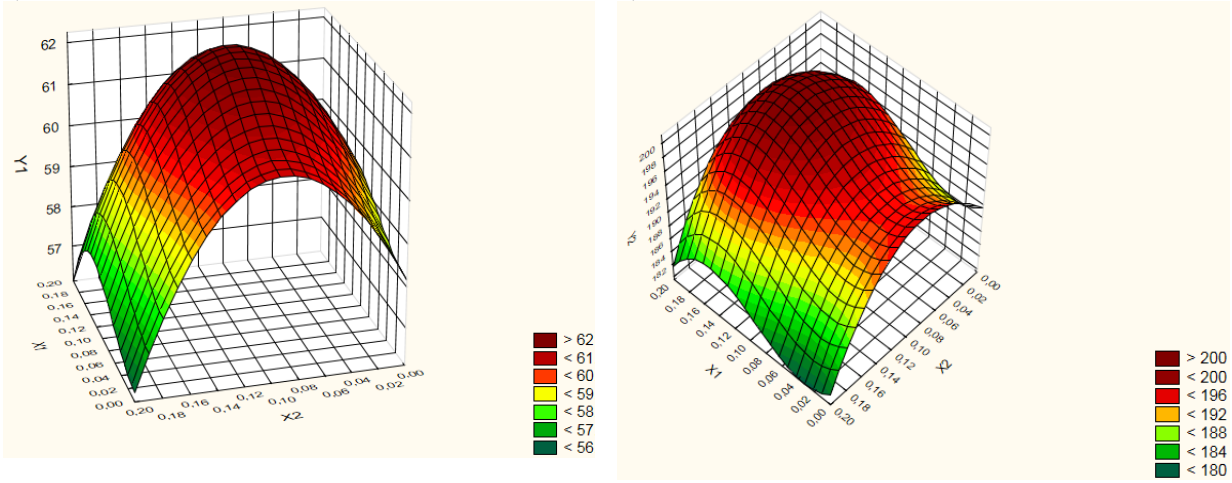
янтарная кислота

а) б)



сукцинат калия

а) б)



сукцинат аммония

а) б)

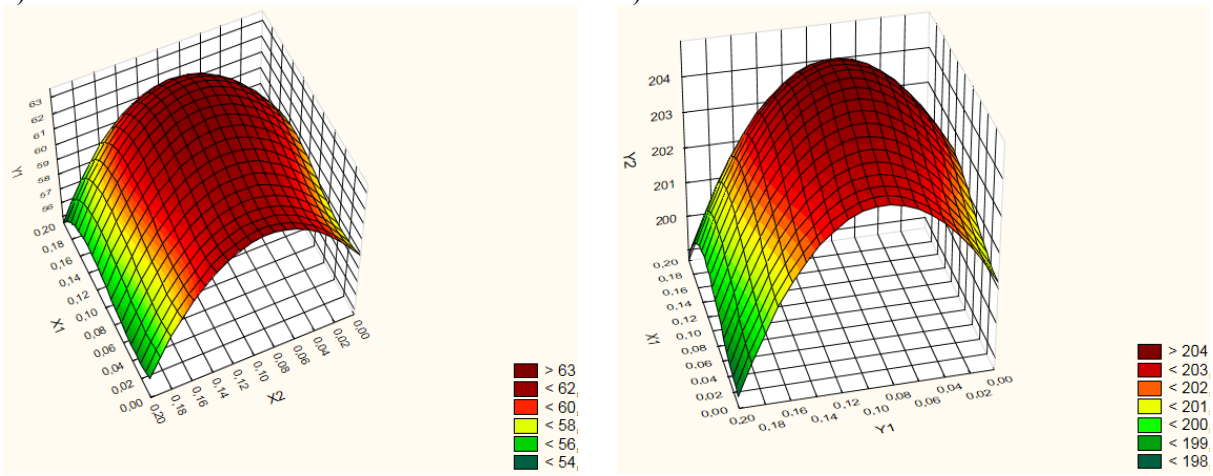


Рисунок 5.57 – Зависимости пористости (а) и удельного объема хлеба (б) от дозировок янтарной кислоты и сукцинатов

Интенсификация процесса брожения теста также связана с высокой выживаемостью клеток дрожжей и лактобактерий при совместном использовании сухой закваски и янтарной кислоты (сукцинатов).

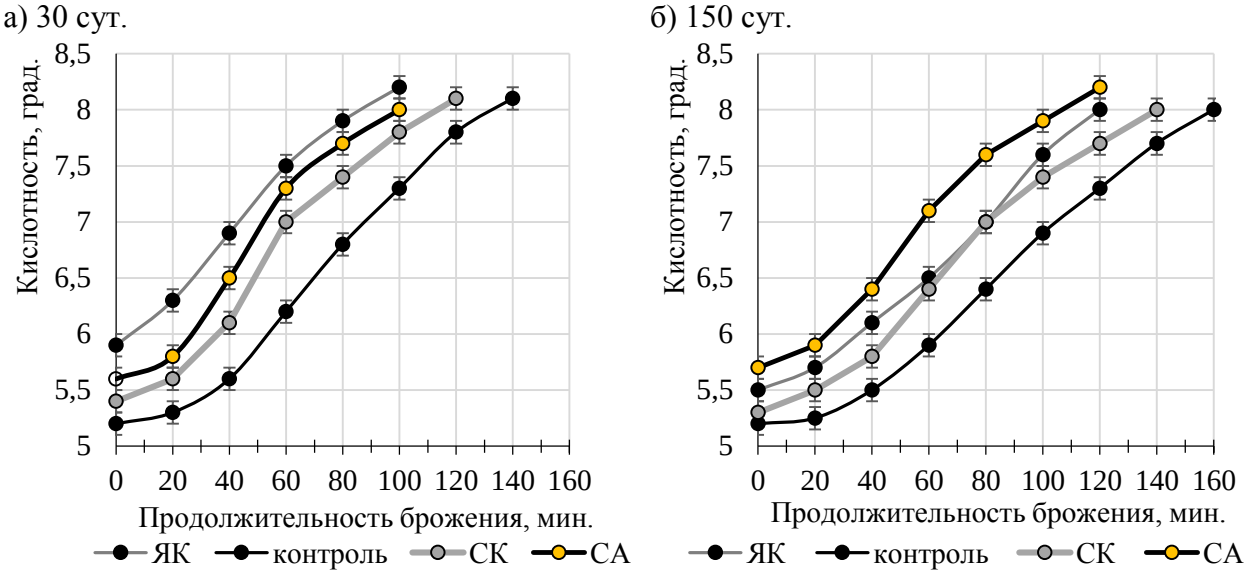


Рисунок 5.58 –Динамика кислотонакопления в дефростированных полуфабрикатах

Результаты исследований показывают, что при использовании исследуемых добавок выживаемость дрожжевых клеток и молочнокислых бактерий увеличивается в среднем на 28,3 % и 24,1 % соответственно через 150 сут. хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде (рис. 5.59).

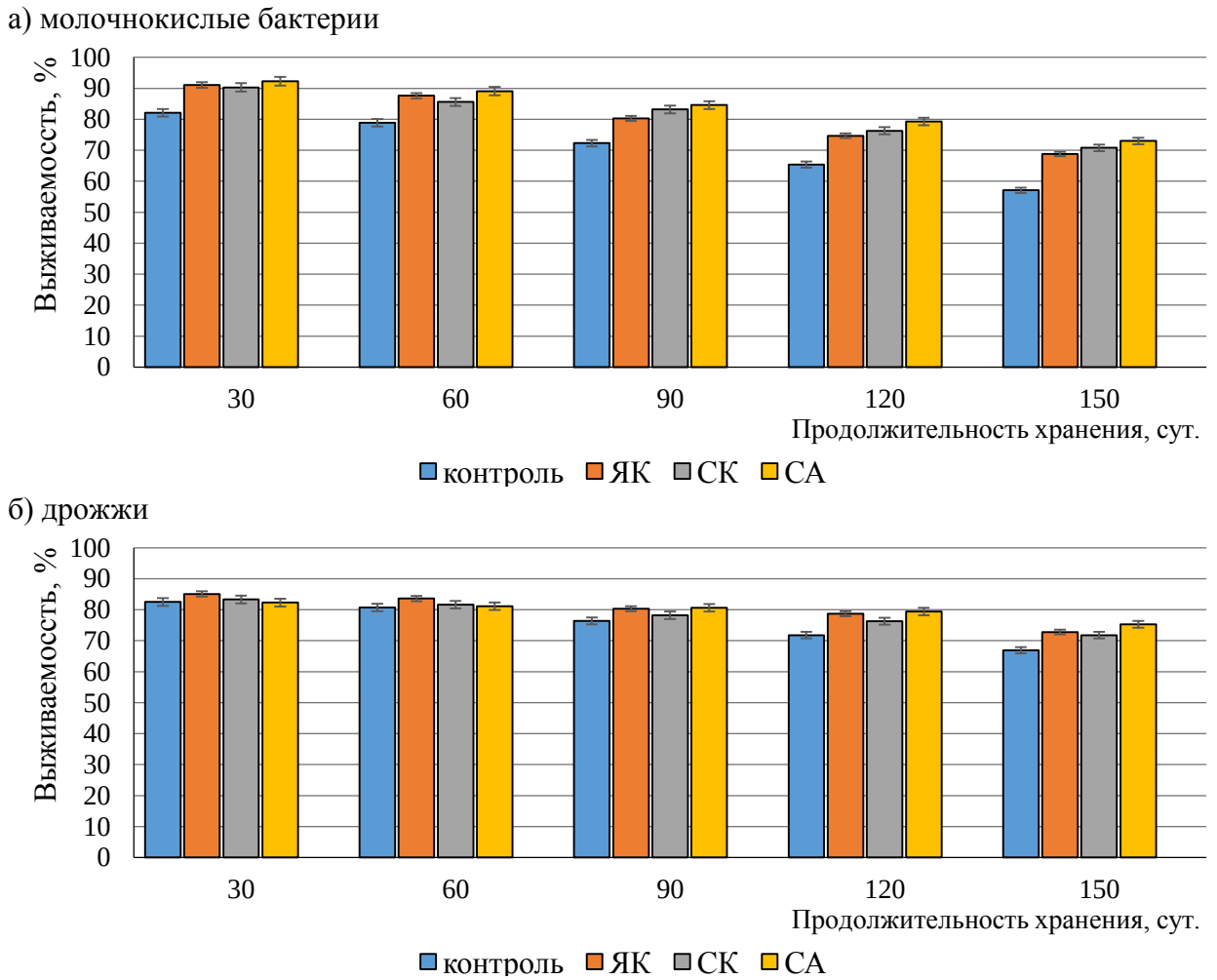


Рисунок 5.59 – Изменение выживаемости микрофлоры теста

Установлено, что дефростированные полуфабрикаты, в рецептуре которых предусмотрено совместное использование сухой закваски и янтарной кислоты или ее солей, сохраняют высокий критерий бродильной активности по сравнению с контрольными образцами, даже после длительного низкотемпературного воздействия (рис. 5.60), так критерий бродильной активности опытных образцов составляет достигает значений 27,3 ед., тогда как контрольных – 10,6 ед. после 150-суточного хранения тестовых полуфабрикатов при температуре минус 18-20 ^{0}С.

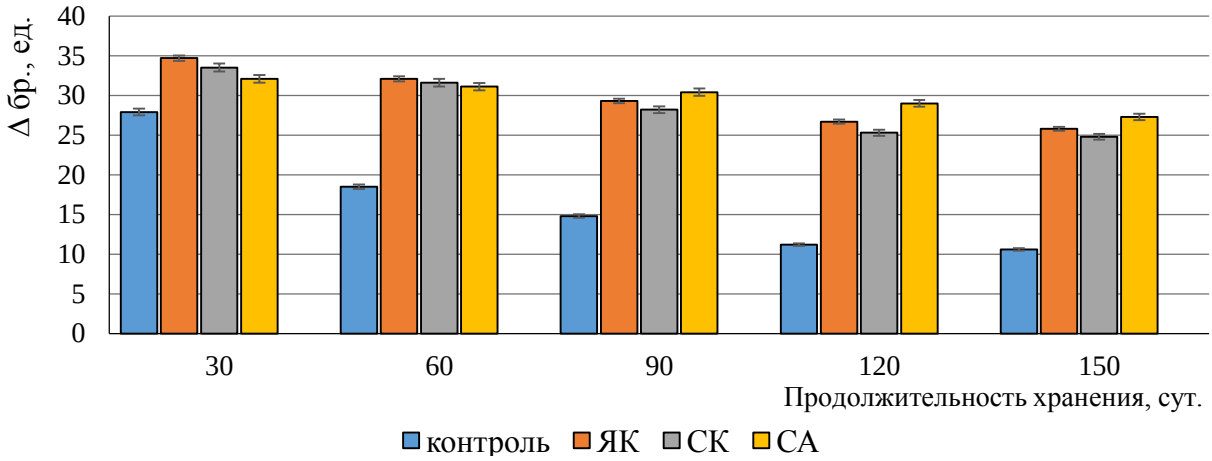


Рисунок 5.60 – Критерий бродильной активности дефростированого теста при совместном использовании янтарной кислоты / сукцинатов и закваски

Установлено, что при совместном применении янтарной кислоты или ее солей и сухой закваски отмечается увеличение газообразующей способности дефростированного ржано-пшеничного теста (рис. 5.61), так газообразующая способность опытных образцов, подвергавшихся низкотемпературной обработке в течение 150 сут. на 21,1 % выше относительно контрольных значений.

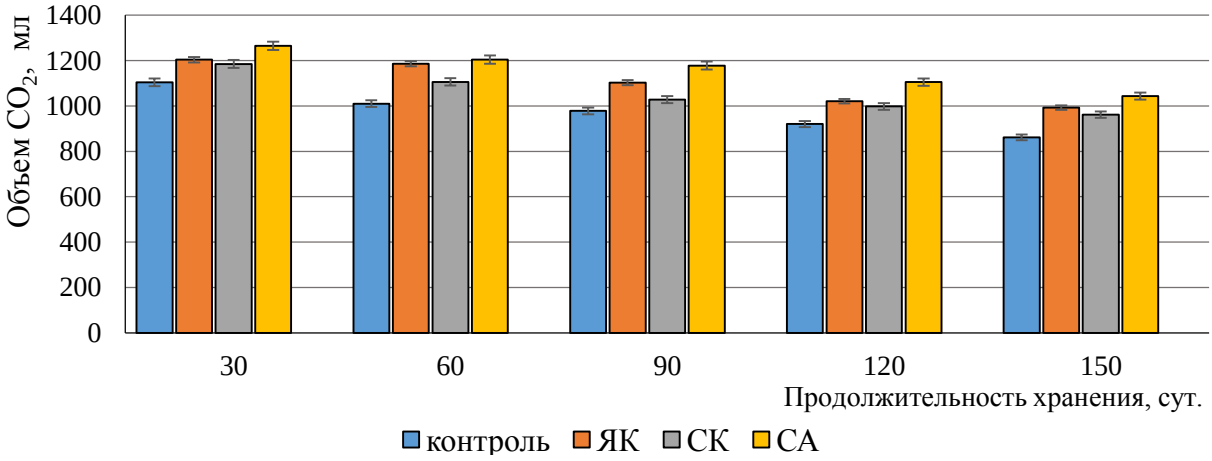
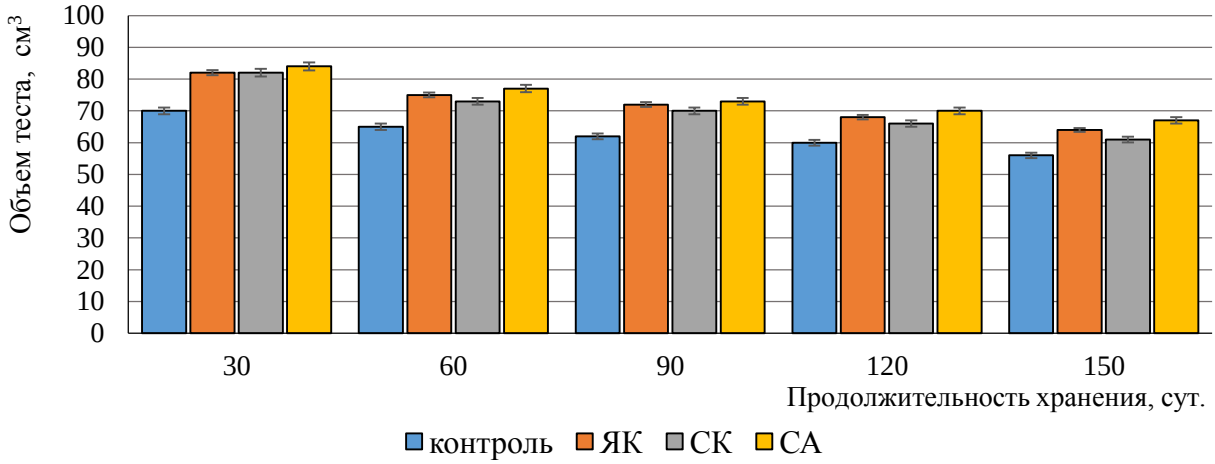


Рисунок 5.61 – Газообразующая способность ржано-пшеничного теста при совместном применении сухой закваски и янтарной кислоты/сукцинатов

Установлено, что совместное внесение сухой закваски и янтарной кислоты/сукцинатов при замесе теста перед низкотемпературной обработкой позволяет увеличить газоудерживающую способность дефростированного ржано-пшеничного теста от 15,3 % до 20,7 % по сравнению с контрольными образцами (рис. 5.62).

а) через 30 мин. расстойки



б) через 60 мин. расстойки

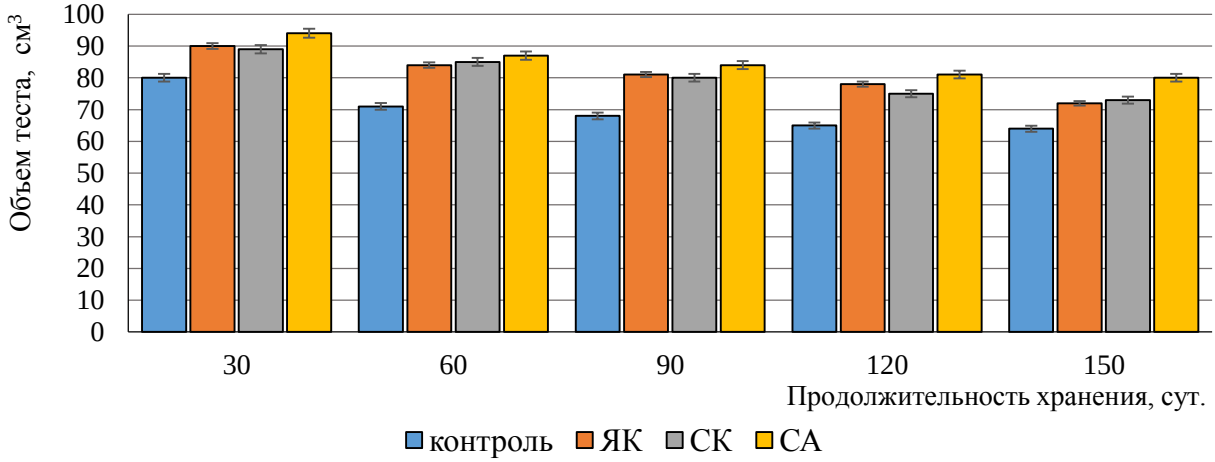


Рисунок 5.62 – Изменение газоудерживающей способности теста при совместном воздействии янтарной кислоты/сукцинатов и сухой закваски

Таким образом, установлено, что применение оптимальных концентраций янтарной кислоты или ее солей (калия и аммония) и сухой закваски лактобактерий *L.casei* 32 позволяет увеличить выживаемость клеток дрожжей и молочнокислых бактерий после низкотемпературного воздействия в среднем на 15-25 %. При увеличении продолжительности хранения теста в замороженном виде отмечается более выраженный криопротекторный эффект янтарной кислоты и ее солей, заключающийся в стабилизизации биотехнологических свойств полуфабрикатов. Выявленные эффекты позволяют сохранить качество тестовых полуфабрикатов при длительном температурном хранении и обеспечить

высокие физико-химические (табл. 5.27), органолептические и реологические характеристики готовой продукции.

Таблица 5.27 – Влияние янтарной кислоты и ее солей на качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба при низкотемпературном хранении полуфабрикатов

Наименование показателей	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.							
	90				150			
	Контроль	ЯК	СК	СА	Контроль	ЯК	СК	СА
Влажность, %	45,4	46,4	46,3	46,4	45,1	46,2	46,1	46,1
Кислотность, град.	7,4	8,0	7,8	8,0	7,2	7,8	7,8	7,8
Пористость, %	54,4	59,9	59,2	59,5	-	59,1	58,8	58,7
Удельный объем, $см^3$/100г	154	185	180	182	127	174	177	177
Крошковатость	0,9	0,7	0,7	0,7	1,3	0,9	0,9	0,8
Удельная набухаемость, $см^3$	242	231	233	230	249	239	239	237
Внешний вид: - форма	правильная, без боковых выплывов; хлеб с плоской верхней коркой	правильная, без боковых выплывов; хлеб с выпуклой верхней коркой			правильная, без боковых выплывов; хлеб с плоской верхней коркой	правильная, без боковых выплывов; хлеб с выпуклой верхней коркой		
- поверхность	достаточно гладкая, имеются трещины и подрывы	достаточно гладкая, без подрывов и трещин			достаточно гладкая, имеются крупные трещины и подрывы	достаточно гладкая, без подрывов и трещин		
-цвет	светло-коричневый	темно-коричневый			светло-коричневый	темно-коричневый		
Состояние мякиша: - пористость	поры различной величины, распределены неравномерно	поры мелкие и средние, распределены равномерно			поры различной величины, распределены неравномерно	поры мелкие и средние, распределены равномерно		
- пропеченность	пропеченный, с липким, заминающимся мякишем	пропеченный, не заминающийся			пропеченный, с липким, заминающимся мякишем	пропеченный, не заминающийся		
Вкус и запах	свойственный хлебу из смеси ржаной и пшеничной муки							

Анализ полученных данных показывает, что внесение в рецептуру замороженных полуфабрикатов сухих заквасок молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами совместно с янтарной кислотой или ее солями аммония и калия позволяет повысить пористость готовых изделий на 4,5 %, удельный объем на 14,9 %, а также улучшить крошковатость и удельную набухаемость мякиша ржано-пшеничного хлеба относительно контрольных образцов. Кроме того, опытные образцы отличаются более выраженным вкусом и ароматом, имеют мягкий мякиш с хорошо развитой пористостью.

Применение янтарной кислоты и ее солей совместно с сухой закваской позволяет снизить негативное влияние низкотемпературной обработки на реологические характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба, возникающее в результате длительного хранения теста в замороженном виде (табл. 5.28), о чем свидетельствуют показатели пластической и упругой деформации мякиша после 90- и 150-суточного хранения полуфабрикатов.

Таблица 5.28 – Влияние добавок на деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением криотехнологии

Наименование показателей	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.							
	90				150			
	Контроль	ЯК	СК	СА	Контроль	ЯК	СК	СА
Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	3,4	2,2	2,5	2,5	3,9	2,7	2,7	2,5
Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	1,3	2,3	2	2,3	1,1	2,3	2,5	2
Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	4,7	4,5	4,5	4,8	5	5	5,2	4,5
Относительная пластичность, $\Delta H_{плас.}^{отн.}$,%	72,3	48,9	55,6	52,1	78	54	51,9	55,6
Относительная упругость, $\Delta H_{упр.}^{отн.}$,%	27,7	51,1	44,4	47,9	22	46	48,1	44,4

Таким образом, результаты исследований позволяют сделать вывод об эффективности использования янтарной кислоты, сукцинатов калия и аммония в качестве криопротекторов, а также целесообразности их применения совместно с сухой закваской, содержащей криорезистентный штамм *L. casei 32*.

Полученные оптимальные значения были положены в основу разработки рецептуры и технологии ржано-пшеничного хлеба «Янтарный» на основе замороженных полуфабрикатов (ТУ, ТИ и РЦ 10.72.19–014–2003968806–2022).

5.5.4 Влияние ферментных препаратов на качество ржано-пшеничного хлеба, вырабатываемого по криотехнологии

Настоящее исследование показало, что под влиянием криообработки происходит значительное изменение ферментативных процессов, протекающих при брожении теста, а именно снижается активность основных ферментов муки – протеаз и амилаз. Следовательно, ферментные препараты могут быть эффективным средством регулирования

структурно-механических свойств полуфабрикатов, интенсификации технологического процесса, а также стабилизации качественных характеристик готовых изделий, выработанных на основе криотехнологии.

Существенным преимуществом применения ферментов перед другими хлебопекарными улучшителями является их узкая специфичность действия, проявление активности при определенных технологических параметрах (температура, pH среды, наличие активаторов и ингибиторов), что создает возможность регулировать окончание процесса ферментации пищевых продуктов [90, 91].

Отечественный и зарубежный опыт применения ферментных препаратов в технологии хлебобулочных изделий доказывает целесообразность использования композиций ферментов, обладающих различными принципами действия. Широкое применение в мировой практике хлебопечения находят мультиэнзимные композиции, основу которых составляют мальтогенная и α- амилазы, ксиланаза, глюкоамилаза, протеаза, липаза [61, 243, 254, 374]. Практическое использование синергетического эффекта композиций ферментных препаратов находит также реализацию в разработке оптимальных составов комплексных хлебопекарных улучшителей, в состав которых помимо ферментов входят другие добавки целевого назначения.

Задачей настоящего этапа работы являлось исследование возможности использования ферментных препаратов в качестве стабилизаторов характеристик дефростированных полуфабрикатов и готовых изделий, выработанных на основе криотехнологии. В результате анализа технологических характеристик ферментных препаратов, успешно применяемых в практике хлебопечения, были отобраны препараты Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG (производства датской компании Novozymes, одного из мирового лидера в области биоинноваций) в качестве перспективных для производства ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов.

Пентопан 500 BG - это очищенный ферментный препарат, производимый штаммом *Humicola insolens.* Препарат содержит ксиланазу и гемицеллюлазу, обеспечивающих модификацию растворимых и нерастворимых пентозанов муки, что улучшает гибкость глютеновой сетки и свойства теста при переработке. Ферментный препарат Пентопан 500 BG используется для улучшения структурно-механических свойств теста и его стабилизации. Внесение Пентопана способствует улучшению качества хлебобулочных изделий: улучшается структура мякиша, увеличивается объем, дольше сохраняется свежесть. Пентопан применяют для изготовления широкого ассортимента хлебобулочных изделий из пшеничной и ржаной муки; препарат целесообразно использовать в виде раствора с водой температурой 25-30 ^{0}C при замесе теста. Активность препарата

2700 FXU/g (FXU–единицы активности ксиланазы). Оптимальными условиями действия Пентопана является значение pH 5-6, температура 40 ^{0}C. Оптимальная дозировка Пентопана 500 BG составляет 3-6 г на 100 кг муки [61].

Ферментный препарат Новамил 1500 MG является очищенной мальтогенной а-амилазой, продуцируемой штаммом *Bacillus subtilis*, полученным генноинженерным методом. Данный фермент повышают содержание сбраживаемых сахаров в тесте, что приводит к интенсификации процесса созревания полуфабрикатов, повышению содержания декстринов, увеличению газообразующей способности теста. Следовательно, хлеб имеет повышенный объем, улучшается структура пористости, мякиш становится более эластичным, улучшаются вкус и аромат, дольше сохраняется свежесть изделия. Производитель рекомендует использовать Новамил 1500 MG в виде раствора с водой температурой 25-30 ^{0}C при замесе теста для широкого ассортимента хлебобулочных изделий из пшеничной и ржаной муки, муки грубого помола, из цельного зерна. Активность препарата составляет 1500 MANU/g (MANU – единицы активности мальтогенной амилазы). Оптимальная дозировка Новамил 1500 MG, указанная производителем для традиционных сортов ржано-пшеничного хлеба составляет 7-15 г на 100 кг муки.

Нейтраза 1,5 MG – это нейтральная протеаза, полученная производством очищенного генетически немодифицированного штамма *Bacillus amyloliguefaciens.* Фермент катализирует гидролитическое расщепление белковых веществ, способствует образованию низкомолекулярных азотистых веществ. Применение данного фермента обеспечивает ослабление клейковины муки, увеличение ее растяжимости. Фермент целесообразно использовать при замесе теста виде раствора температурой 25-30º С. Оптимальными условиями действия фермента является температура до 70 ^{0}C, pH 5,5–7,5. Активность препарата Нейтраза 1,5 AU/г (AU – единицы активности Ансона). Оптимальная дозировка Нейтразы 1,5 MG составляет 0,2-0,5 г на 100 кг муки для хлебобулочных изделий, 5-20 г на 100 кг муки для мучных кондитерских изделий.

Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG – стандартизированные препараты с использованием пшеничной муки с узкими параметрами размера частиц от 50 до 300 микрон. Ферментные препараты представляют собой сыпучий не распыляющийся агломерированный гранулят светло-коричневого цвета.

Для решения поставленной задачи было изучено влияние отдельных ферментов на показатели качества хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов.

Результаты исследования, отражающие влияние ферментов Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG на показатели качества ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением криотехнологии представлены в таблице 5.29.

Таблица 5.29 – Показатели качества ржано-пшеничного хлеба с применением индивидуальных ферментных препаратов (при хранении полуфабрикатов в замороженном виде в течение 90 сут.)

Фермент	Концентрация, % к массе муки	Показатели качества готовых изделий					
		Кислотность		Пористость		Удельный объем	
		град.	Δ, %	%	Δ, %	$см^3$/100г	Δ, %
Пентопан 500 BG	0 (контроль)	7,1	0	57,8	0	187,2	0,00
	0,003	7,4	4,23	61,4	6,23	192,9	3,04
	0,005	7,6	7,04	63,2	9,34	198,7	6,14
	0,007	7,8	9,86	61,7	6,75	196,5	4,97
	0,010	7,8	9,86	58,4	1,04	193,3	3,26
Новамил 1500 MG	0,007	7,6	7,04	65,1	12,63	204,0	8,97
	0,001	7,9	11,27	67,3	16,44	209,7	12,02
	0,015	8,0	12,68	66,7	15,40	205,3	9,67
	0,020	8,4	18,31	63,4	9,69	199,8	6,73
Нейтраза 1,5 MG	0,0005	7,2	1,41	61,6	6,57	193,5	3,37
	0,001	7,6	7,04	64,8	12,11	199,6	6,62
	0,0015	7,8	9,86	68,2	17,99	211,2	12,82
	0,002	7,8	9,86	66,5	15,05	206,8	10,47

Зависимости прироста показателей кислотности ($К_i$), пористости ($П_i$) и удельного объема ($У_i$) ржано-пшеничного хлеба от концентрации компонентов ферментной композиции при индивидуальном дозировании ферментов можно представить в виде уравнений:

Пентопан 500 BG (Пен):	Новамил 1500 MG (Нов):	Нейтраза 1,5 MG (Ней):	
$\Delta К_{Пен}=1,41\ Х_{Пен};$	$\Delta К_{Нов}=1,13\ Х_{Нов};$	$\Delta К_{Ней}=6,57\ Х_{Ней};$	(5.14)
$\Delta П_{Пен}=1,87\ Х_{Пен};$	$\Delta П_{Нов}=1,64\ П_{Нов};$	$\Delta К_{Ней}=11,99\ Х_{Ней};$	
$\Delta У_{Пен}=1,23\ Х_{Пен};$	$\Delta У_{Нов}=1,2\ У_{Нов};$	$\Delta К_{Ней}=8,55\ Х_{Ней}.$	

При совместном дозировании добавок в составе ферментной композиции (ФК) прирост показателей рассчитывается по формулам:

$$\Delta К_{ФК}=1,41\ Х_{Пен}+1,13\ Х_{Нов}+6,57\ Х_{Ней}; \quad (5.15)$$

$$\Delta П_{ФК}=1,87\ П_{Пен}+1,64\ П_{Нов}+11,99\ П_{Ней}; \quad (5.16)$$

$$\Delta У_{ФК}=1,23\ У_{Пен}+1,2\ У_{Нов}+8,55\ У_{Ней} \quad (5.17)$$

Необходимыми условиями при решении данной задачи также являются:

$$К_{контр.}+(\Delta К_{ФК}/100)\ К_{контр.} \leq 8; \quad (5.18)$$

$$П_{контр.}+(\Delta П_{ФК}/100)\ П_{контр.} \rightarrow max; \quad 5.19)$$

$$У_{контр.}+(\Delta У_{ФК}/100)\ У_{контр.} \rightarrow max, \quad (5.20)$$

где $К_{контр.}$, $П_{контр.}$, $У_{контр.}$ – кислотность, пористость и удельный объем контрольных образцов соответственно.

Тогда, неравенства примут вид:

$$К_{ФК}=5,01\ Х_{Пен}+4,72\ Х_{Нов}+23,32\ Х_{Ней}\leq 45; \quad (5,21)$$

$$П_{ФК}=115,6+2,16\ Х_{Пен}+1,89\ Х_{Нов}+13,86\ Х_{Ней}\rightarrow \max; \quad 5.22)$$

$$У_{ФК}=187,4+2,31\ Х_{Пен}+2,45\ Х_{Нов}+16,02\ Х_{Ней}\rightarrow \max \quad (5.23)$$

На основании допустимых дозировок индивидуальных ферментов и введенных ограничений математическая модель задачи примет вид системы неравенств:

$$\begin{cases} К_{ФК}=5,01\ Х_{Пен}+4,72\ Х_{Нов}+23,32\ Х_{Ней}\leq 45 \\ П_{ФК}=115,6+2,16\ Х_{Пен}+1,89\ Х_{Нов}+13,86\ Х_{Ней}\rightarrow \max \\ У_{ФК}=187,4+2,31\ Х_{Пен}+2,45\ Х_{Нов}+16,02\ Х_{Ней}\rightarrow \max \\ 0,003\leq Х_{Пен}\leq 0,007 \\ 0,007\leq Х_{Нов}\leq 0,015 \\ 0,001\leq Х_{Ней}\leq 0,002 \end{cases} \quad (5.24)$$

Систему неравенств решали с помощью инструмента «Поиск решения» программного обеспечения MS Excel 2016. В процедуре поиска решения использовали алгоритмы метода обобщенного приведенного градиента для нелинейных задач. В результате получили следующие максимально возможные концентрации компонентов ферментного комплекса, масс. %: Пентопан 500 BG – 0,012, Новамил 1500 MG – 0,005 и Нейтраза 1,5 MG – 0,002, таким образом оптимальное соотношение отдельных ферментов Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG в составе ферментной композиции составляет 6:2,5:1.

Полученные данные были использованы при проведении полного факторного эксперимента. В качестве факторов принимали количество закваски молочнокислых бактерий *L. casei 32* и количество ферментной композиции. Концентрацию сухой закваски молочнокислых бактерий (X_1) варьировали в диапазоне 0-0,15 %; количество фермента (X_2) в интервале от 0,003 % до 0,010 % к массе муки. Уровни варьирования факторов основаны на результатах предварительных экспериментов (приложение В, таблица 9 и 10).

В результате математической обработки результатов получены регрессионные уравнения зависимости пористости (Y_1) и удельного объема (Y_2) ржано-пшеничного хлеба от концентраций рецептурных компонентов.

Для показателя пористость хлеба (Y_1) получено уравнение регрессии вида:

$$Y_1 = 58,34 + 8,97X_1 + 0,84X_2 + 350,21X_1^2 - 0,37X_1X_2^2 - 1576,91X_1^3 - 0,14X_2^3 \quad (5.25)$$

Для удельного объема (Y_2) ржано-пшеничного хлеба уравнение имеет вид:

$$Y_2 = 189,49 + 100,97X_1 + 1,57X_2 + 1756,26X_1^2 + 0,35X_2^2 - 6510,37X_1^3 - 0,04X_2^3 \quad (5.26)$$

Графическая зависимость исследуемых показателей качества ржано-пшеничного хлеба от данных факторов представлена на рисунке 5.63.

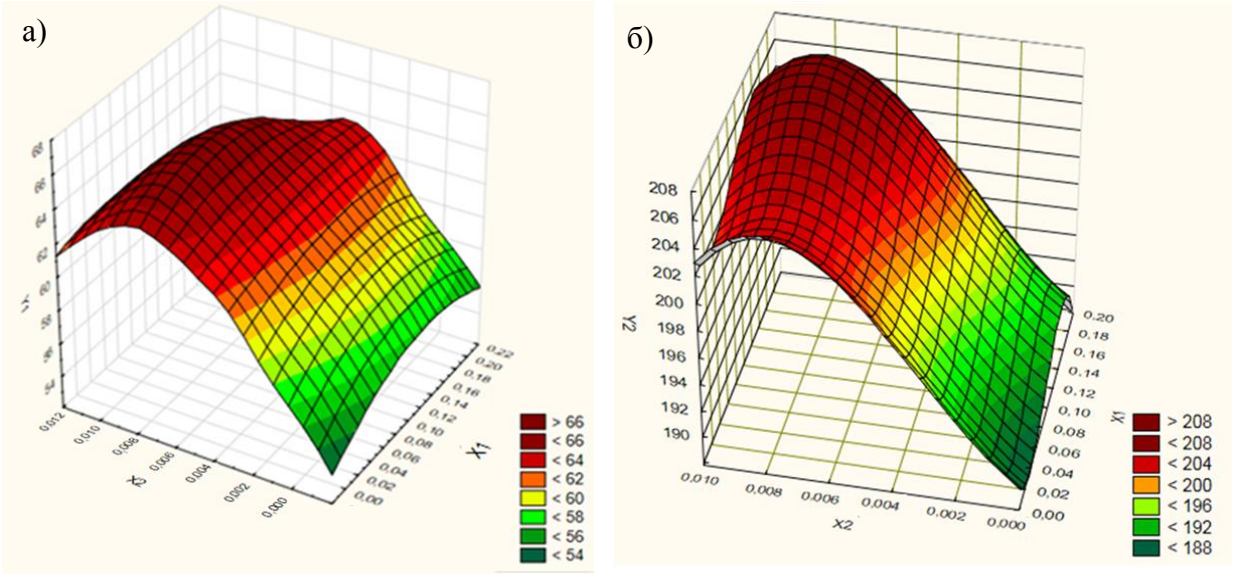


Рисунок 5.63 – Влияние дозировки сухой закваски и ферментной композиции на пористость (а) и удельный объем (б) ржано-пшеничного хлеба

При анализе коэффициентов уравнения регрессии и поверхности отклика (рис.6.31) были выбраны оптимальные значения: дозировка сухой закваски (X_1, %) – 0,1 % и ферментной композиции (X_2, %) – 0,0085 % к массе муки, при которых пористость и удельный объем хлеба составляет 62,3 % и 208 см$^{3/}$100 г соответственно.

Далее была проведена серия экспериментов по изучению влияния оптимальной концентрации ферментной композиции на процессы созревания дефростированных полуфабрикатов и качество ржано-пшеничного хлеба, выработанного на основе криотехнологии. На рисунке 5.64 представлены данные по влиянию длительного низкотемпературного хранения тестовых полуфабрикатов на динамику их кислотонакопления после дефростации. Установлено, что по мере увеличения продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде опытные образцы теста более интенсивно накапливают кислотность по сравнению с контрольными образцами (рис. 5.64), при этом существенные различия в характере накопления кислотности наблюдаются после продолжительного периода хранения полуфабрикатов в замороженном виде (в течение 150 сут.).

а) 30 сут. б) 150 сут.

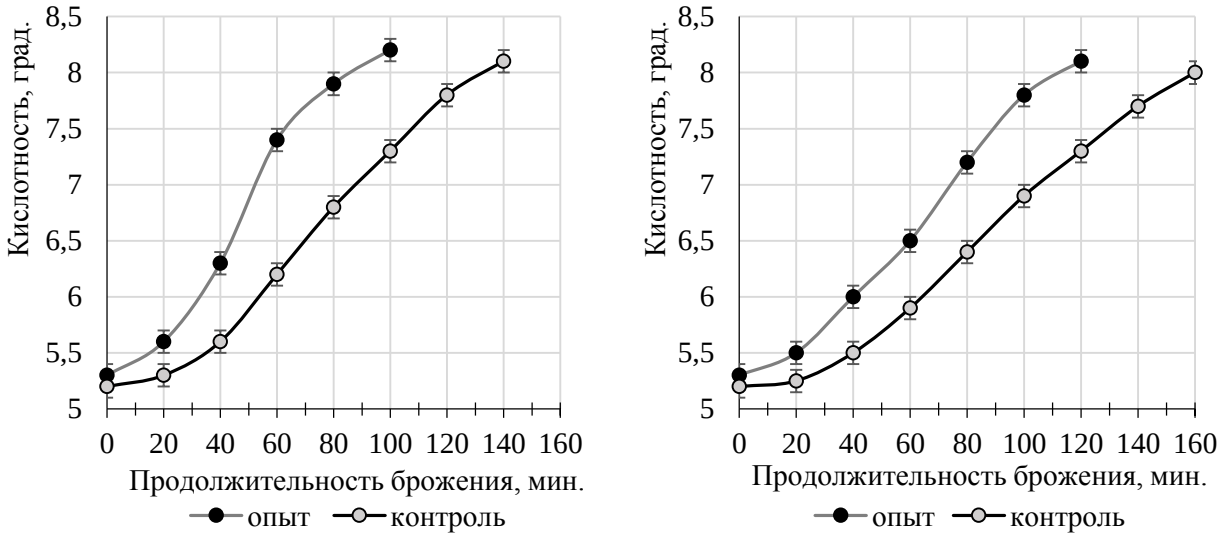


Рисунок 5.64 – Влияние ферментной композиции на процесс кислотонакопления в дефростированных полуфабрикатах

Полученные результаты согласуются с данными по влиянию ферментной композиции на подъемную силу и бродильную активность теста (рис. 5.65).

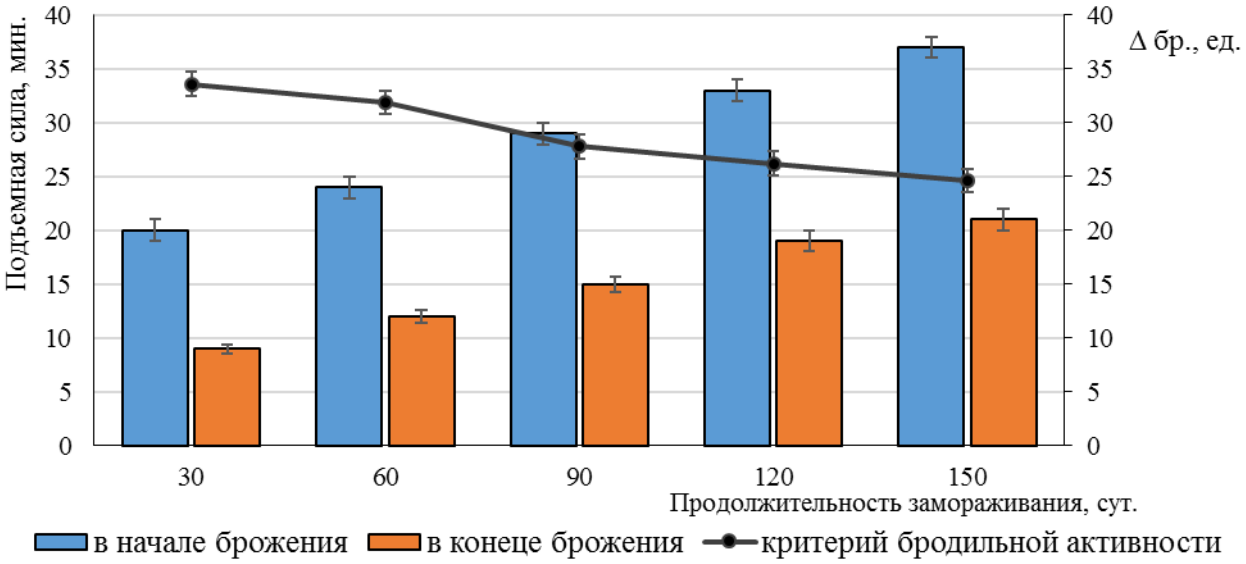


Рисунок 5.65 – Влияние ферментной композиции на биотехнологические свойства дефростированого теста

Анализ полученных данных свидетельствует о положительном влиянии ферментной композиции на биотехнологические свойства дефростированных полуфабрикатов, так внесение добавки позволяет увеличить критерий бродильной

активности теста с 10,6 (контроль) до 24,6 для полуфабрикатов после 150-суточного хранения в замороженном виде.

В результате действия амилаз, входящих в состав ферментного комплекса, в тесте образуются сахара с низким молекулярным весом и декстрины, которые являются дополнительным источником питания для клеток дрожжей и молочнокислых бактерий. Выявленный эффект подтверждают также результаты исследования по изучению влияния ферментной композиции газообразующую способность дефростированных полуфабрикатов (рис. 5.66).

Под воздействием ферментной композиции на компоненты теста происходит увеличение газообразующей способности дефростированных ржано-пшеничных полуфабрикатов от 15,3 % до 20,7 % по сравнению с контрольными образцами (рис.5.66).

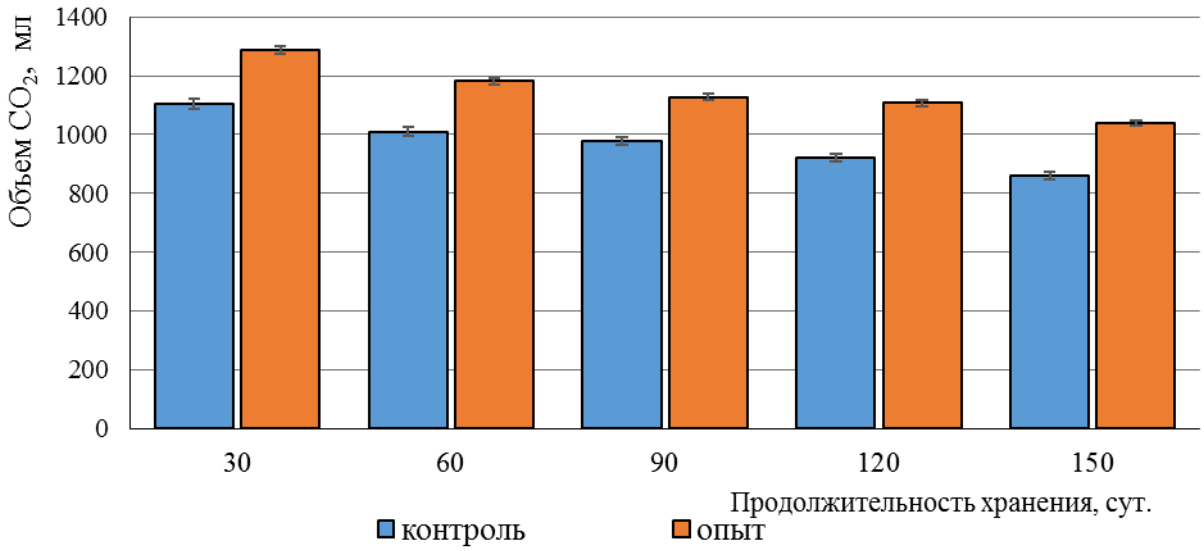


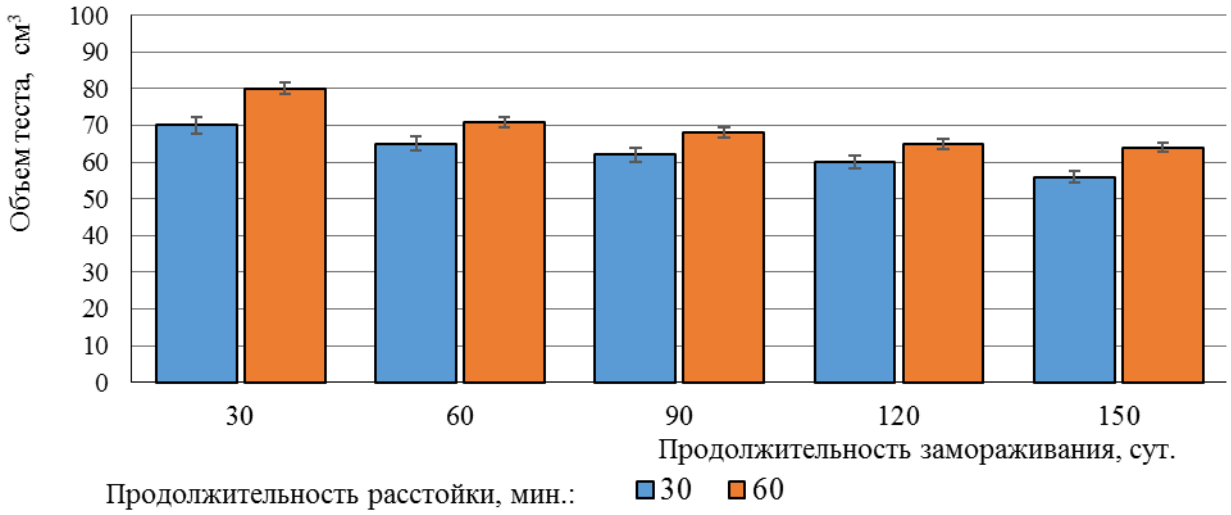
Рисунок 5.66 – Изменение газообразующей способности ржано-пшеничного теста при внесении ферментной композиции

Установлено, что при увеличении продолжительности хранения ржано-пшеничных полуфабрикатов в замороженном виде стабилизируется газоудерживающая способность теста с применением ферментной композиции (рис. 5.67), так газоудерживающая способность опытных образцов, подвергавшихся низкотемпературной обработке в течение 150 сут. увеличилась на 15,7 % относительно контрольных значений.

В результате дальнейших исследований было установлено, что внесение в тесто ферментной композиции приводит к увеличению диаметра контура расплывшегося шарика теста в процессе расстойки (рис. 5.68). В начальный момент расстойки опытный образец имеет диаметр шарика теста 57 мм, что на 12,3 % больше, чем у контрольных образцов, подвергавшихся низкотемпературному хранению в течение 30 сут. Данная тенденция

отмечается на протяжении всего срока хранения полуфабрикатов в замороженном виде. Через 60 мин. расстойки полуфабрикатов данная разница составляет 12,1 % и 31,86 % через 30 сут. и 180 сут. соответственно по сравнению с контролем.

а) контроль



б) опыт

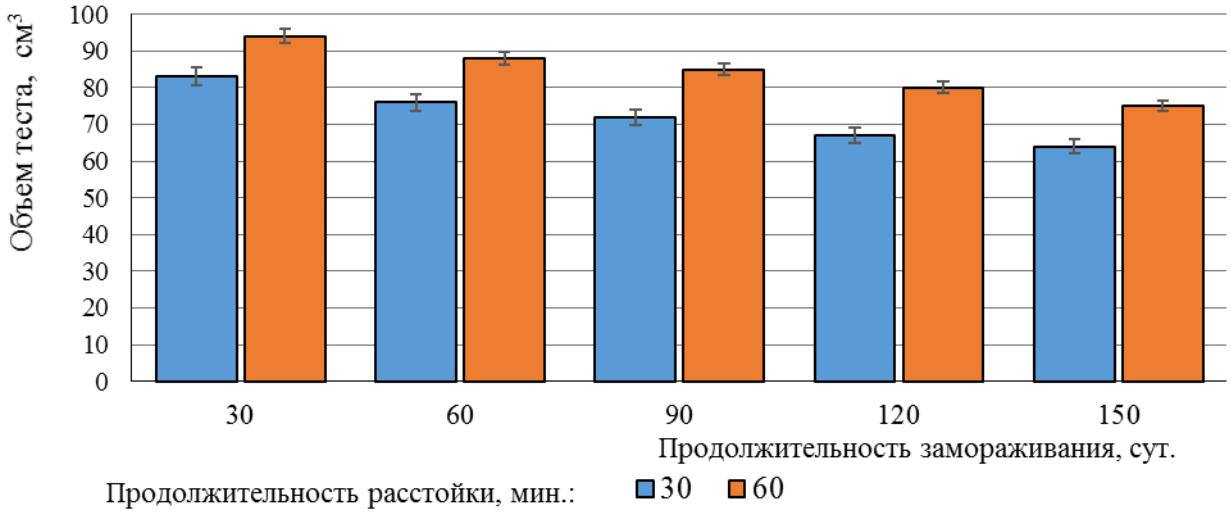
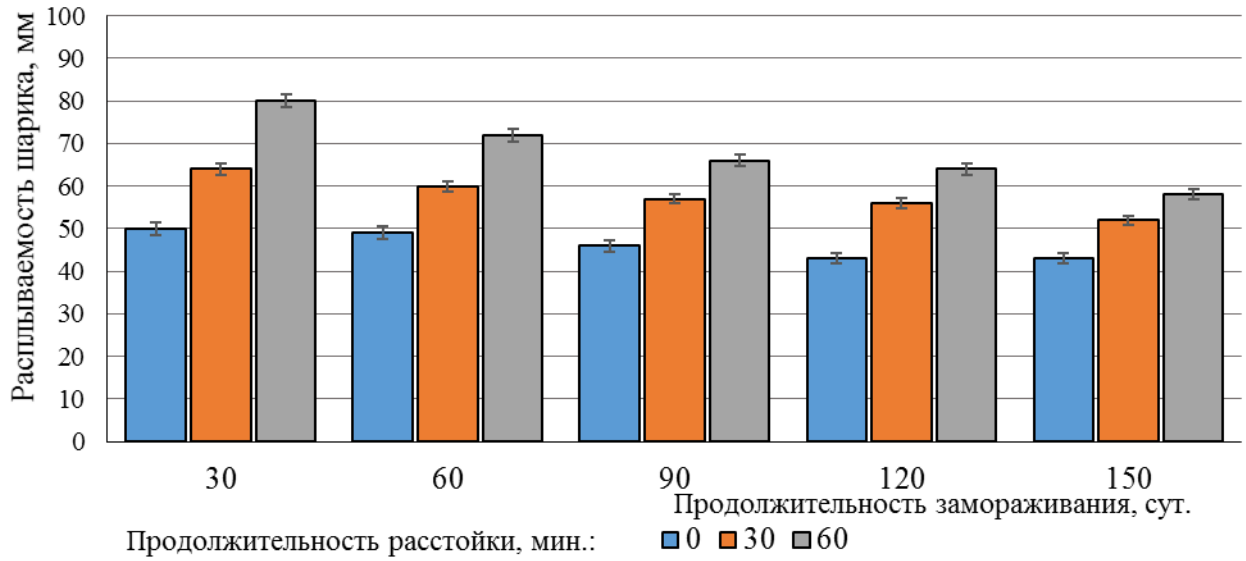


Рисунок 5.67 – Изменение газоудерживающей способности теста при воздействии ферментной композиции

Помимо ферментов амилолитического действия, в состав ферментной композиции входит протеаза, которая обеспечивает ослабление клейковины муки, увеличивает ее растяжимость, что и объясняет повышение газоудерживающей способности теста и приводит к улучшению консистенции дефростированных полуфабрикатов. Кроме того, образующиеся в результате действия ферменной композиции низкомолекулярные продукты протеолиза являются дополнительным источником питания для клеток дрожжей и молочнокислых бактерий.

а) контроль



б) опыт

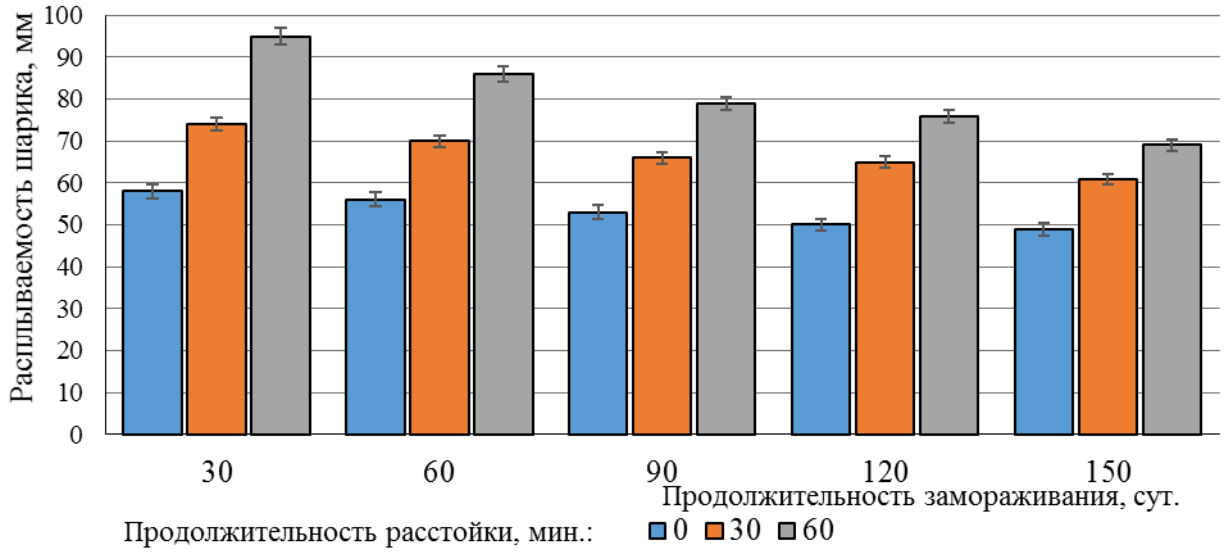


Рисунок 5.68 – Изменение расплываемости шарика теста в процессе расстойки при внесении ферментной композиции

Эффективность применения ферментной композиции подтверждают также данные по изучению качественных характеристик ржано-пшеничного хлеба, выработанного на основе замороженных полуфабрикатов (табл 5.30).

Таблица 5.30 – Влияние ферментной композиции на качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба при низкотемпературном хранении полуфабрикатов

Наименование показателей	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.									
	30		60		90		120		150	
	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт
Влажность, %	46,1	46,6	45,7	46,4	45,4	46,2	45,1	46,0	45,1	46,0
Кислотность, град.	7,4	7,6	7,2	7,6	7,4	7,5	7,4	7,5	7,2	7,5
Пористость, %	57,3	62,2	56,0	62,0	54,4	61,6	50,1	61,1	-	59,5
Удельный объем, $см^3/100г$	180	198	169	193	154	186	143	183	127	180
Крошковатость	0,8	0,7	0,9	0,7	0,9	0,8	1,1	0,8	1,3	0,9
Удельная набухаемость, $см^3$	235	232	239	233	242	235	246	238	249	238

Анализ качественных показателей хлебобулочных изделий, выработанных по криотехнологии, показывает, что ржано-пшеничный хлеб, приготовленный с применением ферментной композиции имеет стабильные показатели качества (влажность, кислотность, пористость, удельный объем, крошковатость и удельная набухаемость) на протяжении всего срока хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде. Так, применение препарата в технологии приготовления хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов позволяет повысить пористость и удельный объем ржано-пшеничного хлеба на 11 % и 27,9 % соответственно. При этом опытная партия продукции отличается высокими органолептическими характеристиками - изделия имеют более выраженный вкус и запах, тонкостенную равномерную пористость (рис. 5.69), более светлый и мягкий мякиш (табл. 5.31).

Таблица 5.31 – Результаты оценки цветности ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением ферментной композиции

Параметр	Мякиш		Корка	
	контроль	опыт	контроль	опыт
L	63,7±0,2	67,1±0,3	60,4±0,2	60,5±0,2
a	3,3±0,1	2,9±0,1	3,2±0,1	6,3±0,1
b	25,4±0,3	26,0±0,2	22,5±0,2	25,3±0,3
C	25,6±0,3	26,2±0,3	22,7±0,2	26,1±0,2
DW	48,8±0,3	50,6±0,4	49,1±0,3	46,3±0,3

а) 30 сут. б) 150 сут.

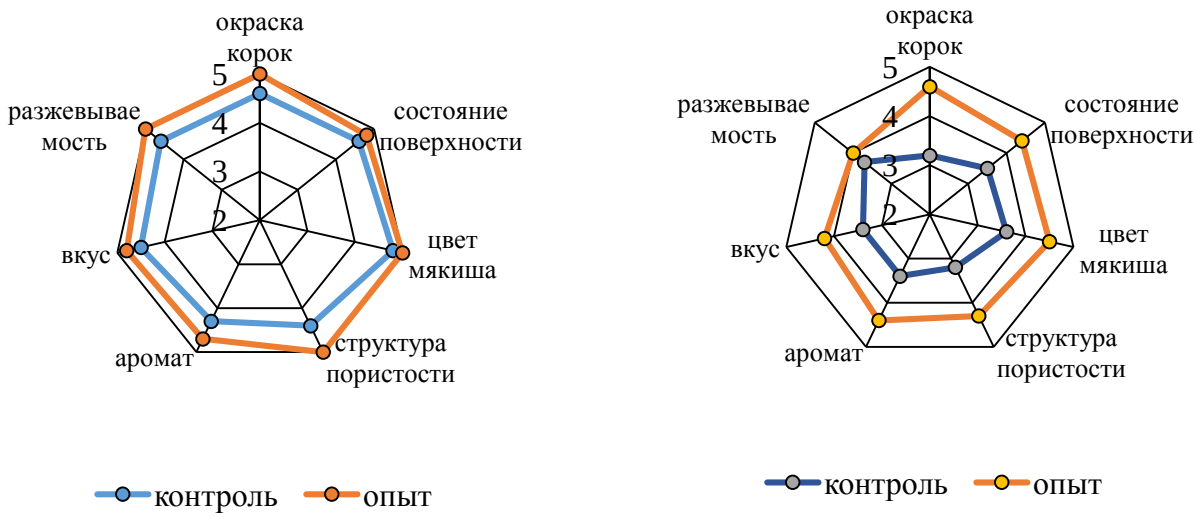


Рисунок 5.69 – Влияние ферментной композиции на органолептические характеристики ржано-пшеничного хлеба

Проведенные нами исследования показали, что низкотемпературная обработка приводит к ухудшению структурно-механических свойств мякиша ржано-пшеничного хлеба, по мере увеличения продолжительности хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде снижается относительная упругость мякиша ржано-пшеничного хлеба. Применение ферментной композиции позволяет сохранить баланс между относительной упругостью и относительной пластичностью мякиша хлеба (табл. 5.32).

Таблица 5.32 – Влияние ферментной композиции на деформационные характеристики мякиша хлеба, выработанного с применением криотехнологии

Наименование показателей	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.									
	30		60		90		120		150	
	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт
Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	2,0	2,2	3,1	2,4	3,4	2,4	3,8	2,6	3,9	2,7
Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %	2,6	2	1,6	2	1,3	2,2	0,9	2,2	1,1	2
Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	4,6	4,2	4,7	4,4	4,7	4,6	4,8	4,8	5,0	4,7
Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	43,5	52,4	66,0	54,5	72,3	52,2	79,2	54,2	78,0	57,4
Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	56,5	47,6	34,0	45,5	27,7	47,8	18,8	45,8	22,0	42,6

Таким образом, применение ферментной композиции, содержащей препараты Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG (в соотношении 6:2,5:1) в концентрации 0,0085 % к массе муки (8,5 г на 100 кг муки) позволяет стабилизировать реологические свойства дефростированного полуфабрикатов, увеличить газообразующую и газоудерживающую способность теста, улучшить структурно-механические, органолептические и физико-химические показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов.

Полученные оптимальные значения были положены в основу разработки рецептуры и технологии ржано-пшеничного хлеба «Элита» на основе замороженных полуфабрикатов (ТУ, ТИ и РЦ 10.72.19–016–2003968806–2022).

5.5.5 Разработка технологии и рецептур ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением солодовых препаратов

Результаты предыдущих исследований доказывают эффективность применения ферментных препаратов амилолитического и протеолитического действия в технологии ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. Помимо использования чистых ферментов и комплексных ферментных препаратов, в криотехнологии хлебопечения весьма перспективным представляется применение солодовых препаратов, содержащих высокоактивные ферменты пророщенного зерна (ячменя, ржи, пшеницы и др.) В солоде благодаря процессу прорастания зерна особенно активными становятся протеолитические и амилолитические ферменты [75, 98, 131].

Помимо солода в мировой практике хлебопечения применяют солодовые экстракты, которые представляют собой густую сиропообразную массу, содержащую все ценные пищевые вещества зерна: сахара (мальтозу, глюкозу, фруктозу и др.), мальтодекстрины, белки, органические кислоты (уксусную, янтарную, молочную, лимонную, пировиноградную и др.), витамины, гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты, фосфорсодержащие, красящие и полифенольные соединения, минеральные вещества [98, 131]. Если рассматривать действие солодовых препаратов как хлебопекарных улучшителей, то их влияние наблюдается в трех главных направлениях:

1) повышается способность крахмала и клейковины к поглощению воды;

2) интенсифицируются процессы брожения;

3) усиливаются реакции карамелизации и меланоидинообразования.

Однако, исследования по оценке критериев выбора солодовых препаратов для технологии хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов и их научное

обоснование в России и за рубежом до настоящего времени малочисленны в научно-технической литературе. По этой причине имеющиеся на рынке солодовые препараты используются производителями хлебобулочной продукции по принципу популярности и доступности бренда.

Задачей настоящего этапа работы явилось разработка технологии и рецептур ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением солодовых препаратов.

Разработка технологических решений применения солодовых препаратов в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба базировалась на изучении закономерностей изменений качественных характеристик готовой продукции в зависимости от вида и концентрации добавок. Количество солодов (пшеничного, ржаного, ячменного и гречневого) варьировали в интервале от 0,5 % до 2,5 % к массе муки; солодовых экстрактов - от 1% до 5 % к массе муки. Результаты исследований представлены в таблице 5.33.

Анализ полученных данных свидетельствует о положительном влиянии солодовых препаратов на физико-химические показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов в количестве 1,5-2,0 % и 3,0-4,0 % для солодов и экстрактов соответственно. Установлено, что при применении солодовых экстрактов улучшаются органолептические показатели продукции – хлеб отличается ярко-выраженным вкусом и ароматом, равномерно окрашенной корочкой, увеличенным объемом по сравнению с контрольными образцами. Следует отметить, что при добавлении в тесто сухого солода, помимо выявленных эффектов наблюдается также улучшение структуры пористости мякиша (рис. 5.70).

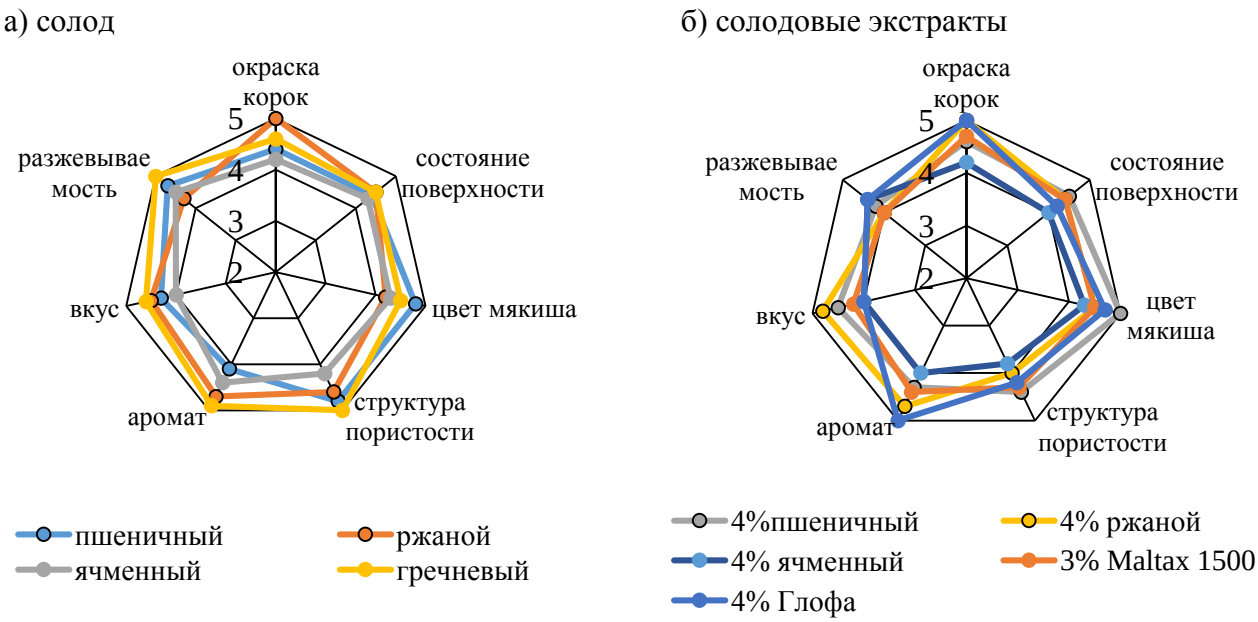


Рисунок 5.70 – Профилограммы ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением солодовых препаратов

Таблица 5.33 – Влияние солодовых препаратов на качество ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Добавка	Концентрация, % к массе муки	Показатели качества			
		Кислотность, град.	Пористость, %	Удельный объем,см^3/100г	Органолептическая оценка, балл
Пшеничный солод	0 (контроль)	7,1	57,8	187	66,4
	0,5	7,2	59,5	188	75,5
	1,0	7,2	60,7	193	81,3
	1,5	7,4	61,1	201	82,0
	2,0	**7,4**	**61,8**	**203**	**82,9**
	2,5	7,6	61,6	203	79,6
Ржаной солод	0,5	7,4	58,1	189	70,3
	1,0	7,6	58,7	189	71,2
	1,5	7,9	59,5	194	74,5
	2,0	**8,0**	**60,4**	**196**	**76,5**
	2,5	8,2	60,2	196	72,8
Ячменный солод	0,5	7,3	58,3	190	68,9
	1,0	7,4	58,7	192	70,5
	1,5	**7,4**	**60,8**	**196**	**76,8**
	2,0	7,5	60,3	196	73,1
	2,5	7,6	60,0	194	72,2
Гречишный солод	0,5	7,4	59,1	192	72,8
	1,0	7,4	60,6	198	76,3
	1,5	7,6	61,8	202	80,5
	2,0	**7,8**	**62,5**	**206**	**84,6**
	2,5	7,8	62,3	206	81,8
Пшеничный экстракт	1	7,2	58,0	187	70,7
	2	7,2	58,4	187	72,6
	3	7,3	58,9	189	74,0
	4	**7,4**	**59,7**	**192**	**75,2**
	5	7,4	59,3	192	74,3
Ржаной экстракт	1	7,5	58,2	187	71,6
	2	7,5	58,6	189	76,5
	3	7,6	58,9	189	78,5
	4	**7,6**	**59,9**	**193**	**76,3**
	5	7,8	59,5	193	74,8
Ячменный экстракт	1	7,3	58,5	189	70,7
	2	7,4	59,2	191	71,4
	3	7,4	59,6	193	73,5
	4	**7,5**	**60,3**	**196**	**77,4**
	5	7,5	60,0	196	75,1
Maltax 1500	1	7,3	58,9	190	72,3
	2	7,4	59,4	192	75,7
	3	**7,4**	**60,9**	**198**	**79,6**
	4	7,4	59,9	195	76,2
	5	7,5	60,3	195	75,2
Глофа	1	7,2	58,5	191	72,4
	2	7,2	60,3	197	78,8
	3	7,2	62,4	203	81,2
	4	**7,3**	**62,1**	**200**	**78,6**
	5	7,4	61,8	200	77,2

Положительные эффекты от применения солодовых препаратов в криотехнологии хлебопечения объясняются их химическим составом. Под действием амилолитических ферментов солода происходит осахаривание крахмала, гидролизаты которого совместно с простыми сахарами, входящими в состав препаратов (преимущественного мальтоза) являются дополнительными источниками питания для клеток дрожжей и молочнокислых бактерий, за счет этого происходит улучшение газообразующей способности теста; интенсифицируются процесс брожения дефростированных полуфабрикатов.

Далее были проведены исследования по разработке оптимизированной рецептурной композиции хлеба из смеси ржаной и пшеничной муки на основе замороженных полуфабрикатов, с применением сухой закваски молочнокислых бактерий и солодовых препаратов. В качестве факторов эксперимента принимали количество закваски молочнокислых бактерий *L. casei ТМБ-Д,* дозировку прессованных дрожжей и количество пшеничного солода. Количество прессованных дрожжей (X_1) варьировали в диапазоне от 0,5 % до 1,5 %; концентрацию сухой закваски молочнокислых бактерий (X_2) в интервале 0-0,2 %; пшеничного солода (X_3) от 2 % до 6 % к массе муки. Пределы варьирования параметров выбирали с учетом реально возможных изменений каждого фактора. Исследования проводили в соответствии с композиционным униформ-ротатабельным планом трехфакторного эксперимента (приложение В, таблица 11 и 12). Тестовые полуфабрикаты упаковывали во влагонепроницаемую пленку, замораживали при температуре минус 30 ^{0}С и хранили в замороженном виде в течение 1 мес. при температуре минус 18-20 ^{0}С.

Решение задачи оптимизации изучаемых факторов проводили путем нахождения экстремально-максимального значения полученной математической зависимости пористости и удельного объема ржано-пшеничного хлеба:

Полученные уравнения математической зависимости пористости (Y_1) и удельного объема (Y_2) ржано-пшеничного хлеба:

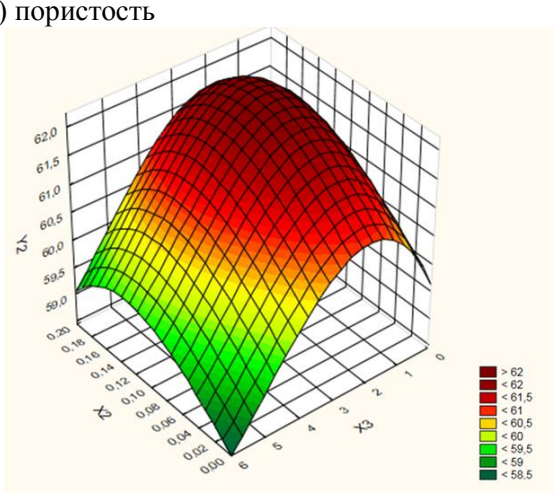
$$Y_1 = 59{,}63 + 1{,}03X_1 + 14{,}43X_2 + 1{,}47X_3 + 0{,}43X_1^{\,2} + 0{,}87X_2^{\,2} - \\ - 0{,}48X_3^{\,2} - 41{,}04X_1^{\,3} - 281{,}12X_2^{\,3} + 0{,}03X_3^{\,3}, \qquad (5.27)$$

$$Y_2 = 198{,}15 + 2{,}77X_1 + 20{,}43X_2 + 2{,}34X_3 + 3{,}91X_1^{\,2} + \\ + 72{,}73X_2^{\,2} - 1{,}61X_3^{\,2} - 101{,}78X_1^{\,3} - 856{,}12X_2^{\,3} + 0{,}13X_3^{\,3}. \qquad (5.28)$$

Графическая зависимость исследуемых показателей качества ржано-пшеничного хлеба от исследуемых факторов представлена на рисунке 5.71.

В результате математического анализа определены оптимальные концентрации сухой закваски молочнокислых бактерий, составляющая 0,12 %; дрожжей – 1,0 %, пшеничного солода – 2,1 % к массе муки.

а) пористость



б) удельный объем

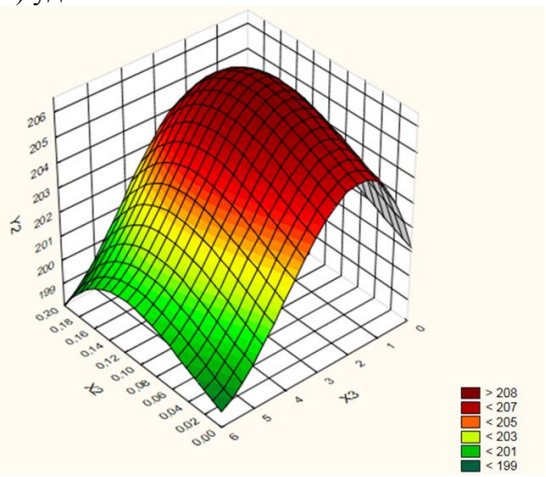
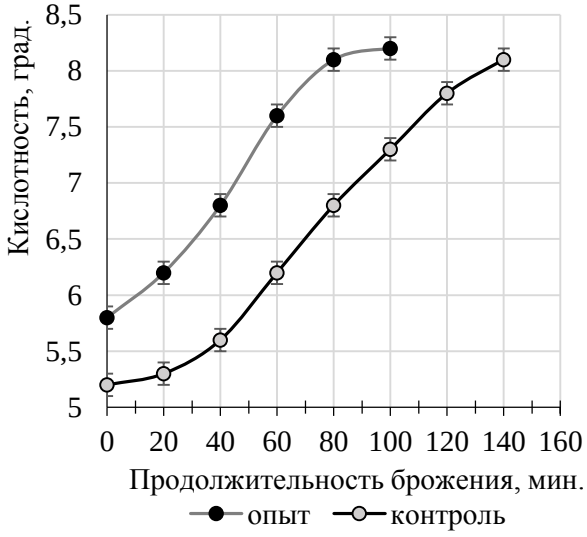


Рисунок 5.71 – Влияние дозировки сухой закваски и пшеничного солода на пористость (а) и удельный объем (б) ржано-пшеничного хлеба

Далее была поставлена серия экспериментальных исследований по изучению влияния длительного низкотемпературного хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде на процессы созревания теста и качество ржано-пшеничного хлеба при совместном введении в рецептуру сухой закваски молочнокислых бактерий *L. casei ТМБ-Д* и пшеничного солода в оптимальных концентрациях.

Результаты исследования влияния низкотемпературной обработки тестовых полуфабрикатов на динамику их кислотонакопления после дефростации. показывают, что по мере увеличения продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде опытные образцы более интенсивно накапливают кислотность по сравнению с контрольными образцами (рис. 5.72) даже после длительного низкотемпературного воздействия (в течение 150 сут.).

а) 30 сут.



б) 150 сут.

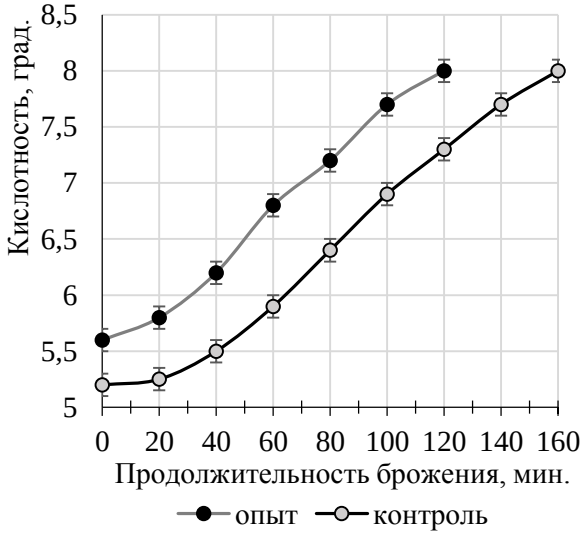


Рисунок 5.72 – Влияние пшеничного солода на процесс кислотонакопления в дефростированных полуфабрикатах

Данные по влиянию пшеничного солода на подъемную силу и бродильную активность ржано-пшеничного теста представлены на рисунке 5.73. Результаты исследования показывают, что внесение добавки позволяет увеличить критерий бродильной активности теста с 10,6 (контрольный вариант) до 27,1 для полуфабрикатов после 150-суточного хранения в замороженном виде.

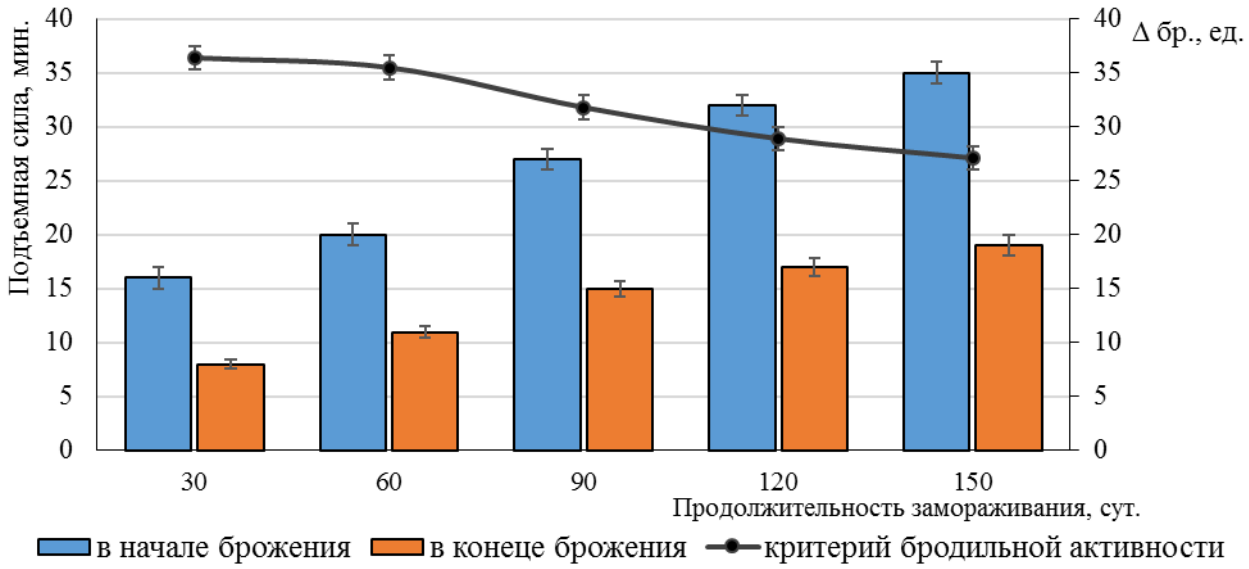


Рисунок 5.73 – Биотехнологические свойства дефростированого теста с применением пшеничного солода

Установлено, что при совместном использовании пшеничного солода и сухой закваски происходит увеличение газообразующей способности дефростированных ржано-пшеничных полуфабрикатов в среднем на 23,3 % по сравнению с контрольными образцами (рис. 5.74).

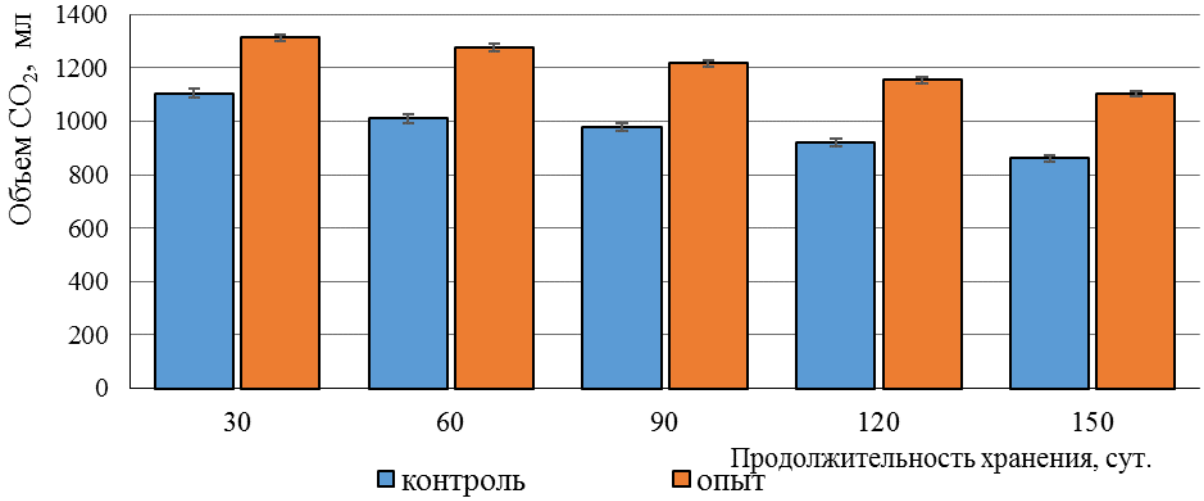


Рисунок 5.74 – Изменение газообразующей способности ржано-пшеничного теста при совместном применении пшеничного солода и сухой закваски

На рисунке 5.75 представлена динамика газоудерживающей способности дефростированного теста из смеси ржаной и пшеничной муки после низкотемпературной обработки при совместном использовании пшеничного солода и сухой закваски молочнокислых бактерий. Установлено, что исследуемые препараты позволяют увеличить газоудерживающую способность ржано-пшеничного теста, подвергавшегося низкотемпературной обработке в течение 150 сут. на 15,7 % относительно контроля.

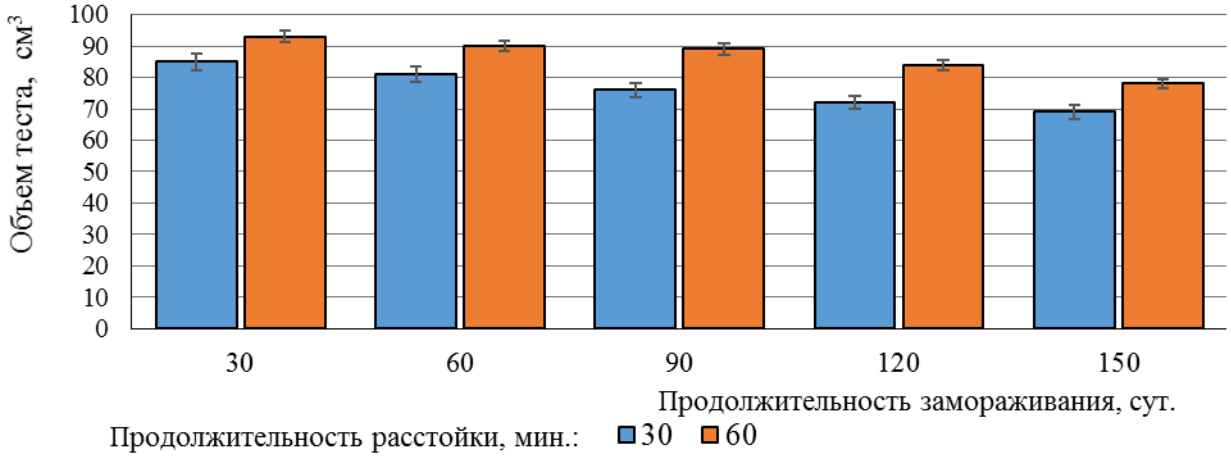


Рисунок 5.75 – Изменение газоудерживающей способности теста при совместном использовании солода и закваски

Установлено, что совместное применение пшеничного солода и сухой закваски позволяет увеличить число жизнеспособных клеток микрофлоры, участвующей в процессах брожения ржано-пшеничных полуфабрикатов, что так же служит причиной интенсификации процесса брожения. Так, результаты исследований показывают, что выживаемость молочнокислых бактерий и дрожжевых клеток при использовании исследуемых добавок увеличивается в среднем на 28,0 % и 15,4 % соответственно через 150 сут. хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде (рис. 5.76).

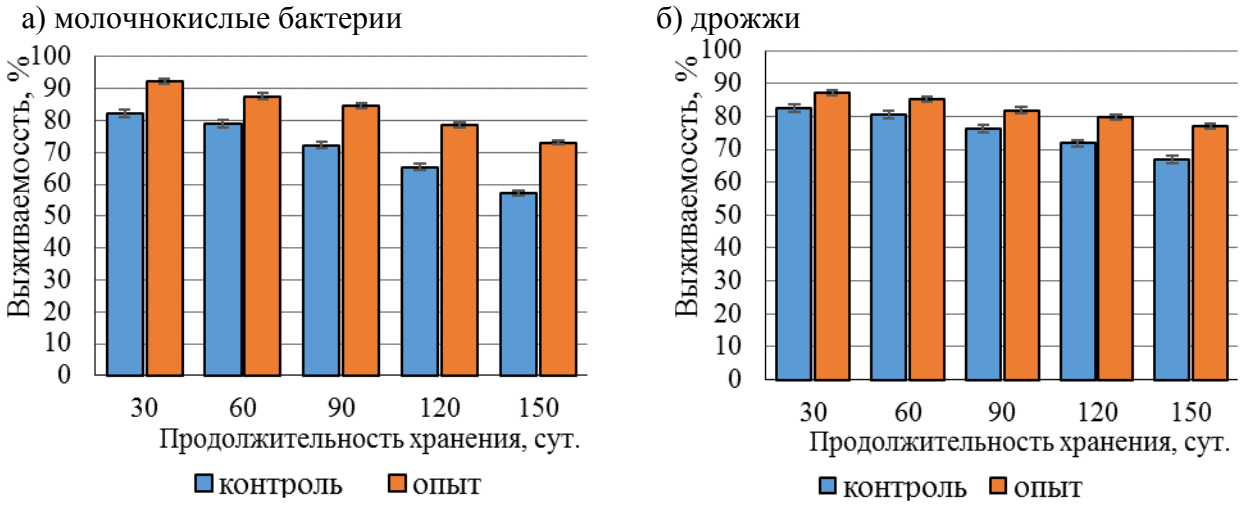


Рисунок 5.76 – Изменение выживаемости микрофлоры теста

Результаты исследования совместного влияния пшеничного солода и сухой закваски молочнокислых бактерий *L. casei ТМБ-Д* на качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов подтверждают эффективность исследуемых добавок в криотехнологии хлебопечения (табл. 5.34).

Таблица 5.34 – Качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением солода и сухой закваски

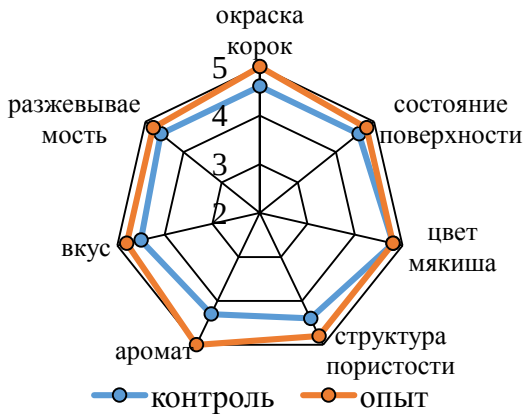
Наименование показателей	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.									
	30		60		90		120		150	
	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт
Влажность, %	46,1	46,6	45,7	46,4	45,4	46,2	45,1	46,0	45,1	46,0
Кислотность, град.	7,4	7,9	7,2	7,8	7,4	7,8	7,4	7,6	7,2	7,6
Пористость, %	57,3	62,7	56,0	62,2	54,4	61,3	50,1	61,1	-	59,7
Удельный объем, $см^3$/100г	180	211	169	199	154	189	143	186	127	182
Крошковатость	0,8	0,7	0,9	0,7	0,9	0,7	1,1	0,8	1,3	0,8
Удельная набухаемость, $см^3$	235	230	239	231	242	233	246	236	249	238

Анализ полученных данных показывает, что применение сухой закваски молочнокислых бактерий совместно с пшеничным солодом в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба позволяет сохранить стабильные показатели качества готовой продукции на протяжении всего срока хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде. Кроме того, исследуемые добавки позволяют снизить негативное влияние низкотемпературной обработки на структурно-механические свойства мякиша ржано-пшеничного хлеба, возникающее в результате длительного хранения теста в замороженном виде (табл. 5.35), о чем свидетельствуют деформационные характеристики мякиша, а также органолептическая оценка опытной партии продукции (рис. 5.77, табл. 5.35).

Таблица 5.35 – Деформационные характеристики мякиша ржано-пшеничного хлеба

Наименование показателей	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.									
	30		60		90		120		150	
	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт
Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	2	2,2	3,1	2,2	3,4	2,4	3,8	2,5	3,9	2,8
Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	2,6	3,7	1,6	3,5	1,3	3,4	0,9	3,2	1,1	3
Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	4,6	5,9	4,7	5,7	4,7	5,8	4,7	5,7	5	5,8
Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$, %	43,5	37,3	66,0	38,6	72,3	41,4	80,9	43,9	78,0	48,3
Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %	56,5	62,7	34,0	61,4	27,7	58,6	19,1	56,1	22,0	51,7

а) 30 сут.



б) 150 сут.

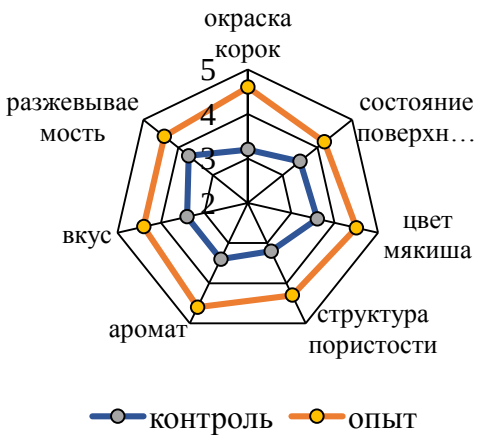


Рисунок 5.77 – Органолептические характеристики изделий с применением солода и закваски

Таблица 5.36 – Цветовые характеристики ржано-пшеничного хлеба с применением солода, приготовленного на основе криотехнологии

Параметр	Мякиш		Корка	
	контроль	опыт	контроль	опыт
L	63,7	61,4	60,4	62,1
a	3,3	3,9	3,2	5,8
b	25,4	20,7	22,5	25,6
C	25,6	21,06	22,7	26,24
DW	48,8	51,40	49,1	47,27

Таким образом, совместное применение пшеничного солода и сухой закваски, содержащей криорезистентный штамм *L. casei ТМБ-Д*, в концентрациях 2,1 и 0,12 и % соответственно позволяет получить хлебопекарную продукцию из смеси пшеничной и ржаной муки на основе замороженных полуфабрикатов с улучшенными структурно-механическими, органолептическими и физико-химическими характеристиками.

На основе проведенных исследований разработана и утверждена техническая документация на ржано-пшеничный хлеб «Злата» на основе замороженных полуфабрикатов (ТУ, ТИ и РЦ 10.72.19–017–2003968806–2022).

На рисунке 5.78 представлена аппаратурно-технологическая схема производства ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. Разработана принципиальная технологическая схема производства ржано-пшеничных сортов хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов (рис. 5.79) с применением сухих заквасок молочнокислых бактерий с криорезистивными свойствами.

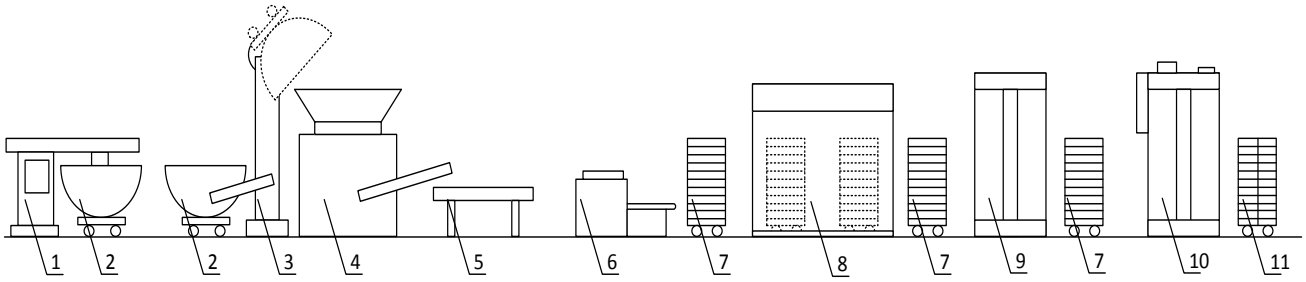


Рисунок 5.78 – Аппаратурно-технологическая схема производства ржано-пшеничных сортов хлеба на основе замороженных полуфабрикатов:

1 – тестомесильная машина; 2 – дежа; 3 – дежеподъемоопрокидыватель; 4 – тестоделительная машина; 5 – стол; 6 – упаковочная машина; 7 – вагонетка; 8 – шкаф шоковой заморозки; 9 – расстоечный шкаф; 10 – хлебопекарная печь; 11 – контейнер

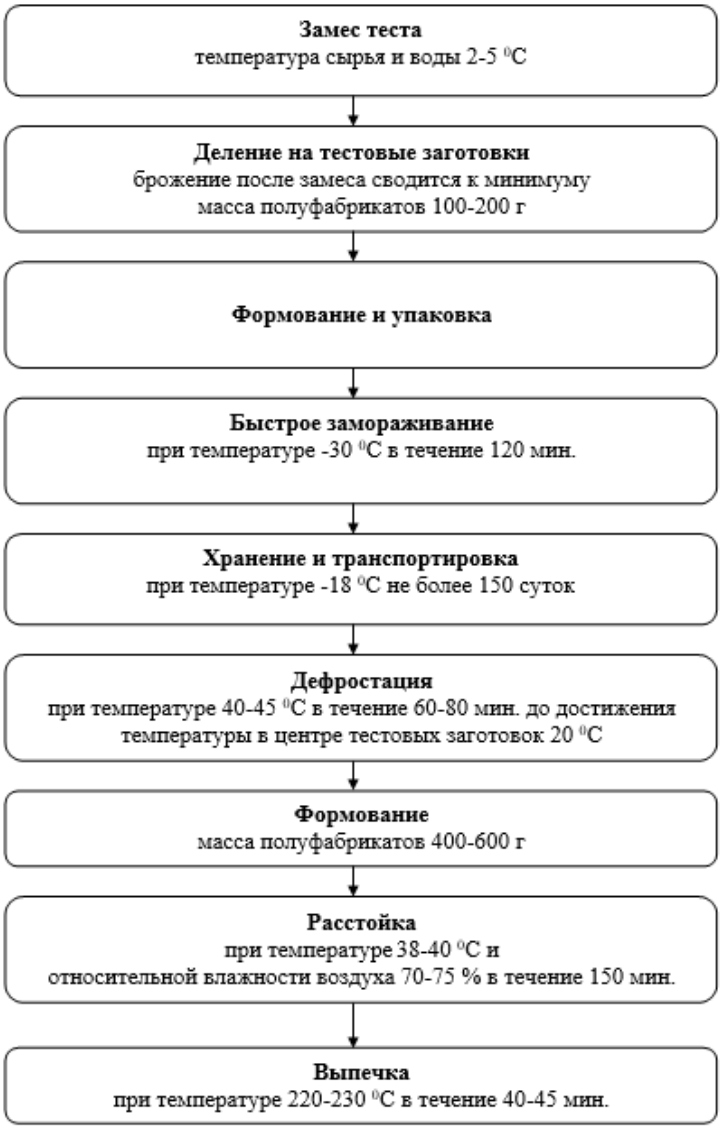


Рисунок 5.79 – Принципиальная технологическая схема производства ржано-пшеничных сортов хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов

5.6 Расчет экономического эффекта производства новых видов ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

В настоящее время доля замороженных хлебобулочных изделий отечественного производства на российском рынке постепенно увеличивается. Основные их потребители данной продукции сегмент HoReCa (отели, рестораны, кафе) и сектор розничной торговли. Потребители проявляют незначительный интерес к изделиям на основе замороженных полуфабрикатов, особенно на продукты для здорового питания. Поэтому необходимо производителям и импортерам проводить активную маркетинговую политику, акцентировать внимание на удобстве их приготовления. В настоящее время данная технология получает все большее распространение и используется при производстве обычных и специальных сортов пшеничного и ржано-пшеничного хлеба, пиццы, слоеных изделий, сдобы и т.п.

Нами была проведена сравнительная оценка экономического эффекта производства новых видов ржано-пшеничного хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов, в двух вариантах: 1 вариант – для предприятий, осуществляющих производство полуфабрикатов и свежевыпеченного хлеба из них; 2 вариант – для предприятий, осуществляющих производство только замороженных полуфабрикатов.

Расчёт основных экономических показателей, характеризующих целесообразность производства нового ассортимента замороженных полуфабрикатов и ржано-пшеничного хлеба, производили на основе разработанных рецептур, оптовых цен на сырье, вспомогательные материалы и укрупненных статей расхода на производство (предоставлены хлебопекарными предприятиями, на которых осуществлялись апробации предлагаемых технологий) [152]. Результаты расчета плановой калькуляции и проекта оптовой цены 1 т хлеба представлены в таблице 5.37.

Результаты проведенных экономических расчетов показывают, что цены на ржано-пшеничный хлеб на основе замороженных полуфабрикатов за 1 шт. массой 0,3 кг, приготовленного по 1 варианту выше на 2,52-3,24 руб. по сравнению с хлебом «Дарницкий», выработанным по традиционной технологии (расчет произведен в ценах на 10.12.22) и лежат в диапазоне 34,08-34,80 руб. Это обусловлено дополнительными затратами на дорогостоящее сырье (главным образом на сухую закваску молочнокислых бактерий), оборудование, тепло и электроэнергию, заработную плату; так затраты на производство ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов в среднем на 9,1 % выше по сравнению с традиционным способом производства.

Таблица 5.37 – Результаты расчета плановой калькуляции и оптовой цены 1 т хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов (в ценах на 10.12.22 г.)

Статьи калькуляции	Затраты на 1 т разработанной продукции, тыс. руб.										
	Хлеб «Дарницкий»	Хлеб «Морозко»		Хлеб «Морозко новый»		Хлеб «Элита»		Хлеб «Янтарный»		Хлеб «Злата»	
		1 вариант	2 вариант	1 вариант	2 вариант	1 вариант	2 вариант	1 вариант	2 вариант	1 вариант	2 вариант
Сырье, основные и вспомогательные материалы	49,12	53,02	53,02	52,64	52,64	53,32	53,32	52,73	52,73	52,22	52,22
Транспортные расходы	4,91	5,30	5,30	5,26	5,26	5,33	5,33	5,27	5,27	5,22	5,22
Расходы на тепло и электроэнергию	9,82	11,66	4,77	10,53	4,74	10,66	4,80	10,55	4,75	10,44	4,70
Расходы на заработную плату	9,82	10,60	7,95	11,58	7,90	11,73	8,00	11,60	7,91	11,49	7,83
Отчисления на соцстрахование	2,95	3,18	2,39	3,47	2,37	3,52	2,40	3,48	2,37	3,45	2,35
Расходы на содержание помещений, оборудования и инвентаря	2,46	2,65	1,33	2,63	1,32	2,67	1,33	2,64	1,32	2,61	1,31
Общехозяйственные расходы	2,46	2,65	2,65	2,63	2,63	2,67	2,67	2,64	2,64	2,61	2,61
Производственная себестоимость	81,54	89,07	77,41	88,75	76,85	89,90	77,85	88,90	76,99	88,04	76,24
Внепроизводственные расходы	1,63	1,78	1,55	1,78	1,54	1,80	1,56	1,78	1,54	1,76	1,52
Полная себестоимость	83,17	90,86	78,96	90,53	78,39	91,70	79,40	90,68	78,53	89,80	77,77
Рентабельность, %	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Прибыль	12,48	13,63	11,84	13,58	11,76	13,75	11,91	13,60	11,78	13,47	11,66
Оптовая цена	95,65	104,48	90,80	104,10	90,15	105,45	91,31	104,28	90,30	103,27	89,43
НДС	9,56	10,45	9,08	10,41	9,02	10,54	9,13	10,43	9,03	10,33	8,94
Отпускная цена	105,21	114,93	99,88	114,52	99,17	115,99	100,45	114,71	99,33	113,60	98,37
Цена за 1 шт. изделия массой 0,3 кг, руб.	31,56	34,48	29,96	34,35	29,75	34,80	30,13	34,41	29,80	34,08	29,51

Однако, затраты на производство замороженных ржано-пшеничных полуфабрикатов в среднем на 13,34 % ниже затрат на производство ржано-пшеничного хлеба на их основе, что весьма привлекательно для малых предприятий, пекарен, предприятий сектора HoReCa, осуществляющих неполный цикл производства ржано-пшеничного хлеба, который включает в себя только хранение замороженных полуфабрикатов, их дефростацию и выпечку. Поэтому на хлебопекарных предприятиях экономически целесообразно реализовывать замороженные полуфабрикаты. Экономический эффект от реализации 1 т замороженных полуфабрикатов составит для хлеба «Морозко» 4,21 тыс. руб., «Морозко новый» – 4,78 тыс. руб., «Элита» – 3,77 тыс. руб., «Янтарный» – 4,64 тыс. руб., «Злата» – 5,40 тыс. руб.

Кроме того, у данного направления имеется весомое конкурентное преимущество перед традиционным производством ржано-пшеничного хлеба – наличие замороженных ржано-пшеничных полуфабрикатов обеспечивает простоту и надежность изготовления, позволяет более гибко реагировать на изменения, происходящие на рынке и производить продукцию в соответствии со спросом, создает возможность транспортирования продукции на различные расстояния без потери качества, регулировать колебания спроса за счет запаса длительного хранения [33].

В работе проведена оценка конкурентоспособности новых видов ржано-пшеничного хлеба с применением экономического критерия – «показатель конкурентоспособности», основанном на определении соотношения сводных технических и экономических параметров [18, 86]. В основе оценки положено сопоставление качественных характеристик разрабатываемой продукции и контрольного образца к затратам, необходимым для достижения заданного качества [86]. При расчете индекса технических параметров учитывали важнейшие характеристики хлебобулочных изделий – пористость, удельный объем, формоустойчивость, крошковатость, удельная набухаемость и общая деформация мякиша опытных и контрольных образцов ржано-пшеничного хлеба (продолжительность хранения полуфабрикатов в замороженном виде составила 90 сут.). Результаты анализа конкурентоспособности разработанных изделий представлены в таблице 5.38.

Результаты расчета показателей конкурентоспособности ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов показывают, что хлебобулочные изделия имеют расчетный интегральный показатель конкурентоспособности 1,16-1,21 за счет более высоких значений сводного индекса технических параметров.

Таблица 5.38 – Оценка конкурентоспособности разработанных видов ржано-пшеничного хлеба

Наименование показателей	Хлеб «Морозко»	Хлеб «Морозко новый»	Хлеб «Элита»	Хлеб «Янтарный»	Хлеб «Злата»
Пористость, %	0,186	0,184	0,189	0,184	0,188
Удельный объем, $см^3$/100г	0,206	0,200	0,201	0,200	0,205
Формоустойчивость	0,148	0,167	0,148	0,130	0,130
Крошковатость	0,161	0,164	0,162	0,159	0,160
Удельная набухаемость, $см^3$	0,170	0,178	0,170	0,178	0,210
Общая деформация мякиша, мм	0,214	0,221	0,231	0,220	0,229
Индекс технических параметров	1,085	1,114	1,101	1,071	1,122
Индекс экономических параметров	0,92	0,92	0,91	0,92	0,93
Показатель конкурентоспособности (k)	1,18	1,21	1,21	1,16	1,21

В результате проведенных расчетов установлено, что показатели конкурентоспособности всех разработанных изделий отвечает условию $k>1$, что подтверждает конкурентоспособность новых видов изделий.

5.7 Заключение к пятой главе

Настоящее исследование позволяет более глубоко представить комплекс механизмов, вызывающих изменение выживаемости ключевых микроорганизмов теста – дрожжей и молочнокислых бактерий при воздействии криообработки, а также биотехнологических процессов в тестовых полуфабрикатах из ржаной и пшеничной муки при низкотемпературном хранении.

Экспериментально установлено, что низкотемпературная обработка полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба отрицательно влияет на созревание тестовых заготовок и качество готовых изделий, что связано с нарушением биохимических и микробиологических процессов, протекающих при брожении теста после дефростации.

Исследованы зависимости изменения биотехнологических свойств теста и качественных характеристик готовой продукции от продолжительности низкотемпературного воздействия. Установлено, что по мере хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде уменьшается скорость кислотонакопления, снижаются газообразующая и газоудерживающая способности теста, его бродильная активность.

Выявлено, что низкотемпературная обработка приводит к снижению значений таких важнейших характеристик готовой продукции как пористость, удельный объем, влажность,

кислотность, крошковатость и удельная набухаемость мякиша. Низкотемпературная обработка приводит также к ухудшению структурно-механических свойств мякиша хлеба из смеси ржаной и пшеничной муки: общая деформация мякиша увеличивается, при этом снижается относительная упругость мякиша ржано-пшеничного хлеба.

Изучен состав микрофлоры тестовых полуфабрикатов из ржаной муки – жидкой и густой заквасок и теста, приготовленного на них. Установлено, что молочнокислые бактерии *L. plantarum* и дрожжи *S. cerevisiae* являются преобладающими видами микрофлоры заквасок и теста, участвующими в процессах брожения ржано-пшеничных полуфабрикатов и формирования качественных характеристик готового хлеба.

Установлены закономерности изменения выживаемости клеток дрожжей и молочнокислых бактерий в зависимости от температуры и продолжительности замораживания как в тестовых полуфабрикатах, так и при низкотемпературной обработке клеточной суспензии.

Установлено, что температурный режим замораживания минус 5-10 ^{0}C оказывает на дрожжевые клетки меньшее отрицательное воздействие, чем режим минус 25-30 ^{0}C. Низкотемпературная обработка значительно влияет на жизнеспособность клеток *p. Pediococcus* и *p. Leuconostoc* - чем ниже была температура замораживания, тем более чувствительными к ее воздействию оказывались клетки данных родов молочнокислых бактерий – загрязнителей хлебопекарного производства, и, напротив, для *p. Lactobacillus* – чем ниже была температура замораживания среды, тем выше сохранялась их жизнеспособность.

Выявлено, что из молочнокислых бактерий ржано-пшеничного теста наиболее устойчивыми к низкотемпературному воздействию являются представители *p. Lactobacillus:* клетки *L. plantarum* и *L. fermentum* обладают криорезистентными свойствами в отличие от клеток *L. delbruckii, L. brevis* и *L. buchneri.* Установлено, что клетки дрожжей и молочнокислых бактерий, находящиеся перед замораживанием в лаг-фазе, проявляют большую устойчивость к низкотемпературной обработке по сравнению с клетками, находящимися в фазе активного роста (лог-фаза).

Выявлены закономерности изменения активности протеолитических и амилолитических ферментов ржаной и пшеничной муки различных сортов в зависимости от pH среды и продолжительности низкотемпературного воздействия. Установлено, что при низкотемпературном хранении наблюдается тенденция к понижению активности кислых протеаз в среднем на 10 %. Активность слабокислых и слабощелочных протеаз под действием отрицательных температур при хранении зависит от вида исследуемой муки. По

мере увеличения продолжительности низкотемпературного воздействия протеолитическая активность пшеничной муки при pH 5,5 снижается в среднем на 20 %, тогда как ржаной напротив увеличивается на 12 %. Под влиянием процессов замораживания и хранения происходит прирост активности слабощелочных протеаз всех исследуемых видов и сортов муки на 15,9 %.

Результаты исследования влияния низкотемпературной обработки на активность амилолитических ферментов муки показывают, что ферментативная активность амилаз снижается на протяжении всего периода исследований независимо от вида и сорта муки, так активность α-амилазы уменьшается в среднем на 60,6 % и 32,4 %, β-амилазы на 26,7 % и 52,1 % для пшеничной муки и ржаной муки соответственно.

Таким образом, настоящее исследование позволяет сделать вывод о том, что помимо существенных изменений в качественном составе и количественном соотношении ключевых микроорганизмов тестовых полуфабрикатов – дрожжей и молочнокислых бактерий под влиянием криообработки происходит также значительное снижение основных ферментов муки – протеаз и амилаз.

Проведены комплексные исследования, направленные на разработку эффективных способов стабилизации качества замороженных ржано-пшеничных полуфабрикатов и основанные на изучении микробиологических, биотехнологических, физико-химических и биохимических процессов, происходящих при низкотемпературном воздействии на тестовые полуфабрикаты.

Обоснована целесообразность использования криорезистентных штаммов молочнокислых бактерий в составе сухой закваски в криотехнологии ржано-пшеничного хлеба для интенсификации процессов брожения полуфабрикатов и улучшения качества готовых изделий, в частности, *L. casei TMB-D, L. casei 32.*

Установлена взаимосвязь между температурными режимами замораживания, хранения, размораживания и количеством жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий и дрожжей ржано-пшеничного теста.

Установлены оптимальные технологические параметры тестоприготовления, замораживания, хранения и дефростации ржано-пшеничных полуфабрикатов, использование которых позволяет сохранить высокую бродильную активность микрофлоры и повысить качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба:

1) время брожения полуфабрикатов перед замораживанием должно быть минимальным, поэтому при замесе следует использовать охлажденную воду до 2-5 ^{0}C; после замеса формовать, упаковывать и немедленно замораживать тестовые заготовки;

2) замораживание полуфабрикатов необходимо производить при температуре минус 30-32 ^{0}С в течение 1,5-2 ч с последующим хранением при температуре минус 18-20 ^{0}С;

3) дефростацию тестовых заготовок целесообразно вести при 40-45 ^{0}С до достижения температуры в центре тестовой заготовки 18-20 ^{0}С.

Регулирование технологического процесса производства ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов можно обеспечить путем поиска молочнокислых бактерий с криорезистентными свойствами, что позволит обеспечить приготовление полуфабрикатов высокого качества в наиболее короткий период времени; создать оптимальные условия жизнедеятельности дрожжей и молочнокислых бактерий в тестовой среде с целью достижения наилучшего качества готовых изделий; получать продукты разнообразного вкуса, используя специфические свойства отдельных штаммов молочнокислых бактерий, в частности, их способность к кислотообразованию, а также увеличить продолжительность хранения полуфабрикатов в замороженном виде.

Получены математические зависимости изменения пористости и удельного объема ржано-пшеничного хлеба от количества сухой закваски лактобактерий (от 0,05 до 1,15 %), дозировки прессованных дрожжей (от 0,5 % до 1,5 %), янтарной кислоты (от 0,05 % до 0,15 %); сукцинатов калия и аммония (от 0,1 % до 0,3 %), сухого молока и сухой молочной сыворотки (от 1% до 6 %) пшеничного солода (от 1% до 6 %), набухающего модифицированного крахмала (от 1 % до 3 %) и ферментной композиции (от 0,003 % до 0,010 %).

В результате анализа полученных зависимостей определены оптимальные концентрации компонентов: сухой закваски молочнокислых бактерий 0,1-0,12 %, прессованных дрожжей 0,7-1,0 %, сухого молока 4 %, сухой молочной сыворотки 3,4%, набухающего кукурузного крахмала 1,3 %, янтарной кислоты 0,08 %, сукцината калия 0,17 % и сукцината аммония 0,15 %, ферментной композиции (в составе ферментной композиции Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG в соотношении 6:2,5:1) 0,0085 %, пшеничного солода 4,2 % к массе муки.

Установлено, что сухие молочные продукты, модифицированные крахмалы, янтарная кислота и ее соли проявляют криопротекторный эффект и повышают выживаемость клеток дрожжей и молочнокислых бактерий в ржано-пшеничном тесте после низкотемпературного хранения.

Разработана криотехнология ржано-пшеничного хлеба на основе использования сухих заквасок молочнокислых бактерий с различными добавками, позволяющими интенсифицировать процесс брожения теста, стабилизировать криорезистентные свойства

ржано-пшеничных полуфабрикатов, увеличить продолжительность хранения полуфабрикатов, а также улучшить качественные характеристики готовых изделий.

На основе проведенных исследований разработана нормативная документация на производство новых видов ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов (приложение Г): хлеб «Морозко» с сухими молочными продуктами (ТУ 001–13981212–2004), хлеб «Морозко новый» с набухающим кукурузным крахмалом (ТУ 10.72.19–011–2003968806–022) , хлеб «Элита» с ферментной композицией (ТУ 10.72.19–016–2003968806–2022) , хлеб «Злата» с солодовыми препаратами (ТУ 10.72.19–017–2003968806–2022), хлеб «Янтарный» с янтарной кислотой или ее солями (ТУ 10.72.19–014– 2003968806–2022);

Проведена апробация разработанных рецептур и технологий на хлебопекарных предприятиях Республики Татарстан (приложение Д).

Разработанные технологические решения позволяют увеличить продолжительность хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде до 5 мес., получить хлебопекарную продукцию с высокими потребительскими характеристиками, а также расширить ассортимент хлебобулочных изделий, приготовленных на основе криотехнологии, увеличить конкурентоспособность продукции. Установлено, что экономический эффект от реализации 1 т разработанных видов замороженных полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба составит от 3,77 до 5,40 тыс. руб.

ГЛАВА 6. НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ЦЕЛЬНОЗЕРНОВОГО ХЛЕБА

6.1 Разработка технологии зернового хлеба на ферментированной молочнокислыми бактериями диспергированной массе

При использовании современных технологий переработки зерна в процессе помола удаляются оболочки, алейроновый слой и зародыш, что приводит к снижению пищевой ценности получаемой муки, так как с этими анатомическими частями зерна удаляются ценные пищевые компоненты - витамины, микроэлементы и пищевые волокна. Способ приготовления хлеба из диспергированной зерновой массы позволяет полностью сохранить основные ингредиенты целого зерна – аминокислоты, белки, витамины группы В, Е, РР, клетчатку и пищевые волокна (оболочку зерна) [4, 80, 98, 102-113, 118, 119].

Зерновые сорта хлеба из-за оптимального сочетания ценнейших пищевых веществ обеспечивают положительное влияние на все жизненно важные органы и системы организма человека. Так высокое содержание клетчатки и пищевых волокон в зерновом хлебе улучшает процесс пищеварения, способствует выведению из организма радионуклеидов, токсинов различной природы происхождения, солей тяжелых металлов и др. Кроме того, пищевые волокна оказывают положительное влияние на обмен веществ, что весьма важно для людей, имеющих избыточную массу тела, положительно воздействуют на микрофлору кишечника. Употребление зерновых сортов хлеба приводит к нормализации желчевыделения, что способствует снижению образования камней в желчевыводящих путях. Выявлено, что при употреблении зернового хлеба также стабилизируется кровяное давление и улучшается кроветворение [4, 80, 102, 119].

Таким образом, зерновые сорта хлеба можно рекомендовать как продукты с высокой пищевой ценностью и рекомендовать их для всех групп населения, а также в качестве лечебного средства при многих заболеваниях современности, таких как сахарный диабет, заболевания желудочно-кишечного тракта, ожирение, атеросклероз и др.

Анализ научно-технической литературы, практических и экспериментальных данных свидетельствует о том, что в силу особенности технологии приготовления тестовых полуфабрикатов, хлеб из целого зерна характеризуется специфическими органолептическими свойствами - низкими показателями объема и формоустойчивости, липким мякишем, что отрицательно влияет на уровень его потребления населением и сдерживает внедрение в производство данной технологии [102].

В процессе диспергирования зерна настолько разрушается его структура, что при тестоведении глиадиновая и глютениновая фракции белка в полной мере не способны образовывать упругопластичный пространственный структурный каркас теста. Кроме того, прорастание зерна при отволаживании приводит к повышению его автолитической активности, отмечается существенный рост активности амилолитических и протеолитических ферментов зерна [4, 102].

На наш взгляд наиболее эффективным способом повышения качества зерновых хлебобулочных изделий является внедрение стадии ферментации диспергированной массы функционально-активными штаммами молочнокислых бактерий. Применение молочнокислой ферментации зерновой массы позволит интенсифицировать процесс кислотонакопления в тесте, снизить содержание фитина, активность амилаз и протеаз зерна, повысить биодоступность минеральных веществ, обеспечить подавление посторонней микрофлоры. Кроме того, различные виды гомо- и гетероферментативных молочнокислых бактерий активно участвуют в формировании вкуса и запаха хлебобулочных изделий, в результате их метаболизма в тесте накапливаются нелетучие и летучие органические кислоты, преимущественно молочная и уксусная, ароматические соединения, продукты протеолиза белков муки и зерна и др. [65 69, 116, 124].

6.1.1 Изучение роста молочнокислых бактерий на диспергированной зерновой массе

Нами были проведены исследования по изучению влияния сухих заквасок молочнокислых бактерий на функционально-технологические свойства диспергированной зерновой массы. В диспергированную зерновую массу вносили исследуемые закваски молочнокислых бактерий в количестве 10^7 КОЕ/г. Ферментацию зерновой массы осуществляли при температуре 37 ^{0}С в течение 4 ч.

О влиянии используемой бродильной микрофлоры на процессы ферментации диспергированной зерновой массы судили по изменению pH среды, накоплению молочной кислоты и молочнокислых бактерий в ферментированной зерновой массе, а также по изменению активности протеолитических и амилолитических ферментов зерновой массы.

Показано, что характер изменения pH диспергированной массы при ферментации (рис. 6.1) зависит от вида вносимой культуры, к концу процесса ферментации pH среды достигает значений 4,5-4,7.

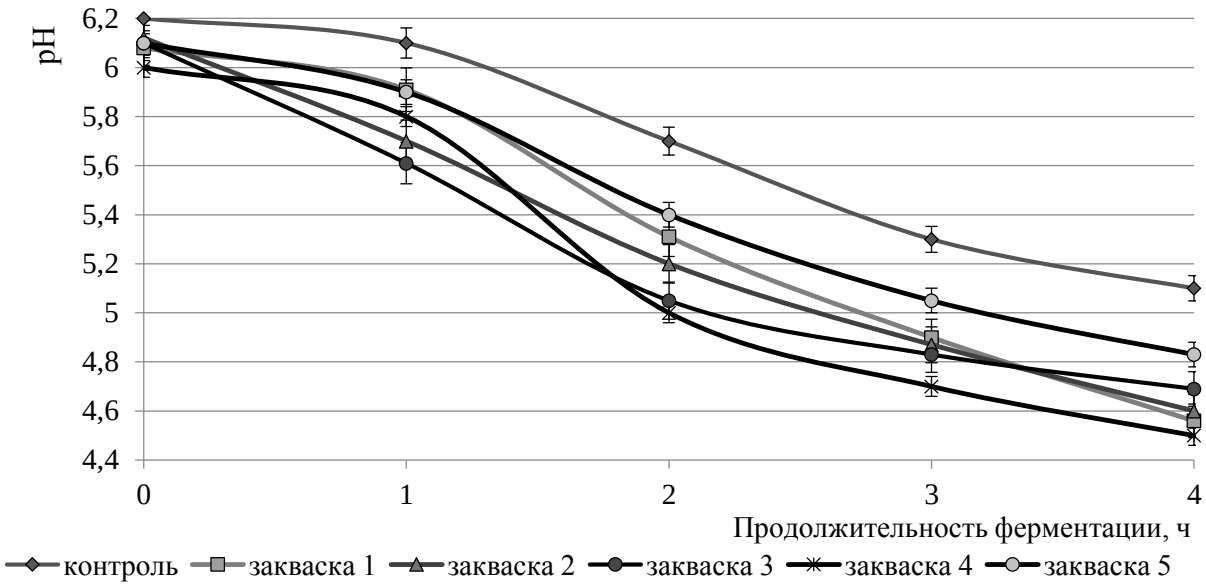


Рисунок 6.1 – Динамика pH при ферментации зерновой массы лактобактериями

Наиболее интенсивно процесс снижения pH отмечается у образцов с закваской 4. Следует отметить, что при выдержке контрольных образцов при температуре 37 ^{0}C также отмечается снижение pH среды до значений 5,3-5,5, что вероятно объясняется развитием дикой кислотообразующей микрофлоры зерна - молочнокислыми, пропионокислыми, уксусными бактериями.

Согласно данным научно-технической литературы, молочнокислая микрофлора теста из диспергированного зерна может быть разнообразна [117]. Доминирующими видами являются лактобактерии видов *L. plantarum* и *L. brevis.* Довольно часто так же встречаются молочнокислые бактерии вида *L. fermentum*, в меньшем количестве *L. bushnerii* и *L. casei*, попадающие в тесто, вероятно, с зерном. Таким образом, при брожении заквасок может протекать как гомоферментативное молочнокислое брожение, так и гетероферментативное.

Об интенсивности кислотонакопления судили по количеству молочной кислоты в исследуемых образцах через 2 и 4 ч после внесения культур молочнокислых бактерий в диспергированную зерновую массу (рис. 6.2).

Установлено, что начальное содержание молочной кислоты в зерновой массе составляет 0,1-0,12 г/см^3 и не зависит от вида вносимой культуры. К концу процесса экзогенной молочнокислой ферментации диспергированной массы количество молочной кислоты втрое превышает первоначальные значения исследуемого показателя. Наибольшее содержание молочной кислоты (0,33-0,36 г/100 г) отмечается в образцах с использованием заквасок 1, 4 и 5.

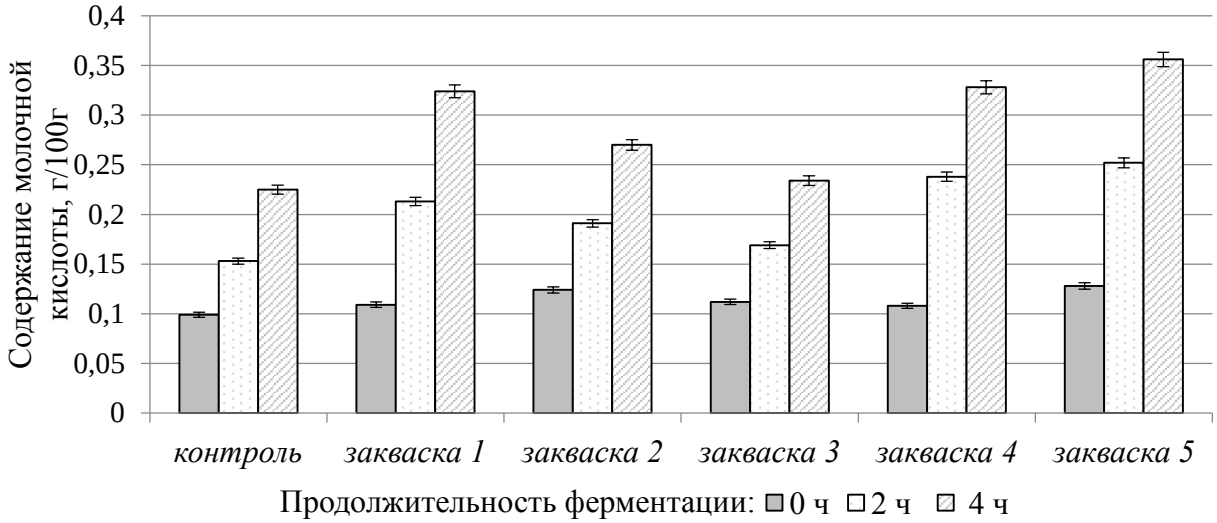


Рисунок 6.2 – Изменение содержания молочной кислоты в зерновой массе в процессе экзогенной молочнокислой ферментации

Основные функционально-технологические характеристики ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Функционально-технологические свойства ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы

Функционально-технологические свойства	Контроль	Закваска 1	Закваска 2	Закваска 3	Закваска 4	Закваска 5
Активная кислотность, pH	5,5	4,2	4,6	4,6	4,0	4,4
Титруемая кислотность, град.	2,5	4,0	3,2	3,0	4,4	3,6
Предельная кислотность, град.	4,2	8,8	7,0	7,2	7,6	6,8
Количество молочнокислых бактерий, КОЕ/г	$9{,}5\cdot10^{6}$	$1{,}2\cdot10^{11}$	$8{,}6\cdot10^{10}$	$6{,}4\cdot10^{10}$	$5{,}3\cdot10^{11}$	$2{,}4\cdot10^{10}$
Амилолитическая активность, ед.акт./г	0,068	0,044	0,049	0,053	0,038	0,050
Протеолитическая активность, ед.акт./г	0,207	0,109	0,167	0,155	0,096	0,121

Полученные экспериментальные данные объясняются активным ростом данных видов микроорганизмов в диспергированной зерновой массе. Количество клеток молочнокислых бактерий через 4 ч ферментации значительно увеличивается и составляет 10^{10}-10^{11} КОЕ/г (табл. 6.1).

Установлено, что по технологическим показателям все исследуемые закваски подходят для производственных целей, о чем свидетельствует быстрая ферментация зерновой массы и максимальное количество жизнеспособных клеток молочнокислых

бактерий, а также уровень титруемой кислотности, что соответствует технологическим требованиям для производства полуфабрикатов и готовых изделий на основе диспергированной зерновой массы.

При изучении характера изменения активности ферментов проросшего зерна пшеницы при использовании культур молочнокислых бактерий установлено, что протеолитическая активность контрольных образцов составляла в среднем 0,207 ед.акт./г, что примерно в 2 раза выше значений данного показателя у полуфабрикатов приготовленных на основе ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы. Наименьшей протеолитической активностью (0,096 ед.акт./г) отличались образцы из зерновой массы с использованием закваски 4.

Результаты исследований влияния молочнокислой микрофлоры на активность амилолитических ферментов отволоженного зерна пшеницы показывают, что амилолитическая активность зерновой массы по истечении времени ферментации снижается в среднем на 20-25 % в зависимости от вида молочнокислой микрофлоры.

Снижение активности амилолитических и протеолитических ферментов за счет применения высокоактивных культур молочнокислых бактерий позволит решить одну из важнейших проблем при производстве зерновых сортов хлеба – нестабильность качественных характеристик полуфабрикатов и готовой продукции, вследствие повышенной активности ферментных систем диспергированной зерновой массы.

При отволаживании зерна крахмальные зерна набухают, увеличиваются в размерах, в результате чего возрастает атакуемость крахмала амилазами, увеличивается количество водорастворимых веществ, и как следствие, снижается вязкость крахмального клейстера. Кроме того, под воздействием протеолитических ферментов в процессе тестоведения также происходит разжижение полуфабрикатов. Многие специалисты в области производства хлеба из цельного зерна сходятся во мнении, что именно этими факторами и обусловлено получение изделий низкого объема, с липким, заминающимся мякишем [4, 80, 102, 118, 119].

В ходе исследований нами установлено, что применение заквасок молочнокислых бактерий позволяет увеличить газообразующую способность теста от 10,2 до 52,6 % в зависимости от их состава, наибольшей газообразующей способностью обладают образцы с применением сухой закваски 4 (рис.6.3).

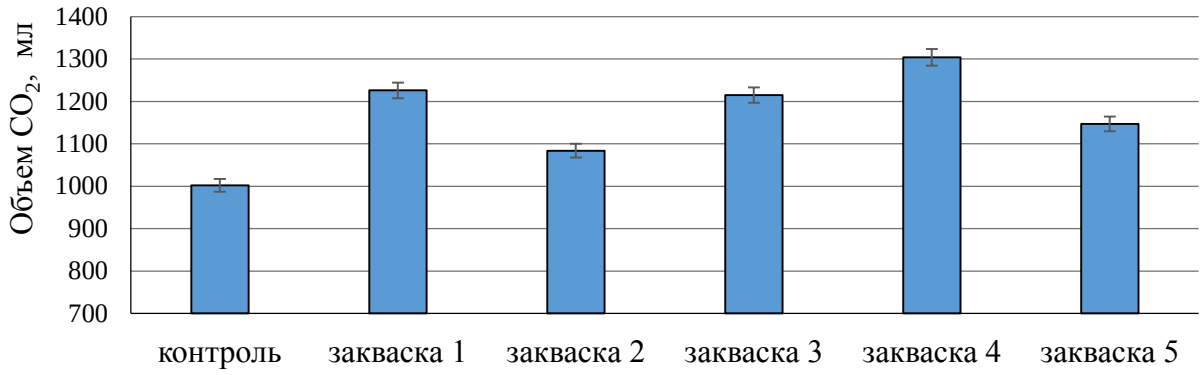


Рисунок 6.3 – Изменение газообразующей способности теста вод воздействием заквасок

Установлено, что внесение сухих заквасок молочнокислых бактерий приводит к улучшению газоудерживающей способности полуфабрикатов, это связано с тем, что молочная кислота приводит к укреплению клейковинного каркаса теста и способствует их газоудерживающей способности. Наибольшей способностью удерживать CO_2 обладают образцы теста, приготовленного на сухих закваскаx 1 и 4 (рис. 6.4).

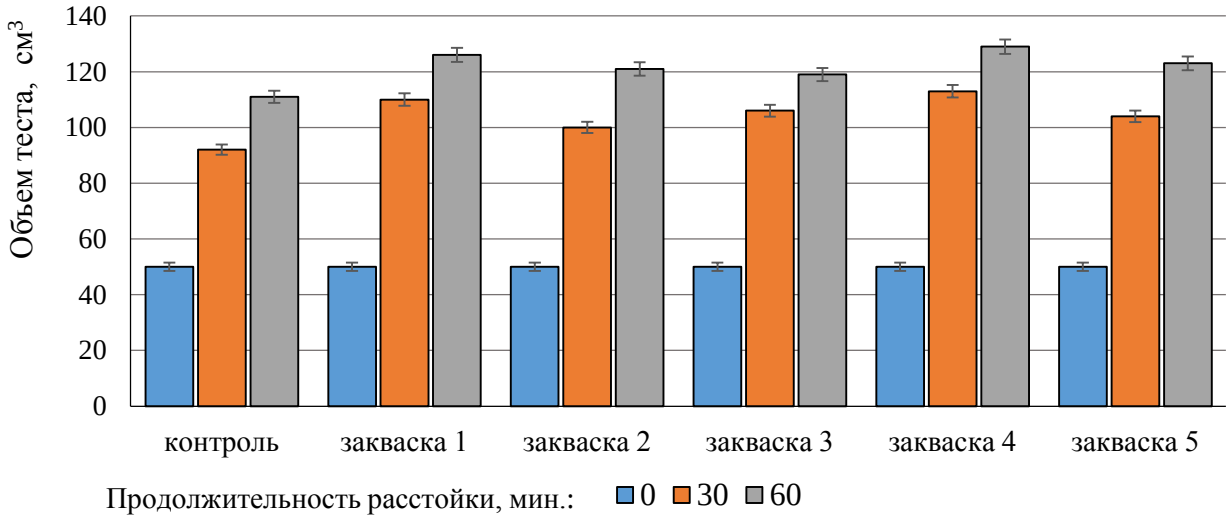


Рисунок 6.4 – Изменение газоудерживающей способности полуфабрикатов под воздействием сухих заквасок

На рисунке 6.5 представлены данные результатов исследования влияния исследуемых сухих заквасок на подъемную силу и бродильную активность тестовых полуфабрикатов.

Наилучшими показателями подъемной силы и бродильной активности обладали образцы тестовых полуфабрикатов с внесением заквасок молочнокислых бактерий 1 и 4 в начальной и конечной точках процесса брожения. Таким образом, результаты исследований

свидетельствуют о перспективности внедрения стадии молочнокислой ферментации зерновой массы в технологии зернового хлеба с целью снижения автолитической активности тестовых полуфабрикатов.

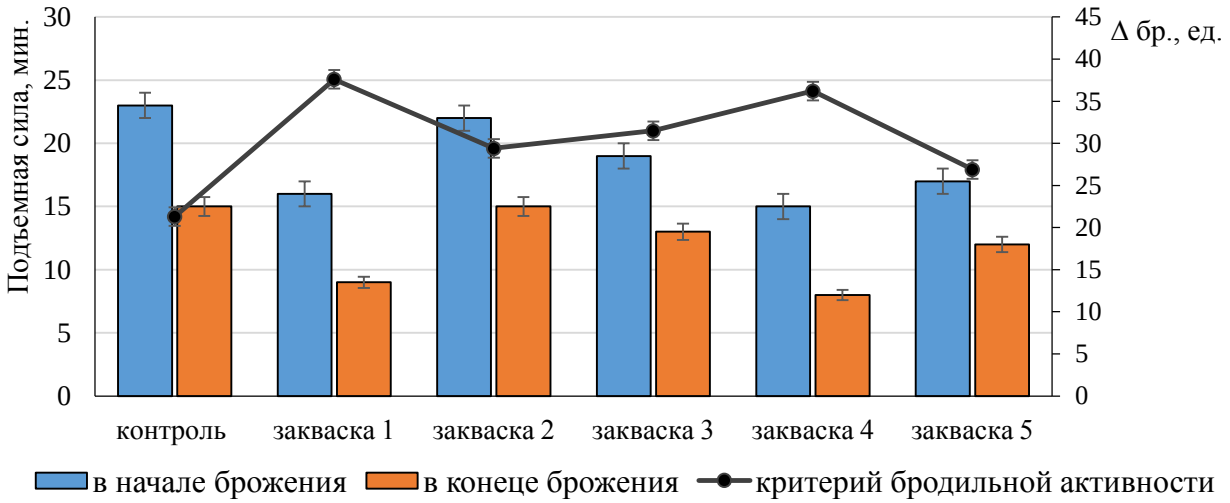


Рисунок 6.5 – Влияние заквасок на биотехнологические свойства теста

Диспергированная зерновая масса является хорошей питательной средой для роста и развития молочнокислых бактерий, при ферментации которой отмечается резкое снижение pH среды до значений 4,0-4,2, увеличение содержания молочной кислоты до 0,36 г/100 г, увеличение количества жизнеспособных клеток до $1\text{-}5\times10^{11}$ КОЕ/г. Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что использование зерновой массы, ферментированной молочнокислыми бактериями, позволяет интенсифицировать процессы созревания полуфабрикатов, сократить продолжительность брожения теста на 40-60 мин., снизить амилолитическую и протеолитическую активность зерновой массы в среднем на 25 % и 50 % соответственно по сравнению с образцами, выработанными по традиционной технологии, что позволяет улучшить реологические свойства теста.

6.1.2 Исследование влияния молочнокислых заквасок на качество зернового хлеба

Далее были проведена серия лабораторных выпечек с целью исследования влияния сухих заквасок молочнокислых бактерий на качество зернового хлеба. За опытные варианты приняты образцы зернового хлеба, приготовленные с добавлением ферментированной зерновой массы молочнокислыми закваскими; за контрольные – без использования молочнокислой ферментации.

В таблице 6.2 представлены физико-химические показатели качества хлеба из целого зерна пшеницы.

Таблица 6.2 – Показатели качества зернового хлеба

Показатели качества	Контроль	Закваска 1	Закваска 2	Закваска 3	Закваска 4	Закваска 5
Влажность, %	47,2	46,9	47,0	47,2	47,0	46,7
Кислотность, град.	2,5	3,8	3,2	2,9	4,0	3,4
Пористость, %	58,2	62,2	61,5	61,0	63,6	63,3
Удельный объем, $см^3$/100 г	214	238	229	226	247	235
Формоустойчивость	0,17	0,26	0,22	0,22	0,28	0,25
Крошковатость, %	2,0	1,8	1,6	1,8	1,6	1,5
Удельная набухаемость, $см^3$	289	282	284	282	285	280
Внешний вид: форма	правильная, хлеб с плоской верхней коркой	правильная, хлеб с заметно выпуклой верхней коркой				
поверхность	слегка шероховатая, без подрывов и трещин					
цвет	золотисто-коричневый	темно-коричневый				золотисто-коричневый
Состояние мякиша: пористость	пористость развитая, без пустот и уплотнений, с вкраплением оболочек зерна					
пропеченность	пропеченный, с липким, заминающимся мякишем	пропеченный, не заминающийся				
Вкус и запах	приятный, свойственный зерновому хлебу, без постороннего привкуса и запаха					

Установлено, что образцы зернового хлеба с применением молочнокислых заквасок отличаются более высокими показателями пористости и удельного объема по сравнению с контрольными образцами, приготовленными с использованием только хлебопекарных дрожжей. Это объясняется стимулирующим действием продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий на дрожжевые клетки, о чем свидетельствует сокращение продолжительности брожения теста в среднем на 40 мин.

Выявлено, что применение зерновой массы, ферментированной молочнокислыми заквасками, позволяет повысить пористость готовых изделий на 5 %, удельный объем на 15 % и формоустойчивость зернового хлеба на 35 % по сравнению с контрольными образцами. Образцы из целого зерна пшеницы с применением ферментированной зерновой массы имели выпуклую верхнюю корку и отличались более выраженным ароматом.

Установлено, что внедрение стадии ферментации молочнокислыми заквасками диспергированной зерновой массы при производстве хлеба из целого зерна пшеницы позволяет увеличить количество органических кислот и ароматических соединений в готовых изделиях (рис. 6.6).

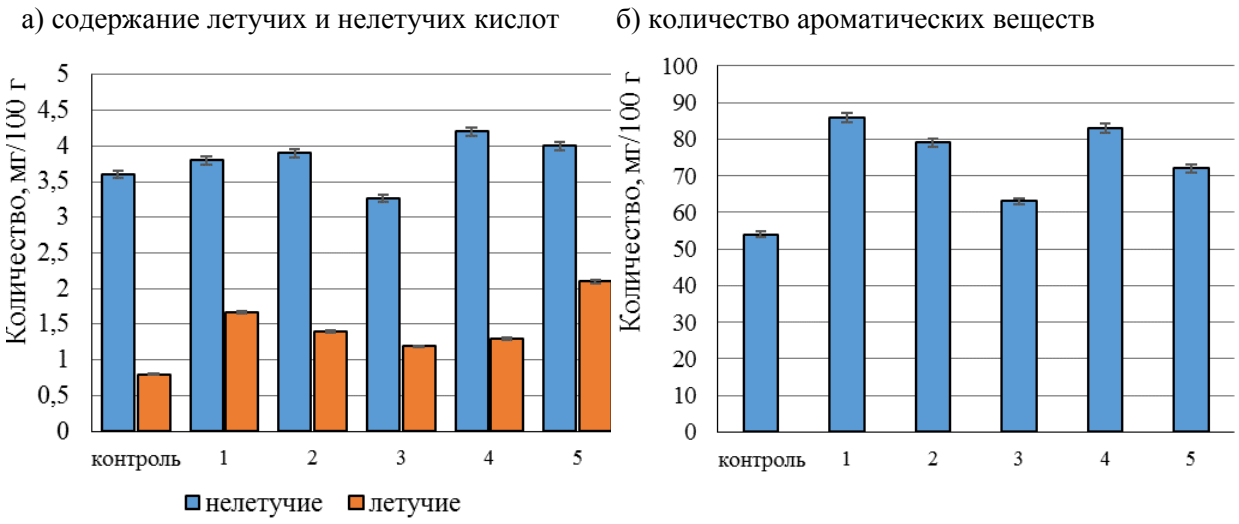


Рисунок 6.6 – Содержание кислот и ароматических соединений в зерновом хлебе

Зерновой хлеб с применением ферментированной зерновой массы имеет большее содержание летучих и нелетучих кислот в среднем в 1,5-1,8 раза по сравнению с изделиями, приготовленными по традиционной технологии. Наибольшее содержание ароматических веществ (80-86 мг/100 г) отмечается в образцах хлеба с использованием молочнокислых заквасок 1 и 4, тогда как в контрольных образцах с применением только хлебопекарных дрожжей содержание ароматических веществ составляет 53 мг/100 г.

Выявлено, что применение зерновой массы, ферментированной молочнокислыми заквасками, позволяет получить изделия, имеющие более светлый мякиш и интенсивно окрашенную корку, о чем свидетельствуют результаты анализа цветности готовой продукции (табл. 6.3).

Установлено, что применение ферментированной зерновой массы оказывает положительное влияние на структурно-механические свойства мякиша зернового хлеба (табл. 6.4), что выражается в увеличении общей деформации мякиша при воздействии внешних нагрузок. Наилучшими структурно-механическими свойствами мякиша обладает хлеб с применением закваски 4, мякиш которого характеризуется большей общей, пластической и упругой деформацией.

Таблица 6.3 – Результаты оценки цветности зернового хлеба

Экспериментальные образцы	Параметр цветности				
	L	a	b	C	DW
мякиш изделий					
Контроль	67,58	3,11	25,77	25,95	51,12
Закваска 1	65,73	3,66	26,29	26,54	49,30
Закваска 2	62,72	3,25	25,09	25,30	48,44
Закваска 3	66,63	3,11	26,27	26,45	49,97
Закваска 4	62,59	3,08	24,87	25,05	48,56
Закваска 5	63,32	2,63	24,48	24,62	49,49
корка изделий					
Контроль	60,09	4,61	23,69	24,13	47,69
Закваска 1	68,43	7,02	31,53	32,29	44,92
Закваска 2	59,22	5,64	23,87	24,52	46,76
Закваска 3	59,65	4,71	23,66	24,12	47,37
Закваска 4	62,13	7,32	27,52	28,47	45,20
Закваска 5	63,68	3,33	25,42	25,63	48,77

Таблица 6.4 – Деформационные характеристики мякиша зернового хлеба, выработанного с применением заквасок

Образцы	Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %
Контроль	1,6	1,9	3,5	45,71	54,29
Закваска 1	2,1	1,8	3,9	53,85	46,15
Закваска 2	1,9	2	3,9	48,72	51,28
Закваска 3	1,8	1,6	3,4	52,94	47,06
Закваска 4	2,3	1,9	4,2	54,76	45,24
Закваска 5	2	1,8	3,8	52,63	47,37

Общеизвестно, что во время хранения хлебобулочные изделия могут подвергаться микробиологической порче. Скорость развития микробиологической порчи зависит от различных факторов, в первую очередь от вида хлебобулочных изделий (рецептуры, кислотности) и технологии их приготовления (опарный, безопарный, ускоренные способы), а также от условия хранения (температура, относительная влажность воздуха, наличие кислорода, продолжительность хранения). Нами было проведено исследование влияния заквасок на изменение микробиологических показателей (КМАФАнМ, количество плесневых грибов, дрожжей) зернового хлеба в процессе хранения.

Результаты исследования показали, что зерновой хлеб с применением ферментированной зерновой массы отличается более низкой микробиологической обсемененностью по сравнению с контролем (табл. 6.5), что объясняется высокой антагонистической активностью исследуемых заквасок против широкого спектра микроорганизмов, в том числе плесневых грибов и дрожжей. Так через 72 ч хранения

зернового хлеба общая обсемененность в образцах с закваскими 1, 4 и 5 была ниже в 10 раз по сравнению с контролем. Следует отметить, что на протяжении всего периода исследования во всех образцах картофельной болезни обнаружено не было, количество плесневых грибов и дрожжей не превышало 10 КОЕ/г.

Таблица 6.5 – Изменение микробиологических показателей в процессе хранения зернового хлеба

Показатели качества	Контроль	Закваска 1	Закваска 2	Закваска 3	Закваска 4	Закваска 5
через 24 ч хранения						
КМАФАнМ	(24±3)×10 ^{2}	(12±3)×10	(58±6)×10	(44±5)×10	(18±3)×10	(22±4)×10
Плесени	менее 10	н.о.	н.о.	менее 10	н.о.	н.о.
Дрожжи	менее 10	н.о.	менее 10	менее 10	н.о.	н.о.
через 72 ч хранения						
КМАФАнМ	(31±5)×10 ^{3}	(63±5)×10	(30±4)×10^{2}	(11±3)×10^{2}	(79±6)×10	(54±5)×10
Плесени	менее 10	н.о.	менее 10	менее 10	н.о.	н.о.
Дрожжи	менее 10	менее 10	менее 10	менее 10	н.о.	н.о.

Примечание: н.о. – не обнаружено

Признаки возникновения плесневения хлебобулочных изделий представлены в таблице 6.6. При исследовании разных видов зернового хлеба на наличие в них плесени в летний период хранения установлено, что в контрольных образцах, признаки плесневения появились на 3сут. (72 ч), в образцах с закваскими 2 и 3 – на 5 сут. (110-115 ч), с закваскими 1, 4 и 5 – на 6 сут. (135-140 ч).

Таблица 6.6 – Признаки возникновения плесневения на образцах зернового хлеба в летний период

Экспериментальные образцы	Признаки плесневения							
	Продолжительность хранения, ч							
	0	24	48	72	98	120	144	168
Контроль	-	-	-	±	+	+	+	+
Закваска 1	-	-	-	-	-	-	±	+
Закваска 2	-	-	-	-	-	±	+	+
Закваска 3	-	-	-	-	-	±	+	+
Закваска 4	-	-	-	-	-	-	±	+
Закваска 5	-	-	-	-	-	-	±	+

Примечание: «-» отсутствие каких-либо признаков плесневения; «±» появление запаха плесневения, но отсутствие колоний; «+» ярко выраженный запах, интенсивное появление колоний плесневых грибов.

На основе проведенных исследований выявлено, что приготовление зернового хлеба из ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы позволяет получить

изделия повышенной микробиологической чистоты. При этом наименьшей обсемененностью обладают готовые изделия с закваскими 1, 4 и 5.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности и перспективности внедрения стадии молочнокислой ферментации диспергированной зерновой массы в технологии зернового хлеба, что позволит снизить автолитическую активность тестовых полуфабрикатов, получить хлеб с высокими физико-химическими, органолептическими, реологическими и микробиологическими характеристиками.

6.1.3 Определение антиоксидантной активности, перевариваемости белков и гликемического индекса зернового хлеба

Одной из основных причин патологических изменений в организме человека, приводящих к развитию многочисленных болезней, таких как сердечно-сосудистые, онкологические заболевая, диабет, болезнь Альцгеймера, а также преждевременному старению, является избыточное накопление в биологических жидкостях кислородных свободных радикалов. Для того чтобы предотвратить окислительный стресс, в последнее время большое внимание уделяется антиоксидантной терапии, т.е. обеспечению в рационе питания нужного количества антиоксидантов, в первую очередь природных.

Клинические и эпидемиологические исследования показывают, что потребление цельного зерна и продуктов на его основе связано со снижением риска развития хронических заболеваний. Польза для здоровья цельного зерна частично объясняется его уникальным фитохимическим составом, так как многие из нутриентов, содержащихся в зерномучных товарах, обладают антиоксидантной активностью. Главной задачей антиоксиданта является перехват свободных радикалов, которые образуются в результате протекания определенных процессов в клетке живого организма. Антиоксиданты зерновых сконцентрированы во внешней оболочке зёрен злаковых культур, где их содержание достигает 80 % от общего количества в зерне. Основными антиоксидантами цельных зерен считаются оксиароматические кислоты, являющиеся производными бензойной и коричной кислот. Помимо этого, в злаковых культурах широко распространены антоцианы, флавоны, алкилрезоцинолы и другие нутриенты, проявляющие антиоксидантные свойства. Это обуславливает рост объёмов производства для населения хлебобулочных изделий из цельного зерна, цельнозерновой муки или с добавлением отрубей [4, 80, 118, 119].

На наш взгляд, перспективным является включение в состав стартовых заквасок для производства продуктов питания, в основе которых лежит процесс ферментации сырья

молочнокислыми бактериями, культур, проявляющих высокую антиоксидантную активность, что позволит не только обогатить пищевые продукты дополнительными антиоксидантами, но и предотвратить окислительные процессы, протекающие в липидной фракции продуктов питания при хранении. В связи с чем задачей дальнейших исследований явилось изучение антиоксидантной активности зернового хлеба с закваскими. Результаты исследования восстанавливающей силы, антирадикальной активности, способности связывать гидроксилы и ингибировать окисление β – каротина водных и спиртовых экстрактов зернового хлеба представлена на рисунке 6.7.

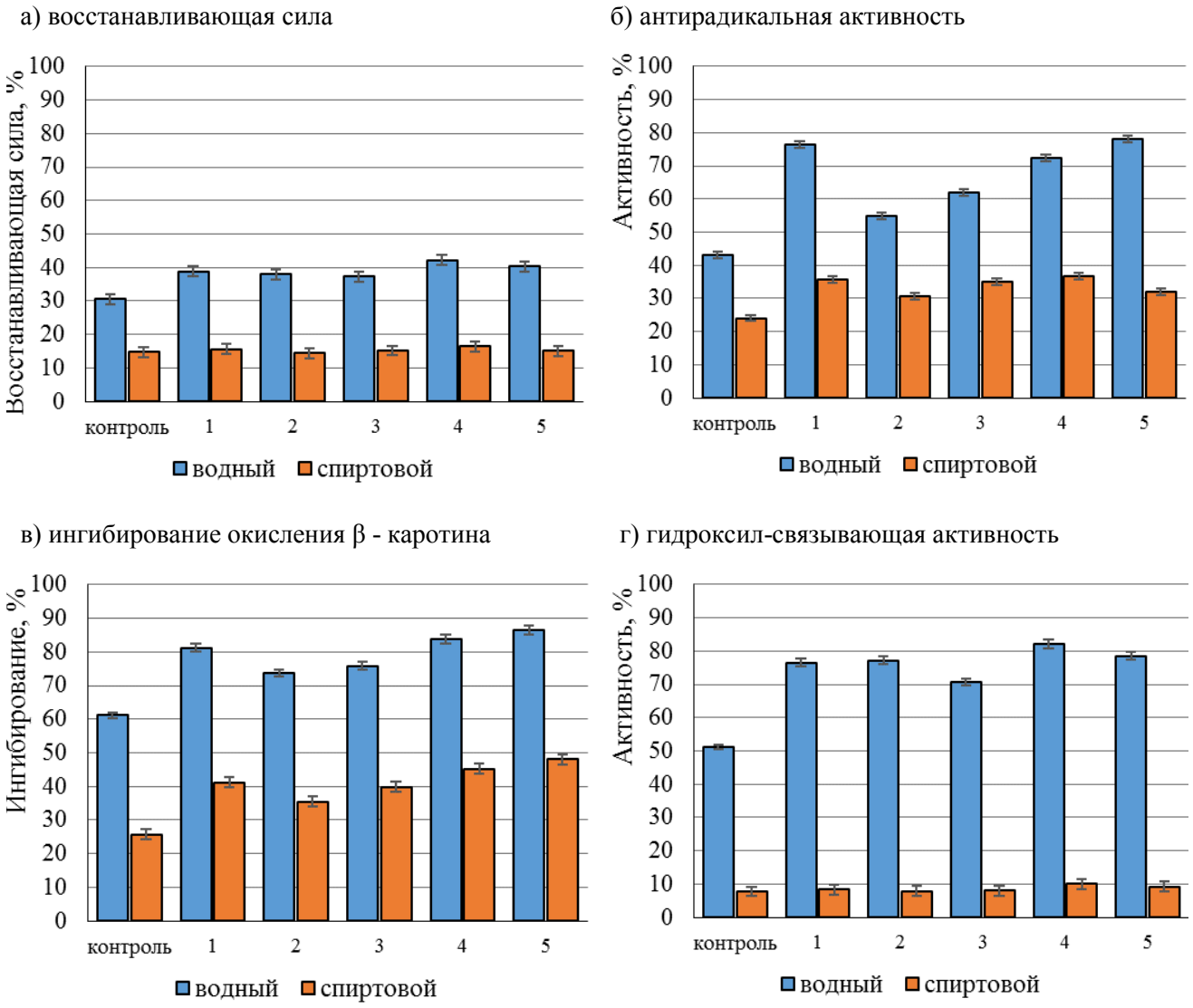


Рисунок 6.7 – Влияние заквасок молочнокислых бактерий на антиоксидантную активность зернового хлеба

Анализ экспериментальных данных свидетельствует о том, что водные экстракты зернового хлеба обладают большей антиоксидантной емкостью по сравнению со спиртовыми. Так, значения восстанавливающей силы, антирадикальной активности и антиоксидантной активности, полученной на модели окисления β-каротина водных экстрактов в 2-2,5 раза выше по сравнению с таковыми у спиртовых, кроме того спиртовые экстракты не проявляют гидроксил-связывающую активность. Восстанавливающая сила водных экстрактов зернового хлеба лежит в диапазоне 30,6-42,2 %, антирадикальная активность – 43,2-78,1 %, способность ингибировать окисление β-каротина – 61,1-86,5 %, гидроксил-связвающая активноть – 51,1-82,1 %, что свидетельствует о высокой антиоксидантной емкости хлебобулочных изделий на основе диспергированной зерновой массы.

Установлено, что применение ферментированной молочнокислыми заквасками зерновой массы позволяет увеличить антиоксидантную активность зернового хлеба. Так, восстанавливающая сила зернового хлеба увеличивается в среднем на 8,7 %, антирадикальная активность на 25,5 %, способность ингибировать окисление β-каротина на 19,1 %, гидроксил-связвающая активность на 25,9 % по сравнению с контролем, что объясняется высоким антиоксидантным потенциалом штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав заквасок (табл. 3.14). Выявлено, что антиоксидантную активность могут проявлять как клетки молочнокислых бактерий, так и их метаболиты, содержание которых накапливается в процессе ферментации диспергированной зерновой массы и брожении теста.

Белявской И.Г. предложена классификация хлебобулочных изделий на основе определения антиоксидантной емкости, позволяющей ранжировать продукцию в зависимости от величины показателя Р (prior)-критерия [17], данный метод основан на определении антиоксидантной активности гидрофильной и липофильной фракции хлебобулочных изделий по катион-радикалу $ABTS^{+}\bullet$.

Анализ результатов исследования антиоксидантной активности гидрофильной и липофильной фракции зернового хлеба по катион-радикалу $ABTS^{+}\bullet$ (рис. 6.8) и приведение экспериментальных данных к величине показателя Р (prior)-критерия позволило выявить, что зерновой хлеб относится к хлебобулочным изделиям со средней антиоксидантной емкостью, согласно классификации, разработанной отечественными учеными [17], поскольку 0,2< Р (prior)-критерий <0,8 (рис. 6.9).

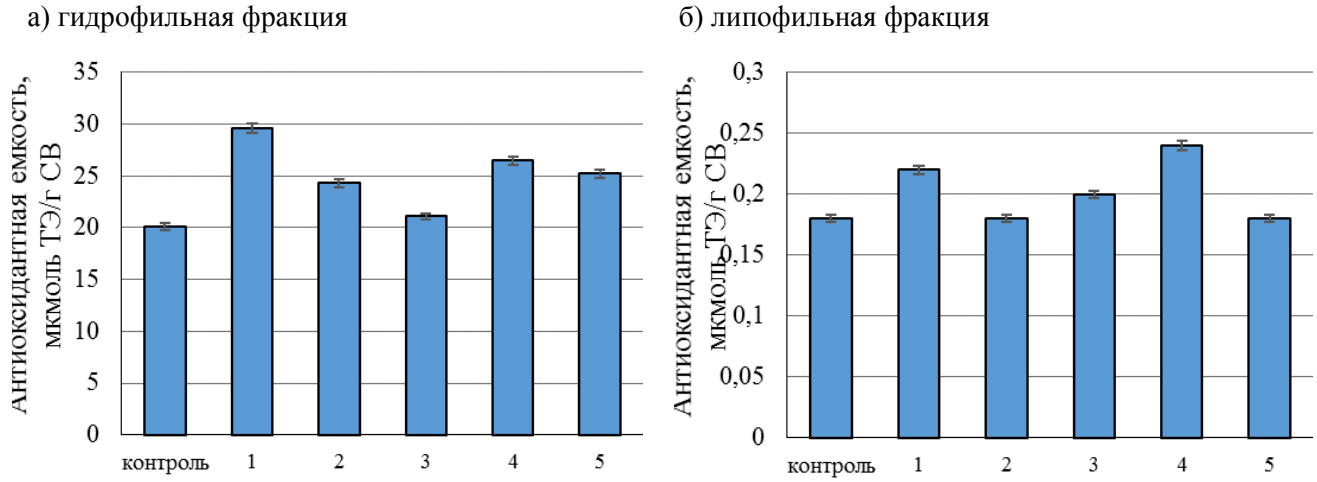


Рисунок 6.8 – Антиоксидантная емкость зернового хлеба по отношению к радикалу $ABTS^{+}\bullet$

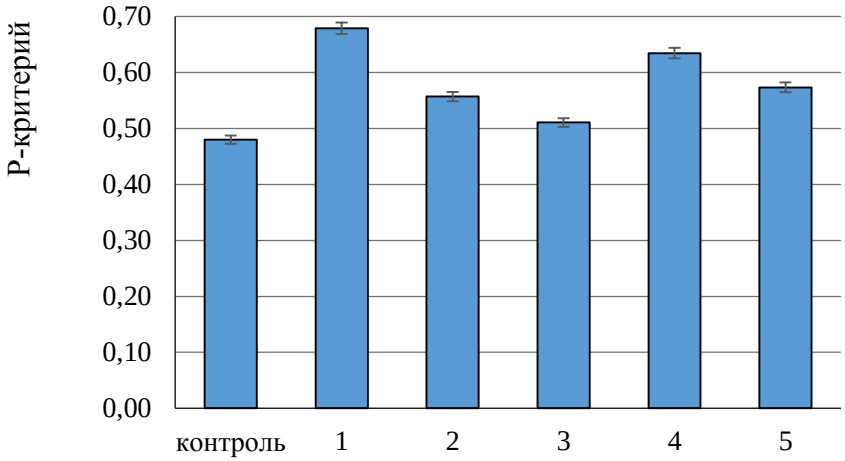


Рисунок 6.9 – Р-критерий образцов зернового хлеба

Значение Р-критерия зернового хлеба составляет 0,48, внедрение стадии ферментации зерновой массы молочнокислыми заквасками 1, 4 и 5 позволяет увеличить данный показатель на 41,4 %, 32,2 % и 19,5 % соответственно.

Таким образом, результаты исследований показывают, что внедрение стадии молочнокислой ферментации диспергированной зерновой массы в технологии зернового хлеба позволяет увеличить антиоксидантную емкость хлебопекарной продукции.

Далее было изучена перевариваемость белков опытных образцов зернового хлеба в системе «пепсин-трипсин». Результаты исследования показывают, что характер кривых, отображающих динамику накопления продуктов протеолиза под действием на белок изделий системой «пепсин-трипсин» имеют схожий характер и существенно не зависят от варианта эксперимента (рис. 6.10). Однако, наибольшее содержание тирозина через

360 мин. гидролиза отмечается в образцах, выработанных с применением ферментированной зерновой массы, что обусловлено, во-первых, высокой протеолитической активностью исследуемых штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав заквасок, а во-вторых, их высокой кислотообразующей способностью, поскольку повышенная кислотность среды также способствует гидролизу белков муки.

Из разработанных видов зернового хлеба наибольшей перевариваемостью отличаются образцы, с закваскими 1 и 4, количество образовавшегося тирозина в результате гидролиза белка системой «пепсин-трипсин» данных образцов составляет 50,9 и 49,3 мкг/см^3 соответственно, против 42,6 мкг/см^3 для контрольного образца. Таким образом, новые виды хлебобулочных изделий отличаются лучшей перевариваемостью белка по сравнению с традиционным зерновым хлебом.

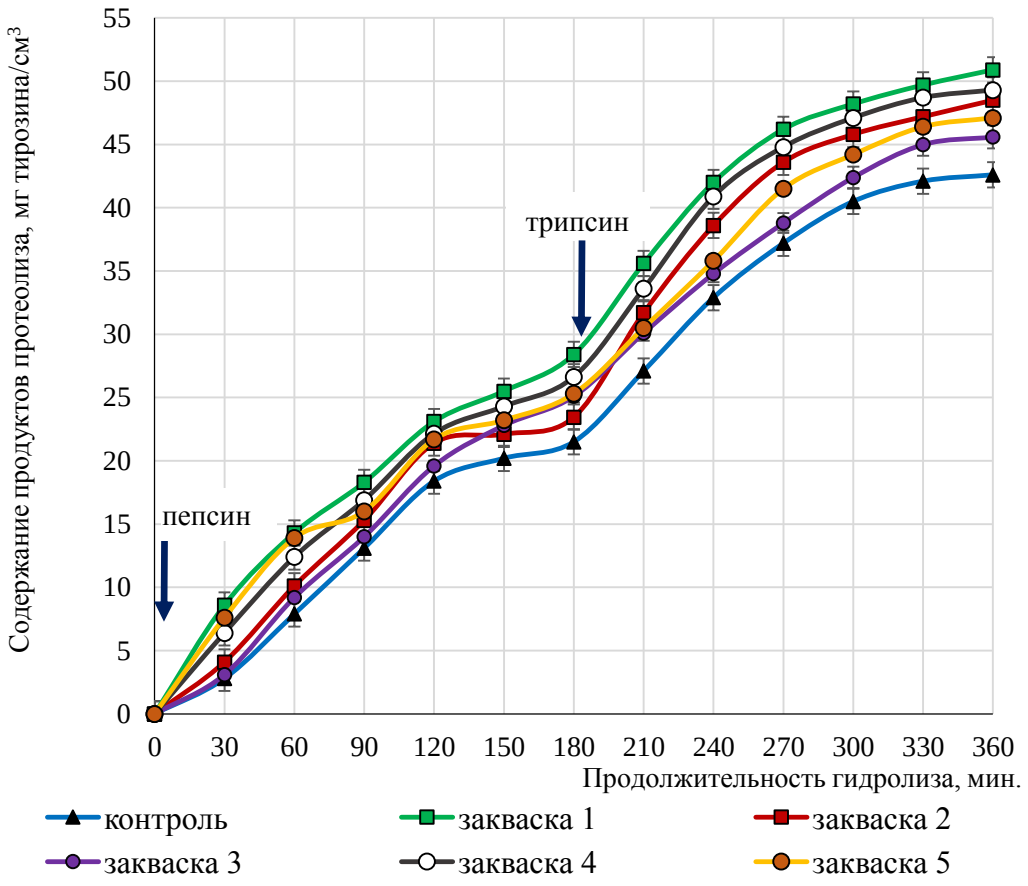


Рисунок 6.10 – Перевариваемость белковых веществ изделий в системе «пепсин – трипсин»

Одной из важнейших характеристик пищевой продукции является гликемический индекс, отображающий скорость адсорбции углеводов продукта в организме человека. Следующей задачей исследований явилось изучение скорости расщепления углеводов по

изменению уровня глюкозы в крови после приема разработанных хлебобулочных изделий на основе ферментированной зерновой массы. В качестве эталона служила чистая глюкоза, гликемический индекс которой составляет 100 %.

Выявлено, что характер изменения уровня глюкозы в крови при употреблении разработанных видов хлебобулочных изделий существенно не зависит от варианта эксперимента (рис. 6.11). Пик уровня глюкозы в крови отмечается через 30 мин. употребления зернового хлеба и составляет в среднем 5,6-5,8 ммоль/л, затем уровень глюкозы плавно снижается и достигает значений 4,9 ммоль/л через 120 мин. эксперимента. Это обусловлено большим количеством пищевых волокон, содержащихся в зерне.

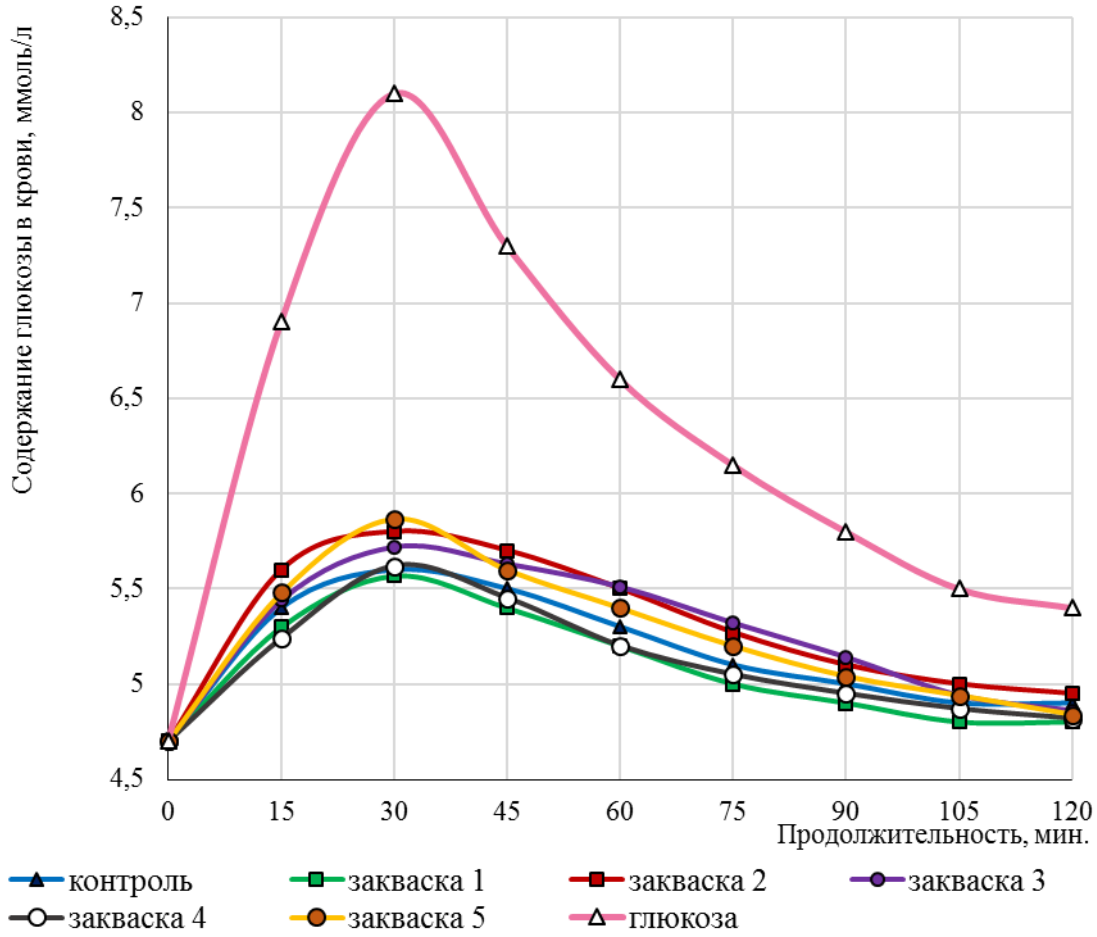


Рисунок 6.11 – Уровень глюкозы в крови после употребления зернового хлеба

В результате сравнительной оценки площадей под гликемическими кривыми после употребления исследуемых продуктов были рассчитаны гликемические индексы хлебобулочных изделий (рис. 6.12). Установлено, что гликемический индекс контрольных образцов составляет 40,1 %, опытных образцов – с применением ферментированной зерновой массы до 46,8 %.

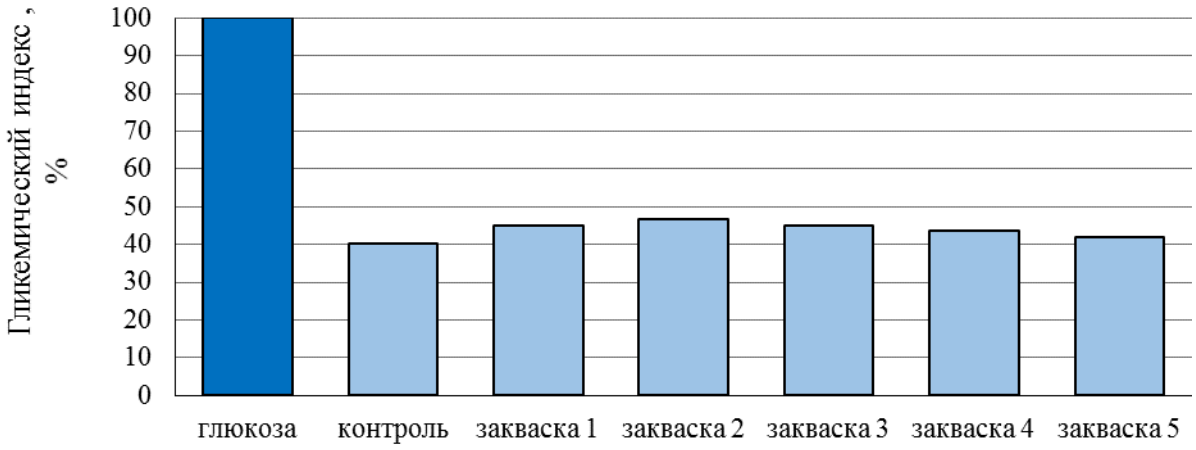


Рисунок 6.12 – Гликемический индекс зернового хлеба

Анализ представленных данных позволяет отнести разработанные изделия к категориям продуктов с низким гликемическим уровнем (не выше 55%) согласно классификации ВОЗ и могут быть рекомендованы для включения в рацион питания людей с целью профилактики сахарного диабета.

Таким образом, результаты исследования показали, что лучшими физико-химическими, органолептическими, реологическими и микробиологическими показателями качества обладают образцы зернового хлеба, выработанные с использованием молочнокислой закваски *L. casei 32*, использование которой позволяет снизить автолитическую активность в тестовых полуфабрикатах и получить продукцию с улучшенными потребительскими характеристиками. Внедрение стадии молочнокислой ферментации зерновой массы позволяет повысить антиоксидантную емкость зернового хлеба, оказывает положительное влияние на его перевариваемость. Новые виды зерновых сортов хлеба относятся к пищевым продуктам с низким гликемическим индексом.

6.1.4 Исследование сроков и условий хранения ферментированной зерновой массы

Приготовление ферментированной молочнокислыми заквасками зерновой массы даже на предприятиях с полным циклом производства зернового хлеба из диспергированной зерновой массы требует дополнительных затрат на осуществление самого процесса ферментации – дополнительных площадей, чанов для брожения и т.п., помимо затрат на приобретение заквасок и времени на осуществление ферментации. В связи с чем целесообразным представляется применение ферментированной зерновой массы как охлажденного или замороженного полуфабриката для замеса теста. При предложенной схеме процесс ферментации может осуществляться на крупном

предприятии, а замес теста и приготовление широкой линейки хлебобулочных изделий на предприятии малой мощности или в пекарне.

Задачей настоящего этапа работы было установить сроки и условия хранения ферментированной зерновой массы.

В качестве интегрального критерия при определении продолжительности хранения полуфабриката использовали результаты анализа функционально-технологических свойств зерновой массы, полученной путем молочнокислой ферментированной, а также количества санитарно-показательной микрофлоры и общепринятые качественные характеристики готовой продукции. Первоначально были проведены исследования по определению предельных сроков хранения ферментированной зерновой массы в охлажденном виде при температуре ±2 ^{0}С массой 0,5 кг. В качестве объекта исследования выступала закваска 4, хорошо зарекомендовавшая себя в предыдущих исследованиях. В таблице 6.7 представлены данные по изменению функционально-технологических свойств ферментированной зерновой массы в зависимости от продолжительности хранения в охлажденном виде.

Таблица 6.7 – Функционально-технологические свойства ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы

Функционально-технологические свойства	Продолжительность хранения, сут.										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Титруемая кислотность, град.	4,4	4,8	4,9	5,0	5,0	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
Количество молочнокислых бактерий, lg КОЕ/г	11,73	11,84	11,98	12,07	12,18	12,11	12,08	11,68	11,02	10,54	10,30
Амилолитическая активность, ед.акт.	0,038	0,038	0,031	0,028	0,028	0,026	0,020	0,020	0,017	0,017	0,017
Протеолитическая активность, ед.акт.	0,207	0,229	0,263	0,275	0,291	0,221	0,198	0,191	0,184	0,184	0,180

Установлено, что в процессе хранения наблюдается увеличение титруемой кислотности ферментированной массы с 4,4 до 5,1 град., в течение первых 5 сут. хранения в охлажденном виде, при этом происходит прирост клеток молочнокислых бактерий. В дальнейшем отмечается снижение числа жизнеспособных клеток до значений 2×10^{10} КОЕ/г, что связано, по-видимому, с уменьшением количества питательных веществ и неблагоприятными условия для жизнедеятельности. Выявлено, что по мере хранения зерновой массы ее амилолитическая активность снижается и к концу эксперимента составляет 0,017 ед.акт./г. Протеолитическая активность, напротив, растет в первые 4 сут. хранения до значений 0,291 ед. акт./г с последующим ее уменьшением до значений 0,180 ед. акт./г.

Оценка микробиологических показателей ферментированной зерновой массы свидетельствуют о высокой антагонистической активности закваски, так количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и дрожжей существенно не изменяется при хранении зерновой массы в охлажденном виде, плесневые грибы не обнаруживаются по истечении 7 сут. хранения (табл. 6.8).

Таблица 6.8 – Изменение микробиологических показателей в процессе хранения зерновой массы

Показатели	Продолжительность хранения, сут.										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
КМАФАнМ, КОЕ/г	$1{,}3\cdot10^{11}$	$11\cdot10^{11}$	$14\cdot10^{11}$	$19\cdot10^{11}$	$22\cdot10^{11}$	$29\cdot10^{11}$	$26\cdot10^{11}$	$24\cdot10^{11}$	$20\cdot10^{11}$	$24\cdot10^{11}$	$28\cdot10^{11}$
Плесени, КОЕ/г	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	менее 10	менее 10	менее 10
Дрожжи, КОЕ/г	$14\cdot10^{2}$	$31\cdot10^{2}$	$44\cdot10^{2}$	$62\cdot10^{2}$	$68\cdot10^{2}$	$85\cdot10^{2}$	$58\cdot10^{2}$	$39\cdot10^{2}$	$4\cdot10^{2}$	$0{,}7\cdot10^{2}$	$0{,}3\cdot10^{2}$

Примечание: н.о. – не обнаружено

Результаты исследования влияния продолжительности хранения ферментированной зерновой массы на качественные характеристики хлеба представлены в таблице 6.9.

Таблица 6.9 – Изменение показателей качества зернового хлебав зависимости от продолжительности хранения ферментированной зерновой массы в охлажденном виде

Показатели	Продолжительность хранения, сут.										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Кислотность, град.	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	8,0	8,2	8,2
Влажность, %	47,6	47,6	47,6	47,6	47,6	47,6	47,5	47,5	47,2	47,0	47,0
Пористость %	61,5	61,6	61,5	61,2	61,4	61,4	61,5	61,3	60,2	59,6	59,1
Удельный объем, $см^3/100$ г	204,2	204,8	203,6	204,0	204,8	203,6	203,9	204,0	198,2	195,4	190,7
Крошковатость	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8
Удельная набухаемость, $см^3$	230	231	230	228	230	230	228	230	230	232	232
Внешний вид: форма	правильная, хлеб с заметно выпуклой верхней коркой								правильная, хлеб с плоской верхней коркой		
поверхность	слегка шероховатая, без подрывов и трещин								слегка шероховатая, с небольшими трещинами		
цвет	темно-коричневый										
Состояние мякиша: пористость	пористость развитая, без пустот и уплотнений, с вкраплением оболочек зерна								пористость не развитая, поры расположены неравномерно		
пропеченность	пропеченный, не заминающийся										
Вкус и запах	приятный, свойственный зерновому хлебу, без постороннего привкуса и запаха								не выраженный, без постороннего привкуса и запаха		

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что через 7 сут. хранения ферментированной молочнокислыми заквасками зерновой массы в охлажденном виде физико-химические показатели зернового хлеба (кислотность, пористость, удельный объем, крошковатость и удельная набухаемость мякиша) соответствуют первоначальным значениям, по органолептическим показателем образцы соответствуют требованиям к качеству зернового хлеба. По мере увеличения сроков хранения зерновой массы отмечается снижение как физико-химических, так и органолептических характеристик зернового хлеба, в частности, отмечается увеличение кислотности с 7,9 град. до 8,2 град., снижение пористости и удельного объема на 2,4 и 6,6 % соответственно, на поверхности изделий появляются трещины, мякиш характеризуется не развитой пористостью с неравномерно расположенными порами, изделия не имеют ярко выраженного хлебного вкуса и аромата.

Таким образом, максимальный срок хранения ферментированной зерновой массы при холодильном хранении (температура ±2 ^{0}С) составляет 7 сут., рекомендованный срок реализации – 5 сут. (с учетом коэффициента 1,5).

Далее были проведены исследования по определению предельных сроков хранения ферментированной зерновой массы в замороженном виде. На данном этапе эксперимента использовали шоковое замораживание полуфабриката массой 0,5 кг, упакованного в полиэтиленовые пакеты, при температуре минус 30 ^{0}С в течение 3 ч, с последующим хранением при температуре минус 18-20 ^{0}С.

Результаты исследования влияния продолжительности хранения в замороженном виде ферментированной зерновой массы на изменение ее функционально-технологических свойств представлены в таблице 6.10.

Таблица 6.10 – Функционально-технологические свойства ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы после низкотемпературной обработки

Функционально-технологические свойства	Продолжительность хранения, сут.										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Титруемая кислотность, град.	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
Количество молочнокислых бактерий, lg КОЕ/г	11,73	11,66	11,61	11,60	11,56	11,51	11,51	11,32	11,09	10,73	10,49
Амилолитическая активность, ед.акт./г	0,038	0,026	0,026	0,022	0,018	0,018	0,020	0,020	0,024	0,020	0,018
Протеолитическая активность, ед.акт./г	0,207	0,200	0,187	0,182	0,176	0,171	0,160	0,145	0,124	0,119	0,102

Установлено, что в процессе низкотемпературного хранения не происходит изменений значения титруемой кислотности ферментированной массы, при этом наблюдается незначительное снижение количества молочнокислых бактерий (на 10,6 %), однако отмечается существенное снижение (в 2 раза) ферментативной активности полуфабриката – амилолитических и протеолитических ферментов.

Важно было изучить степень влияния продолжительности хранения ферментированной зерновой массы в замороженном виде на процесс брожения и созревания тестовых полуфабрикатов, а также качество готовой продукции.

В ходе исследований установлено, что после низкотемпературного воздействия газообразующая способность теста снижается примерно на 12,1 % по сравнению с первоначальными данными, по мере увеличения продолжительности хранения газообразующая способность теста постепенно снижается (рис. 6.13) и к концу эксперимента достигает 931 мл CO_2.

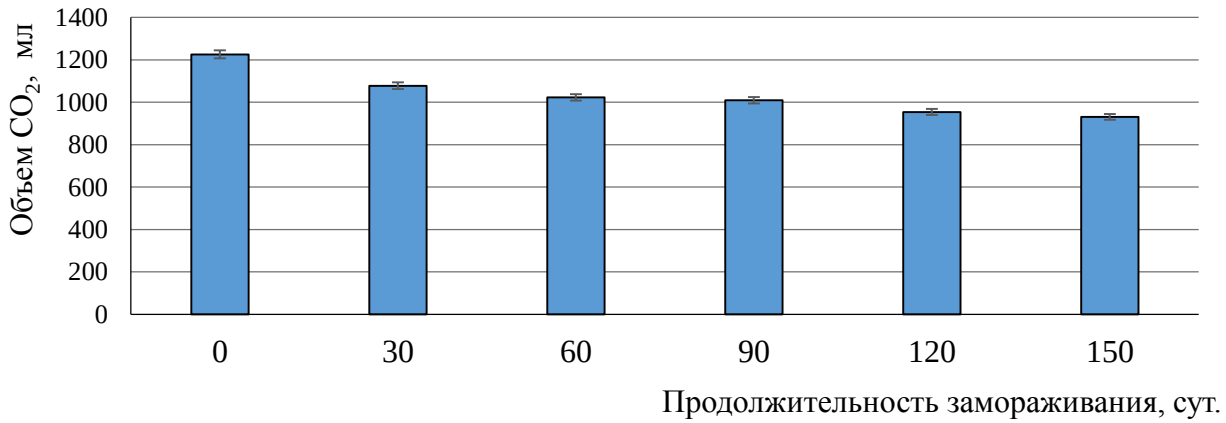


Рисунок 6.13 – Изменение газообразующей способности теста на дефростированной диспергированной зерновой массе

Установлено, что при увеличении продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде снижается также газоудерживающая способность теста (рис. 6.14). Так, газоудерживающая способность образцов, подвергавшихся низкотемпературной обработке в течение 60 сут., в среднем ниже на 14,5 %, через 150 сут. – на 24,9 % относительно первоначальных значений (образцов, выработанных по традиционной технологии).

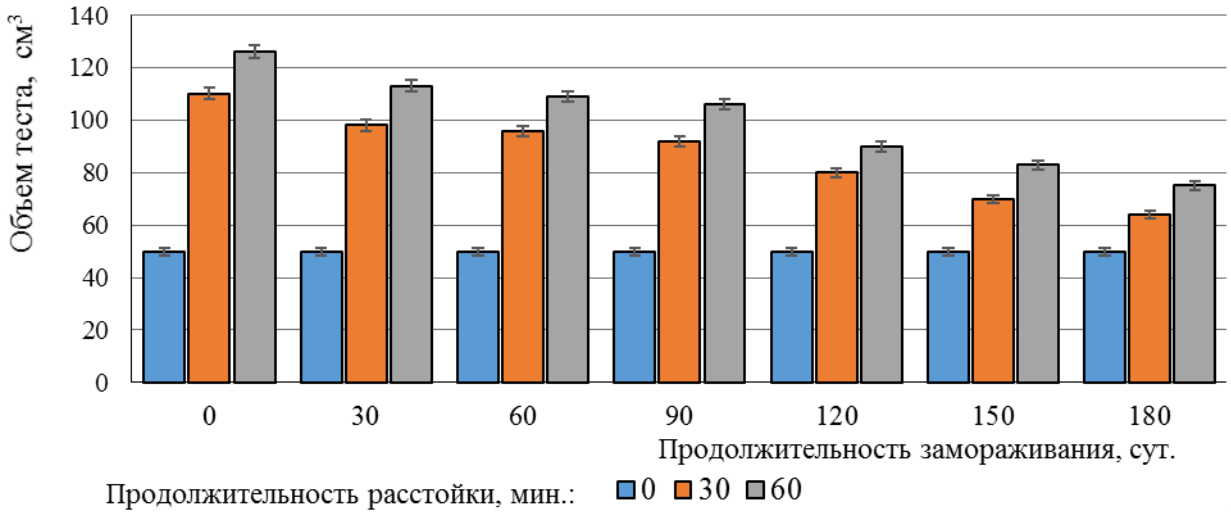


Рисунок 6.14 – Изменение газоудерживающей способности полуфабрикатов на дефростированной диспергированной зерновой массе

В результате дальнейших исследований было установлено, что по мере увеличения продолжительности хранения диспергированной зерновой массы в замороженном виде уменьшается диаметр расплывшегося шарика полуфабриката в процессе расстойки (рис. 6.15). В начальный момент расстойки контрольный образец имеет диаметр шарика теста 63 мм, что на 10,2 % больше, чем у образцов, подвергавшихся низкотемпературному хранению в течение 30 сут. При увеличении продолжительности хранения теста до 150 сут. данный показатель снижается на 13,9 % относительно исходных значений. Через 60 мин. расстойки полуфабрикатов данная разница составляет 19,2 % и 33,4 % для 90 сут. и 150 сут. хранения соответственно по сравнению с контролем.

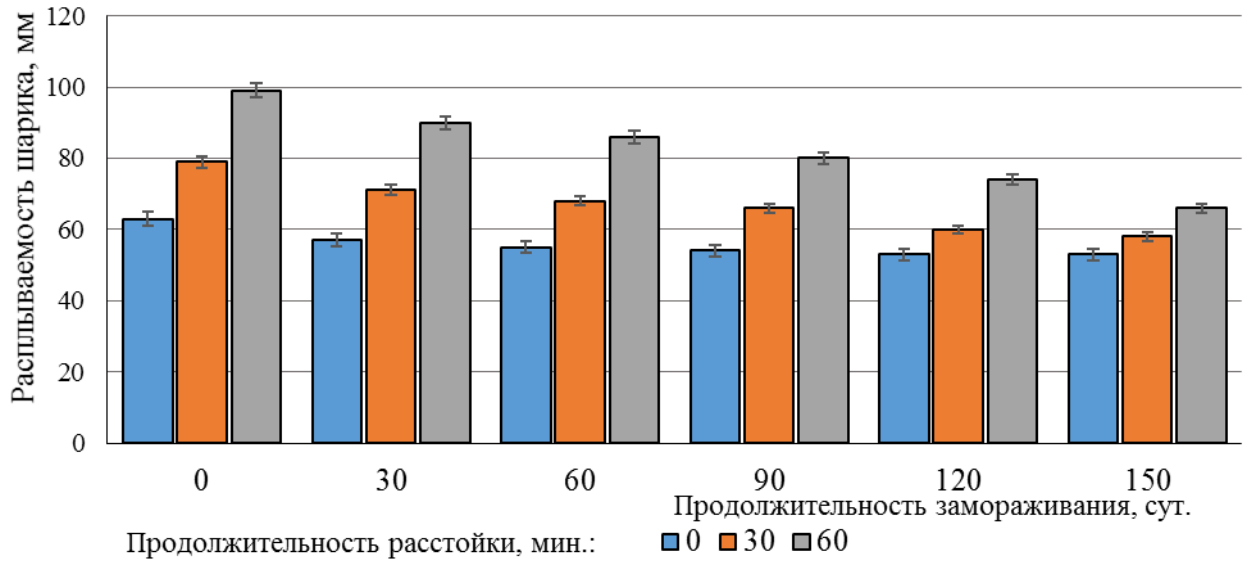


Рисунок 6.15 – Изменение расплываемости шарика теста в процессе расстойки

На рисунке 6.16 представлены данные результатов исследования изменения подъемной силы и бродильной активности тестовых полуфабрикатов, выработанных на основе дефростированной зерновой массы.

Анализ полученных данных свидетельствует о снижении бродильной активности полуфабрикатов, выработанных на ферментированной зерновой массе после длительного низкотемпературного хранения (более 90 сут.), значение исследуемого критерия к концу эксперимента (через 150 сут.) составляет 27,6, что примерно на 26,6 % меньше исходных значений.

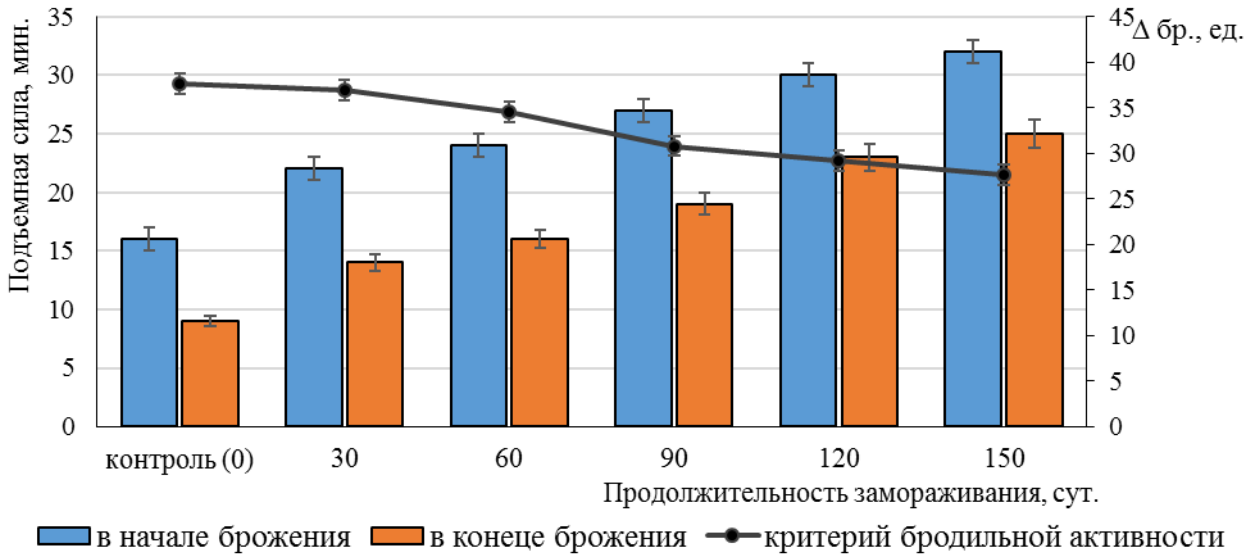


Рисунок 6.16 – Влияние низкотемпературной обработки ферментированной зерновой массы на биотехнологические свойства теста

В таблице 6.11 представлены физико-химические показатели качества хлеба из целого зерна пшеницы.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что через 120 сут. хранения в замороженном виде ферментированной молочнокислыми закваскаами зерновой массы ухудшаются показатели качества готовой продукции, так отмечается снижение пористости и удельного объема на 1,9 и 15,2 % соответственно, при этом готовые изделия характеризуются пониженными органолептическими показателями - имеют плоскую верхнюю корку и небольшие трещины на поверхности.

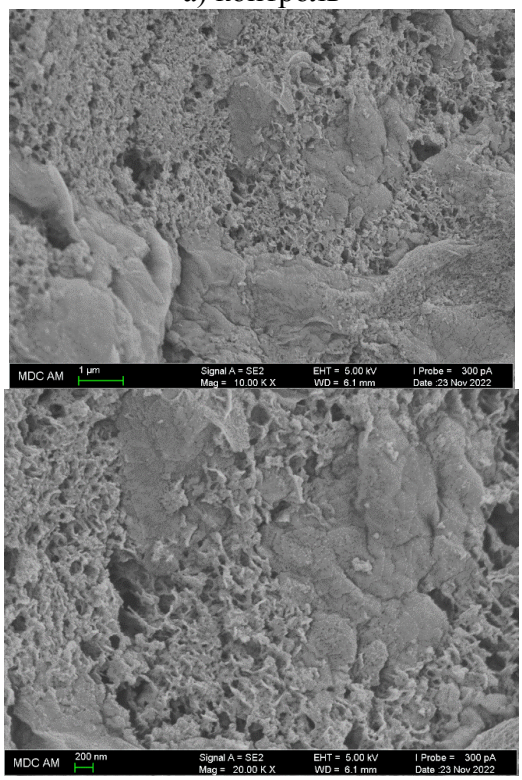
Таблица 6.11 – Показатели качества зернового хлеба

Показатели качества	Продолжительность хранения замороженной ферментированной массы, сут.					
	0 (контроль)	30	60	90	120	150
Влажность, %	46,9	46,9	46,7	46,5	46,5	46,5
Кислотность, град.	3,8	3,8	3,8	3,6	3,4	3,4
Пористость, %	62,2	61,8	61,5	61,0	60,3	59,5
Удельный объем, $см^3$/100 г	238	228	224	216	202	199
Формоустойчивость	0,26	0,24	0,24	0,20	0,15	0,11
Крошковатость, %	1,8	1,8	2,0	2,0	2,4	2,4
Удельная набухаемость, $см^3$	282	282	284	284	284	286
Внешний вид: форма	правильная, хлеб с заметно выпуклой верхней коркой				правильная, хлеб с плоской верхней коркой	
поверхность	слегка шероховатая, без подрывов и трещин				слегка шероховатая, с небольшими трещинами	
цвет	темно-коричневый					
Состояние мякиша: пористость	пористость развитая, без пустот и уплотнений, с вкраплением оболочек зерна					
пропеченность	пропеченный, не липкий					
Вкус и запах	приятный, свойственный зерновому хлебу, без постороннего привкуса и запаха					

Результаты анализа микроструктуры зернового хлеба так же подтверждают ранее сформулированные выводы о том, что при низкотемпературном хранении тестовых полуфабрикатов происходит уплотнение белкового матрикса, в следствие чего снижается пористость мякиша хлебобулочных изделий (рис. 6.17).

Методом электронной сканирующей микроскопии выявлено, что контрольные образцы изделий, приготовленные на основе ферментированной зерновой массы без замораживания тестовых полуфабрикатов, отличаются пористой структурой, однако поры в зерновом хлебе расположены менее равномерно по сравнению с образцами ржано-пшеничного хлеба и имеют меньший размер пор 50-200 нм (рис. 5.28 а и 6.17 а). Образцы зернового хлеба, выработанные с применением криотехнологии, имеют плотную и неразрыхленную структуру.

а) контроль



б) опыт

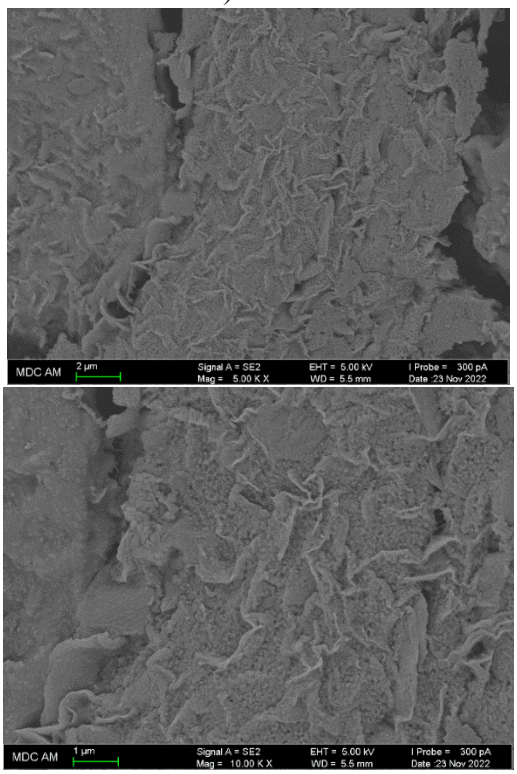
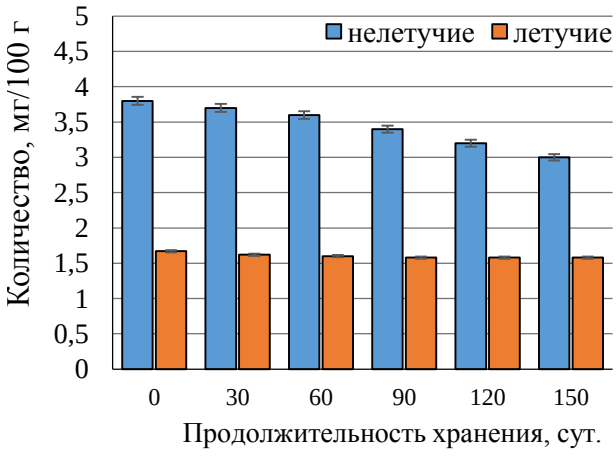


Рисунок 6.17 – Микроструктура зернового хлеба, приготовленного с применением ферментированной зерновой массы: а) без замораживания полуфабрикатов, б) по криотехнологии (продолжительность замораживания 30 сут.)

Выявлено, что длительное низкотемпературное хранение ферментированной зерновой массы приводит к снижению содержания кислот и ароматических соединений в готовой продукции на 16,3 % и 12,8 % соответственно (рис. 6.18), а также к снижению структурно-механических характеристик зернового хлеба (табл. 6.12).

а) содержание летучих и нелетучих кислот



б) количество ароматических веществ

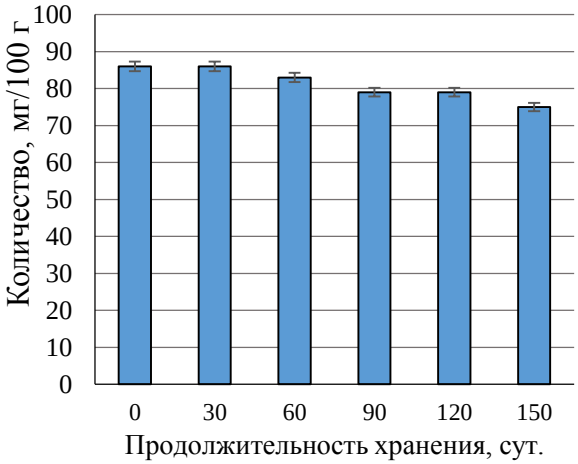


Рисунок 6.18 – Содержание кислот и ароматических соединений в зерновом хлебе с применением дефростированной ферментированной зерновой массы

Таблица 6.12 – Деформационные характеристики мякиша зернового хлеба, выработанного с применением заквасок

Продолжительность хранения, сут.	Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %
Контроль (0)	1,6	1,9	3,5	45,71	54,29
30	2,1	1,8	3,9	53,85	46,15
60	1,9	2	3,9	48,72	51,28
90	1,8	1,6	3,4	52,94	47,06
120	2,3	1,9	4,2	54,76	45,24
150	2	1,8	3,8	52,63	47,37

Таким образом, в результате исследования по изменению функционально-технологических свойств ферментированной зерновой массы, физико-химических, реологических и органолептических характеристик зернового хлеба в зависимости от продолжительности низкотемпературного хранения, установлен максимальный срок хранения ферментированной зерновой массы в замороженном виде (температура минус 18-20 ^{0}С) – 120 сут., рекомендованный срок реализации – 90 сут.

6.2 Разработка криотехнологии хлеба на основе ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы

Внедрение технологии зернового хлеба на основе ферментированной зерновой массы может вызвать определенные затруднения, что обусловлено необходимостью дополнительных производственных площадей, наличия оборудования для отволаживания и проращивания зерна, высококвалифицированных работников. Указанные затруднения возможно избежать путем применения замороженных полуфабрикатов. По предложенной схеме процесс ферментации зерновой массы и производство замороженных полуфабрикатов может осуществляться на крупном предприятии, а выпечка продукции в необходимых объемах на предприятии малой мощности, пекарнях, в секторе розничной торговли, предприятиях сегмента HoReCa. При этом возникает необходимость разработать способы производства зернового хлеба на основе ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы с применением криогенных технологий.

6.2.1 Исследование влияния продолжительности низкотемпературной обработки на процессы созревания полуфабрикатов из ферментированной зерновой массы и качественные характеристики зернового хлеба

С целью сохранения клеток молочнокислых бактерий и дрожжей в активном состоянии после воздействия отрицательных температур в работе придерживались следующих рекомендаций по выбору технологических параметров для производства полуфабрикатов:

1) ферментацию диспергированной зерновой массы рекомендуется проводить в течение 1,5-2 ч при температуре 30-35 ^{0}С;

2) время брожения полуфабрикатов перед замораживанием должно быть минимальным, т.е. при замесе следует использовать ледяную воду (2-4 ^{0}С); после замеса формовать, упаковывать и немедленно замораживать тестовые заготовки;

3) замораживание полуфабрикатов необходимо производить при температуре минус 30-32 ^{0}С в течение 1,5-2 часов с последующим хранением при температуре минус 18-20 ^{0}С;

4) дефростацию тестовых заготовок целесообразно проводить при 40-45 ^{0}С до достижения температуры в центре тестовой заготовки 18-20 ^{0}С.

Установлено, что низкотемпературная обработка полуфабрикатов приводит к некоторому замедлению процессов кислотообразования в тесте и, следовательно, к увеличению продолжительности брожения тестовых заготовок. Так, продолжительность брожения размороженных образцов увеличивается на 30 мин. по сравнению с незамороженным тестом.

Анализ кривых, представленных на рисунке 6.19 показывает, что по мере увеличения продолжительности хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде процессы газообразования в тесте снижаются по сравнению с первоначальными значениями (незамороженное тесто), при этом существенные изменения отмечаются через 120 сут. хранения тестовых заготовок в замороженном виде, что подтверждается смещением экстремума газообразования на 30 мин. по сравнению с исходными значениями.

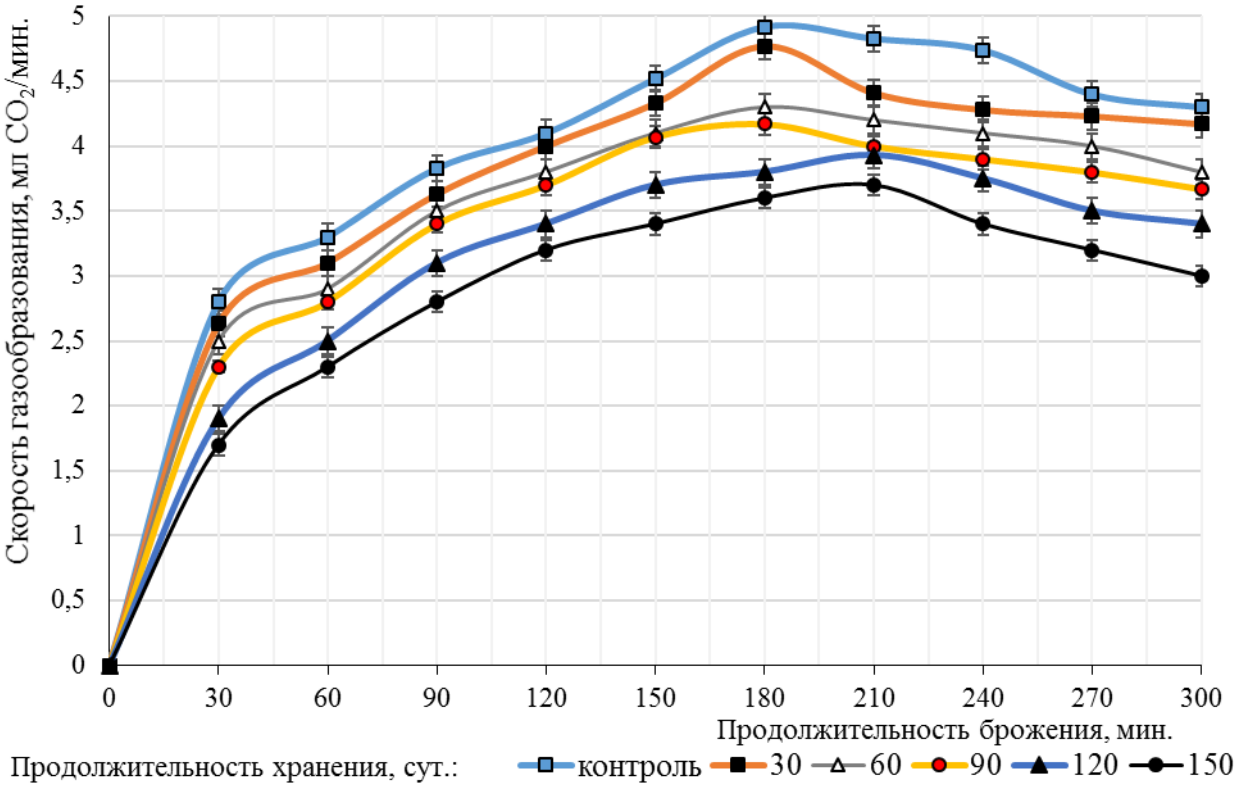


Рисунок 6.19 – Изменение скорости газообразования дефростированных полуфабрикатов

При этом газообразующая способность теста постепенно снижается на протяжении всего периода хранения замороженных полуфабрикатов (рис. 6.20). Так, после 150 сут. хранения замороженных полуфабрикатов газообразующая способность тестовых заготовок ниже на 15,3 % относительно первоначальных значений.

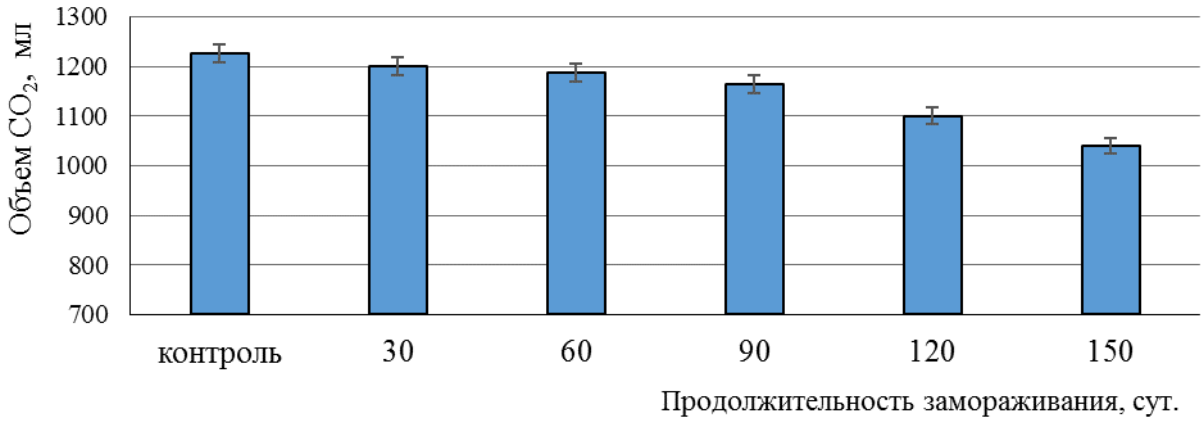


Рисунок 6.20 – Изменение газообразующей способности полуфабрикатов

Установлено, что при увеличении продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде снижается также газоудерживающая способность теста (рис. 6.21), так

газоудерживающая способность опытных образцов, подвергавшихся низкотемпературной обработке в течение 150 сут., в среднем ниже на 18,5 % относительно контрольных значений.

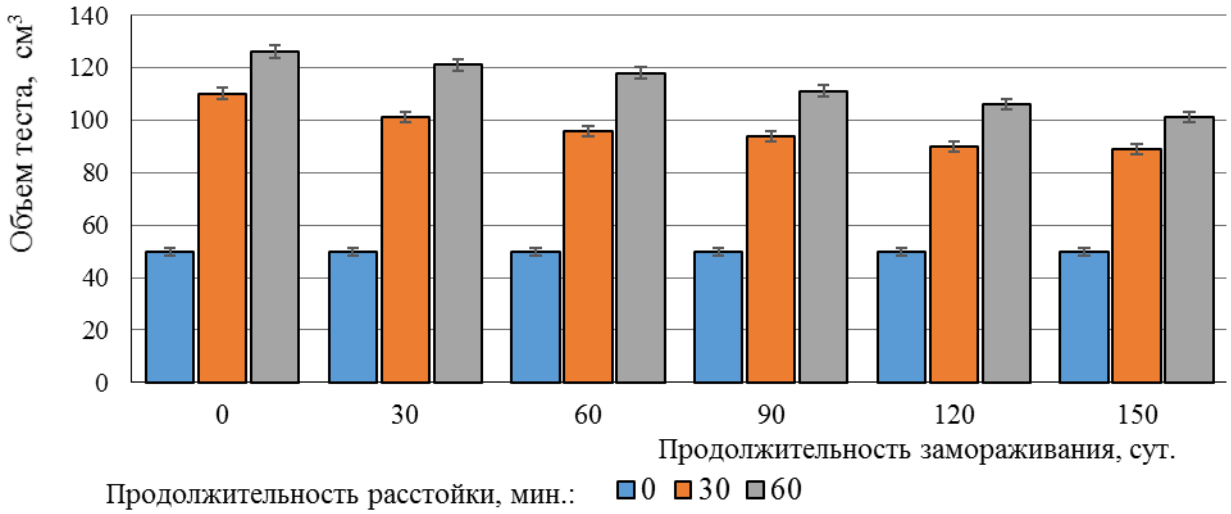


Рисунок 6.21 – Изменение газоудерживающей способности полуфабрикатов результате низкотемпературного хранения

Полученные результаты согласуются с данными по влиянию исследуемых препаратов на подъемную силу и бродильную активность теста (рис. 6.22), значение критерия бродильной активности через 150 сут. хранения полуфабрикатов в замороженном виде составляет 25,6, что примерно на 31,9 % меньше исходного значения.

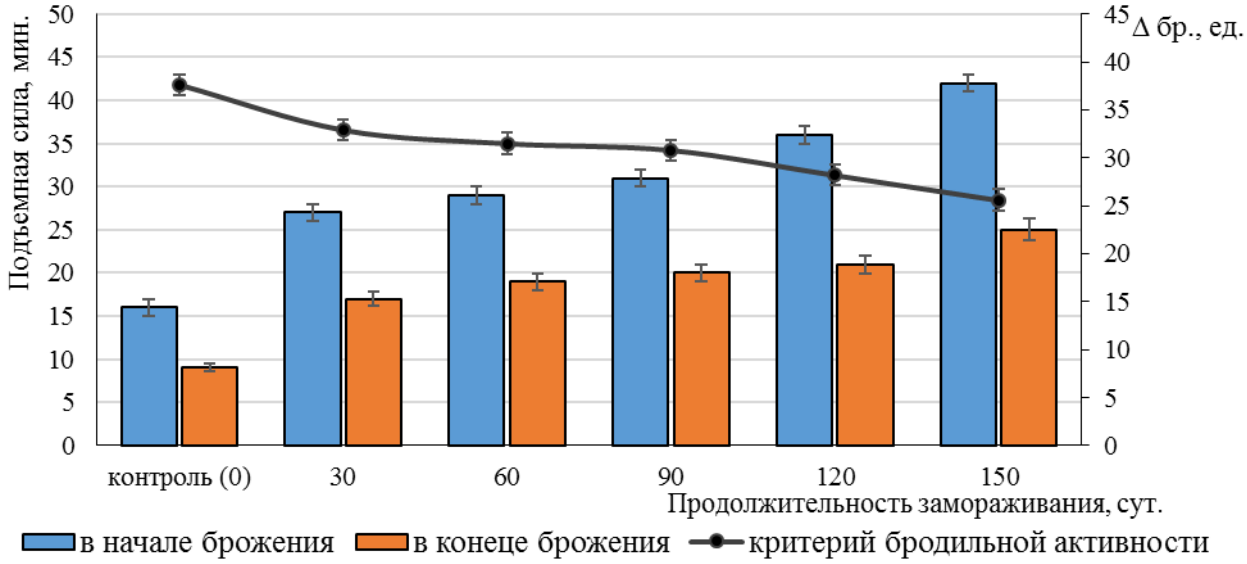


Рисунок 6.22 – Влияние низкотемпературной обработки на биотехнологические свойства полуфабрикатов

В результаты исследований влияния длительного низкотемпературного хранения полуфабрикатов выявлено, что при хранении теста до 90 сут. при температуре минус 18-20 ^{0}С выживаемость клеток дрожжей и молочнокислых бактерий составляет 88,1% и 86,5 % соответственно, при увеличении продолжительности низкотемпературной обработки число жизнеспособных клеток уменьшается на 17,8 % и 19,2 % соответственно относительно контрольных значений (рис. 6.23).

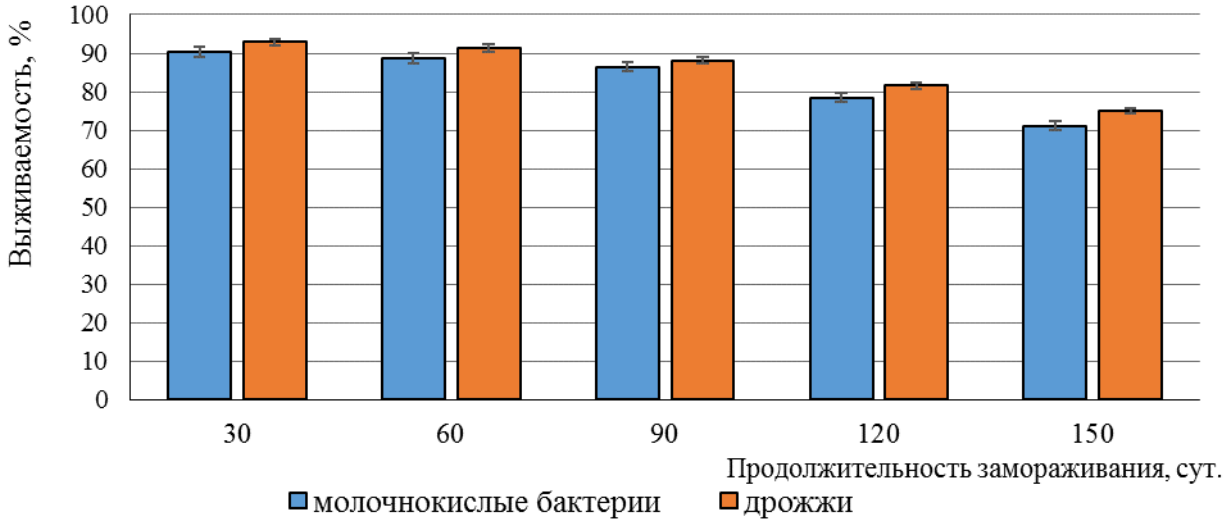


Рисунок 6.23 – Выживаемость дрожжей и молочнокислых бактерий в полуфабрикатах в зависимости от времени их хранения в замороженном виде

Таким образом, экспериментальным путем установлены оптимальные сроки хранения тестовых полуфабрикатов на основе ферментированной зерновой массы в замороженном виде, которые составляют 3 мес., по истечении данного срока отмечается замедление процесса брожения дефростированных полуфабрикатов, что выражается в снижении выживаемости клеток молочнокислых бактерий и дрожжей, уменьшении бродильной активности теста, его газообразующей и газоудерживающей способности.

На следующем этапе исследований проводили анализ качества готовых изделий по органолептическим и физико-химическим показателям.

Установлено, что увеличение продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде приводит к изменению всех снимаемых характеристик готовых изделий, при этом в течение первых 90 сут. пористость изделий снижается на 2,6 %, удельный объем на 16,8 %, крошковатость и удельная набухаемость мякиша увеличиваются на 16,6 % и 3,2 % соответственно (табл. 6.13). При увеличении сроков хранения теста при температуре минус 18-20 ^{0}С происходит значительное ухудшение исследуемых показателей, так к концу эксперимента

(через 150 сут.) важнейшие характеристики «пористость» и «удельный объем» уменьшаются на 4,1 % и 20,6 % соответственно.

Таблица 6.13 – Показатели качества зернового хлеба, выработанного с применением криотехнологии

Продолжительность хранения теста, сут.	Кислотность, град.	Влажность, %	Пористость %	Удельный объем, $см^3$/100 г	Формо-устойчивость	Крошко-ватость	Удельная набухаемость, $см^3$
0 (контроль)	3,8	46,9	62,2	238	0,26	1,8	282
30	3,8	46,9	60,4	224	0,21	1,8	280
60	3,6	46,8	60,0	213	0,20	1,9	275
90	3,6	46,8	59,6	198	0,18	2,1	273
120	3,6	46,8	58,7	192	0,12	2,3	266
150	3,6	46,8	58,1	189	0,10	2,4	259

Установлено, что воздействие отрицательных температур на тестовые полуфабрикаты приводит к снижению общей деформации мякиша, по мере увеличения продолжительности хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде снижается относительная упругость мякиша зернового хлеба (табл. 6.14). Так, к концу эксперимента общая деформация мякиша снижается на 22,2 %, относительная упругость – на 12,7 %.

Таблица 6.14 – Деформационные характеристики мякиша зернового хлеба, выработанного с применением криотехнологии через 24 ч хранения

Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.	Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	Упругая деформация, $\Delta H_{упр.}$	Общая деформация, $\Delta H_{общ.}$	Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$, %
0 (контроль)	2,8	2,6	5,4	51,85	48,15
30	2,4	2,3	4,7	51,06	48,94
60	2,4	2,2	4,6	52,17	47,83
90	2,4	2	4,4	54,55	45,45
120	2,3	2	4,3	53,49	46,51
150	2,3	1,9	4,2	54,76	45,24

При хранении изделий наряду с изменением структурно-механических свойств мякиша изменяются и его гидрофильные свойства, в связи с чем было изучено изменение содержания связанной влаги в хлебе из ферментированной зерновой массы на основе замороженных полуфабрикатов, упакованного в полиэтиленовые пакеты.

Результаты исследования содержания связанной влаги при хранении зернового хлеба в зависимости от продолжительности хранения полуфабрикатов в замороженном виде представлены на рисунке 6.24. Установлено, что количество связанной влаги в образцах снижается на 14,7 % относительно контроля в свежевыпеченных изделиях и на

18,8 % через 72 ч хранения упакованных изделий, что объясняется ускорением процесса черствения хлеба, за счет того, что клейстеризованный крахмал, при переходе в кристаллическое состояние, лучше отдает поглощенную им влагу.

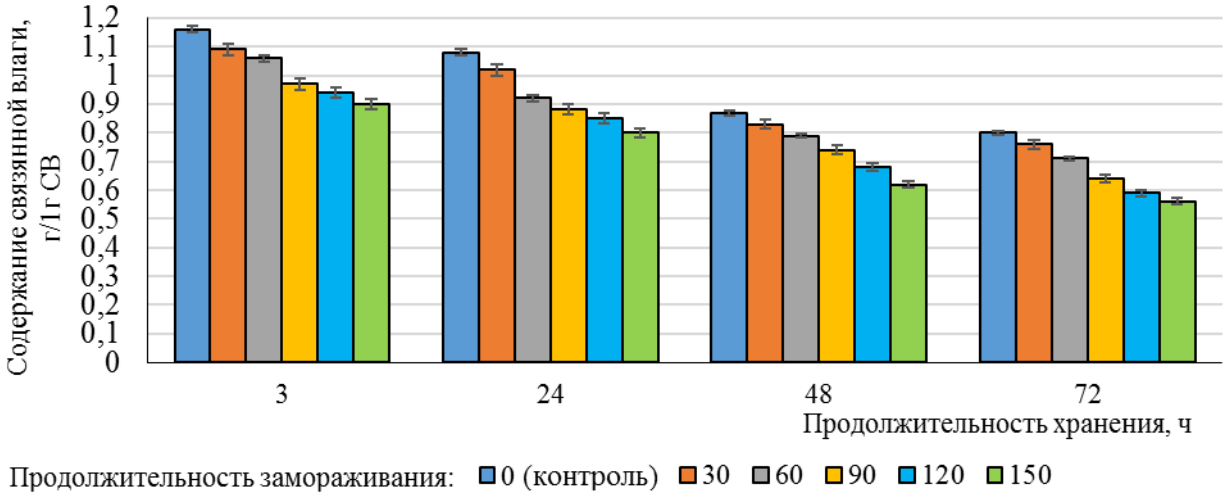


Рисунок 6.24 – Содержание связанной влаги в зерновом хлебе при хранении в зависимости от продолжительности замораживания полуфабрикатов

В результате анализа органолептических показателей зернового хлеба (рис. 6.25) выявлено, что длительное низкотемпературное воздействие на тестовые полуфабрикаты (более 120 сут.) приводит к снижению объема изделий, ухудшению текстуры и пористости мякиша.

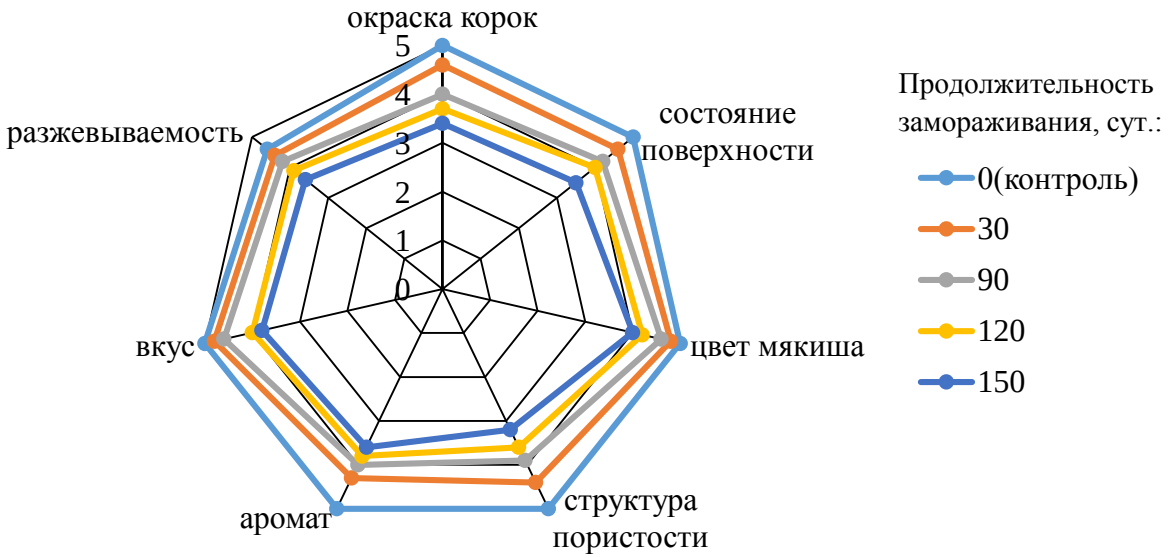


Рисунок 6.25 – Влияние продолжительности хранения теста на органолептические характеристики зернового хлеба

Нами было проведено исследование влияния продолжительности замораживания зерновых полуфабрикатов на ферментированной массе на изменение микробиологических показателей зернового хлеба в процессе хранения (табл. 6.15).

Таблица 6.15 – Микробиологические показатели изделий на основе замороженных полуфабрикатов

Показатели	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.					
	Контроль (0)	30	60	90	120	150
через 24 ч хранения						
КМАФАнМ	(22±4)×10	(15±3)×10	(18±4)×10	(14±5)×10	(11±4)×10	(16±4)×10
Плесени	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Дрожжи	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
через 72 ч хранения						
КМАФАнМ	(63±5)×10	(54±4)×10	(58±5)×10	(33±4)×10	(39±6)×10	(54±5)×10
Плесени	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Дрожжи	менее 10	менее 10	менее 10	менее 10	менее 10	менее 10

Примечание: н.о. – не обнаружено

Результаты исследования показали, что зерновой хлеб с применением ферментированной зерновой массы отличается низкой микробиологической обсемененностью (табл. 6.16). На протяжении всего периода исследования во всех образцах возбудителей картофельной болезни и плеснеевых грибов обнаружено не было, количество дрожжей не превышало 10 КОЕ/г.

Установлено, что в всех образцах зернового хлеба признаки плесневения в летний период появились на шестые сут. (135-144 ч), что свидетельствует о высокой микробиологической чистоте зернового хлеба на основе ферментированной зерновой массы, выработанного с применением криотехнологии (табл. 6.16).

Таблица 6.16 – Признаки возникновения плесневения на образцах зернового хлеба

Продолжительность хранения полуфабрикатов в замороженном виде, сут.	Признаки плесневения							
	Продолжительность хранения зернового хлеба, ч							
	0	24	48	72	98	120	144	168
Контроль (0)	-	-	-	-	-	-	±	+
30	-	-	-	-	-	-	±	+
60	-	-	-	-	-	-	±	+
90	-	-	-	-	-	-	±	+
120	-	-	-	-	-	-	±	+
150	-	-	-	-	-	-	±	+

Примечание: «-» отсутствие каких-либо признаков плесневения; «±» появление запаха плесневения, но отсутствие колоний; «+» ярко выраженный запах, интенсивное появление колоний плесневых грибов

Таким образом, результаты исследования влияния продолжительности низкотемпературной обработки полуфабрикатов из ферментированной зерновой массы на качественные характеристики зернового хлеба подтверждают раннее сделанные выводы об оптимальных сроках хранения полуфабрикатов в замороженном виде – 3 мес.

Проведенные исследования позволили рекомендовать разработанный способ приготовления хлебопекарной продукции на основе замороженных полуфабрикатов из ферментированной молочнокислыми бактериями *L. casei 32* зерновой массы, применение которого позволит при необходимости на предприятии быстро прекратить и возобновить технологический процесс, сократить продолжительность процесса производства зерновых сортов хлеба, что представляет определенный интерес для предприятий малой мощности.

6.2.2 Разработка технологических решений применения янтарной кислоты и ее солей в криотехнологии зернового хлеба

Задачей настоящего этапа экспериментальной работы было проведение исследований по разработке оптимизированной рецептурной композиции зернового хлеба, вырабатываемого на основе замороженных полуфабрикатов с применением ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы, а также янтарной кислоты и её солей в качестве добавок к основному сырью.

В качестве факторов принимали количество прессованных дрожжей (X_1), ферментированной зерновой массы (X_2) и янтарной кислоты (X_3). Концентрацию янтарной кислоты варьировали в интервале от 0,05 % до 0,15 %; сукцинатов калия и аммония от 0,1 % до 0,3 %, количество ферментированной зерновой массы - в диапазоне 35-55 %, количество прессованных дрожжей от 2,0 % до 3,0 % к массе зерна. Пределы варьирования параметров выбирали с учетом реально возможных изменений каждого фактора. Исследования проводили в соответствии с композиционным униформ-ротатабельным планом многофакторного эксперимента (приложение В, таблицы 13 и 14). Тестовые полуфабрикаты упаковывали во влагонепроницаемую пленку, замораживали при температуре минус 30 ^{0}С и хранили в замороженном виде при температуре минус 18 ^{0}С в течение 1 мес.

Полученные уравнения математической зависимости пористости (Y_1) и удельного объема (Y_2) зернового хлеба имеют вид:

$$Y_1 = 57{,}93 + 1{,}02X_1 + 0{,}25X_1^2 + 0{,}394X_2 - 0{,}696X_3 + 0{,}713X_1X_2 + \\ + 0{,}238X_2X_3 - 0{,}26X_2^2 - 1{,}91X_3^2 + 0{,}33X_2X_3 - 0{,}37X_1X_2X_3 \quad (6.1)$$

$$Y_2 = 206{,}14 + 5{,}12X_1 + 7{,}34X_1^{\,2} + 1{,}07X_2 - 1{,}43X_2^{\,2} - 0{,}94X_3 + 3{,}74X_3^{\,2} + 6{,}91X_2X_3 - \\ - 8{,}47X_1X_3. - 0{,}16X_1X_2 - 0{,}35X_1X_2X_3 \qquad (6.2)$$

Графическая зависимость исследуемых показателей качества зернового хлеба от данных факторов представлена на рис 6.26.

а) пористость б) удельный объем

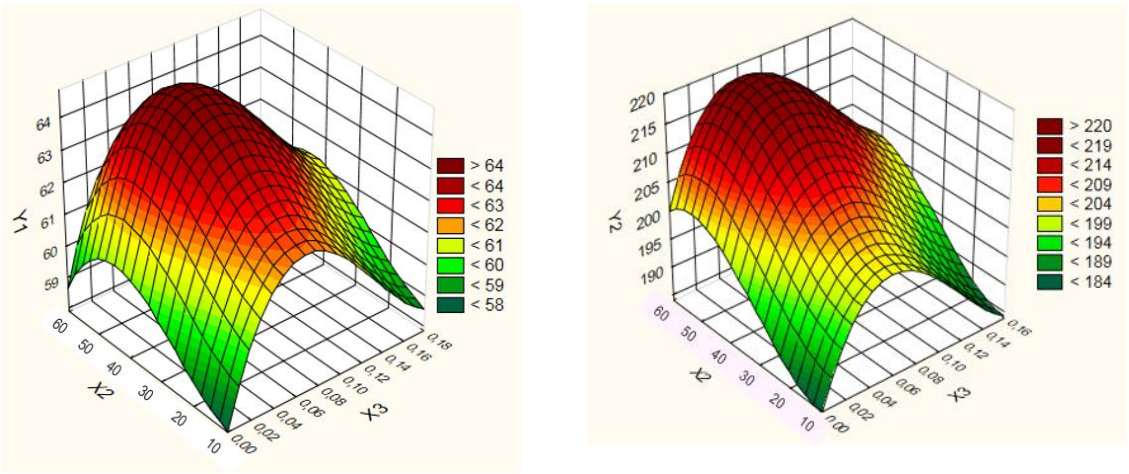


Рисунок 6.26 – Влияние дозировки ферментированной зерновой массы и янтарной кислоты на пористость (а) и удельный объем (б) зернового хлеба

Анализ уравнений позволил получить оптимальные концентрации янтарной кислоты – 0,07 %, прессованных дрожжей – 2,4 % и ферментированной зерновой массы – 45 % к массе зерна.

Далее была поставлена серия экспериментальных исследований по изучению влияния солей янтарной кислоты на качественные характеристики зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. На данном этапе эксперимента и далее количество вносимой ферментированной зерновой массы составило 45 % к массе зерна.

Исследования проводили в соответствии с композиционным униформ-ротатабельным планом, приведенным в приложении В (таблицы 15-17), где концентрации дрожжей (X_1, %), сукцината калия (X_2, %) и сукцината аммония (X_3, %) были выбраны качестве переменных; а пористость (Y_1, %) и удельный объем (Y_2, %) готовых изделий приняты в качестве искомых функций.

В результате математической обработки результатов получены регрессионные уравнения зависимости пористости (Y_1) и удельного объема (Y_2) зернового хлеба от концентраций рецептурных компонентов.

Для пористости зернового хлеба (Y_1) получены уравнения регрессии вида:

- для сукцината калия:

$$Y_1 = 60{,}23 + 1{,}16X_1 - 3{,}11X_1^2 + 1{,}31X_2 - 1{,}64X_1X_2 - 0{,}28X_2^2, \quad (6.3)$$

- для сукцината аммония:

$$Y_1 = 60{,}18 + 1{,}53X_1 - 2{,}97X_1^2 + 1{,}62X_2 - 1{,}55X_1X_2 - 0{,}22X_2^2 \quad (6.4)$$

Для удельного объема готовых изделий (Y_2) получены уравнения регрессии вида:

- для сукцината калия:

$$Y_2 = 190{,}57 + 12{,}74X_1 - 12{,}08X_1^2 + 37{,}97X_2 + 1{,}88X_1X_2 - 8{,}10X_2^2, \quad (6.5)$$

- для сукцината аммония:

$$Y_2 = 186{,}12 + 29{,}59X_1 - 19{,}07X_1^2 + 35{,}96X_2 + 1{,}35X_1X_2 - 7{,}15X_2^2 \quad (6.6)$$

Установлено, что пористость и удельный объем готовых изделий в наибольшей степени зависят от концентрации прессованных дрожжей и янтарной кислоты, графическая зависимость исследуемых показателей качества зернового хлеба от данных факторов представлена на рис 6.27 и 6.28. Анализ уравнений позволил получить оптимальные концентрации сукцината калия – 0,22 %, сукцината аммония – 0,25 %, прессованных дрожжей – 2,4 %.

Далее было изучено влияние длительного низкотемпературного хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде на процессы созревания теста и качество зернового хлеба при совместном введении в рецептуру ферментированной зерновой массы молочнокислыми бактериями *L. casei* 32 и янтарной кислоты/сукцинатов в оптимальных концентрациях.

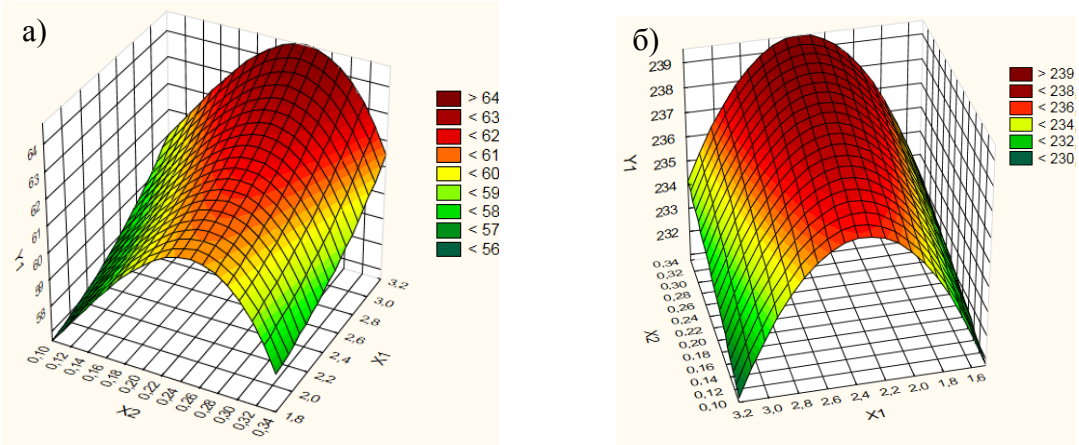


Рисунок 6.27 – Влияние дозировки прессованных дрожжей и сукцината калия на пористость (а) и удельный объем (б) зернового хлеба

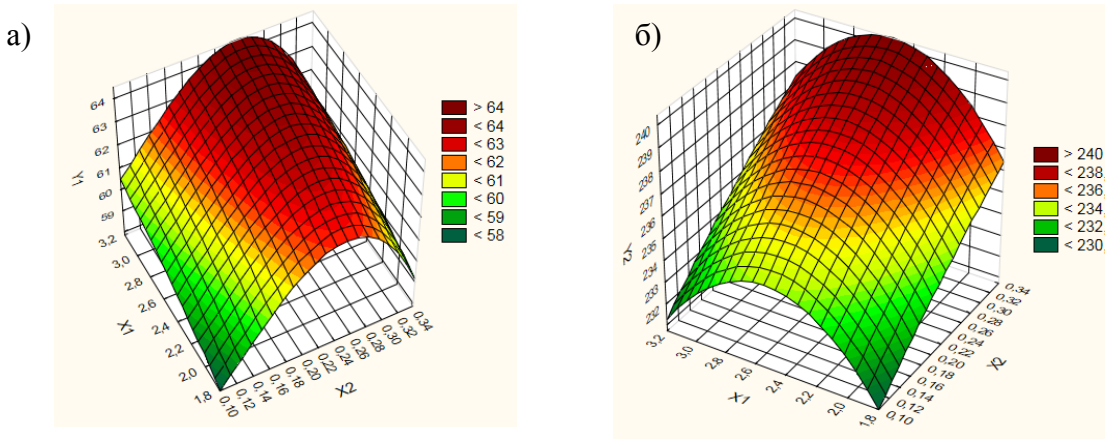


Рисунок 6.28 – Влияние дозировки прессованных дрожжей и сукцината аммония на пористость (а) и удельный объем (б) изделий

Установлено, что применение янтарной кислоты и ее солей позволяет интенсифицировать процесс кислотонакопления дефростированных полуфабрикатов и сократить продолжительность брожения теста на 30 мин. по сравнению с контролем даже после 150 сут. хранения полуфабрикатов в замороженном виде (рис. 6.29).

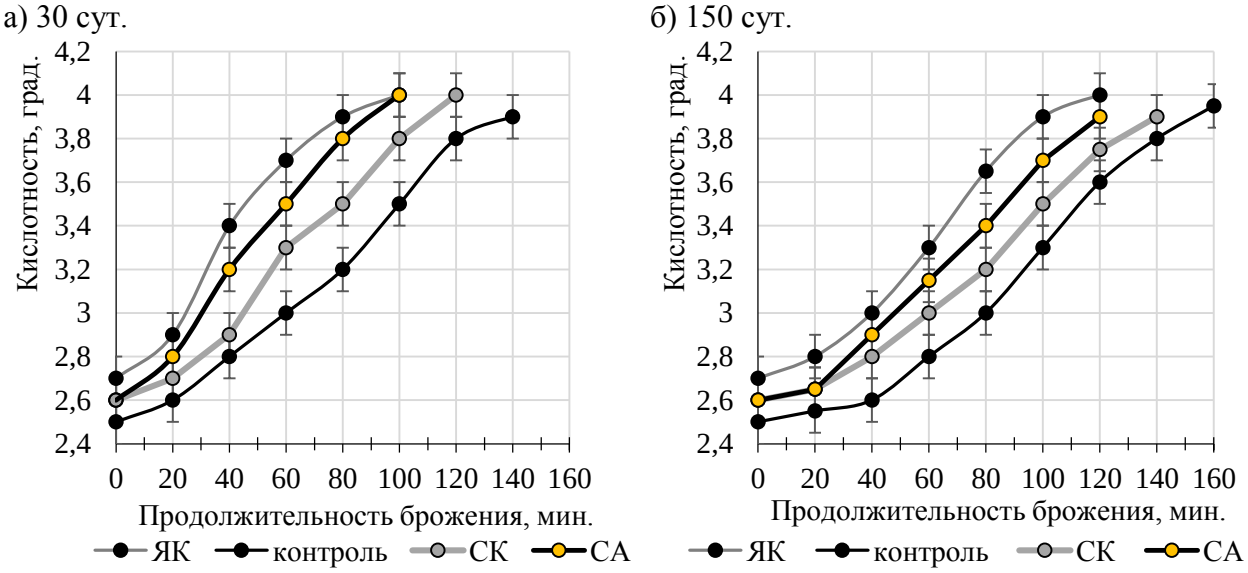
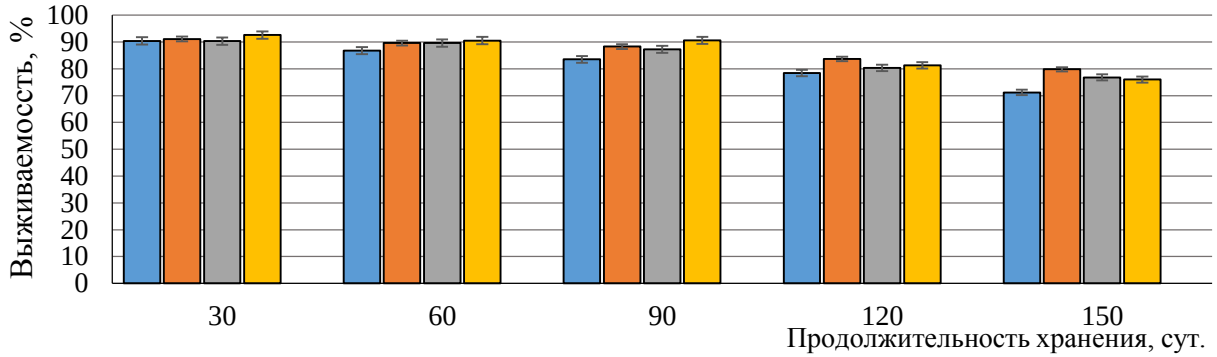


Рисунок 6.29 – Динамика кислотонакопления в зерновых полуфабрикатах после дефростации

Результаты исследований показывают, что при использовании исследуемых добавок выживаемость дрожжевых клеток и молочнокислых бактерий увеличивается по сравнению с контролем в среднем на 10,3 % и 8,1 % соответственно через 150 сут. хранения полуфабрикатов в замороженном виде (рис. 6.30).

а) молочнокислые бактерии



б) дрожжи

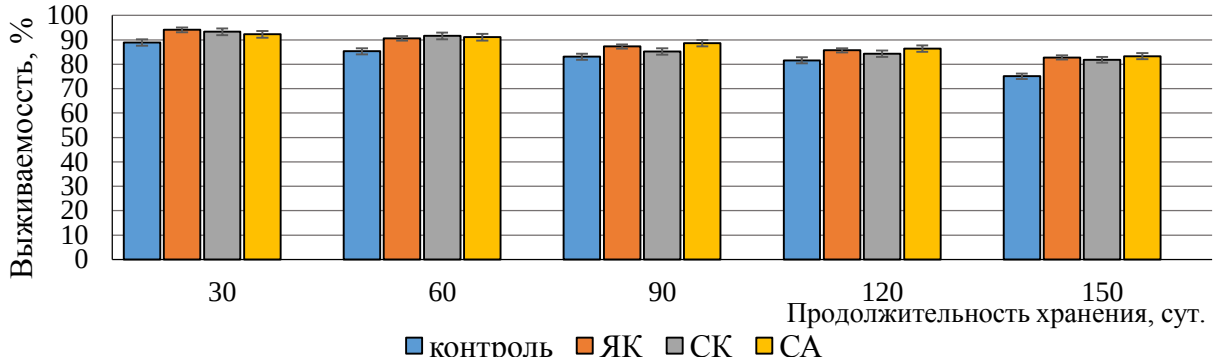


Рисунок 6.30 – Изменение выживаемости дрожжей и молочнокислых бактерий в зависимости от продолжительности хранения полуфабрикатов из зерновой массы

Установлено, что после длительного низкотемпературного воздействия дефростированные полуфабрикаты на основе ферментированной зерновой массы с добавлением янтарной кислоты или ее солей, сохраняют высокий критерий бродильной активности по сравнению с контрольными образцами (рис. 6.31), так критерий бродильной активности опытных образцов достигает значений 31,8 ед., тогда как контрольных 25,6 ед. после 150-суточного хранения тестовых полуфабрикатов при температуре минус 18-20 ^{0}С.

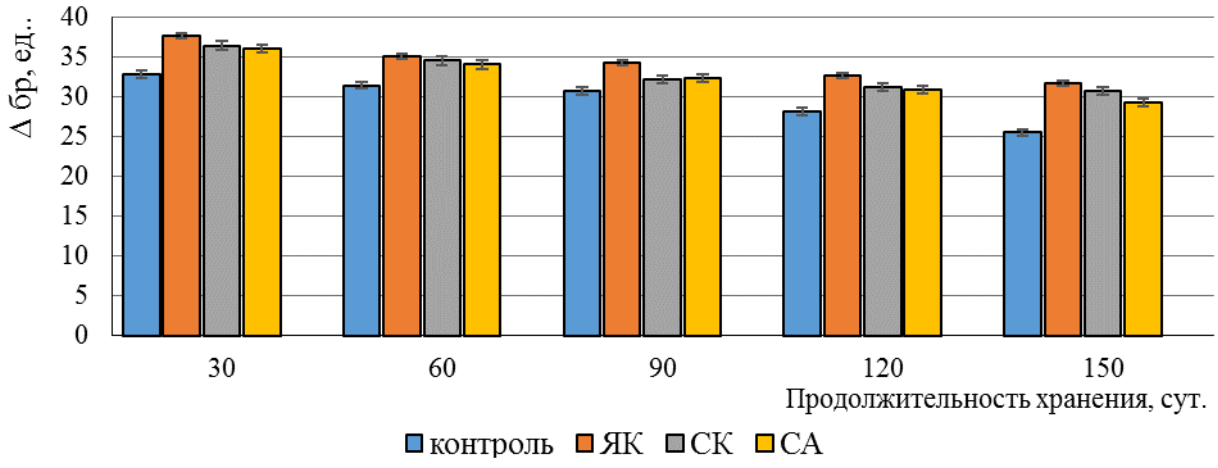


Рисунок 6.31 – Критерий бродильной активности теста из зерновой массы

Установлено, что газообразующая и газоудерживающая способности опытных образцов, подвергавшихся низкотемпературной обработке в течение 150 сут., на 19,6 % и 11,9 % выше относительно контрольных значений соответственно (рис. 6.32 и 6.33).

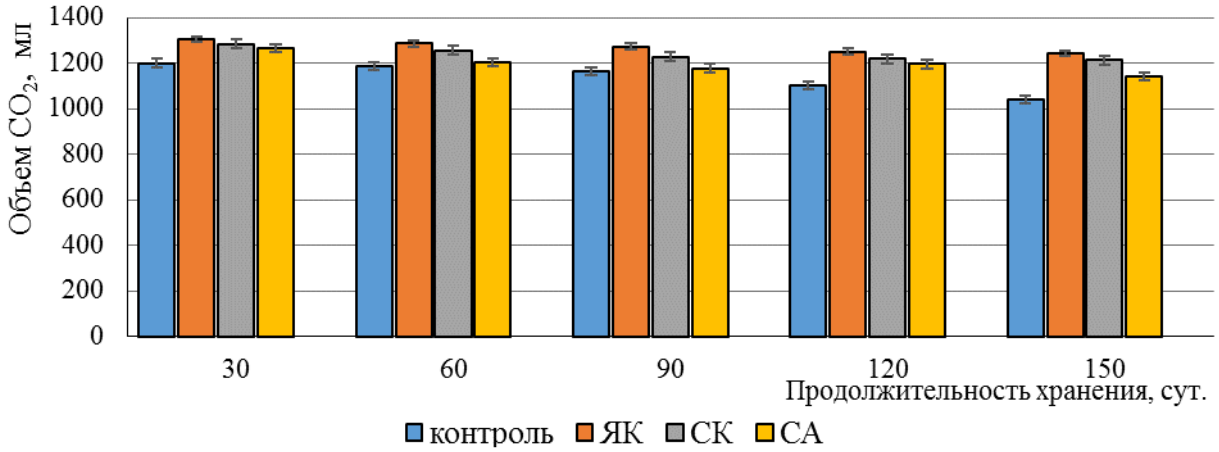
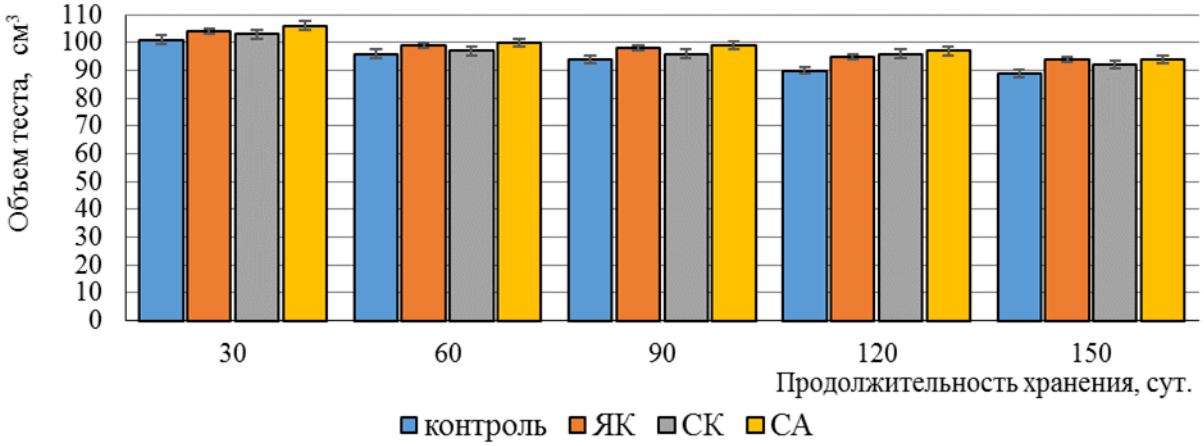


Рисунок 6.32 – Газообразующая способность дефростированного теста с добавлением янтарной кислоты и сукцинатов

а) через 30 мин. расстойки



б) через 60 мин. расстойки

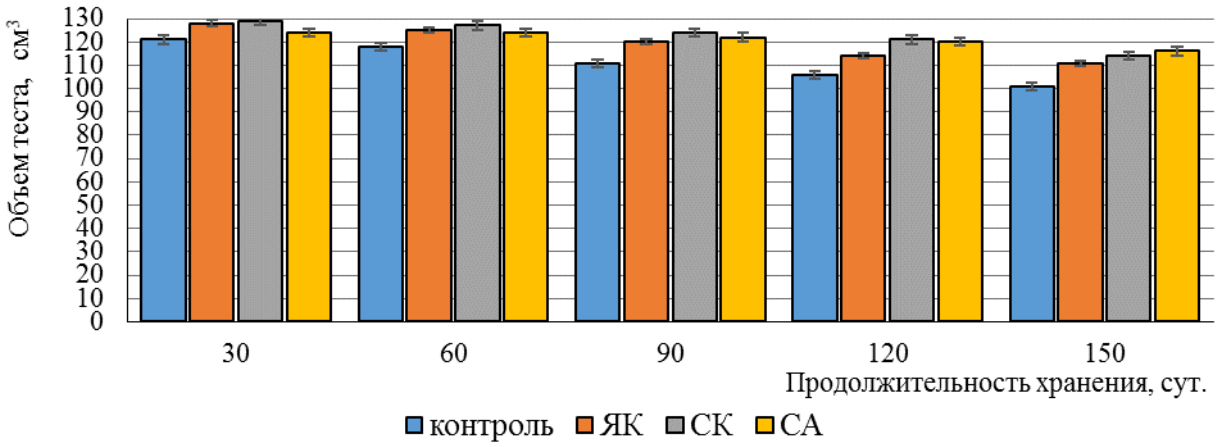


Рисунок 6.33 – Изменение газоудерживающей способности теста при воздействии янтарной кислоты и сукцинатов

Таким образом, внедрение стадии ферментации зерновой массы, применение оптимальных концентраций янтарной кислоты или ее солей (калия и аммония) позволяет стабилизировать биотехнологических свойства полуфабрикатов зернового хлеба, подвергающихся низкотемпературной обработке, что обеспечивает высокие физико-химические (табл. 6.17), органолептические и реологические характеристики готовой продукции. Анализ полученных данных показывает, что опытные образцы отличаются улучшенными физико-химическими и органолептическими характеристиками по сравнению с контрольными. Так, при совместном применении ферментированной зерновой массы и янтарной кислоты или ее солей увеличивается пористость готовых изделий на 4,4 %, удельный объем на 21,2 % по сравнению с контролем.

Таблица 6.17 – Качественные характеристики зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

<table>
<tr><td rowspan="3">Наименование показателей</td><td colspan="8">Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.</td></tr>
<tr><td colspan="4">90</td><td colspan="4">150</td></tr>
<tr><td>Контроль</td><td>ЯК</td><td>СК</td><td>СА</td><td>Контроль</td><td>ЯК</td><td>СК</td><td>СА</td></tr>
<tr><td>Влажность, %</td><td>46,8</td><td>46,8</td><td>46,8</td><td>46,8</td><td>46,8</td><td>46,8</td><td>46,8</td><td>46,8</td></tr>
<tr><td>Кислотность, град.</td><td>3,6</td><td>3,9</td><td>3,8</td><td>3,9</td><td>3,6</td><td>3,8</td><td>3,8</td><td>3,9</td></tr>
<tr><td>Пористость, %</td><td>59,6</td><td>63,6</td><td>63,8</td><td>64,0</td><td>58,1</td><td>62,1</td><td>62,4</td><td>62,5</td></tr>
<tr><td>Удельный объем, см^3/100г</td><td>198</td><td>231</td><td>234</td><td>236</td><td>189</td><td>224</td><td>227</td><td>229</td></tr>
<tr><td>Формоустойчивость</td><td>0,18</td><td>0,20</td><td>0,22</td><td>0,22</td><td>0,10</td><td>0,17</td><td>0,18</td><td>0,18</td></tr>
<tr><td>Крошковатость</td><td>2,1</td><td>1,8</td><td>1,9</td><td>1,8</td><td>2,4</td><td>2,1</td><td>2,1</td><td>2,0</td></tr>
<tr><td>Удельная набухаемость, см^3</td><td>273</td><td>280</td><td>280</td><td>282</td><td>259</td><td>271</td><td>273</td><td>273</td></tr>
<tr><td>Внешний вид:
- форма</td><td colspan="4">правильная, хлеб с заметно выпуклой верхней коркой</td><td>правильная, хлеб с плоской верхней коркой</td><td colspan="3">правильная, хлеб с заметно выпуклой верхней коркой</td></tr>
<tr><td>- поверхность</td><td colspan="4">слегка шероховатая, без подрывов и трещин</td><td>слегка шероховатая, с трещинами</td><td colspan="3">слегка шероховатая, без подрывов и трещин</td></tr>
<tr><td>-цвет</td><td colspan="8">темно-коричневый</td></tr>
<tr><td>Состояние мякиша:
- пористость</td><td colspan="4">пористость развитая, без пустот и уплотнений,
с вкраплением оболочек зерна</td><td>пористость слабо развита, без пустот, с вкраплением оболочек зерна</td><td colspan="3">пористость развитая, без пустот и уплотнений,
с вкраплением оболочек зерна</td></tr>
<tr><td>- пропеченность</td><td colspan="8">пропеченный, не липкий</td></tr>
<tr><td>Вкус и запах</td><td>приятный, свойственный зерновому хлебу, без постороннего привкуса и запаха</td><td colspan="3">приятный, выраженный хлебный, без постороннего привкуса и запаха</td><td>приятный, свойственный зерновому хлебу, без постороннего привкуса и запаха</td><td colspan="3">приятный, выраженный хлебный, без постороннего привкуса и запаха</td></tr>
</table>

На рисунке 6.34 представлена микроструктура мякиша зернового хлеба, приготовленного с применением криотехнологии (продолжительность хранения полуфабрикатов 90 сут.).

а) контроль б) опыт

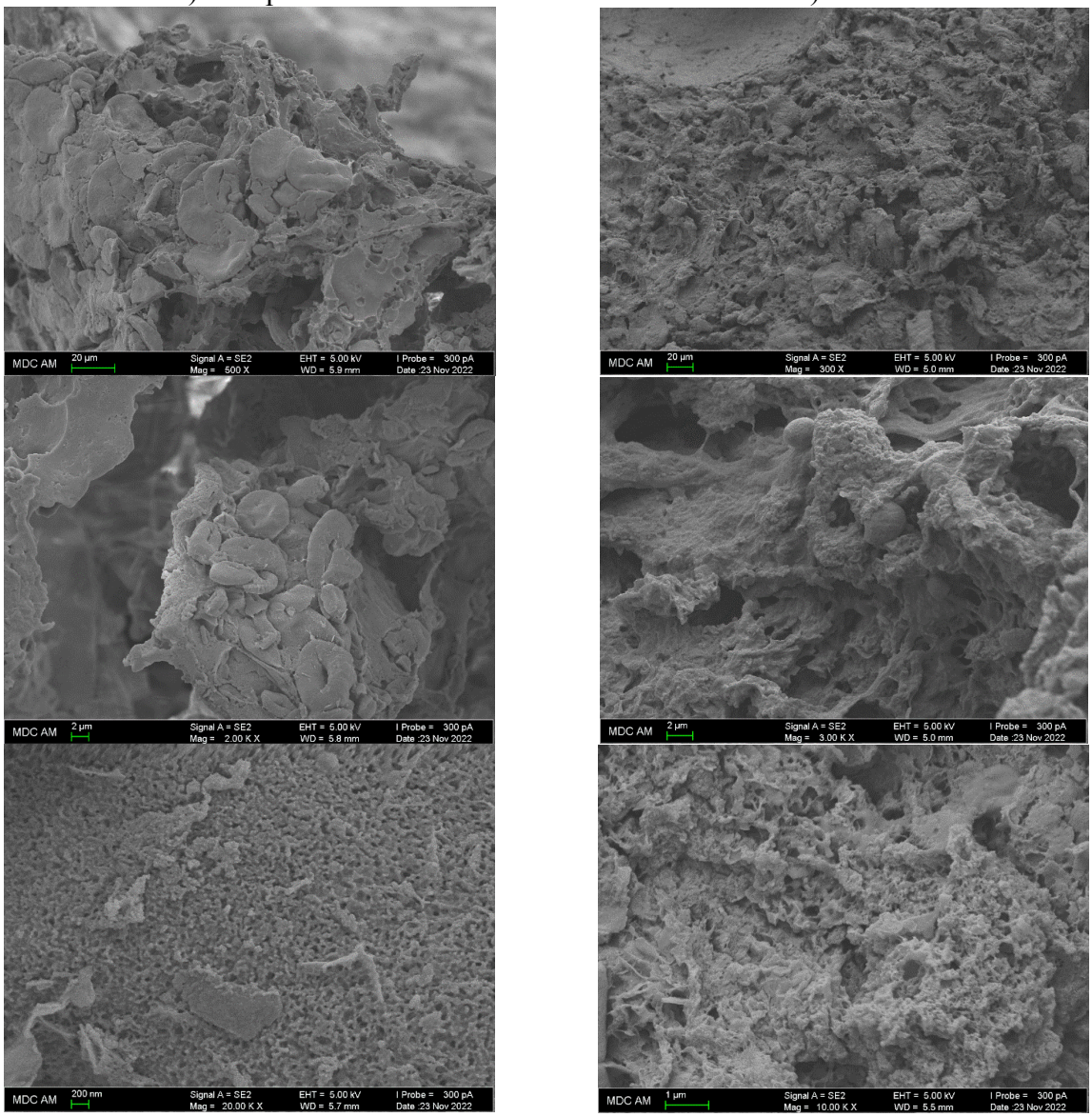


Рисунок 6.34 – Микроструктура мякиша изделий, приготовленных на основе криотехнологии а) контроль, б) с применением закваски и янтарной кислоты

Методом электронной сканирующей микроскопии показано, что контрольные образцы хлеба имеют плотную структуру, в которую встроены по всему объему сплющенные или разрушенные гранулы крахмала неправильной формы размером от 1 до 8 мкм. Опытные образцы изделий, приготовленные с применением янтарной кислоты, имеют более организованную гелеобразную структуру, в которой распределены поры различного диаметра от 0,1 до 1,0 мкм, при этом крахмальные зерна четко не просматриваются.

Кроме того, применение ферментированной зерновой массы совместно с янтарной кислотой или сукцинатами позволяет снизить негативное влияние низкотемпературной обработки на реологические характеристики мякиша зернового хлеба, возникающее в результате длительного хранения теста в замороженном виде (табл. 6.18), о чем свидетельствуют показатели пластической и упругой деформации мякиша после длительного хранения полуфабрикатов в замороженном виде.

Таблица 6.18 – Деформационные характеристики мякиша зернового хлеба

Наименование показателей	Продолжительность хранения полуфабрикатов, сут.							
	90				150			
	контроль	ЯК	СК	СА	контроль	ЯК	СК	СА
Пластическая деформация, $\Delta H_{плас.}$	1,9	2,3	2,2	2,4	2,0	2,0	2,1	2,2
Упругая деформация, $\Delta H_{упр}$.	2,4	3,1	3,4	3,4	2,3	2,9	3,1	3
Общая деформация, $\Delta H_{общ}$.	4,4	5,4	5,6	5,8	4,2	4,9	5,2	5,2
Относительная пластичность, $\Delta H^{отн.}_{плас.}$,%	45,45	42,59	39,29	41,38	45,24	40,82	40,38	42,31
Относительная упругость, $\Delta H^{отн.}_{упр.}$,%	54,55	57,41	60,71	58,62	54,76	59,18	59,62	57,69

В таблице 6.19 представлены результаты анализа цветовых характеристик зернового хлеба, выработанного с применением криогенных технологий (продолжительность хранения полуфабрикатов в замороженном виде 150 сут). Установлено, что при низкотемпературной обработке происходит снижение интенсивности окраски корки зернового хлеба, применение янтарной кислоты приводит к повышению индекса белизны мякиша и улучшению цветовых характеристик корки изделий.

Таблица 6.19 – Цветовые характеристики зернового хлеба, приготовленного на основе криотехнологии

Параметр	Мякиш		Корка	
	контроль	опыт	контроль	опыт
L	63,45	65,23	60,78	60,26
a	5,41	3,12	6,37	3,32
b	21,57	22,17	26,13	23,15
C	22,24	22,39	26,89	23,38
DW	52,09	53,08	45,74	48,40

Результаты исследований доказывают эффективность применения янтарной кислоты, сукцинатов калия и аммония в качестве криопротекторов, а также целесообразность их использования совместно с ферментированной зерновой массой криорезистентным штаммом *L. casei 32* в технологии зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов.

6.2.3 Определение антиоксидантной активности, перевариваемости белков и гликемического индекса зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Результаты собственных исследований показывают, что низкотемпературная обработка тестовых полуфабрикатов приводит к снижению интенсивности процесса брожения теста не только за счет гибели клеток дрожжей и молочнокислых бактерий, но и вызывает снижение активности протеолитических и амилолитических ферментов зерна, что в свою очередь вызывает нарушение биотехнологических процессов при созревании полуфабрикатов и как следствие приводит к ухудшению потребительских свойств готовой продукции. За счет данных процессов может происходить изменение антиоксидантной емкости хлебобулочных изделий. Поэтому задачей дальнейших исследований явилось определение антиоксидантной активности зернового хлеба с применением ферментированной зерновой массы.

Результаты исследования антиоксидантной активности водных и спиртовых экстрактов зернового хлеба представлены на рисунке 6.35. На данном этапе эксперимента тестовые полуфабрикаты хранили при температуре минус 18-20 ^{0}С в течение 1 мес. За контроль-1 приняты образцы зернового хлеба, выработанные на ферментированной зерновой массы без низкотемпературной обработки полуфабрикатов, за контроль-2 образцы, приготовленные на основе замороженных полуфабрикатов.

Выявлено, что низкотемпературная обработка приводит к снижению антиоксидантной емкости зерновых полуфабрикатов. Так, после хранения полуфабрикатов в замороженном виде снижается антирадикальная активность, активность ингибирования окисления β-каротина, гидроксил-связывающая активность спиртовых вытяжек на 18,6 %, 15,7 % и 9,3 % соответственно. Следует отметить, что восстанавливающая сила контрольных и опытных образцов не подвергаются существенным изменениям при низкотемпературном хранении полуфабрикатов и составляют в среднем 38,7 % и 14,1 % для спиртовых и водных вытяжек соответственно независимо от варианта эксперимента.

Установлено, что применение янтарной кислоты и сукцинатов калия и аммония позволяет увеличить антиоксидантную активность зернового хлеба, так антирадикальная активность зернового хлеба увеличивается в среднем на 12,4 %, способность ингибировать окисление β-каротина на 16,8 %, гидроксил-связывающая активность на 14,2 % по сравнению с контролем, что объясняется антиоксидантной активностью добавок и криорезистентного штамма *L. casei 32*.

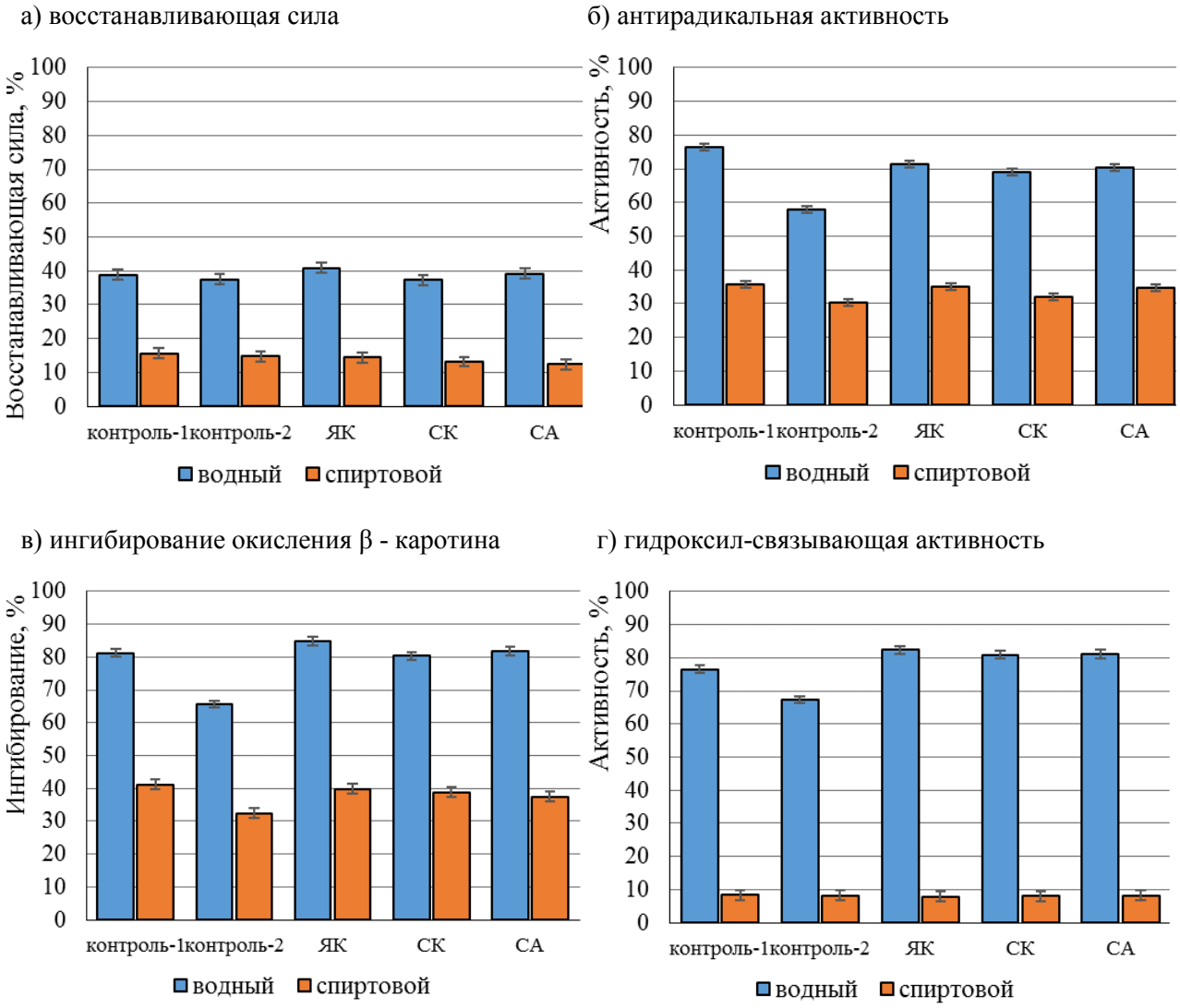


Рисунок 6.35 – Антиоксидантная активность водных и спиртовых экстрактов зернового хлеба

Результаты исследования антиоксидантной активности гидрофильной и липофильной фракции зернового хлеба по катион - радикалу $ABTS^{+}\bullet$ (рис. 6.36) и величина показателя P (prior)-критерия [17] свидетельствуют о том, что зерновой хлеб относится к хлебобулочным изделиям со средней антиоксидантной емкостью (рис.6.37). Значение P-критерия зернового хлеба образцов зернового хлеба с применением янтарной кислоты или сукцинатов колеблется в диапазоне 0,64-0,69 ед., что превышает данный показатель у контрольных образцов на 27,5 %.

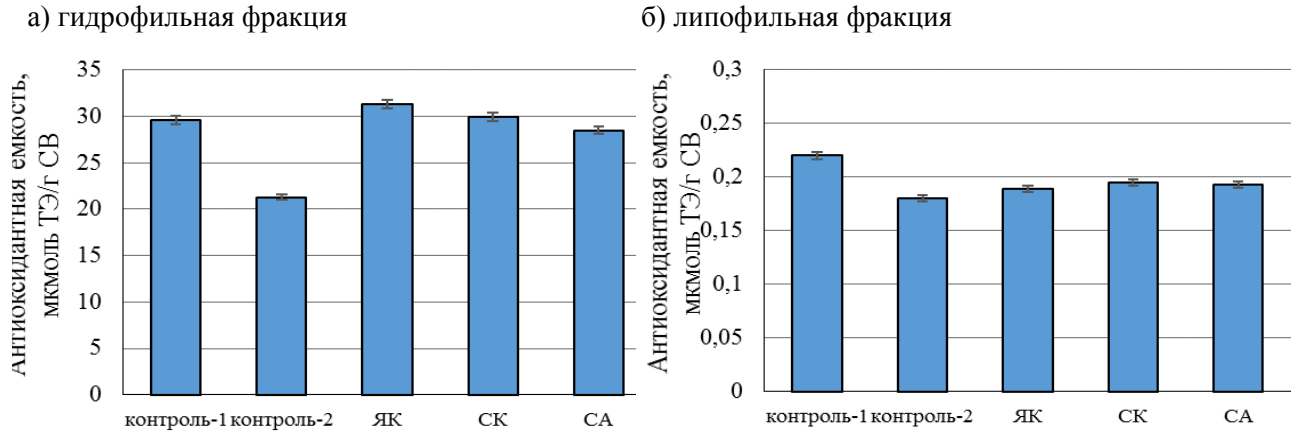


Рисунок 6.36 – Антиоксидантная емкость зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов по отношению к радикалу $ABTS^{+}\bullet$

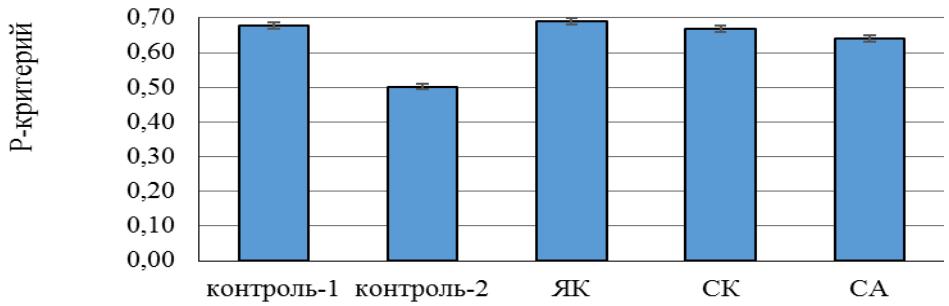


Рисунок 6.37 – Р-критерий образцов зернового хлеба

Таким образом, результаты исследования показывают, что внедрение стадии молочнокислой ферментации диспергированной зерновой массы и применение янтарной кислоты и ее солей в технологии зернового хлеба позволяет увеличить антиоксидантную емкость зернового хлеба.

Изменения белково-протеиназного комплекса зерна под воздействием низкотемпературной обработки полуфабрикатов приводит к изменению доступности белка хлебобулочных изделий пищеварительным ферментам, в связи с чем далее была изучена перевариваемость белков зернового хлеба системой «пепсин-трипсин».

Результаты исследования динамики накопления продуктов протеолиза под действием на белок изделий системой «пепсин-трипсин» показывают, что контрольные образцы, выработанные с применением криотехнологии имеют наименьшее содержание тирозина через 360 мин. гидролиза по сравнению с контрольными образцами, выработанными по традиционной технологии (рис. 6.38), что согласуется с ранее полученными данными [4, 119]. По-видимому, это объясняется изменениями структуры белка, снижением активности

собственных протеолитических ферментов зерна под воздействием низкотемпературной обработки полуфабрикатов

Из разработанных видов зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов наибольшей перевариваемостью белка отличаются образцы с янтарной кислотой, количество образовавшегося тирозина в результате гидролиза белка системой «пепсин-трипсин» данных образцов составляет 53,5 мкг/см^3.

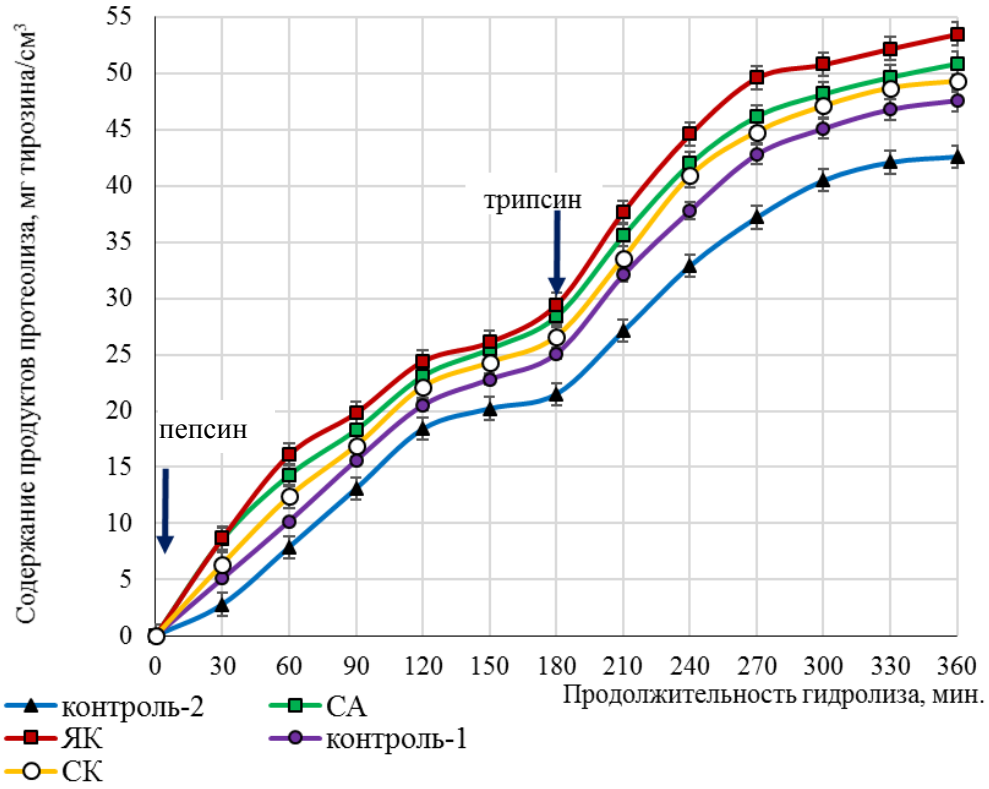


Рисунок 6.38 – Перевариваемость белков зернового хлеба в системе «пепсин-трипсин»

Установлено также, что гликемический индекс новых видов зернового хлеба существенно не зависит от варианта эксперимента (табл. 6.20). Через 30 мин после употребления опытных образцов зернового хлеба, уровень глюкозы в крови поднимается в наибольшей степени до уровня 5,9 ммоль/л, затем уровень глюкозы плавно снижается и достигает значений 4,8-4,9 ммоль/л через 120 мин. эксперимента.

Таблица 6.20 – Средний уровень глюкозы в крови после употребления зернового хлеба и глюкозы, ммоль/л

Продукт	Продолжительность эксперимента после приема продукта, мин.								
	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Контроль-1	4,7±0,3	5,3±0,3	5,6±0,2	5,4±0,3	5,2±0,3	5,0±0,3	4,9±0,2	4,8±0,3	4,8±0,3
Контроль-2	4,7±0,3	5,4±0,2	5,6±0,3	5,5±0,3	5,3±0,2	5,2±0,3	5,1±0,3	5,0±0,2	4,9±0,3
ЯК	4,7±0,3	5,5±0,3	5,9±0,3	5,6±0,2	5,4±0,3	5,2±0,3	5,1±0,3	5,0±0,2	4,9±0,2
СК	4,7±0,3	5,5±0,3	5,7±0,2	5,6±0,3	5,5±0,3	5,3±0,2	5,1±0,3	4,9±0,3	4,8±0,2
СА	4,7±0,3	5,6±0,2	5,8±0,3	5,7±0,3	5,5±0,3	5,3±0,3	5,1±0,3	5,0±0,3	4,9±0,3
Глюкоза	4,7±0,3	6,9±0,3	8,1±0,4	7,3±0,3	6,6±0,3	6,2±0,3	5,8±0,3	5,5±0,3	5,4±0,3

При этом наименьшим значением гликемического индекса – 42,7 % характеризовался зерновой хлеб, выработанный без применения низкотемпературной обработки полуфабрикатов (контроль-1), тогда как образцы хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов имеют гликемический индекс в среднем на 5-6 % выше (рис. 6.39), что обусловлено несколькими причинами. Во-первых, при длительной низкотемпературной обработке происходит прирост сбраживаемых сахаров за счет разрушения крахмала и частичной гибели дрожжей и молочнокислых бактерий, а во-вторых введение в рецептуру янтарной кислоты и ее солей приводит к дополнительному кислотному гидролизу крахмала и накоплению в изделиях декстринов, моно- и дисахаридов. Обозначенные факторы, по-видимому, приводят к повышению уровня глюкозы в крови после употребления зернового хлеба с добавками.

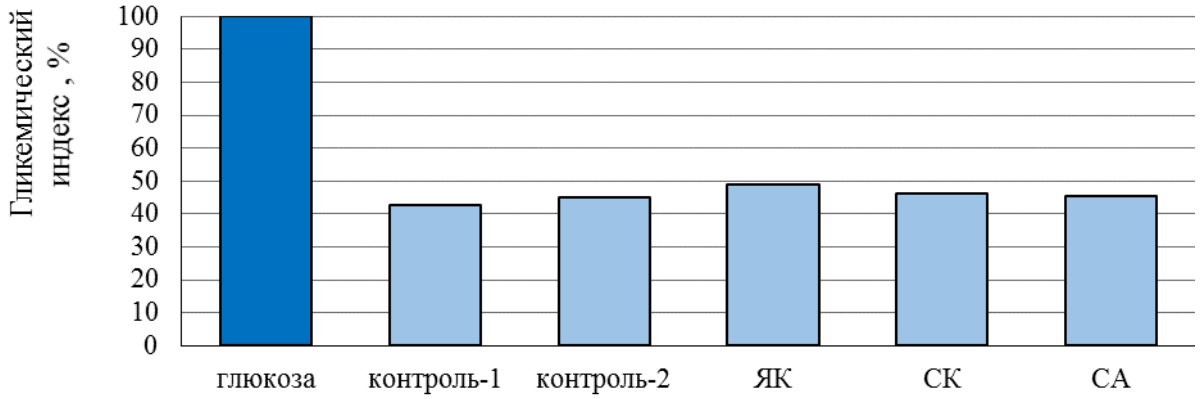


Рисунок 6.39 – Гликемический индекс новых видов зернового хлеба

В результате сравнительной оценки площадей под гликемическими кривыми после употребления исследуемых продуктов было установлено, что гликемические индексы разработанных хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов ниже уровня ≤ 55 %, что позволяет их отнести к продуктам питания с низким гликемическим индексом.

На основе проведенных исследований разработана и утверждена техническая документация на хлеб «Янтарь» (ТУ, ТИ и РЦ 10.72.19–004–2005989134–2022).

Разработана принципиальная технологическая схема производства зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов (рис. 6.40) с ферментированной зерновой массы. На рисунке 6.41 представлена аппаратурно-технологическая схема приготовления новых видов зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов.

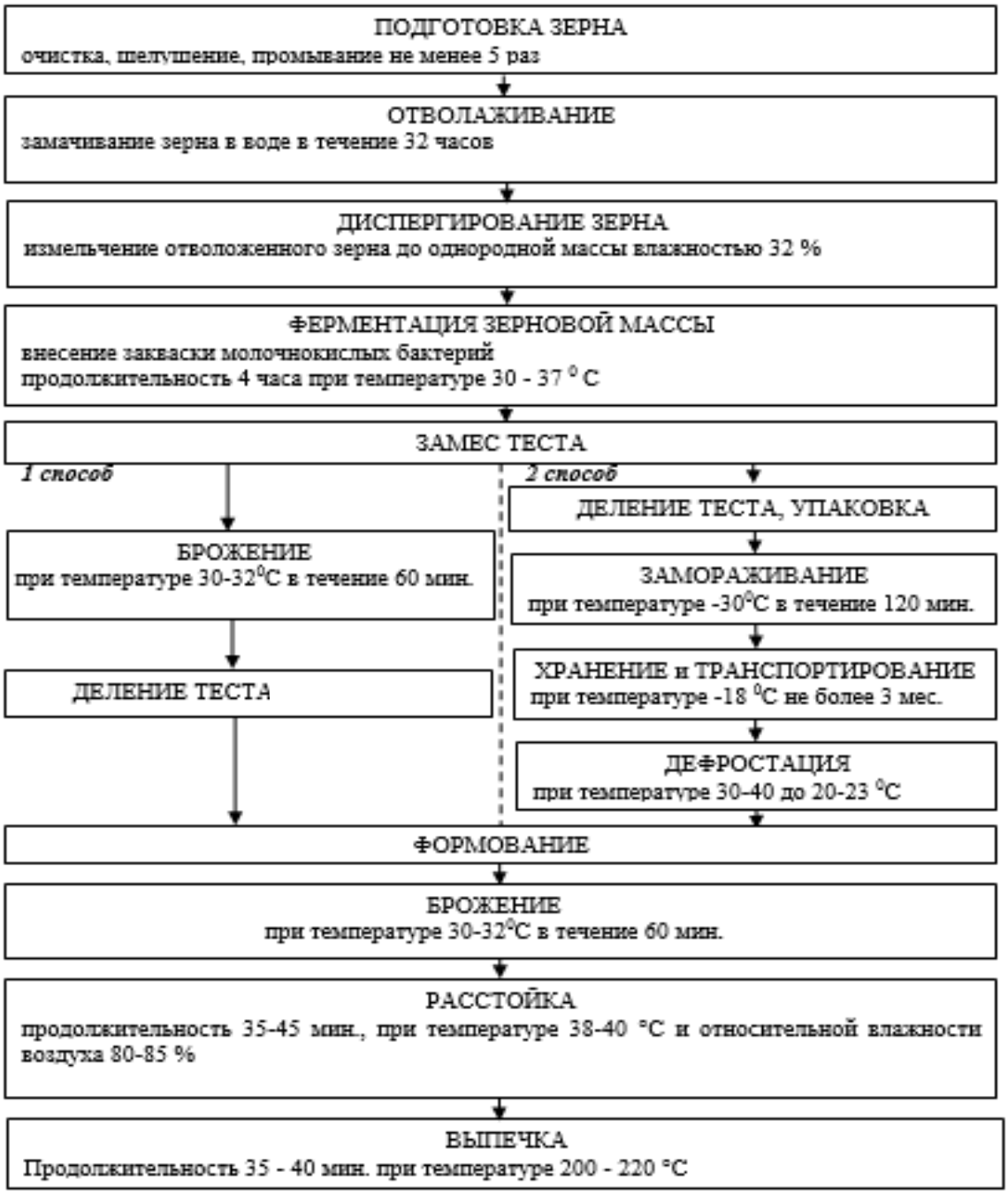


Рисунок 6.40 – Принципиальная технологическая схема производства новых видов зернового хлеба с применением ферментированной зерновой массы:
1 способ – без замораживания полуфабрикатов; 2 способ – по криотехнологии

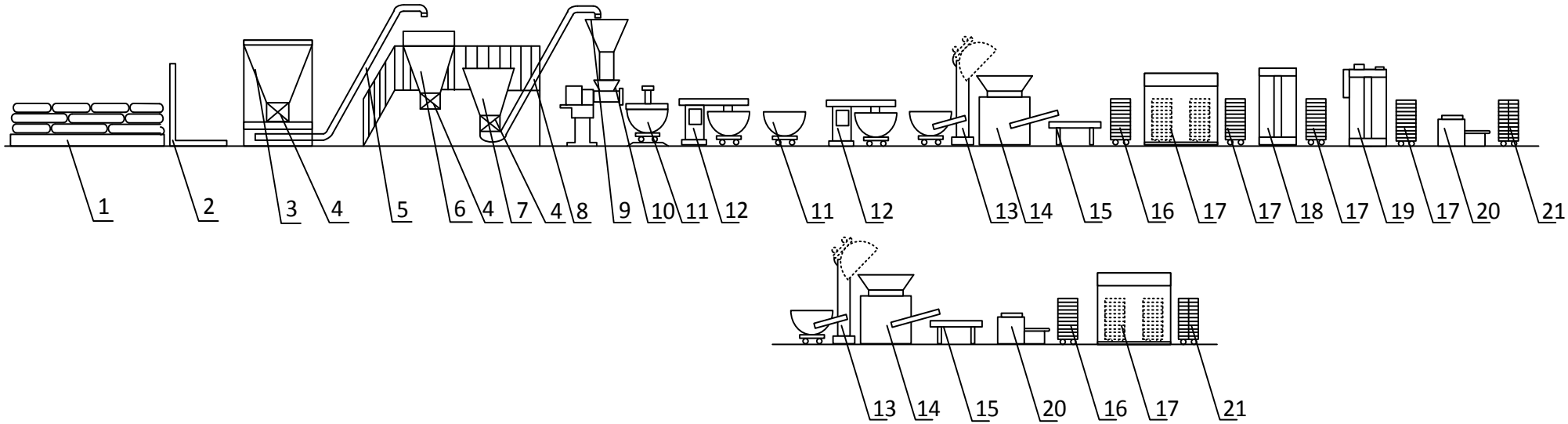


Рисунок 6.41 – Аппаратурно-технологическая схема производства новых видов зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов:

1 – поддон для хранения мешков с зерном; 2 – весы; 3 – загрузочная воронка; 4 – крыльчатый питатель;
5 – гибкий шнек; 6 – оборудование для замачивания зерна; 7 – загрузочная воронка; 8 – ковшовый элеватор;
9 – распределительная воронка; 10 – диспергирующая машина; 11 – дежа; 12 – тестомесильная машина;
13 – дежеподъемоопрокидыватель; 14 – тестоделительная машина; 15 – стол; 16 – вагонетка; 17 – шкаф шоковой заморозки;
18 – расстоечный шкаф; 19 – хлебопекарная печь; 20 – упаковочная машина; 21 – контейнер

Разработанные технологические решения позволяют увеличить продолжительность хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде с 3 мес. до 5 мес. и получить продукцию для здорового питания с улучшенными потребительскими характеристиками.

6.3 Расчет экономического эффекта производства новых видов зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Длительность технологического цикла приготовления зерновых сортов хлеба, необходимость дополнительных производственных площадей, специализированного оборудования, квалифицированных кадров вызывает определенные затруднения производства зерновых сортов хлеба в условиях малых предприятий. Решением обозначенной проблемы является внедрение технологии на основе замороженных полуфабрикатов, которая позволяет разделить производственный цикл на производство замороженных полуфабрикатов и готовой продукции на их основе.

Далее была проведена сравнительная оценка экономического эффекта производства хлеба «Биозлак» из ферментированной зерновой массы (без криогенной технологии, контроль) и «Янтарь», приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов в двух вариантах: 1 вариант – для предприятий, осуществляющих производство полуфабрикатов и свежевыпеченного хлеба из них; 2 вариант – для предприятий, осуществляющих производство только замороженных полуфабрикатов. Расчет себестоимости разработанной хлебопекарной продукции осуществляли методом калькулирования с учетом всех расходов на ее производство и реализацию [152]. Результаты расчета плановой калькуляции и проекта оптовой цены 1 т зернового хлеба, полученных на основе замороженных полуфабрикатов, представлены в таблице 6.21.

Результаты проведенных экономических расчетов показывают, что цена зернового хлеба «Янтарь» за 1 шт. массой 0,3 кг, приготовленного по 1 варианту (для предприятий, осуществляющих производство полуфабрикатов и свежевыпеченного хлеба из них) составляет 35,29 руб., что выше на 2,24 руб. по сравнению с хлебом «Биозлак» (контроль). Это обусловлено дополнительными затратами на сырье (закваски, пищевые добавки) и расходами на тепло и электроэнергию. Следует отметить, что минимальные затраты наблюдаются при выработке и реализации полуфабрикатов в замороженном виде (вариант 2), что связано с исключением трудоемких стадий технологического процесса (брожение теста, разделка, расстойка полуфабрикатов и выпечка продукции). Экономический эффект от реализации 1 т замороженных полуфабрикатов хлеба «Янтарь» составит 6,06 тыс. руб. Поэтому на хлебопекарных предприятиях экономически целесообразно реализовывать замороженные полуфабрикаты.

Таблица 6.21 – Результаты расчета плановой калькуляции 1 т разработанных зерновых видов хлеба (в ценах на 10.12.22 г.)

Статьи калькуляции	Затраты на 1 т продукции, тыс. руб.		
	Хлеб «Биозлак»	Хлеб «Янтарь»	
		1 вариант	2 вариант
Сырье, основные и вспомогательные материалы	51,43	53,31	53,31
Транспортные расходы	5,14	5,33	5,33
Расходы на тепло и электроэнергию	10,29	13,33	6,40
Расходы на заработную плату	10,29	10,66	8,00
Отчисления на соцстрахование	3,09	3,20	2,40
Расходы на содержание помещений, оборудования и инвентаря	2,57	2,67	1,33
Общехозяйственные расходы	2,57	2,67	2,67
Производственная себестоимость	85,37	91,16	79,43
Внепроизводственные расходы	1,71	1,82	1,59
Полная себестоимость	87,08	92,98	81,02
Рентабельность, %	15	15	15
Прибыль	13,06	13,95	12,15
Оптовая цена	100,14	106,93	93,17
НДС	10,01	10,69	9,32
Отпускная цена	110,16	117,62	102,49
Цена за 1 шт. изделия массой 0,3 кг	33,05	35,29	30,75

Результаты расчетов конкурентоспособности разработанных видов зернового хлеба с применением экономического критерия – «показатель конкурентоспособности» [18, 86] представлены в таблице 6.22 (продолжительность хранения полуфабрикатов в замороженном виде для хлеба «Янтарь» составила 90 сут.). В расчет индекса технических параметров разработанных изделий были включены значения Р-критерия, свидетельствующего об антиоксидантной активности хлебобулочных изделий.

Таблица 6.22 – Оценка конкурентоспособности разработанных видов зернового хлеба

Наименование показателей	Хлеб «Янтарь»		
	ЯК	СК	СА
Пористость, %	0,152	0,153	0,153
Удельный объем, $см^3$/100г	0,167	0,169	0,17
Формоустойчивость	0,159	0,175	0,175
Крошковатость	0,122	0,129	0,122
Удельная набухаемость, $см^3$	0,147	0,147	0,148
Общая деформация, мм	0,175	0,182	0,188
Р-критерий	0,197	0,191	0,183
Индекс технических параметров	1,119	1,146	1,139
Индекс экономических параметров	0,94	0,94	0,94
Показатель конкурентоспособности (k)	1,19	1,22	1,21

Результаты расчета показателей конкурентоспособности новых видов зернового хлеба показали, что хлеб «Янтарь» имеет расчетный интегральный показатель конкурентоспособности 1,19-1,22 за счет более высоких значений сводного индекса технических параметров. Следует отметить, что рассчитанные показатели конкурентоспособности всех разработанных изделий отвечают условию k>1, что подтверждает конкурентоспособность разработанных видов зернового хлеба.

Таким образом, применение закваски криорезистентных молочнокислых бактерий и внедрение стадии молочнокислой ферментации зерновой массы при производстве зернового хлеба позволит выпускать конкурентоспособную и экономически выгодную продукцию, о чем свидетельствует полученный экономический эффект. Разработанная технология позволит обеспечить простоту и надежность изготовления зернового хлеба из замороженных полуфабрикатов, а также расширить ассортимент зерновых видов хлеба и отрегулировать спрос потребителей на хлебопекарную продукцию для здорового питания с улучшенными потребительскими характеристиками.

6.4 Заключение к шестой главе

По результатам проведенных исследований обосновано внедрение стадии молочнокислой ферментации диспергированной зерновой массы из пшеницы в технологии зернового хлеба, что позволит обогатить изделия антиоксидантами, улучшить свойства полуфабрикатов и качество готовой продукции.

Данное предложение позволяет решить одну из основных проблем при производстве зернового хлеба - нестабильность качества полуфабрикатов и готовой продукции, вследствие повышенной активности ферментных систем диспергированной зерновой массы.

В ходе исследований установлено, что диспергированная зерновая масса является хорошей питательной средой для роста и развития молочнокислых бактерий, при ферментации которой отмечается резкое снижение pH среды до значений 4,0-4,2, увеличение содержания молочной кислоты до 0,33-0,36 г/100 г, увеличение количества жизнеспособных клеток до $1\text{-}5\times10^{11}$ КОЕ/г. Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что использование зерновой массы, ферментированной молочнокислыми бактериями *L. casei 32*, позволяет интенсифицировать процессы созревания полуфабрикатов, сократить продолжительность брожения теста на 40-60 мин., снизить амилолитическую и протеолитическую активность зерновой массы в среднем на 25 % и 50 % соответственно по

сравнению с образцами, выработанными по традиционной технологии, что позволяет улучшить реологические свойства теста.

Установлены оптимальные сроки хранения ферментированной зерновой массы: 5 сут. при холодильном хранении (температура ±2 ^{0}C) и 90 сут. при низкотемпературном хранении (температура минус 18-20 ^{0}C).

Выявлено, что внедрение стадии ферментации молочнокислыми заквасками диспергированной зерновой массы при производстве хлеба из целого зерна пшеницы позволяет улучшить органолептические, физико-химические и структурно-механические характеристики зернового хлеба, увеличить количество органических кислот и ароматических соединений в готовых изделиях, а также повысить микробиологическую чистоту изделий, содержание связанной влаги, что приводит к увеличению срока сохранения свежести хлеба, его выхода.

На основе ферментированной зерновой массы лактобактериями *L. casei 32* разработана технология зернового хлеба «Биозлак» (ТУ, ТИ и РЦ 10.71.11–009–2005989134–2021).

Установлено, что применение ферментированной молочнокислыми заквасками зерновой массы позволяет увеличить антиоксидантную емкость хлебопекарной продукции и оказывает положительное влияние на перевариваемость зернового хлеба. Новые виды зернового хлеба относятся к пищевым продуктам с низким гликемическим индексом согласно классификации ВОЗ и могут быть рекомендованы для включения в рацион питания людей с целью профилактики сахарного диабета.

Разработана криотехнология зернового хлеба на основе ферментированной молочнокислыми бактериями диспергированной массы из пшеницы.

Установлено, что при низкотемпературной обработке тестовых полуфабрикатов снижаются потребительские свойства зернового хлеба – ухудшаются структурно-механические свойства мякиша и физико-химические показатели качества изделий (пористость, удельный объем, крошковатость и удельная набухаемость мякиша), снижается интенсивность аромата, содержание связанной влаги. Применение ферментированной криорезистентными лактобактериями *L. casei 32* зерновой массы при замесе теста с последующим его замораживанием позволяет повысить качество зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов, увеличить сроки хранения теста в замороженном виде до 3 мес. Применение предлагаемого способа приготовления зернового хлеба позволит при необходимости на предприятии быстро прекратить и возобновить работу, сократить продолжительность процесса приготовления зернового хлеба, а также произвести выпечку

продукции в необходимых объемах на предприятии малой мощности, пекарнях, в секторе розничной торговли, предприятиях сегмента HoReCa.

На основе ферментированной зерновой массы лактобактериями *L. casei 32* разработана технология зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов «Биозлаковый» (ТУ, ТИ и РЦ 10.71.11–002–2005989134–2022).

Обосновано применение янтарной кислоты и ее солей - сукцинатов калия и аммония в качестве добавок, позволяющих интенсифицировать процесс брожения дефростированных полуфабрикатов, увеличить количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий и дрожжей, что приводит к стабилизации биотехнологических свойств полуфабрикатов зернового хлеба, подвергающихся низкотемпературной обработке, и обеспечению высоких потребительских характеристик готовой продукции.

Получены математические зависимости изменения пористости и удельного объема зернового хлеба от количества ферментированной зерновой массы закваской *L. casei 32* (от 35 до 55 %), дозировки прессованных дрожжей (от 2,0 % до 3,0 %), янтарной кислоты (от 0,05 % до 0,15 %); сукцинатов калия и аммония (от 0,1 % до 0,3 %) которые позволяют прогнозировать качество зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов, в результате анализа полученных зависимостей были определены оптимальные дозировки компонентов.

Применение ферментированной зерновой массы совместно с янтарной кислотой или сукцинатами позволяет снизить негативное влияние низкотемпературной обработки на свойства дефростированных полуфабрикатов, возникающее в результате длительного хранения теста в замороженном виде, сократить продолжительность брожения теста на 40 мин., улучшить качественные характеристики зернового хлеба.

На основе проведенных исследований разработана технология приготовления зернового хлеба «Янтарь» на основе замороженных полуфабрикатов с применением ферментированной зерновой массы и янтарной кислоты или сукцинатов (ТУ, ТИ и РЦ 10.72.19–004–2005989134–2022).

Разработанные технологические решения позволяют увеличить продолжительность хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде с 3 мес. до 5 мес. и получить продукцию для здорового питания с улучшенными потребительскими характеристиками.

Выявлено, что низкотемпературная обработка приводит к снижению антиоксидантной емкости зернового хлеба, способствует повышению перевариваемости его белков и незначительному повышению гликемического индекса.

Результаты исследования показали, что внедрение стадии молочнокислой ферментации диспергированной зерновой массы и применение янтарной кислоты и ее солей

в технологии зернового хлеба позволяет увеличить антиоксидантную емкость зернового хлеба на 24,5 %, увеличить перевариваемость белков на 4-5 %.

При приготовлении хлеба «Янтарь» на основе замороженных полуфабрикатов гликемический индекс изделий незначительно повышается, однако значения показателя ниже уровня ≤ 55 %, что позволяет их отнести к продуктам питания с низким гликемическим индексом согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, новые виды зернового хлеба могут быть рекомендованы как для широкого употребления, так и для профилактики сахарного диабета.

В результате проведенных расчетов установлено, что экономический эффект от реализации 1 т разработанных полуфабрикатов зернового хлеба в замороженном виде составит 6,06 тыс. руб.

Разработаны технологические схемы производства, рецептуры и нормативно-техническая документация на полуфабрикаты и новые виды зернового хлеба на основе ферментированной зерновой массы, проведена апробация разработанных технологий в промышленных условиях (приложения Г и Д).

Разработанная технология позволит обеспечить простоту и надежность изготовления зернового хлеба из замороженных полуфабрикатов, обеспечит возможность транспортирования продукции в замороженном виде на различные расстояния с сохранением качественных характеристик, позволит регулировать колебания спроса на готовую продукцию, а также обеспечить потребителя всегда свежим зерновым хлебом.

Таким образом, применение предлагаемых ингредиентов, полуфабрикатов и приготовление зерновых сортов хлеба на их основе позволит улучшить качество и повысить биологическую ценность хлебопекарной продукции, расширить ассортимент, повысить экономический эффект от реализации изделий, увеличить их конкурентоспособность.

Основные результаты исследований используются в учебном процессе в ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» при реализации основных образовательных программ подготовки бакалавров и магистров по направлениям 19.03.02, 19.04.02 – «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.04, 19.04.04 – «Технология и организация продукции общественного питания» (приложение Е).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате завершенного теоретического и экспериментального исследования решен комплекс научно-практических задач по поиску криорезистентных культур молочнокислых бактерий, повышению их устойчивости к низкотемпературной обработке, а также по совершенствованию технологий хлебобулочных изделий путем применения криорезистентных заквасок молочнокислых бактерий и использования пищевых добавок с криопротекторными свойствами.

В основу разработки технологии хлебобулочных изделий из замороженных полуфабрикатов положена комплексная оценка микробиологических, биотехнологических, физико-химических и биохимических процессов, происходящих при низкотемпературном воздействии на тестовые полуфабрикаты для стабилизации их биотехнологических свойств и формирования совокупности показателей качества готовой продукции.

Результаты выполненной работы представлены в следующих выводах:

1. Теоретически обоснована и разработана концепция стабилизации процесса брожения и биотехнологических свойств полуфабрикатов хлебопекарного производства в условиях криотехнологии за счет применения криорезистентных заквасок лактобактерий, пищевых добавок и ингредиентов с криопротекторными свойствами.

2. В результате направленного отбора криорезистентных функционально-активных молочнокислых бактерий из различных пищевых источников растительного и животного происхождения отобрано пятнадцать перспективных штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus.* Результаты оценки их биотехнологического потенциала позволяют рекомендовать штаммы лактобактерий с расширенным спектром функциональных свойств - *L. casei 32* и *L. plantarum 24* для производства пищевых продуктов с применением криогенных технологий, а также биологически активных добавок для пищевой, фармацевтической, косметической промышленности и ветеринарии. Данные штаммы характеризуются высокой кислотообразующей способностью и антагонистической активностью, устойчивостью к различным стрессовым воздействиям (изменению pH среды, наличию в среде желчи, NaCl, фенола, антибиотикам и окислительному стрессу), высокой антимутагенной и антиоксидантной активностью, способностью синтезировать протеолитические и амилолитические ферменты.

3. Установлено, что янтарная кислота, сукцинат калия и сукцинат аммония обладают криопротекторным действием в отношении хлебопекарных дрожжей и молочнокислых бактерий. Применение янтарной кислоты в среде культивирования позволяет увеличить количество жизнеспособных клеток лактобактерий и дрожжей после замораживания в среднем

на 15-30 %. Включение янтарной кислоты и сукцинатов в питательную среду позволяет повысить активность амилолитических ферментов молочнокислых бактерий на 30-45 % и 15-20 % соответственно, интенсифицировать процесс кислотообразования на 10-20 %.

4. Проведены комплексные исследования по разработке состава питательной среды с этапом оптимизации для повышения криорезистентности молочнокислых бактерий. Применение оптимизированной питательной среды по содержанию глюкозы, дрожжевого экстракта, сукцината аммония, ионов Mn^{2+} и Mg^{2+}, позволяет увеличить выживаемость лактобактерий при низкотемпературной обработке в 2,5 раза по сравнению с контрольными значениями, повысить удельную скорость роста клеток на 16,3 %.

5. Разработана нормативно-техническая документация на криорезистентную закваску лактобактерий для пищевой промышленности (ТУ 10.89.19.300–007–02069639–2023), представляющей собой жизнеспособные клетки *L. casei 32* или *L. plantarum 24*, предназначенную для производства продуктов питания, вырабатываемых с применением криогенных технологий. Установлено, что экономический эффект от реализации разработанной криорезистентной закваски составит 2,28 тыс. руб/кг.

6. Проведены исследования по унификации рецептуры, способа тестоприготовления и технологических режимов производства полуфабрикатов хлебопекарного производства (ржано-пшеничного теста и полуфабрикатов из ферментированной зерновой массы), обоснована целесообразность и эффективность использования криорезистентных заквасок молочнокислых бактерий *L. casei 32* и *L. casei TMB-D* в криотехнологии хлебобулочных изделий в целях интенсификации процессов брожения, улучшения органолептических, физико-химических и структурно-механических характеристик хлебопекарной продукции.

7. Проведены исследования по моделированию и оптимизации рецептур ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. Предложены эффективные пищевые криопротекторы в отношении молочнокислых бактерий и хлебопекарных дрожжей (сухое молоко и сухая молочная сыворотка, янтарная кислота и ее соли, набухающий кукурузный крахмал, пшеничный солод, ферментная композиция, содержащая Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG в соотношении 6:2,5:1). Усовершенствована криотехнология ржано-пшеничного хлеба с применением криорезистентных молочнокислых бактерий, разработанные технологические решения позволяют увеличить продолжительность хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде до 5 мес., получить хлебопекарную продукцию с высокими потребительскими характеристиками, увеличить конкурентоспособность продукции, а также расширить ассортимент хлебобулочных изделий, произведенных на основе криотехнологии.

8. Экспериментально исследован процесс биомодификации зерновой диспергированной массы путем экзогенной молочнокислой ферментации с точки зрения изменений комплекса свойств полуфабрикатов и качественных характеристик зернового хлеба. Разработана криотехнология зернового хлеба на основе ферментированной молочнокислыми бактериями зерновой массы, позволяющая увеличить сроки хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде с 3 до 5 месяцев, улучшить качественные характеристики и антиоксидантную емкость зернового хлеба на 24,5 %.

9. Разработана нормативно-техническая документация на полуфабрикаты и новый ассортимент ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением криорезистентных заквасок лактобактерий: хлеб «Морозко» с сухими молочными продуктами (ТУ 001–13981212–2004), «Морозко новый» с набухающим кукурузным крахмалом (ТУ 10.72.19–011–2003968806–2022), «Элита» с ферментной композицией (ТУ 10.72.19–016–2003968806–2022), «Злата» с солодовыми препаратами (ТУ 10.72.19–017–2003968806–2022), «Янтарный» с янтарной кислотой или ее солями (ТУ 10.72.19–014–2003968806–2022), а также на новые виды зернового хлеба на основе ферментированной зерновой массы: хлеб «Биозлак» (ТУ 10.71.11–009–2005989134–2021), «Биозлаковый» (ТУ 10.71.11–002–2005989134–2022) и «Янтарь» (ТУ 10.72.19–004–2005989134–2022).

10. Проведена промышленная апробация разработанных технологий, обеспечивающих выпуск готовой продукции с высокими технологическими и потребительскими свойствами. Установлено, что экономический эффект от реализации разработанных видов замороженных полуфабрикатов ржано-пшеничного и зернового хлеба составит 5,4 тыс. руб./т и 6,06 тыс. руб./т соответственно.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в развитии научно-практических основ биотехнологии молочнокислых бактерий для разработки нового ассортимента функциональных продуктов питания с применением криогенных технологий, а также новых конкурентоспособных биопрепаратов и биологически активных добавок для пищевой, фармацевтической, косметической промышленности и ветеринарии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АА – антимутагенная активность;

АДФ – аденозиндифосфат;

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АТФ – аденозинтрифосфат;

ацетил-КоА – ацетилкофермент А;

БГКП – бактерии группы кишечной палочки;

ВКЭ – внутриклеточный экстракт;

ВОЗ –Всемирная Организация Здравоохранения;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

КЖ – культуральная жидкость;

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;

КОЕ – колониеобразующая единица;

МДА – малоновый диальдегид;

МКБ – молочнокислые бактерии;

$НАД^+$ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

СА – сукцинат аммония;

СВ – сухие вещества;

СВ-лучи – сверхвысокочастотное излучение;

СК – сукцинат калия;

СОД – супероксиддисмутаза;

УрО АН России (г. Пермь) – Уральское отделение Российской академии наук;

$ФАД^+$ – окисленная форма флавинадениндинуклеотида;

$ФАДН_2$ – восстановленная форма флавинадениндинуклеотида;

ФГАНУ «ВНИМИ» – Федеральное государственное автономное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности»);

ФГБОУ ВО КНИТУ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Казанский национальный исследовательский технологический университет;

ФГБОУ ВО МГУПП – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет пищевых производств;

ЯК – янтарная кислота;

Δ бр. – бродильная активность полуфабрикатов;

16 S рРНК – прокариотический ген рибосомной РНК с константой седиментации 16 единиц Сведберга*;*

a – интенсивность красного оттенка;

ABTS+• –2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота (катион-радикал);

AU – единицы активности Ансона;

b – интенсивность желтого оттенка;

C – цветность;

D_{590} – оптическая плотность раствора, снимаемая при длине волны 590 нм;

DW – степень белизны;

FXU – единицы активности ксиланазы;

FR – жировой рацион кормления животных;

FR+LC32 – нормальный рацион кормления животных с добавлением ферментированного обезжиренного молока штаммом *L. casei 32;*

GRAS – «общепризнанно как безопасно» – «Generally recognized as safe»;

HoReCa – индустрия гостеприимства («Hotel – Restaurant – Catering/Cafe» – «Отель – Ресторан – Кейтеринг/кафе»);

in vitro – экспериментальные исследования в искусственных условиях;

in vivo – экспериментальные исследования на живых организмах;

L – насыщенность оттенка;

NR – нормальный рацион кормления животных;

NR+LC32 – нормальный рацион кормления животных с добавлением ферментированного обезжиренного молока штаммом *L. casei 32*;

MANU – единицы активности мальтогенной амилазы;

PEP/PTS-система – фосфоенолпируват-зависимая фосфотрансферазная система;

SH-группы – сульфгидрильные группы соединений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абилев, С.К. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений / С.К. Абилев, Г.Г. Порошенко // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Сер. Токсикология. – 1986. 14 (1). – 174 с.

2. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. – Л.: Наука, 1975. – 86 с.

3. Алехина, Н.Н. Сравнительная оценка состава ароматобразующих веществ в закваскахи хлебе зерновом на их основе / Н.Н. Алехина, Е.И. Пономарева, Х.Ю. Боташева // Хлебопродукты. – 2022. – № 5. – С. 40-43.

4. Алехина, Н.Н. Зерновой хлеб для повышения пищевого статуса населения: биоактивация злаковых культур, ресурсосбережение сырья, разработка технологий и расширение ассортимента продукции: дисс…док. техн. наук. – Воронеж: ВГУИТ, 2020. – 598 с.

5. Ананьева, Н.В. Применение иммобилизованных форм пробиотических бактерий в производстве молочных продуктов / Н.В. Ананьева [и др.] // Молочная промышленность. – 2006. – № 11. – С. 46-47.

6. Антипова, Л. В. Химия пищи / Л. В. Антипова, Н. И. Дунченко. – СПб.: Лань, 2018. – 856 с.

7. Артюхова, С.И. Использование пробиотиков и пребиотиков в биотехнологии производства биопродуктов: монография / С.И. Артюхова, Ю.А. Гаврилова. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2010. – 112 с.

8. Ауэрман Л.Я. Технология хлебопекарного производства. – СПб.: Профессия, 2002. – 416 с.

9. Бактерии рода *Lactobacillus*: Общая характеристика и методы работы с ними: учебно–методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с.

10. Базарнова, Ю.Г. Применение бактериальных заквасок, стартовых культур и биопрепаратов / Ю.Г. Базарнова, Т.А. Кузнецова, О. Б. Иванченко. – СПб: ФГФОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 2021. – 170 с.

11. Банникова, Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.

12. Бегунова, А.В. Потенциал молочнокислых бактерий в снижении уровня холестерина / А.В. Бегунова, И.В. Рожкова, Т.И. Ширшова, Ю.И. Крысанова // Пищевая промышленность. – 2020. – №11. – С 12-15.

13. Беккер, М. Е. Анабиоз микроорганизмов / М.Е. Беккер, Б.Э. Дамберг, А.И. Рапопорт. – Рига: Зинанте, 1981. – 253 с.

14. Белова, Г.А. Влияние температуры на газообразующую активность ароматобразующих молочнокислых бактерий / Г.А. Белова [и др.] // Молочная промышленность. – 1981. – №1. – С. 17-20.

15. Белоус А.М. Биохимия мембран / А.М. Белоус, Е.А. Гродиенко, Л.Ф. Розанов. – М: Высшая школа, 1987. – 83 с.

16. Белявская, И.Г. Технологические аспекты криогенных технологий хлебобулочных изделий с использованием Carbo activatus / И.Г. Белявская, Н.В. Лабутина, М.Г. Балыхин, К.С. Юркина, Д.С. Никифорова, И.В. Матвеева // Пищевая промышленность. – 2019. – № 3. – С. 40-44.

17. Белявская, И.Г. Научно–практические основы технологии хлебобулочных изделий с направленной коррекцией пищевой ценности и антиоксидантных свойств: дисс… док. техн. наук. –М.: МГУПП, 2019. – 381с.

18. Березина, Н.А. Научно-практические основы создания поликомпозитных мучных смесей для ржано-пшеничных хлебобулочных изделий повышенной пищевой ценности: дисс… док. техн. наук. –Орел: ОГУ, 2019. – 461 с.

19. Беспоместных, К.В. Исследование биохимических и морфологических свойств штаммов бактерий рода *Lactobacillus* / К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая // Техника и технология пищевых производств. 2011. № 2. – С. 94-98.

20. Бирман, С.Я. Липолитическая активность молочнокислых бактерий / С.Я. Бирман, М.С. Уманский // Тр. ВНИИИМС «Биологические и физиолого–химические исследования в маслоделии и сыроделии». – Углич. – 1986. – С. 29-35.

21. Богоявленский В.Ф. Применение янтарнокислого калия в терапевтической практике / В.Ф. Богоявленский. – Казань: Альфа, 2001. – 24 с.

22. Бондаренко, В.М. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве основы препаратов пробиотиков / В.М. Бондаренко, Э.И. Рубакова, В.А. Лаврова // Микробиология. – 1998. – № 5. – С. 107-112.

23. Ботина, С.Г. Сравнение генотипических и биохимических характеристик штаммов *Streptococcus thermophilus*, выделенных из кисломолочных продуктов / С.Г. Ботина, [и др.] // Прикладная биохимимия и микробиология. –2007. –Т.43. –№6. – С.670-676.

24. Ботина, С.Г. Технологические свойства штаммов *Streptococcus thermophilus*, выделенных их кисломолочных продуктов / С.Г Ботина, [и др.] // Биотехнология. – 2007. –№2. – С. 21-27.

25. Веснина, А.Д. Разработка пробиотического консорциума для людей с онкологическими заболеваниями / А.Д. Веснина, А.Ю. Просеков, О.В. Козлова, М.Г. Курбанова, Е.А. Козленко, Ю.В. Голубцова // Вестник ВГУИТ. – 2021. – №1 (87). – С. 219-232.

26. Военная, А.В. Совершенствование технологии приготовления хлеба на основе замороженных полуфабрикатов: дисс. … канд. техн. наук. – М., 1998. – 306 с.

27. Волкова, Г.С. Изучение и оценка биологических свойств пробиотических штаммов рода *Lactobacillus*, перспективных для производства биологически активных добавок к пище / Г. С. Волкова, Е. В. Куксова, Е. М. Серба, Н. Н. Мартыненко // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № S5. – С. 54-55.

28. Воробьев, А.А. Предпосылки и перспективы применения пробиотиков в комплексной терапии онкологических больных / А.А. Воробьев, М.Л. Гершанович, Л.Н. Петров // Вопросы онкологии. – 2004. – № 3. – С. 361-365.

29. Воробьева, Л.И. Антимутагенные свойства бактерий (обзор) / Л.И. Воробьева, С.К. Абилев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – № 2. – С. 115-127.

30. Воробьева, Л.И. Биоантимутагенное действие культуральной жидкости *Streptococcus faecalis* против мутагенеза, индуцированного 2-нитрофлуореном у *Salmonella typhimurium* ТА 1538 и ТА 98 / Л.И. Воробьева, Т.А. Чердынцева, С.К. Абилев // Микробиология. – 1996. – Т. 65. – №1. – С. 79-83.

31. Ганина, В.И. Анализ зарубежных исследований в области молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды / В.И. Ганина, Т.В. Рожкова // Известия вузов. Пищевая технология. – 2005. – № 5–6. – С. 65-66.

32. Ганина, В.И. Научные и практические основы биотехнологии кисломолочных продуктов и препаратов с пробиотическими свойствами: дисс. … канд. техн. наук. – М.: МГУПБ, 2001. – 391 с.

33. Герасимова, Э.О. Криогенные технологии в хлебопечении / Э.О. Герасимова, Н.В. Лабутина // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2019. – № 1. – С. 6-9.

34. Глушанова, Н.А. Биологические свойства лактобацилл / Н.А. Глушанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50-58.

35. Глушанова, Н.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования in vitro / Н.А. Глушанова, Б.А. Шендеров // Микробиология – 2005. – №2. – С. 134-138.

36. Глушанова, Н.А. Лактобациллы в исследовании и коррекции резистентной микрофлоры человека.: автореф. дисс. …канд. мед. наук. – Челябинск, 1999. – 29 с.

37. Глушанова, Н.А. Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника: дисс. … док. мед. наук. – Москва, 2006. – 260 с.

38. Головин, М.А. Холестеринредуцирующие пробиотические бактерии в молочной продукции / М.А. Головин, В.И. Ганина, Н.Г. Машенцева // Молочная промышленность. – 2014. – № 5. – С. 46-47.

39. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 344 с.

40. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико–химические аспекты / Под ред. С.А. Гудкова. – М: ДеЛипринт, 2003. – 800 с.

41. Гулевский А.К. Барьерные свойства мембран при низких температурах / А.К. Гулевский, В. А. Бондаренко, А. М. Белоус. – Киев: Наук. думк., 1988. – 208 с.

42. Денисенко, В.В. Рост молочнокислых бактерий на средах, содержащих желчь / В.В. Денисенко, И.А. Найденко // Мат. Международного конгресса «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты». – 2007. – №1–2. – С. 37.

43. Джафаров, М.М. Влияние источников азота на рост молочнокислых бактерий / М.М. Джафаров // Молочная промышленность. – 2006. – №8. – С.58.

44. Емельянов, С.А. Влияние температуры на развитие микроорганизмов в молоке и молочных продуктах / С.А. Емельянов [и др.] // Вестник СевКавГТУ. – 2006. – №2 (6). – С. 15-17.

45. Зверева, Л.Ф. Технология и технохимический контроль хлебопекарного производства / Л.Ф. Зверева, ЗС. Немцова, Н.П. Волкова. – М.: Легкая и пищевая промышленность. – 1983. – 416 с.

46. Звязинцев, В.И. Протеолитическая активность молочнокислых бактерий как один из факторов вкусообразования в сыре / В.И. Звязинцев // Прикладная биохимия и микробиология – 1973. – Т. 9. – Вып. 5. – С. 710-719.

47. Ивницкий Ю.Ю. Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма. / Ю. Ю. Ивницкий, А. И. Головко, Г.А. Сафронов. – С–Пб.: Лань, 1998. – 82с.

48. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / под ред Г. Г. Онищенко [и др.]; ГОУ ВУНМЦ Минздрав РФ. – М., 2002. – 608 с.

49. Кадырова Р.Г. Янтарная кислота и ее свойства / Р.Г. Кадырова. – Казань: Казан. гос. энерг. ун–т, 2005. – 99 с.

50. Карамова, Н.С. Антиоксидантная активность промышленных бактериальных заквасок / Н.С. Карамова, Р.Э. Хабибуллин, С. А. Жакслыкова [и др.] // – 2014. – Т. 17, № 21. – С. 190-194.

51. Карпушина, С.Г. Селекция и конструирование штаммов молочнокислых бактерий, перспективных для использования в пробиотиках: дисс… канд. биол. наук. – М., 1999. – 320 с.

52. Квасников, Е.И. Биология молочнокислых бактерий. – Ташкент: Изд–во УзССР, 1960. – 352 с.

53. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М: Наука, 1975. – 389 с.

54. Кенийз, Н.В. Влияние дефростации в технологии хлеба из замороженных полуфабрикатов на качество готового продукта / Н.В. Кенийз, Н.В. Сокол // Вестник НГИЭИ. – 2011. – Т. 2. – № 2 (3). – С. 92-101.

55. Кенийз, Н.В. Влияние пектина как криопротектора на водопоглотительную способность теста и дрожжевые клетки / Н.В. Кенийз // Вестник Казанского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 8. – № 3 (29). – С. 67-69.

56. Кенийз, Н.В. Разработка технологии хлебобулочных полуфабрикатов с применением криопротектора / Н.В. Кенийз, Н.В. Сокол // Новые технологии. – 2013. –№ 1. – С. 19-24.

57. Кенийз, Н.В. Технология производства хлеба из замороженных полуфабрикатов с использованием пектина в качестве криопротектора / Н.В. Кенийз, Н.В. Сокол // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2011. – № 2 (2). – С. 92-94.

58. Кенийз, Н. В. Технология применения замороженных полуфабрикатов с применением криопротекторов / Н. В. Кенийз, Н. В. Сокол – Саарбрюккен, 2014. – 129 с.

59. Кирюхина, А.Н. Современное состояние и перспективы развития производства хлеба и хлебобулочных изделий в России / А.Н. Кирюхина, Р.З. Григорьева, А.Ю. Кожевникова // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т. 49. – № 2. –С. 330-337.

60. Кисриев, Ю.С. Биосинтез диацетила в культурах молочнокислых бактерий: автореф. дисс… канд. биол. наук. – М., 2000. – 26 с.

61. Китаевская, С.В. Биотехнологические основы использования криорезистетнтных микроорганизмов в хлебопечении / С.В. Китаевская, О.А. Решетник // Казань: КНИТУ. – 2006. – 268 с.

62. Китаевская, С.В. Биотехнологический потенциал молочнокислых бактерий как биологически активных компонентов пищи / С.В. Китаевская // Материалы XVI Всероссийской конференций молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». Казань. – 2019 – С. 19-24.

63. Китаевская, С.В. Влияние низкотемпературного хранения на активность амилолитических ферментов тестовых полуфабрикатов / С.В. Китаевская, Д.Р. Камартдинова, О.А. Решетник // Материалы Международной научно-технической конференции «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение» – Воронеж: ВГУИТ. – 2020. – С. 45-48.

64. Китаевская, С.В. Влияние низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки / С.В. Китаевская, О.А. Решетник // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2020. – Т. 10. – № 3(34). – С. 439-449.

65. Китаевская, С.В. Влияние заквасок молочнокислых бактерий на качественные характеристики зернового хлеба / С.В. Китаевская, Д.Р. Камартдинова, Н.К. Романова, О.А. Решетник // Материалы Национальной научно–практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты и практические вопросы современной микробиологии и биотехнологии». – Ульяновск: ГАУ. – 2022. – С.290-297.

66. Китаевская, С.В. Оптимизация рецептурного состава ржано-пшеничного хлеба, выработанного на основе замороженных полуфабрикатов / С.В. Китаевская, Н.К. Романова, Е.В. Попова, Д.Р. Камартдинова // XXI век: Итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2019. – Т. 8. – № 4 (48). – С. 171-176.

67. Китаевская, С.В. Применение ферментных препаратов в технологии хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов / С.В. Китаевская, О.А. Решетник // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16. – № 24. – С. 91-94.

68. Китаевская, С.В. Изучение способности молочнокислых бактерий продуцировать липолитические ферменты / С.В. Китаевская // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18. – № 18. – С. 256-258.

69. Китаевская, С.В. Исследование влияния молочнокислых бактерий на процесс ферментации диспергированной зерновой массы / С.В. Китаевская, О.А. Решетник // V Международный Балтийский морской форум: VI Международная научно–практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология». –Калининград. – 2017. – С.59-61.

70. Китаевская, С.В. Современные тенденции отбора и идентификации пробиотических штаммов молочнокислых бактерий / С.В. Китаевская // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – №17. – С. 184-188.

71. Китиссу, П. Использование ферментов в технологии быстрозамороженных тестовых полуфабрикатов / П. Китиссу, А. Андреев // Хлебопродукты. – 2009. – № 4. – С. 52-53.

72. Климовский, И.И. Развитие ароматобразующих стрептококков в среде с цитратом / И.И Климовский, Г.В. Мурунова // Молочная промышленность. – 1982. – №4. – С. 21-23.

73. Козлова, О.В. Влияние олигосахаридов на активность микроорганизмов в сыворотке / О.В. Козлова, К.В. Новоселов, С.Ю. Юрьева // Молочная промышленность. – 2006. – №10. – С. 75-76.

74. Козловская, А.Э. Влияние хлебопекарных свойств ржаной обдирной муки на теплофизические характеристики ржано-пшеничных полуфабрикатов при замораживании и

дефростации / А.Э. Козловская, Н.В. Лабутина, О.А. Суворов // Пищевая промышленность. – 2017. – № 4. – С. 55-59.

75. Козьмина Н.П. Биохимия хлебопечения. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 275 с.

76. Кондрашова М. Н. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве / М. Н. Кондрашова, Ю. Г. Каминский, Е. И. Маевский. – Пущино: ОНТИ РАМН, 1996. – 300 с.

77. Кондрашова М.Н. Терапевтическое действие янтарной кислоты / М.Н. Кондрашова. – Пущино: Институт Биофизики АН СССР, 1976. – 234 с.

78. Короткая, Е.В. Исследование свойств криоконсервированных заквасок / Е.В. Короткая // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 1 (20). – С. 31-36.

79. Короткая, Е.В. Моделирование кристаллизации влаги при замораживании бактериальных заквасок / Е.В. Короткая, И.А. Короткий, К.И. Васильев, Л.А. Остроумов // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 2. – С. 252-260.

80. Корячкина, С.Я. Технология хлеба из целого зерна тритикале: монография / С.Я. Корячкина, Е. А. Кузнецова, Л. В. Черепнина. – Орел: ФГБОУ ВПО «Госуниверситет – УНПК», 2012. – 177 с.

81. Кушнарев, В.М. Характеристика сукцинатдегидрогеназной активности кишечной палочки в зависимости от устойчивости к замораживанию-высушиванию / В.М. Кушнарев, В.А. Благовещенский // Микробиология. – 1963. – Т. 32. – Вып. 1. – С. 17-19.

82. Лабутина, Н.В. Совершенствование криотехнологии ржано-пшеничного хлеба / Н.В. Лабутина, С.В. Китаевская, О.А. Решетник // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2003. – № 5–6. – С. 46-48.

83. Лабутина, Н.В. Оптимизация процесса замораживания-размораживания полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба / Н.В. Лабутина, С.В. Китаевская, О.А. Решетник // Известия вузов. Пищевая технология. – 2003. – № 4. – С. 34-37.

84. Лабутина, Н.В. Технология производства хлебобулочных изделий их замороженных полуфабрикатов ржано-пшеничного хлеба: монография. / Н.В. Лабутина. – Смоленск: Изд-во «Универсум». – 2004. – 236 с.

85. Ленинджер, А.Л. Основы биохимии пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – Т. 1–3. – 1076 с.

86. Лифиц, И.М. Конкурентоспособность товаров и услуг. – М: Изд-во Юрайт, 2022. – 392 с.

87. Малик, Н.И. Оценка жизнеспособности культур молочнокислых микроорганизмов при их замораживании и низкотемпературном хранении / Н.И. Малик и др. // Аграрная наука. – 2021. 350 (6). – С. 6-11.

88. Малихова, О.А. Кишечный микробиом и колоректальный рак / О.А. Малихова, И.А. Карасев, Давыдкина Т.С., Верещак В.В. и др. // Поволжский онкологический вестник. – 2019. – Т. 10. – № 4 (41). – С. 45-51.

89. Мартиросян, А.О. Антимикробная активность штаммов молочнокислых бактерий из кисломолочных продуктов «Наринэ», «Карине» и «Мацун» / А.О. Мартиросян [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология – 2004. – Т. 40, № 2. – С. 210-213.

90. Матвеева, И.В. Биотехнологические основы приготовления хлеба / И.В. Матвеева, И.Г. Белявская. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 150 с.

91. Матвеева, И.В. Биотехнологические решения для замороженных полуфабрикатов и хлебобулочных изделий / И.В. Матвеева, Д. Гаццола, С. Страхан // Хлебопродукты. – 2011. – № 9. – С. 30-32.

92. Машенцева, Н.Г. Образование ароматических соединений стартовыми культурами, используемыми в мясной промышленности / Н.Г. Машенцева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. – № 3. – С. 32-35.

93. Машенцева, Н.Г. Скрининг молочнокислых микроорганизмов – продуцентов бактериоцинов, перспективных для использования в мясной промышленности / Н.Г. Машенцева [и др.] // Биотехнология. – 2006. – № 6. – С. 20-27.

94. Машенцева, Н.Г. Функциональные стартовые культуры в мясной промышленности / Н.Г. Машенцева, В.В. Хорольский – М.: ДеЛи принт, 2008. – 335 с.

95. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда. – М.: Изд–во Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.

96. Мулендеев, С.В. Роль дисбиоза кишечника в этиологии и профилактике колоректального рака / С.В. Мулендеев С.В., Соловьёв И.А., Шостка К.Г., Арутюнян К.В. и др. // Профилактическая и клиническая медицина. – 2017. – № 4 (65). – С. 55-60.

97. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. – Москва : Издательство КолосС, 2001. – 570 с.

98. Назимова, Е.В. Совершенствование технологии и товароведная оценка хлеба с применением солодовых экстрактов: автореф. дисс. … канд. тех. наук. – Кемерово, 2017. – 17 с.

99. Николаева, Т.Н. Анализ влияния пробиотических штаммов лактобактерий в поддержании иммунного гемостаза организма / Т.Н. Николаева, В.В. Зорина, С.В. Вотрин // Материалы междунар. конгресса «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты». – 2007. – № 1–2. – С. 56.

100. Новик, Г.И. Биологическая активность микроорганизмов–пробионтов / Г.И. Новик [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006 – Т. 42. – №2. – С. 187-194.

101. Новик, Г.И. Продукция гидролаз и антибиотикорезистентность молочнокислых и бифидобактерий /Г.И. Новик, Н.И. Астапович, Н.Е. Рябая // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, №2. – С. 184-192.

102. Новикова, А. Н. Современная технология хлеба из целого зерна пшеницы: автореф. дис… канд. техн. наук / А. Н. Новикова. – Москва, 2004. – 25 с.

103. Овсянкина, Н.А. Гидролитическое действие на молочный жир некоторых штаммов *Lactococcus lactis* с различным уровнем протеолитической активности / Н.А. Овсянкина, А.Н. Белов // Сборник научных трудов СевКавГТУ. Серия «Продовольствие». – 2006. – №2. – С. 23-25.

104. Определитель бактерий Берги 9–е изд. в 2–х томах / Под ред. Дж. Хоулт, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса / Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. Т.1: – 432 с, Т. 2: – 368 с.

105. Пат. 2258376 Российская Федерация, МПК7 A 21 D 13/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Седелкин В. М., Рамзаева Л. Ф., Суркова А. Н., Денисова Г. П., Целовальникова О. Н. – № 2002122061/13; заявл.12.08.2002, опубл. 20.08.2005, Бюл. № 35.

106. Пат. 2258377 Российская Федерация, МПК7 A 21D 13/02, 8/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Корячкина С. Я., Кузнецова Е. А., Хмелева Е. В., Станцаева И. К. – № 2004108546/13; заявл. 22.03.2004; опубл.20.08.2005, Бюл. № 23.

107. Пат. 2341086 Российская Федерация, МПК6 A 21D 13/02, 8/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Павлик С. Ф. – № 2007106778/13; заявл. 26.02.2007; опубл. 20.12.2008, Бюл. № 35.

108. Пат. 2516598 Российская Федерация, МПК6 A 21 D 13/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Пономарева Е. И., Алехина Н. Н., Журавлева И. А., Саврасова С. В. – № 2012149536/13; заявл. 21.11.2012; опубл. 20.05.2014, Бюл. № 14.

109. Пат. 2524827 Российская Федерация, МПК6 A 21 D 13/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Пономарева Е. И., Алехина Н. Н., Журавлева И. А. – № 2013107452/13; заявл. 20.02.2013; опубл. 10.08.2014, Бюл. № 22.

110. Пат. 2560192 Российская Федерация, МПК6 A 21 D 13/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Пономарева Е. И., Алехина Н. Н., Бакаева И. А., Краснова И. Ю. – № 2014119203/13; заявл. 13.05.2014; опубл. 20.08.2015, Бюл. № 23.

111. Пат. 2560618 Российская Федерация, МПК6 A 21 D 13/02. Способ производства зернового хлеба повышенной пищевой ценности [Текст] / Пономарева Е. И., Алехина Н. Н., Бакаева И. А., Краснова И. Ю. – № 2014132827/13; заявл. 08.08.2014; опубл. 20.08.2015, Бюл. № 23.

112. Пат. 2569020 Российская Федерация, МПК6 A 21 D 8/02, A 21 D 13/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Пономарева Е. И., Алехина Н. Н.,426 Бакаева И. А., Филюшкина А. С., Олейникова Н. В. – № 2014132678/13; заявл. 07.08.2014; опубл. 20.11.2015, Бюл. № 32.

113. Пат. 2619277 Российская Федерация, МПК6 A 21 D 13/02. Способ производства зернового хлеба [Текст] / Пономарева Е. И., Алехина Н. Н., Напрасникова А. А., Быковская И. С. – № 2015147510; заявл. 05.11.2015; опубл. 12.05.2017, Бюл. № 14

114. Перфилев, Г.Д. Развитие молочнокислых бактерий в зависимости от содержания в среде микроэлементов / Г.Д. Перфилев, А.В. Гудков, Н.И. Григоров // Молочная промышленность. – 1982. – №6. – С. 30-31.

115. Пономарева, О.И. Штамм хлебопекарных дрожжей ЛВ–3, устойчивый к воздействию низкой температуры / О.И. Пономарева [и др.]// Хлебопечение России. – 2005. – № 4. – С. 14-16.

116. Пономарева, Е.И. Влияние параметров приготовления закваски спонтанного брожения на качество зернового хлеба / Е. И. Пономарева, Н. Н. Алехина, И. А. Журавлева // Хлебопродукты. – 2013. – № 3. – С. 42-43.

117. Пономарева, Е. И. Исследование микрофлоры закваски спонтанного брожения из биоактивированного зерна пшеницы / Е. И. Пономарева, Н. Н. Алехина, И. А. Бакаева // Сборник материалов III Международной научно–практической конференции «Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков». – Новосибирск : Изд–во ЦРНС, 2013. – С. 49-52.

118. Пономарева, Е.И. Практические рекомендации по совершенствованию технологии и ассортимента функциональных хлебобулочных изделий / Е. И. Пономарева, Н. М. Застрогина, Л. В. Шторх. – Воронеж : Воронеж. гос. ун–т. инж. технол., 2014. – 290 с.

119. Пономарева, Е. И. Хлеб из биоактивированного зерна пшеницы повышенной пищевой ценности / Е. И. Пономарева, Н. Н. Алехина, И. А. Бакаева // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 2. – С. 116-121.

120. Похиленко, В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99-121.

121. Пучкова, Л.И. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства / Л.И. Пучкова. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 232с.

122. Пушкарь Н.С. Введение в криобиологию / Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус. – Киев: Наук. думка, 1975. – 343 с.

123. Пушкарь, Н.С. Актуальные проблемы криобиологии / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус. – Киев: Наук. думка, 1975. – 301 с.

124. Рахманов, К.С. Закваски спонтанного брожения – эффективное средство профилактики картофельной болезни хлеба / К.С. Рахманов, И.Б. Исабаев, Т.И. Атамуратова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2011. – № 12 – С. 37-38.

125. Раченко, М.А. Антиоксидантная активность плодов рода *Malus* в условиях Южного Предбайкалья / М.А. Раченко, А.М. Шигарова // Химия растительного сырья. – 2013. – № 4. – С. 97-101.

126. Рогов, И.А. Идентификация и отбор культур *Lactobacillus* для биотрансформации молочного сырья / И.А. Рогов и др. // Биотехнология. – 2003. – № 4. – С. 45-51.

127. Савкина, О.А. Криоконсервация – перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей / О.А. Савкина, Г.В. Терновской, М.Н. Локачук, Е.Н. Павловская, В.И. Сафронова // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – 4. – С. 112-119.

128. Самойлов, В.А. Молочнокислые продукты пробиотической направленности / В.А. Самойлов, П. Г. Нестеренко, О.А. Суюнчев // Молочная промышленность. – 2007. – №7. – С. 45-47.

129. Сафонова, М.Е. Особенности роста и продукции внеклеточных протеиназ *Lactobacillus plantarum* ИМ–9 / М.Е. Сафонова, Н.И. Астапович, И.А. Буряко // Микробиология. – 1999. – Т. 68, №4. – С. 449-452.

130. Серба, Е.М. Универсальный метод определения протеолитической активности ферментных препаратов для пищевой промышленности / Е.М. Серба, М.Б. Оверченко, С.П. Агашичев, Л.В. Римарева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – № 6. – С. 33–35.

131. Серякова, Е. В. (Назимова) Оценка качества хлеба с добавлением солодовых экстрактов / Е. В. Серякова (Назимова), А. С. Романов, З. Э. Гарш //Хлебопродукты. – 2009. – № 12. – С. 48-49.

132. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – Сергиев Пасад: ООО «Все для Вас – Подмосковье», 2002. – 415 с.

133. Стоянова, Л.Г. Выделение и идентификация новых низинобразующих штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* из молока / Л.Г. Стоянова, [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – № 5. – С. 560-568.

134. Стоянова, Л.Г. Метабиотические свойства штаммов *Lactobacillus acidophilus,* входящих в комплексные закваски для производства пробиотических молочных продуктов / Л.Г. Стоянова, С.Д. Дбар, И.С. Полянская // Биотехнология. – 2022. – Т. 38. – № 1. – С. 3-12.

135. Стоянова, Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) / Стоянова, Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – № 48(3). – С. 259-275.

136. Суюнчева, Б.О. Использование пробиотиков и пребиотиков в хлебопекарной промышленности / Б.О. Суюнчева, П.В. Вавренюк, М.С. Ткачева // Сборник научных трудов СевКавГТУ. Серия «Продовольствие». – 2006. – №2. – С. 31-34.

137. Технология хлебобулочных изделий (лабораторный практикум): учеб. пособие / Е. И. Пономарева, С. И. Лукина, Н. Н. Алехина [и др.]. – Воронеж, 2014. – 280 с.

138. Тешитель, О.В. Влияние аскорбиновой кислоты на стабильность замороженного теста / О.В. Тешитель, А.В. Самусь, Л.А. Сверлик // Известия вузов. Пищевая технология. – 1989. – № 6. – С. 71-73.

139. Тешитель, О. В. Зависимость свойств клейковины и качества изделий от силы муки при замораживании теста / О.В. Тешитель // Хлебопродукты. –1989.– №9. – С. 24-25.

140. Тешитель, О.В. Улучшители хлеба для замороженного теста / О.В. Тешитель // Хлебопродукты. – 1991. – №12. – С. 42-46.

141. Тушина, Э.Н. Иммуностимулирующие влияние перорального введения бифидобактерий различных штаммов в эксперименте / Э.Н. Тушина [и др.] // Вопросы питания. – 2006. – Т. 75. – № 5. – С. 70-74.

142. Тюрин, М.В. Антибиотикорезистентность и антагонистическая активность лактобацилл: дисс….канд. мед. наук. – М., 1990. – 146 с.

143. Ускова, М.А. Антиоксидантные эффекты молочнокислых бактерий–пробиотиков и йогуртных заквасок / М.А. Ускова, Л.В. Кравченко // Вопр. питания. – 2009. – № 2. – С. 18-23.

144. Усцелемова, О. А. Разработка способов стабилизации свойств замороженных полуфабрикатов и качества хлебобулочных изделий: дисс. … канд. техн. наук. – М., 1999. – 229 с.

145. Хамагаева, И.С. Использование пробиотических культур для производства колбасных изделий / И.С. Хамагаева, И.А. Ханхалаева, Л.И. Заиграева. – Улан–Удэ: Изд–во ВСГТУ, 2006. – 204 с.

146. Хамагаева, И.С. Протеолитическая активность лактобактерий / И.С. Хамагаева, О.А. Жеребятьева, А.В. Щёкотова // Молочная промышленность. – 2016. – № 11. – С. 29-31.

147. Хромова, Н.Ю. Поиск перспективных пробиотических штаммов лакто- и бифидобактерий в комбинации с оценкой витамин-В-продуцирующего потенциала для создания биообогащенных продуктов / Н.Ю. Хромова, Ю.М. Епишкина, Н.В. Хабибулина, И.В. Шакир, В.И. Панфилов // Актуальная биотехнология. – 2022. – № 1. – С. 204-207.

148. Цуцаева А. А. Криобиология и биотехнология. – Киев: Наук. думка, 1987. – 216 с.

149. Червинец, Ю.В. Высокоантогонистические штаммы лактобацилл, перспективные для конструирования новых пробиотических препаратов: автореф. дисс… канд. мед. наук. – М., 2006. – 21 с.

150. Черных, И.В. Совершенствование технологии ржаного и ржано-пшеничного хлеба на основе оптимизации биотехнологических свойств полуфабрикатов: автореф. дисс… канд. тех. наук. – М., 2009. – 27 с.

151. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.3. Пробиотики и функциональное питание. – М.: Грантъ, 2001. – 288 с.

152. Экономика предприятия / О.И. Волков [и др.]. – М.: ИНФРА-М, 2008. – 604 с.

153. Юнусов, Э.Ш. Оценка перспективы использования незаквасочного штамма *Lactiplantibacillus plantarum* AG15 в технологиях ферментированных молочных продуктов / Э.Ш. Юнусов, В.Я. Пономарев, Е.В. Никитина // Индустрия питания|Food Industry. – 2022. – Т. 7, № 3. – С. 5-17.

154. Ямашев, Т.А. Продукты метаболизма молочнокислых бактерий как вещества, снижающие действие генотоксикантов / Т.А. Ямашев, С.В. Китаевская, О.Б. Иванченко, О.А. Решетник // Вестник Казанского технологического университета. – 2015. – №4. – С. 283-286.

155. Agafonova, A.N. Study of the influence of lactic acid bacteria on hydrolytic and oxidation processes in stuffed meat / A.N. Agafonova, T.V. Bagaeva, S.V. Kitaevskaya, N.K. Romanova, O.A. Reshetnik // Helix. – 2019. – Vol. 9 (5). – P. 5318-5322.

156. Amanatidou, A. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of Lactobacillus sake upon exposure to elevated oxygen / A. Amanatidou, M.H. Bennik, L.G. Gorris, E. Smid // Arch. Microbiol. – 2001. – № 176. – P. 79-88.

157. Amapu, T.B. Amylolytic potential of lactic acid bacteria isolated from wet milled cereals, cassava flour and fruits / Amapu, T.B., A. Ado, S. Abdullahi, I. Hycinth // British Microbiology Research Journal. – 2016. – Vol. 13. – P. 1-8.

158. Arendt, E.K. The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: / E.K. Arendt, D.P. Lowe // Journal of the Institute of Brewing. – 2014. – Vol. 110. – P. 163-180.

159. Arendt, E.K. Impact of sourdough on the texture of bread / E.K. Arendt, L.A. Ryan, F. Dal Bello // Food Microbiology. – 2007. – Vol. 24. – P. 165-174.

160. Atanasova, J. Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk / J. Atanasova, P. Moncheva, I. Ivanova // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2014. – Vol. 28. – № 6. – P. 1073-1078.

161. Axelsson, L.T. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects / L.T. Axelsson. Ed. S. Salminen, A. Atte von Wright. – New York: Marcel Dekker, 1998. – P.1-72.

162. Axelsson, L.T. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. in lactic acid bacteria. microbiology and functional aspects / L.T. Axelsson. Ed. S. Salminen, A.V. Wright, A. Ouwehand. – New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. – P.1-66.

163. Baati, L. Study of the cryotolerance of Lactobacillus acidophilus: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels/ L. Baati, C. Fabre–Gea, D. Auriol, P.J. Blanc // J. Food Microbiol. – 2000 – Vol. 59 (3) – P.241-247.

164. Badgeley A., Anwar H., Modi K., Murphy P., Lakshmikuttyamma A. Effect of probiotics and gut microbiota on anticancer drugs: Mechanistic perspectives // Reviews on Cancer. – 2021. – Vol. 1875. – № 1. – P.188494

165. Bagayeva, T.V. The study of antioxidant potential of commercially valuable starter cultures of lactic acid bacteria / T.V. Bagayeva, S.V. Kitaevskaya, O.A. Reshetnik // International Journal of Pharmacy & Technology. – 2016. – № 8. – P. 24366-24372.

166. Bah, C.S. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations / C.S. Bah, A. Bekhit, A. Carne, M.A. McConnell // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 176. – P. 54-63.

167. Bandell, M. Mechanism of citrate transporters in carbohydrate and citrate catabolism in *Lactococcus* and *Leuconostocs* species / M. Bandell, [et all] // Appl. Environ. Microbiology – 1998. – Vol. 64. – P. 1594-1600.

168. Bartkiene, E. Nutritional quality of fermented defatted soya and flaxseed flours and their effect on texture and sensory characteristics of wheat sourdough bread / E. Bartkiene, G. Juodeikiene, D. Vidmantiene // Int. J. Food Sci. Nutr. – 2012. – Vol. 63. – P. 722-729.

169. Belicova A. Antimutagenicity of milk fermented by *Enterococcus faecium* / A. Belicova, J. Krajcovic, J. Dobias, L. Erbringer // Folia Microbiol (Praha). – 1999. – Vol. 44. – №5 – P. 513-518.

170. Bengoa, A.A. Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir / A.A. Bengoa, C. Iraporda, L.B. Acurcio, S.H. de Cicco Sandes, K. Costa, G.M. Guimarães // Food Research International. – 2019. – Vol. 123. – P. 48-55.

171. Bessmeltseva, M. Evolution of bacterial consortia in spontane ously started rye sourdoughs during two months of daily propagation / M. Bessmeltseva, E. Viiard, J. Simm, T. Paalme, I. Sarand // PLoS ONE. – 2014. –Vol. 9. – P. 95449.

172. 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 (4). – P. 1427-1441.

173. Bodana, A.R. Antimutagenic activity of milk fermented by Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus / A.R. Bodana, D.R. Rao // J. Dairy Sci. – 1990. – Vol. 73. – № 12. – P. 3379-3384.

174. Bojňanská, T. Influence of the xanthan gum addition on the technological and sensory quality of baking products during the freezing storage / T. Bojňanská, J. Šmitalová, V. Vietoris, A. Vollmannová // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2016. –Vol. 10 (1). – P. 332-338.

175. Bojnanska, T. Rheological parameters of dough with inulin addition and its effect on bread quality / T. Bojnanska, M. Tokar, A. Vollmannova // J. Phys.: Conf. Ser. – 2015. – Vol. 602. – P. 12-15.

176. Borruel, N. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria / N. Borruel, M. Carol, F. Casellas // Gut. – 2002. – Vol. 51. – P. 659-664.

177. Brand-Williams. Use of a Free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie/ Brand-Williams, W. Cuvelier, M. E. Berset // Food Science and Technology. –1995. –№ 28 – P. 25-30.

178. Branen, A.L. Growth stimulation of *Lactobacillus casei* by sodium citrate / A.L. Branen, T.W. Keenan //J. Dairy Sci. – 1977. – Vol. 53. – P. 593-597.

179. Brian, C.S. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species / C.S. Brian, M. Etzel //Journal of Food Science. – 2006. – Vol. 62. – P. 576-578.

180. Bruinenberg, P.G. Proteinase over production in *Lactococcus lactis* strains: regulations and effect on growth and acidification in milk / P.G. Bruinenberg, P. Vos, W.M. Vos // Appi. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58. – № 1. – P. 78-84.

181. Bustos, A.Y. Lactic acid fermentation improved textural behaviour, phenolic compounds and antioxidant activity of chia (Salvia hispanica L.) dough / A.Y. Bustos, C.L. Gerez, L.G. Mohtar Mohtar, V.I. Paz Zanini, M.A. Nazareno, M.P. Taranto [et al.] // Food Technol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 55. – P. 381-389.

182. Caballero, P.A. Bread quality and dough rheology of enzyme–supplemented wheat flour / P.A. Caballero, M. Gómez, C.M. Rosell // Eur. Food Res. Technol. – 2006. – Vol. 224. – P. 525-534.

183. Cagno, R. Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophuic lacto bacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system / R. Cagno, [et all] // Int. Dairy J. – 2006. –Vol. 16. – P. 119-130.

184. Cao, C.C. Screening of lactic acid bacteria with high protease activity from fermented sausages and antioxidant activity assessment of its fermented sausages / C.C. Cao, M.Q. Feng, J. Sun, X.L. Xu, G.H. Zhou // CyTA – Journal of Food. – 2019. –Vol. 17 (1). – P. 347-354.

185. Carvalho, A.S. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze–dried lactic acid bacteria / A.S. Carvalho, J.Ho, P. Teixeira, P. Malcata, F.Gibbs // Lait. – 2003. – Vol. 83. – P. 203-210.

186. Carvalho, A.S. Relevant factors for the preparation of freeze–dried lactic acid bacteria / A.S. Carvalho, J. Ho, P. Teixeira, P. Malcata, F. Gibbs // International Dairy Journal. – 2004. – Vol. 14. – P. 835-847.

187. Chavan, R.S. Sourdough technology – a traditional way for wholesome foods: a review / R.S. Chavan, S.R. Chavan // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. – 2011. – Vol. 10. – P. 169-182.

188. Chen, C. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavor / C. Chen, S. Zhao, G. Hao, H. Yu, H. Tian // International Journal of Food Properties. – 2017. – Vol. 20. – № 1. – P. 316-330.

189. Chinma, C.E. Effect of acha and bambara nut sourdough flour addition on the quality of bread / C.E. Chinma, J.C. Anuonye, O.B. Ocheme, S. Abdullahi, S. Oni, C.M. Yakubu // LWT – Food Sci. Technol. – 2016. – Vol. 70. – P. 223-228.

190. Cho, I.H. Chemistry of bread aroma: a review / I.H. Cho, D.G. Peterson // Food Sci. Biotechnol. – 2010. – Vol. 9. – P. 575-582.

191. Choi, I.S. Effect of cation influx on the viability of freeze–dried *Lactobacillus brevis* WiKim0069 / I.S. Choi, H.M. Kim, S.G. Wi, H.H. Chun, I.M. Hwang, H.W. Park // Appl. Sci. – 2018. – Vol. 8. – P. 2189.

192. Christensen, J.E. Peptidases and amino acids anabolism in lactic acid bacteria / J.E. Christensen, E.G. Dudley, J.A. Pederson, J.L. Steele // Ant. Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 76. – P. 217-246.

193. Cizeikiene, D. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread / D. Cizeikiene, G. Juodeikiene, A. Paskevicius, E. Bartkiene // Food Control. – 2013. – Vol. 31. – P. 539-545.

194. Champagne, C.P. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria / C.P. Champagne, F. Mondou, Y. Raymond, D. Roy // Food Research International. – 1996. – Vol. 29. – № 5–6. – P. 555-562.

195. Coda, R. Antifungal activity of Meyerozyma guilliermondii: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long–term storage of wheat bread / R. Coda, C.G. Rizzello, R. Di Cagno, A. Trani, G. Cardinali, M. Gobbetti // Food Microbiol. – 2013. – Vol. 33. – P. 243-251.

196. Coda, R. Antifungal activity of Wickerhamomyces anomalus and Lactobacillus plantarum during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long–term effect during storage of wheat bread / R. Coda, A. Cassone, C.G. Rizzello, L. Nionelli, G. Cardinali, M. Gobbetti // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77. – P. 3484-3492.

197. Coda, R. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours / R. Coda, C.G. Rizzello, D. Pinto, M. Gobbettia // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78. – №4. – P. 1087-1096.

198. Coda, R., Varis, J., Verni, M., Rizzello, C.G., Katina, K., Improvement of the protein quality of wheat bread through faba bean sourdough addition / R. Coda, J. Varis, M. Verni, C.G. Rizzello, K. Katina // LWT Food Sci. Technol. – 2017. – Vol. 82. – P. 296-302.

199. Cogan, T.M. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. General aspects / T.M. Cogan, C. Daly // Elsevier. Appl. Sci., London and New York. – 1987. – P. 179-249.

200. Collins, E.B. Roles of acetate and pyruvate in the metabolism of Streptococcus diacetilactis / E.B. Collins, J.C Bruhn // J. of Bacteriology. – 1970. – V. 103, № 3. – P. 541-546.

201. Condon, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen / S. Condon // FEMS Microbiol. Letters. – 1987. – Vol. 46. – P. 269.

202. Corsetti, A. Combined effect of sour dough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling / A. Corsetti, M. Gobbetti, B. De Marco, F. Balestrieri, F. Paoletti, L. Russi, et al. // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48. – P. 344-305.

203. Corsetti, A. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory–scale fermentations / A. Corsetti, L. Settanni, S. Valmorri, M. Mastrangelo, G. Suzzi, // Food Microbiol. – 2007. – Vol. 24. – P. 592–-600.

204. Corsetti, A., Settanni, L., 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation / A. Corsetti, L. Settanni // Food Res. Int. – 2007. – Vol. 40. – P. 539-558.

205. Cortés–Zavaleta, O. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3–phenyllactic acid production, Intern. / O. Cortés–Zavaleta, A. López–Malo, A. Hernández–Mendoza, H.S. García // J. Food Microbiology – 2014. – Vol. 173. – P. 30-35.

206. Costantini, L. Development of gluten–free ˇ bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega–3 fatty acids as ingredients / L. Costantini, L. Luksiˇ c, R. Molinari, I. Kreft, G. Bonafaccia, L. Manzi, et al. // Food Chem. – 2014. – Vol. 165. – P. 232-240.

207. Curiel, J.A. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: the potential of sourdough fermentation / J.A. Curiel, R. Coda, I. Centomani, C. Summo, M. Gobbetti, C.G. Rizzello // Int. J. Food Microbiol. – 2015. – Vol. 196. – P. 51-61.

208. De Vuyst, L. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria / L. De Vuyst, M. Vancanneyt // Food Microbiology – 2007. – Vol. 24. – P. 120-127.

209. De Vuyst, L. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota / L. De Vuyst, G. Vrancken, F. Ravyts, T. Rimaux, S. Weckx // Food Microbiology. – 2009. – Vol. 26(7). – P. 666-675.

210. De Vuyst, L. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation / L. De Vuyst, S. Van Kerrebroeck, F. Leroy // Adv. Appl. Microbiol. – 2017. – Vol. 100. – P. 49-160.

211. De Vuyst, L. Probiotics, prebiotics and gut health. / L. De Vuyst, L. Avonts, L. Makras // Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease. – 2004. – Vol. 23. – P. 416-482.

212. De Vuyst, L. Microbial ecology of sour dough fermentations: diverse or uniform? L. De Vuyst, S. Van Kerrebroeck, H. Harth, G. Huys, H.M. Daniel, S., Weckx, Food Microbiol. – 2014. – Vol. 37. – P. 11-29.

213. De Vuyst, L. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions / L. De Vuyst, P. Neysens // Trends Food Sci. Technol. – 2005. – Vol. 16. – P.43-56.

214. De Vuyst, L. Yeast diversity of sourdoughs and associated meta bolic properties and functionalities / L. De Vuyst, H. Harth, S. Van Kerrebroeck, F. Leroy // Int. J. Food Microbiol. – 2016. –Vol. 239. – P. 26-34.

215. Decock, P. Bread technology and sourdough technology / P. Decock, S. Cappelle // Trends Food Sci. Technol. – 2005. – Vol. 16. – P. 113-120.

216. Della–Croce, C. Antimutagenic investigations on commercial yogurt / C Della–Croce, E. Morichetti, G. Bronzetti // Mechanism of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: Plenum Press. – 1993. – P. 119-125.

217. Diaz–Muniz, I. Lactobacillus casei metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: a bioinformatics approach / I. Diaz–Muniz, [et all] // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 101. – P. 872-878.

218. Diniz–Mendes, L. Preservation of frozen yeast cells by trehalose / L. Diniz–Mendes, E.Bernardes, P. S.de Araujo, A.D. Panek, V.M. Paschoalin // Biotechnology and Bioengineering. – 1999. – Vol. 65(5). – P. 572-578.

219. Dodić, J. Effects of Hydrophilic Hydrocolloids on Dough and Bread Performance of Samples Made from Frozen Doughs / J. Dodić, D. Pejin, S. Dodić, S. Popov, J. Mastilović, J. Popov–Raljić, S. Zivanovic // Journal of Food Science. – 2007. – Vol. 72. – P. 235-241.

220. Duboc, P. Application of exopolysaccharides in the dairy industry/ P. Duboc, B. Mollet // Int. dairy j. – 2001. – № 11. – P. 759-768.

221. Duboc, P. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria / P. Duboc, L. Jolly, S.J.F. Vincent // Antonie Van Leeuwenhoek– 2002. – № 82. – P. 367-374.

222. Dumont, F. Influence of cooling rate on Saccharomyces cerevisiae destruction during freezing: unexpected viability at ultra–rapid cooling rates / F. Dumont, P.A. Marechal, P. Gervais // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46. – P. 33-42.

223. Dumont, F. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze–thaw cycles with freezing to −196 degrees C / F. Dumont, P.A.Marechal, P. Gervais // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P.1330-1335.

224. Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Storia, A., Gobbetti, M., et al., 2013. Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. Appl. Environ. Microbiol. – Vol. 79. – P. 7827-7836.

225. FAO/WHO Expert Report. Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition. – Rome: WHO Expert Consultation, 2022. – 456 p.

226. Fedorova, T.V. Antagonistic activity of lactic acid bacteria *Lactobacillus spp.* in relation to clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* // Ap. Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 54 (3). – P. 264-276.

227. Feng, W. Quality deterioration and improvement of wheat gluten protein in frozen dough / W. Feng, S. Ma, X. Wang // Grain & Oil Science and Technology. – 2020. – Vol. 3. – № 1. – P. 29-37.

228. Fonseca, F. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage / F. Fonseca, C. Beal, G. Corrieu Cryobiology. – 2001. – Vol. 43 (3). – P.18-198.

229. Frauenlob, J. Effect of physicochemical and empirical rheological wheat flour properties on quality parameters of bread made from pre-fermented frozen dough / J. Frauenlob, M.E. Moriano, U. Innerkofler, S. D'Amico, M. Lucisano, R. Schoenlechner // Journal of Cereal Science. – 2017. – Vol. 77. – P. 58-65.

230. Ga¨nzle, M., Ripari, V., Composition and function of sourdough microbiota: from ecological theory to bread quality / M. Ga¨nzle, V. Ripari // Int. J. Food Microbiol. – 2016. – Vol. 239. – P. 9-25.

231. Ga¨nzle, M.G. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality / M.G. Ga¨nzle, J. Loponen, M. Gobbetti // Trends Food Sci. Technol. – 2008. – Vol. 19. – P. 513-521.

232. Gaggiano, M. Defined multi–species semi–liquid ready–to–use sourdough starter / M. Gaggiano, R. Di Cagno, M. De Angelis, P. Arnault, P. Tossut, P.F. Fox et al. // Food Microbiology – 2007. – Vol. 24. – P. 15-24.

233. Galle, S. Exopolysaccharide–forming Weissella strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs / S. Galle, C. Schwab, E. Arendt, M. Ga¨nzle // J. Agric. Food Chem. – 2010. – Vol. 58. – P. 5834-5841.

234. Galle, S. Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria / S. Galle, E.K. Arendt // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2014. – Vol. 54. – P. 891-901.

235. Galle, S. Influence of in–situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten–free sorghum sourdough bread / S. Galle, C. Schwab, F. Dal Bello, A. Coffey, M.G. Ga¨nzle, E.K. Arendt // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – Vol. 155. – P. 105-112.

236. Gerez, C.L. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties / C.L. Gerez, M.I. Torino, G. Rolla´n, G. Font de Valdez // Food Control. – 2009. – Vol. 20. – P. 144-148.

237. Giannou, V. Frozen dough bread: Quality and textural behavior during prolonged storage e prediction of final product characteristics / V. Giannou, C. Tzia // Journal of Food Engineering. – 2007. – Vol. 79. Issue 3. – P. 929-934.

238. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes / D. Cleland [et al.] // J. of Microbiological Methods. – 2004. – V. 58. – № 1. – P. 31-38.

239. Gori, S. Gut microbiota and cancer: How gut microbiota modulates activity, efficacy and toxicity of antitumoral therapy / S. Gori, A. Inno, L. Belluomini, P. Bocus et al. // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2019. – Vol. 143. – P. 139-147.

240. Gorman, R., An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of −20 degrees C and −85 degrees C for long–term preservation of Campylobacter jejuni / R. Gorman, C.C. Adley// Lett. Appl. Microbiol. – 2004. – Vol. 38. – P.306-310.

241. Grujić, R. Analysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins in pork meat by capillary gel electrophoresis / R. Grujić, D. Savanović // Foods and Raw Materials. – 2018. – Vol. 6 (2). – P. 421-428.

242. Hamed, A. Effect of β–Glucan–Rich Barley Flour Fraction on Rheology and Quality of Frozen Yeasted Dough / A. Hamed, S. Ragaee, E.–S.M. Abdel–Aal // Journal of Food Science. – 2014. – Vol. 79. – P. 2470-479.

243. Han, T. Optimization of additives and their combination to improve the quality of refrigerated dough / T. Han, Y. Xiao, F. Wu, X. Xu // LWT. – 2018. – Vol. 89. – P.482-488.

244. Han, H. Identification of lactic acid bacteria in the rumen and feces of dairy cows fed total mixed ration silage to assess the survival of silage bacteria in the gut / H. Han, Y. Ogata, Y. Yamamoto, S. Nagao, N. Nishino // J. Dairy Sci. – 2014. – Vol. 97. – №9. – P.5754-5762.

245. Hansen, A. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects / A. Hansen, P. Schieberle // Trends Food Sci. Technol. – 2005. – № 16. – P. 85-94.

246. Hassan, Y.I. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. tolerans isolated from a sour dough bread culture / Y.I. Hassan, L.B. Bullerman // Int. J. Food Microbiol. – 2008. – Vol. 121. – P. 112-115.

247. He, C.Z. Effects of trehalose, glycerin and NaCl on the growth and freeze-drying of *Lactobacillus acidophilus*/ C.Z. He, J. Lei, W.G. Shu // In book: Information Technology and Agricultural Engineering, 2012. – P.967-971.

248. Hosoda, M. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N–methyl–N'–nitro–N–nitrosoguanidine / M. Hosoda, H. Hashimoto, H. Morita, M. Chiba, A. Hosono // J Dairy Sci. – 1992. – Vol. 75. – № 4. – P. 976-981.

249. Huang, W. Rheofermentometer parameters and bread specific volume of frozen sweet dough influenced by ingredients and dough mixing temperature / W. Huang, Y. Kim, X. Li, P. Rayas–Duarte // J. Cereal Sci. – 2008. – Vol.48. – P. 639-646.

250. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46. – P. 205-229.

251. Hugenholtz, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria // FEMS Microbiol. Reviews. – 1993. – Vol. 12. – P. 165-169.

252. Hugenholtz, J. Growth and energy generation by Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis during citrate metabolism / J. Hugenholtz, L. Perdon and T. Abee // Appl Environ Microbiol. – 1993. – Vol. 59. – P. 4216-4217.

253. Huys, G. Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria / G. Huys, H.–M. Daniel, L. De Vuyst, // Handbook on Sourdough Biotechnology: Springer, New York, 2013. – 164 p.

254. Hye–Jin, K. Effects of Combined α–Amylase and Endo–Xylanase Treatments on the Properties of Fresh and Frozen Doughs and Final Breads / K. Hye–Jin, Y. Sang–Ho // Polymers. – 2020. – № 12. – P. 1349.

255. Iglesias–Puig, E., Monedero, V., Haros, M., Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. LWT – Food Sci. Technol. – 2015. – Vol. 60. – P. 71-77.

256. Improvement of cryopreservation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CFL1 with additives displaying different protective effects / F. Fonseca [et al.] // International Dairy J. – 2003. – Vol. 13. – № 11. – P. 917-926.

257. Ishimwe, N. The perspective on cholesterollowering mechanisms of probiotics / N. Ishimwe, E.B. Daliri, B.H. Lee [et al.] // Molecular Nutrition and Food Research. – 2015. – №. 59 (1). – P. 94-105.

258. Izzo, L. Whey fermented by using Lactobacillus plantarum strains: a promising approach to increase the shelf life of pita bread / L. Izzo, C. Luz, A. Ritieni, J. Manes, G. Meca // J. Dairy Sci. – 2020. – Vol. 103. – P. 5906-5915.

259. Jekle, M. Effects of selected lactic acid bacteria on the characteris tics of amaranth sourdough / M. Jekle, A. Houben, M. Mitzscherling, T. Becker // J. Sci. Food Agric. – 2010. – Vol. 90. – P. 2326-2333.

260. Jia, C. Study of the mechanism of improvement due to waxy wheat fl our addition on the quality of frozen dough bread / C. Jia, W.-D. Yang, Z. Yang, O.J. Ojobi // Journal of Cereal Science. – 2017. – Vol. 75. – P. 10-16.

261. Kandil, S. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains / S. Kandil, M. E. Soda // Advances in Microbiology.– 2015. – № 5. – P. 371-382.

262. Kariluoto, S. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads / S. Kariluoto, L. Vahteristo, H. Salovaara, K. Katina, K.H. Liukkonen, V. Piironen // Cereal Chem. – 2004. – Vol. 81. – P. 134-139.

263. Kaseleht, K. Analysis of volatile compounds produced by different species of lactobacilli in rye sourdough using multiple headspace extraction / K. Kaseleht, T. Paalme, A. Mihhalevski, I. Sarand // Int. J. Food Sci. Technol. – 2011. – Vol. 46. – P. 1940-1946.

264. Katina, K. Fermentation–induced changes in the nutritional value of native or germinated rye / K. Katina, K.H. Liukkonen, A. Kaukovirta–Norja, H. Adlercreutz, S.M. Heinonen, A.M. Lampi, [et al.] // J. Cereal Sci. – 2007. – Vol. 46. – P. 348-355.

265. Ke, Y. Effects of inulin on protein in frozen dough during frozen storage / Y. Ke, Y. Wang, W. Ding, Y. Leng, Q. Lyu, H. Yang, X. Wang, B. Ding // Food Funct. – 2020. – № 11. – P. 7775.

266. Kenijz, N.V. Cryoprotectants in the Technology for the Production of Frozen Bakery Products / N.V. Kenijz, A.A. Nesterenko, M.S. Zayats // Индустрия питания | Food Industry. – 2019. – Vol. 4. – № 4. – P. 23-29.

267. Kodali, V.P. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharides from a probiotic bacterium // V.P. Kodali, R. Sen. // Biotechnol. J. – 2008. –№ 3. – P. 245-251.

268. Korotkaya, E.V. Effect of freezing on the biochemical and enzymatic activity of *Lactobacillus bulgaricus* / E.V. Korotkaya, I.A. Korotkiy // Foods and Raw Materials. – 2013. – Vol. 1. – № 2. – P. 9-14.

269. Kunji, E.R.S. The proteolytic systems of lactic acid bacteria / E.R.S Kunji, [et all] // Ant.Leeuwenhoek. – 1996. – Vol. 70. – P. 187-221.

270. Laaksonen, T.J. Thermal and dynamic–mechanical properties of frozen wheat doughs with added sucrose, NaCl, ascorbic acid and their mixtures / T.J. Laaksonen, Y.H. Roos // International Journal of Food Properties. – 2001. – Vol. 4. Issue 2. – P. 201-213.

271. Lancelot, E. Effect of long-term storage conditions on wheat flour and bread baking properties / E. Lancelot, J. Fontaine, J. Grua-Priol, A. Le-Bail // Food Chem. – 2021. – Vol. 61. – P. 128902.

272. Lankaputhra, W.E. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids / W.E. Lankaputhra, N.P. Shan // Mutat Res. – 1998. – Vol. 397. – № 2. – P. 169–182.

273. Law, B.A. Proteolylic systems in lactic acid bacteria / B.A. Law, J. Kolstad // Ant. Leeuwenhoek. – 1983. – Vol. 49. – № 3. – P. 225-245.

274. Le Blanc, J.G. B–group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications / Le Blanc J.G. [et all] // Microbiol. – 2011. – № 111. –P. 1297-1309.

275. Le–Bail, A. Fermented Frozen Dough: Impact of Pre–fermentation Time and of Freezing Rate for a Pre–fermented Frozen Dough on Final Volume of the Bread / A. Le–Bail, C. Nicolitch, C. Vuillod // Food Bioprocess Technol. – 2010. – № 3. – P. 197-203.

276. Lertittikul, W. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influence by pH / W. Lertittikul, W. Benjakul, M. Tanaka // Food Chemistry.- 2007. - Vol. 100. - P. 669-677.

277. Lhomme, E. Sourdough microbial community dynamics: an analysis during French organic bread–making processes / E. Lhomme, C. Urien, J. Legrand, X. Dousset, B. Onno, D. Sicard // Food Microbiol. – 2016. – Vol. 53. – P. 41-50.

278. Liong M.–T. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in–vivo evident // International Journal of Molecular Sciences. – 2008. – Vol. 9. – № 5. – P. 854–863.

279. Liong, M.T. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol / M.T. Liong, H.S. Lye, G. Rusul // Journal of dairy science. – 2010. – Vol. 93 (4). – P. 1383-1392.

280. Liong, M.T. Roles of probiotics and prebiotics on cholesterol: the hypothesized mechanisms / M.T. Liong, N.P. Shah // Nutrafood. – 2005. – № 4. – P. 45-57.

281. Liu, A. Antifungal Mechanisms and Application of Lactic Acid Bacteria in Bakery Products: A Review / A. Liu, R. Xu, S. Zhang, Y. Wang, B. Hu, X. Ao, Q. Li, J. Li, K. Hu, Y. Yang, S. Liu // Front. Microbiol. – 2022. – Vol. 13. – P. 398-412.

282. Liu, C.–F. Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides / C.–F. Liu [et all] // J. Sci. Food Agric. – 2011. – № 91. – P. 2284-2291.

283. Liukkonen, K.H. Process induced changes on bioactive compounds in whole grain rye / K.H. Liukkonen, K. Katina, A. Wilhelmsson, O. Myllymaki, A.M. Lampi, S. Kariluoto, [et al.] // Proc. Nutr. Soc. – 2003. – Vol. 62. – P. 11-23.

284. Loan, H. Autoproteolysis of the extracellular serine proteinase of *Lactococcus lactis subsp. cremoris Wg2* / H. Loan, W.N Konings // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57. – № 9. – P. 2586-2590.

285. Luo, W. Improving freeze tolerance of yeast and dough properties for enhancing frozen dough quality – A review of effective methods / W. Luo, D.–W. Sun, Z. Zhu, Q.–J. Wang // Trends in Food Science & Technology. – 2018. – № 72. – P. 25-33.

286. Luray, G. Effects of freezing and frozen storage conditions on the rheological properties of different formulations of non-yeasted wheat and gluten-free bread dough / G. Luray, B. Oliete, S. Mezaize, S. Chevallier, M. de Lamballerie // Journal of Food Engineering. – 2010. – Vol. 100. – № 1. – P. 70-76.

287. Machado Alencar, N.M. Addition of quinoa and amaranth flour in gluten–free breads: temporal profile and instrumental analysis / N.M. Machado Alencar, C.J. Steel, I.D. Alvim, E.C.de Morais, H.M. Andre Bolini // LWT – Food Sci. Technol. – 2015. – Vol. 62. – P. 1011-1018.

288. Marty–Teysset, C. Membrane potential–generating transport of citrate and malate catalyzed by CitP of Leuconostoc mesenteroides / C. Marty–Teysset, J.S. Lolkema, P. Schmitt, C. Divies, W.N. Konings // J Biol Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 70-76.

289. Marty–Teysset, C. The citrate metabolic pathway in Leuconostoc mesenteroides: expression, amino acid synthesis, and a–ketocarboxylate transport / C. Marty–Teysset, J.S. Lolkema, P. Schmitt, C. Divies, W.N. Konings // J. Bacteriol. – 1996. – Vol. 178. – P. 6209-6215.

290. Maske, B.L. A review on enzyme-producing lactobacilli associated with the human digestive process: From metabolism to application / B. L. Maske, G. V. Pereira, A.S. Vale, D. P. Neto, S.G. Karp // Enzyme and Microbial Technology. – 2021. – Vol. 149. – P. 109836.

291. Matar, C. Antimutagenic effects of milk fermented by Lactobacillus helveticus L89 and a protease–deficient derivative / C. Matar, S.S. Nadathur, A.T. Bakalinsky, J. Goulet // J Dairy Sci. – 1997. – Vol. 80. – № 9. – P. 1965-1970.

292. Mego, M. Probiotic bacteria in cancer patients un–dergoing chemotherapy and radiation therapy / M. Mego, V. Holec, L. Drgona, K. Hainova et al. // Complementary Therapies in Medicine. – 2013. – Vol. 21 (6). – P. 712-723.

293. Meziani, S., Effects of freezing treatments on viscoelastic and structural behavior of frozen sweet dough / S. Meziani, J. Jasniewski, C. Gaiani, I. Ioannou, J. Muller, M. Ghoul, S. Desobry // Journal of Food Engineering. – 2011. – Vol. 107(3–4). – P. 358-365.

294. Minervini, F. Ecological parameters influencing microbial diver sity and stability of traditional sourdough / F. Minervini, M. De Angelis, R. Di Cagno, M. Gobbetti, // Int. J. Food Microbiol. – 2014. – Vol. 171. – P. 136-146.

295. Minervini, F. Influence of artisan bakery– or laboratory–propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas / F. Minervini, A. Lattanzi, M. De Angelis, R. Di Cagno, M. Gobbetti // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78. – P. 5328-5340.

296. Minervini, F. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type / F. Minervini, M. De Angelis, R. Di Cagno, D. Pinto, S. Siragusa, C.G. Rizzello, et al. // I. Food Microbiol. – 2010. – Vol. 27. – P.897-908.

297. Minervini, F. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs / F. Minervini, A. Lattanzi, M. De Angelis, G. Celano, M. Gobbetti // Food Microbiol. – 2015. – Vol. 52. – P. 66-76.

298. Moineau–Jean, A. Effect of Greek–style yoghurt manufacturing processes on starter and probiotic bacteria populations during storage / A. Moineau–Jean, C. P. Champagne, D. Roy, Y. Raymond, G. LaPointe // International Dairy Journal. – 2019. – Vol. 93. – P. 35-44.

299. Morgan, CA. Preservation of micro–organisms by drying: A review / CA. Morgan, N. Herman, PA. White, G. Vesey // Journal of Microbiological Methods. – 2006. – Vol. 66 (2). – P. 183-193.

300. Morichi, T. Factors affecting repair of sublethal injury in frozen or freeze–dried bacteria / T. Morichi, R. Irie // Cryobiology. – 1973. – Vol. 10. – № 5. – P. 393-399.

301. Morkūnas, E. The impact of modulating the gastrointestinal microbiota in cancer patients / E. Morkūnas, J. Skiecevičienė, J. Kupčinskas // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. – 2020. – Vol. 48–49. – P. 101700.

302. Moroni, A.V. Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters / A.V. Moroni, E.K. Arendt, J.P. Morrissey, F.D. Bello // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – Vol. 142. – P. 142-148.

303. Moroni, A.V. Sourdough in gluten–free bread–making: an ancient technology to solve a novel issue? / A.V. Moroni, F. Dal Bello, E.K. Arendt // Food Microbiol. – 2009. – № 26. – P. 676-684.

304. Muelas, R. Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters/ R. Muelas, A. Martí de Olives, G. Romero, J.R. Díaz, M.E. Sayas–Barberá, E. Sendra // LWT – Food Science and Technology. – 2018. – Vol. 98. – P. 506-514.

305. Muhialdin, B.J. Identification of low molecular weight antimicrobial peptides from Iraqi camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum* / B.J. Muhialdin, F. Algboory // Pharma Nutrition. – 2018. – Vol. 6. – P. 69-73.

306. Kenijz, N.V. Cryoprotectants in the Technology for the Production of Frozen Bakery Products / N.V. Kenijz, A.A. Nesterenko, M.S. Zayats // Индустрия питания | Food Industry. – 2019. – Vol. 4, № 4. – P. 23-29.

307. Nakamura, M. Effects of L–ascorbic acid on the rheological properties of wheat flour dough / M. Nakamura, Kurata, T// Cereal Chemistry. – 1997. – Vol. 74. – P. 647-650.

308. Namia, Y. Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk / Y. Namia, B. Haghshenasc, R.V. Bakhshayesha, H.M. Jalalya, H. Lotfia, S. Eslamia, M.A. Hejazia // LWT – Food Science and Technology. – 2018. – Vol. 98. – P. 85-93.

309. Nemeroff, C.B. The role of gaba in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders / C.B. Nemeroff // Psychopharmacol. Bull. – 2003. – Vol. 37. – P. 133-146.

310. Nikica, Š. Combined effects of inulin, pectin and guar gum on the quality and stability of partially baked frozen bread / Š. Nikica, N. Dubravka, Č. Nikolina, S. Bojana, Ć. Duška // Food Hydrocolloids. – 2013. – Vol. 30 (1). – P. 428-436.

311. Nikitina, E.V. Potential use of *Lactiplantibacillus plantarum* strains for fermentation of fat milk. IOP Conference Series Earth and Environmental Science. – 2022. – Vol. 978 (1) – P. 012047 (1-4).

312. Nikitina, E.V. Textural and functional properties of skimmed and whole milk fermented by novel *Lactiplantibacillus plantarum AG10* strain isolated from silage / E.V. Nikitina, T. Petrova, A.Vafina, A.M. Ezhkova, Y. M.Nait, A. Kayumov //Fermentation. – 2022. – Vol. 8 (6). P. – 290–296.

313. Nionelli, L. Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation / L. Nionelli, E. Pontonio, M. Gobbetti, C.G. Rizzello // Int. J. Food Microbiol. – 2018. – Vol. 266. – P. 173-182.

314. Ouiddir, M. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products / M. Ouiddir, G. Bettache, M. Leyva Salas, A. Pawtowski, C. Donot, S. Brahimi, et al. Food Microbiol. – 2019. – Vol. 82. – P. 160-170.

315. Ozulku, G. Characterization of the rheological and technological properties of the frozen sourdough bread with chickpea flour addition / G. Ozulku, M. Arıcı // Food Measure. – 2017. – № 11. – P. 1493-1500.

316. Padmavathi, T. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification / T. Padmavathi, R. Bhargavi, P.R. Priyanka, N.R. Niranjan, P.V. Pavitra // J. Genet. Eng. Biotechnol. – 2018. – Vol. 16(2). – P. 357-362.

317. Pan, D. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from Lactococcus lactis subsp. lactis 12 / D. Pan, X. Mei // Carbohydrate Polymers. – 2010. – Vol. 80, Issue 3. – P. 908-914.

318. Panoff, J.–M. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze–thaw stress in Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus CIP 101027T / J.–M.Panoff, B. Thammavongs, M.Gueguen // Cryobiology. – 2000. – Vol. 40. – № 3. – P. 264-269.

319. Parada, J.L. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives / C.R. Caron, A.B.P. Medeiros, R. Soccol // Brazilian arch. biol. technol. – 2007. – № 50. – P. 521-542.

320. Passot, S. Cryopreservation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus: Towards a quantitative understanding of the cell biophysical response during freezing / S. Passot, A. Rault, S. Cenard, F. Fonseca //Cryobiology. – 2010. – Vol. 61 (3). – P. 372-381.

321. Patra, F. Technological and functional applications of low–calorie sweeteners from lactic acid bacteria / F. Patra, S.K. Tomar, S. Arora // J. food sci. – 2009. – Vol. 74. – P. 1.

322. Pe´tel, C. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: a review / C. Pe´tel, B. Onno, C. Prost // Trends Food Sci. Technol. – 2017. – Vol. 59. – P. 105-123.

323. Penas, E. A multistrategic approach in the develop ment of sourdough bread targeted towards blood pressure reduction / E. Penas, M. Diana, J. Frias, J. Quilez, C. Martinez–Villaluenga // Plant Foods Hum. Nutr. – 2015. – Vol. 70. – P.1226-1234.

324. Pico, J. Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: a review / J. Pico, J. Bernal, M. Go´mez // Food Res. Int. – 2015. – Vol. 75. – P. 200-215.

325. Plessas, S. Evolution of aroma vola tiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of Kluyveromyces marxianus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus or Lactobacillus helveticus / S. Plessas, A. Bekatorou, J. Gallanagh, P. Nigam, A.A. Koutinas, C. Psarianos // Food Chem. – 2008. – Vol. 107. – P. 883-889.

326. Polak, B.M. Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by lactobacillus rhamnosus E/N cultivated on different carbon / B.M. Polak, A. Wasko, D. Szwajgier and A. Choma // Sources Polish Journal of Microbiology. – 2013. – Vol. 62. – № 2. – P. 181-189.

327. Pool–Zobel, B.L. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in vivo in the gastrointestinal tract of rats / B.L. Pool–Zobel, B. Bertram, M. Knoll, R. Lambertz // Nutr. Cancer. – 1993. – Vol. 20. – №3. – P. 271-281.

328. Prabhurajeshwar, C. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in–vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt / C. Prabhurajeshwar, K. Chandrakanth // Clinical Nutrition Experimental. – 2019. – Vol. 23. – P. 97-115.

329. Rao, P.A. Effects of Selected Surfactants on Amylopectin Recrystallization and on Recoverability of Bread Crumb During Storage / P.A. Rao, A. Nussinovitch, P. Chinachoti // Cereal Chem. – 1992. – Vol. 69. – P. 613-618.

330. Raveschot, C. Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: from gene to application / C. Raveschot, B. Cudennec, F. Coutte, C. Flahaut, M. Fremont, D. Drider, P. Dhulster // Frontiers in microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 2354.

331. Ribotta, P.D. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality / P.D. Ribotta, A.E. Leon, M.C. Anon // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49. – P. 913-918.

332. Ribotta, P.D. Effects of yeast freezing in frozen dough // P.D. Ribotta, A.E. León, M.C. Añón // Cereal Chem. – 2003. – Vol. 80. – P. 454-458.

333. Ribotta, P.D. Frozen dough in Bakery Products: Science and Technology, edited by Y.H. Hui. / P.D. Ribotta, A.E. Leon, M.C. Anon // Ames (USA) Blackwell Publishing. – 2006. – P. 381-390.

334. Ripari, V., Ga¨nzle, M.G., Berardi, E., Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials / V. Ripari, M.G. Ga¨nzle, E. Berardi // Int. J. Food Microbiol. – 2016. – Vol. 232. – P. 35-42.

335. Rizzello, C.G. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making / C.G. Rizzello, A. Cassone, R. Coda, M. Gobbetti // Food Chem. – 2011. – Vol. 127. – P. 952-959.

336. Rizzello, C.G. Synthesis of angiotensin I–converting enzyme (ACE)–inhibitory peptides and gamma–aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria / C.G. Rizzello, A. Cassone, R. Di Cagno, M. Gobbetti // J. Agric. Food Chem. – 2008. – Vol. 56. – P. 6936-6943.

337. Rizzello, C.G. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery / C.G. Rizzello, D. Tagliazucchi, E.bBabini, G.S.Rutella, D.L. Saa, A. Gianotti // Journal of Functional Foods. – 2016. – Vol. 27. – P. 549-569.

338. Rizzello, C.G. Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lac tic acid bacteria during sourdough fermentation / C.G. Rizzello, L. Nionelli, R. Coda, M. Gobbetti / Nutr. Cancer. – 2012. –Vol. 64. – P. 111-120.

339. Rizzello, C.G. Use of sourdough made with quinoa (Chenopodium quinoa) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread / C.G. Rizzello, A. Lorusso, M. Montemurro, M. Gobbetti // Food Microbiol. – 2016. – Vol. 56. – P. 1-13.

340. Russo, P. Lactobacillus plantarum with broad antifungal activity: a promising approach to increase safety and shelf–life of cereal–based products / P. Russo, M.P. Arena, D. Fiocco, V. Capozzi, D. Drider, G. Spano // Int. J. Food Microbiol. – 2017. – Vol. 247. – P. 48-54.

341. Saarela, M. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of Bifidobacterium animalis ssp. lactis cells produced without milk-based ingredients / M. Saarela, I. Virkajärvi, H.-L. Alakomi // J. of Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 99. – № 6. – P. 1330-1338.

342. Sadeghi, A. The secrets of sourdough: a review of miraculous potentials of sourdough in bread shelf life / A. Sadeghi // Biotechnology. – 2008. – Vol. 7. – P. 413-417.

343. Safronova, V., Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long–term authorized depositing of commercial microbial strains / V. Safronova, I. Tikhonovich // Microbes in applied research: current advances and challenge. – 2012. –Vol. 37. – P.331-334.

344. Selomulyo, V.O. Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers / V.O. Selomulyo and W. Zhou // J. Cereal Sci. – 2007. – Vol. 45. – P. 1-17.

345. Serve, G. Pates boulangeres et surgelation / G.Serve // Industries Gourmandes. – 1986. - №11. – P. 68-67.

346. Servin, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens // FEMS Microbiol. Reviews. – 2004. –Vol. 28. – P. 405-407.

347. Settachaimongkon, S. Influence of *Lactobacillus plantarum WCFS1* on post–acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set–yoghurt/ S. Settachaimongkon, H.J.F. van Valenberg, I. Gazi, M.J.R. Nout, E.J. Smid // Food Microbiology. – 2016. – Vol. 59. – P. 14-22.

348. Sharadanant, R. Effect of Hydrophilic Gums on the Quality of Frozen Dough II. Bread Characteristics / R. Sharadanant, K. Khan // Cereal Chem. – 2003. – Vol. 80. – P. 773-780.

349. Shon, J. Effects of milk proteins and gums on quality of bread made from frozen dough / J. Shon, Y. Yun, M. Shin, K.B. Chin, J.–B. Eun // J. Sci. Food Agric. – 2009. – Vol. 89. – P. 1407-1415.

350. Siepmann, F.B. Overview of sourdough technology: from produc tion to marketing / F.B. Siepmann, V. Ripari, N. Waszczynskyj, M.R. Spier // Food Bioprocess. Technol. – 2018. – № 11. – P. 242-270.

351. Siepmann, F.B., Ripari, V., Waszczynskyj, N., Spier, M.R. Overview of sourdough technology: from production to marketing / F.B. Siepmann, V. Ripari, N. Waszczynskyj, M.R. Spier // Food Bioprocess. Technol. – 2018. – № 11. – P. 242-244.

352. Silvas–García, M.I. Effect of freezing rate and storage on the rheologi cal, thermal and structural properties of frozen wheat dough starch / M.I. Silvas–García, B. Ramírez–Wong, P.I. Torres–Chávez, L.A. Bello–Pérez, E. Carvajal–Millán, J.M. Barrón–Hoyos, M.E. Rodríguez–García, F. Vázquez–Lara, A. Quintero Ramos // Starch/Staerke. – 2016. – Vol. 68. – P. 1103-1110.

353. Singh, S.K. Metabolic engineering approaches for lactic acid production / S.K. Singh, S.U. Ahmed, A. Pandey // Process Biochem. – 2006. – Vol. 41. – P. 991-1000.

354. Siragusa, S. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propaga tion using Lactobacillus sanfranciscensis starters / S. Siragusa, R. Di Cagno, D. Ercolini, F. Minervini, M. Gobbetti, M. De Angelis // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – P. 1099-1109.

355. Škara, N. Combined effects of inulin, pectin and guar gum on the quality and stability of partially baked frozen bread / N. Škara, D. Novotni, N. Čukelj, B. Smerdel, Ć. Duška // Food Hydrocolloids. – 2013. – Vol. 30 (1). – P. 428-436.

356. Smit, G. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products / G. Smit, [et all] // FEMS Microbiol. Reviews. – 2005. – Vol. 29. – P. 591-610.

357. Soccol, C.R. The potential of probiotics: a review / C.R. Soccol [et all] // Food technol. biotechnol. – 2010. – № 48. – P. 413-434.

358. Stauffer, C.E. Frozen dough save work but must be handled carefully // Baking Industry. – 1984. – Vol. 151. - №5. – P. 18-19.

359. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents / Facco S.R. [et all] // Food Research International. – 2019. – Vol. 115. – P.90-94.

360. Sterr, Y. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth / Y. Sterr, A. Weiss, H. Schmidt // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – Vol. 136. – P. 75-82.

361. Stokic, E. Quality of buckwheat–enriched wheat bread and its antihyperlipidemic effect in statin treated patients / E. Stokic, A. Mandi´c, M. Saka´c, A. Miˇsan, M. Pestoriˇc // LWT – Food Sci. Technol. – 2015. – Vol. 63. – P. 556-561.

362. Tan, P.S. Proteolytic enzymes of Lactococcus lactis / P.S. Tan, [et all] / J. Dairy Res. – 1993. – Vol. 60. №2. – P. 269-286.

363. Tanaka, H. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity / H. Tanaka, K. Doesburg, T. Iwasaki, I. Mierau // Journal of Dairy Science. – 1999. – №. 82 (12). – P. 2530-2535.

364. Tanushree, M. Use of hydrocolloids as cryoprotectant for frozen foods / Tanushree Maity, Alok Saxena // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2016. – Vol. 58 (3). – P. 420-435.

365. Tedeschi, R. Collection and preservation of frozen microorganisms / R. Tedeschi, P. De Paoli, // Methods in Molecular Biology – 2011 – Vol. 675. – P. 313-326.

366. Thumu, S.C.R. In vivo safety assessment of *Lactobacillus fermentum* strains, evaluation of their cholesterol–lowering ability and intestinal microbial modulation / S.C.R. Thumu, P.M. Halami // Journal of the Science of Food Agriculture. – 2020. – №. 100 (2). – P. 705-713.

367. Uzunova–Doneva T., Donev T Anabiosis and conservation of microorganisms / T. Uzunova–Doneva, T. Donev // J. of Culture Collections. – 2005. – Vol. 4. – P. 17-28.

368. Vandenbergh, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth // FEMS Microbiol. Reviews. – 1993. –Vol.12. – P. 221-226.

369. Vermeulen, N. Reduction of (E)–2–nonenal and (E,E)–2,4–decadienal during sourdough fermentation / N. Vermeulen, M. Czerny, M.G. Ga¨nzle, P. Schieberle, R.F. Vogel // J. Cereal Sci. – 2007. – № 45. – P. 78-87.

370. Wang, P. Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions / P. Wang, H. Chen, B. Mohanad, L. Xu, Y. Ning// Food Hydrocolloids. – 2014. – Vol. 39. – P. 187-194.

371. Wang, P. Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions / P. Wang, L. Xu, M. Nikoo, D. Ocen, F. Wu, N. Yang // Food Hydrocolloids. – 2014. – Vol. 35. – P. 238-246.

372. Wang, P. Impact of water extractable arabinoxylan from rye bran on the frozen steamed bread dough quality / P. Wang, T. Han, J. Zhengyu, X. Xueming // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 200. – P. 117-124.

373. Wang, P. Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage – A review from gluten, glutenin and gliadin per spectives / P. Wang, Z. Jin, X. Xu // Trends Food Sci. Technol. – 2015. – № 46. – P. 189-198.

374. Wang, X. Effects of enzymes to improve sensory quality of frozen dough bread and analysis on its mechanism / X. Wang, D. Pei, Y. Teng, J. Liang // Journal Food Science & Technology. – 2018. – Vol. 55. Issue 1. – P. 389-398.

375. Weckx, S. Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome / S. Weckx, R.Van der Meulen, J. Allemeersch, G. Huys, P. Vandamme, P. Van Hummelen, et al. Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76. – P. 5402-5408.

376. Williams, A.G. The effect of α–ketoglutaric acid on amino unilization by nonstarter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese / A.G. Williams, J. Noble, J.M. Banks // J. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 99. – P. 333.

377. Wolter, A. Evaluation of exopolysac charide producing *Weissella cibaria MG1* strain for the production of sourdough from various flours / A. Wolter, A.S. Hager, E. Zannini, S. Galle, M.G. Ganzle, D.M. Waters [et al.] // Food Microbiol. – 2014. – Vol. 37. – P. 44-50.

378. Woosung, B. Physicochemical characterization of whole–grain wheat flour in a frozen dough system for bake off technology / B. Woosung, L. Bon, G.H. Gary, L. Suyong // Journal of Cereal Science. – 2014. – Vol. 60. Issue 3. – P. 520-525.

379. Wu, S. Effect of sourdough fermented with corn oil and lactic acid bacteria on bread flavor / S. Wu, Y. Peng, J. Xi, Q. Zhao, D. Xu et al. // LWT. – 2022. – Vol. 155 (3). – P. 112935.

380. Yap, P. G. Allantoin, a potential metabolite that promotes ampk phosphorylation and suppresses cholesterol biosynthesis via the mevalonate pathway and bloch pathway / P.G. Yap, M.T. Liong, S.B. Choi // Applied Biochemistry and Biotechnology – Part A Enzyme Engineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 191. – № 1. – P. 226-244.

381. Yi, J. Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties / J. Yi, W.L. Kerr // LWT–Food Sci. Technol. – 2009. – № 42. – P. 1474-1483.

382. Zannini, E. Applications of microbial fermentations for produc tion of gluten–free products and perspectives / E. Zannini, E. Pontonio, D.M. Waters, E.K. Arendt // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 93. – P. 473-477.

383. Zhao, C.J. Effect of glutamate accumulation during sourdough fer mentation with Lactobacillus reuteri on the taste of bread and sodium–reduced bread / C.J. Zhao, M. Kinner, W. Wismer, M.G. Ga¨nzle // Cereal Chem. – 2015. – Vol. 92. – P. 224-230.

384. Zhao, C.J. Formation of taste–active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations / C.J. Zhao, A. Schieber, M.G. Ga¨nzle // Food Res. Int. – 2016. – Vol. 89. – P. 39-47.

385. Zhao, G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze–drying / G. Zhao, G. Zhang // J. of Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 99. – № 2. – P. 333-340.

386. Zheng, J. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae / J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti, C. Franz, H.M.B. Harris, P. Mattarelli, O'Toole // J. Syst. Evol. Microbiol. – 2020. – Vol. 70. – P. 2782-2858.

387. Zhou, J. The addition of alpha–cyclo dextrin and gamma–cyclodextrin affect quality of dough and prebaked bread during frozen storage / J. Zhou, Y. Ke, F. J. Barba, S. Xiao, X. Hu, X. Qin, W. Ding, Q. Lyu, X. Wang, G. Liu // Foods. – 2019. – Vol. 8. – P. 174.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица – Устойчивость к низкотемпературной обработке изолятов молочнокислых бактерий

Условное обозначение	Источник происхождения	Выживаемость клеток при низкотемпературной обработке, %		
		- 20 ^{0}C	- 30 ^{0}C	- 196 ^{0}C
1	2	3	4	5
РМ-1	**ржаная мука**	**80,2**	**84,3**	**92,4**
РМ-2	ржаная мука	45,9	50,7	62,1
РМ-3	**ржаная мука**	**86,5**	**82,2**	**94,2**
РМ-4	ржаная мука	27,1	34,6	45,0
РМ-5	ржаная мука	32,6	35,8	51,3
РМ-6	ржаная мука	62,4	68,1	70,9
РМ-7	**ржаная мука**	**81,7**	**82,8**	**89,9**
РМ-8	ржаная мука	40,1	41,5	47,2
РМ-9	ржаная мука	57,3	59,9	64,7
РМ-10	**ржаная мука**	**80,5**	**83,1**	**95,3**
РМ-11	ржаная мука	43,3	44,9	49,1
РМ-12	ржаная мука	23,8	27,2	46,0
РМ-13	ржаная мука	29,9	28,5	38,6
РМ-14	ржаная мука	19,8	20,5	29,7
РМ-15	ржаная мука	44,3	52,1	60,9
РМ-16	**ржаная мука**	**82,0**	**82,8**	**90,1**
РМ-17	ржаная мука	56,2	52,8	71,4
РМ-19	ржаная мука	40,3	37,8	53,5
РМ-20	ржаная мука	34,8	39,0	55,2
РМ-21	**ржаная мука**	**82,3**	**88,4**	**94,9**
РМ-22	ржаная мука	43,5	50,3	65,7
РМ-23	ржаная мука	39,2	44,9	54,7
РМ-24	ржаная мука	51,1	54,0	68,9
РМ-25	ржаная мука	46,4	50,5	61,7
РМ-26	ржаная мука	30,4	32,9	41,8
РМ-27	ржаная мука	60,7	68,4	76,0
РМ-28	ржаная мука	33,3	46,9	68,5
РМ-29	ржаная мука	38,3	50,6	59,6
РМ-30	ржаная мука	22,7	39,2	44,8
РМ-31	ржаная мука	40,4	49,5	67,4
РМ-32	ржаная мука	18,5	22,3	26,4
РМ-33	ржаная мука	54,6	50,8	71,3
РМ-34	ржаная мука	22,7	30,1	53,8
КК-1	**квашеная капуста**	**80,6**	**85,3**	**88,9**
КК-2	квашеная капуста	62,1	66,4	73,1
КК-3	квашеная капуста	35,9	42,9	60,2
КК-4	квашеная капуста	26,7	39,5	69,6
КК-5	квашеная капуста	44,9	50,5	67,3
КК-6	**квашеная капуста**	**32,9**	**45,2**	**50,7**
КК-7	квашеная капуста	84,5	85,9	88,7
КК-8	квашеная капуста	43,0	54,7	68,1
КК-9	квашеная капуста	26,7	34,5	58,2

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
КК-10	квашеная капуста	53,8	58,9	72,5
КК-11	квашеная капуста	50,4	61,6	78,5
КК-12	**квашеная капуста**	**83,0**	**84,5**	**88,6**
КК-13	квашеная капуста	46,3	50,7	79,9
КК-14	квашеная капуста	48,7	54,5	81,2
КК-15	квашеная капуста	34,7	45,3	67,2
КК-16	квашеная капуста	46,0	56,3	58,8
КК-17	квашеная капуста	36,2	43,0	54,1
КК-18	квашеная капуста	31,1	40,5	67,4
КК-19	квашеная капуста	48,3	64,2	81,0
КК-20	квашеная капуста	60,2	66,3	78,2
КК-21	квашеная капуста	24,6	45,1	50,3
КК-22	квашеная капуста	51,5	57,9	73,7
КК-23	**квашеная капуста**	**80,0**	**86,4**	**88,5**
КК-24	квашеная капуста	39,9	47,2	70,7
КК-25	квашеная капуста	50,6	56,5	67,4
КК-26	квашеная капуста	31,7	42,6	57,3
КК-27	квашеная капуста	53,3	58,9	72,9
СМ-1	сквашенное молоко	50,4	51,2	69,9
СМ-2	сквашенное молоко	69,3	78,1	82,6
СМ-3	сквашенное молоко	57,3	55,9	78,5
СМ-4	сквашенное молоко	40,6	57,9	60,4
СМ-5	сквашенное молоко	63,1	72,7	81,9
СМ-6	сквашенное молоко	38,3	42,9	57,1
СМ-7	сквашенное молоко	50,3	61,8	72,9
СМ-8	сквашенное молоко	41,8	56,1	69,0
СМ-9	**сквашенное молоко**	**81,1**	**86,5**	**86,9**
СМ-10	сквашенное молоко	66,3	68,0	83,9
СМ-11	сквашенное молоко	46,9	51,6	68,6
СМ-12	сквашенное молоко	29,9	45,7	51,8
СМ-13	сквашенное молоко	82,0	91,1	94,2
СМ-14	сквашенное молоко	53,1	59,9	70,2
СМ-15	сквашенное молоко	40,1	64,7	81,6
СМ-16	сквашенное молоко	24,7	56,2	80,5
СМ-17	сквашенное молоко	35,9	48,6	69,0
СМ-18	сквашенное молоко	40,7	51,9	78,5
СМ-19	сквашенное молоко	42,8	61,7	80,9
СМ-20	сквашенное молоко	52,1	67,9	78,4
СМ-21	сквашенное молоко	33,9	56,2	71,1
СМ-22	сквашенное молоко	40,2	45,5	59,3
СМ-23	сквашенное молоко	36,9	54,4	72,7
СМ-24	**сквашенное молоко**	**84,5**	**85,3**	**87,2**
СМ-25	сквашенное молоко	19,2	34,8	50,6
СМ-26	сквашенное молоко	26,4	48,1	58,4
СМ-27	сквашенное молоко	40,5	65,3	76,6
СМ-28	сквашенное молоко	46,0	57,1	70,8

Окончание таблицы

1	2	3	4	5
СМ-29	сквашенное молоко	23,8	53,1	79,4
СМ-30	сквашенное молоко	51,8	67,4	82,8
СМ-31	сквашенное молоко	67,2	65,4	76,7
СМ-32	**сквашенное молоко**	**80,5**	**81,2**	**93,8**
СМ-33	сквашенное молоко	51,8	54,9	84,5
СМ-34	сквашенное молоко	16,9	20,4	42,1
СМ-35	сквашенное молоко	59,0	67,3	90,47
СМ-36	**сквашенное молоко**	**85,6**	**84,0**	**90,6**
СМ-37	сквашенное молоко	53,3	67,2	85,1
СМ-38	сквашенное молоко	27,5	36,3	49,9
СМ-39	сквашенное молоко	36,0	69,5	84,8
СМ-40	сквашенное молоко	40,2	47,3	70,6
СМ-41	сквашенное молоко	24,8	38,3	57,5
СМ-42	сквашенное молоко	53,7	52,9	80,8
СМ-43	сквашенное молоко	46,7	74,0	89,7
СМ-44	сквашенное молоко	39,1	52,2	60,9
СМ-45	сквашенное молоко	25,8	31,1	43,4
СМ-46	сквашенное молоко	55,3	72,7	81,8
СМ-47	сквашенное молоко	15,6	38,3	70,1
СМ-48	сквашенное молоко	31,0	58,5	83,5
СМ-49	сквашенное молоко	49,2	63,8	75,6
СМ-50	сквашенное молоко	29,5	62,7	83,5
СМ-51	сквашенное молоко	23,9	52,7	69,1
СМ-52	сквашенное молоко	37,0	51,3	80,4
СМ-53	сквашенное молоко	20,7	31,5	54,1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Последовательности 16S рРНК

Lactobacillus casei 32

gcctatacatgcaagtcgtacgagttttggtcgatgaagggtgcttgcactgagattcgacttaaaacgagtggcggacgggtgagtaacacgtgggt
aacctgcccttaagtgggggataacatttggaaacagatgctaataccgcataaatccaagaaccgcatggttcttggctgaaagatggcgcaagct
atcgcttttggatggacccgcggcgtattagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggcgatgatacgtagccgaactgagaggttgatcggccac
attgggactgagacacggcccaaactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccacaatggacgcaagtctgatggagcaacgccgcgtgagtg
aagaaggctttcgggtcgtaaaactctgttgttggagaagaatggtcggcagagtaactgttgtcggcgtgacggtatccaaccagaaagccacggct
aactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtggcaagcgttatccggatttattgggcgtaaagcgagcgcaggcggtttttaagtctgatgtga
aagccctcggcttaaccgaggaagcgcatcggaaactgggaaacttgagtgcagaagaggacagtggaactccatgtgtagcggtgaaatgcgtag
atatatggaagaacaccagtggcgaaggcggctgtctggtctgtaactgacgctgaggctcgaaagcatgggtagcgaacaggattagataccctgg
tagtccatgccgttaacgatgaatgctaggtgttggagggtttccgcccttcagtgccgcagctaacgcattaagcattccgcctggggagtacgaccg
caaggttgaaactcaaaggaattgacaggggcccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggtcttgac
atcttttgatcacctgagagatcaggtttccccttcgggggcaaaatgacaggtggtgcatggttgtcgtcaactcgtgtcgtgagatgttgggttaagt
cccgcaacgagcgcaacccttatgactagttgccagcattgagttgggcactctagtaagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacg
tcaaatcatcatgccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggatggtacaacgagttgcgagaccgcgaggtcaagctaatctcttaaagc
cattctcagttcggactgtaggctgcaactcgcctacacgaagtcggaatcgctagtaatcgcggatcagcacgccgcggtgaatacgttcccgggcct
tgtacacaccgcccgtctcaccatgagagtttgtaacacccgaagccggtggcgtaaccc

Lactobacillus plantarum 24

tgcaagtcgaacgaactctggtattgattggtgcttgcatcatgatttacatttgagtgagtggcgaactggtgagtaacacgtgggaaacctgcccag
aagcgggggataacacctggaaacagatgctaataccgcataacaacttggaccgcatggtccgagcttgaaagatggcttcggctatcacttttgga
tggtcccgcggcgtattagctagatggtggggtaacggctcaccatggcaatgatacgtagccgacctgagagggtaatcggccacattgggactga
gacacggcccaaactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccacaatggacgaaagtctgatggagcaacgccgcgtgagtgaagaagggttt
cggctcgtaaaactctgttgttaaagaagaacatatctgagagtaactgttcaggtattgacggtatttaaccagaaagccacggctaactacgtgcca
gcagccgcggtaatacgtaggtggcaagcgttgtccggatttattgggcgtaaagcgagcgcaggcggtttttaagtctgatgtgaaagccttcggct
caaccgaagaagtgcatcggaaactgggaaacttgagtgcagaagaggacagtggaactccatgtgtagcggtgaaatgcgtagatatatggaaga
acaccagtggcgaaggcggctgtctggtctgtaactgacgctgaggctcgaaagtatgggtagcaaacaggattagataccctggtagtccataccgt
aaacgatgaatgctaagtgttggagggtttccgcccttcagtgctgcagctaacgcattaagcattccgcctggggagtacggccgcaaggctgaaac
tcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgaagctacgcgaagaaccttaccaggtcttgacatactatgcaaat
ctaagagattagacgttcccttcggggacatggatacaggtggtgcatggttgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagc
gcaacccttattatcagttgccagcattaagttgggcactctggtgagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatcatcatg
cccctatgacctgggctacacacgtgctacaatggatggtacaacgagttgcgaactcgcgagagtaagctaatctcttaaagccattctcagttcgg
attgtaggctgcaactcgcctacatgaagtcggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgccgcggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgccc
gtcacaccatgagagtttgtaacacccaaagtcggtggggtaacctttt

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Матрицы планирования экспериментальных исследований

Таблица 1 – Матрица планирования эксперимента для оптимизации питательной среды

Номер опыта	Факторы эксперимента					Функции	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Y_1, г/100 мл	Y_2, %
1	10	2	0,01	0,075	0,025	1,12	56,4
2	10	2	0,01	0,075	0,075	1,34	67,2
3	10	2	0,01	0,125	0,025	1,15	34,8
4	10	2	0,01	0,125	0,075	1,52	33,1
5	10	2	0,08	0,075	0,025	1,36	34,9
6	10	2	0,08	0,075	0,075	0,99	31,1
7	10	2	0,08	0,125	0,025	1,04	45,7
8	10	2	0,08	0,125	0,075	1,26	49,2
9	10	10	0,01	0,075	0,025	1,16	38,5
10	10	10	0,01	0,075	0,075	0,92	36,3
11	10	10	0,01	0,125	0,025	1,43	64,2
12	10	10	0,01	0,125	0,075	1,18	58,2
13	10	10	0,08	0,075	0,025	0,95	34,8
14	10	10	0,08	0,075	0,075	1,04	46,3
15	10	10	0,08	0,125	0,025	1,16	49,7
16	10	10	0,08	0,125	0,075	1,42	57,2
17	30	2	0,01	0,075	0,025	1,28	54,5
18	30	2	0,01	0,075	0,075	1,32	58,3
19	30	2	0,01	0,125	0,025	1,20	50,1
20	30	2	0,01	0,125	0,075	1,23	49,3
21	30	2	0,08	0,075	0,025	0,97	38,4
22	30	2	0,08	0,075	0,075	1,07	45,5
23	30	2	0,08	0,125	0,025	1,15	49,6
24	30	2	0,08	0,125	0,075	1,06	40,3
25	30	10	0,01	0,075	0,025	1,46	47,8
26	30	10	0,01	0,075	0,075	1,32	38,2
27	30	10	0,01	0,125	0,025	1,29	43,1
28	30	10	0,01	0,125	0,075	1,17	44,5
29	30	10	0,08	0,075	0,025	0,95	34,9
30	30	10	0,08	0,075	0,075	1,13	42,0
31	30	10	0,08	0,125	0,025	1,31	45,8
32	30	10	0,08	0,125	0,075	1,17	41,9

Таблица 2 – Матрица планирования эксперимента по влиянию сухой закваски и сухого молока на пористость и удельный объем хлеба

Матрица проведения эксперимента			Показатели качества готовых изделий	
X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
0,5	0	0	56,9	186
0,6	0	0	58,2	192
0,7	0	0	57,6	189
0,8	0	0	57,1	184
0,9	0	0	55,2	180
1,0	0,1	0	61,5	204
0,7	0,05	0	58,7	187
0,7	0,07	0	59,2	190
0,7	0,08	0	60,1	194
0,7	0,09	0	60,9	199
0,7	0,12	0	61,6	205
0,7	0,15	0	60,0	192
0,7	0,2	0	58,3	190
0,7	0,3	0	55,0	179
0,7	0,1	0	59,2	189
0,5	0,15	0	60,1	190
0,5	0,2	0	56,1	181
0,6	0	1	57,2	188
0,7	0	2	58,8	195
0,7	0	3	59,0	197
0,7	0	4	60,5	200
0,7	0	5	60,5	201
0,7	0	6	59,8	196
0,7	0,15	5	58,9	190
0,7	0,15	4	61,8	210
0,7	0,1	4	62,0	209
0,7	0,1	4	60,1	191
1,0	0	4	55,7	186

Таблица 3 – Характеристики планирования по изучению влияния сухой закваски и сухой молочной сыворотки на качество хлеба

Характеристики планирования	Пределы изменения факторов	
	X_1	X_2
Основной уровень (0)	0,1	4,0
Интервал варьирования	0,05	2,0
Верхний уровень (+1)	1,15	6,0
Нижний уровень (-1)	0,05	2,0
Верхняя «звездная» точка (+1,41)	0,18	6,8
Нижняя «звездная» точка (-1,41)	0,03	1,2

Таблица 4 – Матрица планирования и результаты эксперимента по изучению влияния сухой закваски и сухой молочной сыворотки на качество хлеба

Номер опыта	Система опытов	X_1	X_2	Y_1, %	Y_2, см^3/100 г
1	Полный факторный эксперимент	1,15	2,0	60,4	197
2		0,05	2,0	59,6	192
3		1,15	6,0	60,7	196
4		0,05	6,0	59,9	193
5	Опыты в «звездных» точках	0,18	4,0	60,7	188
6		0,03	4,0	59,5	189
7		0,1	6,8	60,2	198
8		0,1	1,2	59,1	182
9	Опыты в центре плана	0,1	4,0	61,3	203
10		0,1	4,0	61,2	201
11		0,1	4,0	61,3	202
12		0,1	4,0	61,4	203
13		0,1	4,0	61,4	203

Таблица 5 – Характеристики планирования эксперимента по изучению влияния сухой закваски и модифицированного крахмала на качество хлеба

Характеристики планирования	Пределы изменения факторов	
	X_1	X_2
Основной уровень (0)	0,1	1,0
Интервал варьирования	0,05	0,5
Верхний уровень (+1)	1,15	1,5
Нижний уровень (-1)	0,05	0,5
Верхняя «звездная» точка (+1,41)	0,18	1,7
Нижняя «звездная» точка (-1,41)	0,03	0,3

Таблица 6 – Матрица планирования и результаты эксперимента по изучению влияния сухой закваски и модифицированного крахмала на качество хлеба

Номер опыта	Система опытов	X_1	X_2	Y_1, %	Y_2, см^3/100 г
1	Полный факторный эксперимент	1,15	0,5	60,1	199
2		0,05	0,5	59,4	197
3		1,15	1,5	60,5	201
4		0,05	1,5	59,8	195
5	Опыты в «звездных» точках	0,18	1,0	58,8	192
6		0,03	1,0	58,2	187
7		0,1	1,7	59,4	194
8		0,1	0,3	58,4	190
9	Опыты в центре плана	0,1	1,0	60,8	203
10		0,1	1,0	60,9	201
11		0,1	1,0	60,9	202
12		0,1	1,0	60,7	200
13		0,1	1,0	60,8	202

Таблица 7 – Характеристики планирования эксперимента по изучению влияния сухой закваски и янтарной кислоты (сукцинатов) на качество хлеба

Характеристики планирования	Пределы изменения факторов			
	X_1	X_2	X_3	X_4
Основной уровень (0)	0,1	0,1	0,2	0,2
Интервал варьирования	0,05	0,05	0,1	0,1
Верхний уровень (+1)	0,15	0,15	0,3	0,3
Нижний уровень (-1)	0,05	0,05	0,1	0,1
Верхняя «звездная» точка (+1,41)	0,18	0,18	0,34	0,34
Нижняя «звездная» точка (-1,41)	0,03	0,03	0,06	0,06

Таблица 8 – Матрица планирования и результаты эксперимента

Номер опыта	Кодированные значения факторов				Y_1, %	Y_2, $см^3$/100 г
	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	0,15	0,05	0	0	61,3	201
2	0,05	0,05	0	0	60,8	205
3	0,15	0,15	0	0	61,0	200
4	0,05	0,15	0	0	60,5	194
5	0,18	0,1	0	0	62,5	211
6	0,03	0,1	0	0	60,7	190
7	0,1	0,18	0	0	61,2	203
8	0,1	0,03	0	0	60,4	198
9	0,1	0,1	0	0	64,8	203
10	0,1	0,1	0	0	64,6	208
11	0,1	0,1	0	0	64,6	191
12	0,1	0,1	0	0	64,6	203
13	0,1	0,1	0	0	64,8	201
14	0,15	0	0,1	0	59,1	200
15	0,05	0	0,1	0	60,3	209
16	0,15	0	0,3	0	58,8	207
17	0,05	0	0,3	0	59,9	200
18	0,18	0	0,2	0	60,2	209
19	0,03	0	0,2	0	59,6	209
20	0,1	0	0,34	0	61,1	200
21	0,1	0	0,06	0	62,1	207
22	0,1	0	0,2	0	62,0	205
23	0,1	0	0,2	0	62,2	209
24	0,1	0	0,2	0	62,2	209
25	0,1	0	0,2	0	62,2	206
26	0,1	0	0,2	0	64,8	208
27	0,15	0	0	0,1	63,2	204
28	0,05	0	0	0,1	64,0	205
29	0,15	0	0	0,3	61,1	201
30	0,05	0	0	0,3	60,4	198
31	0,18	0	0	0,2	59,5	189
32	0,03	0	0	0,2	63,1	207
33	0,1	0	0	0,34	59,7	198
34	0,1	0	0	0,06	58,0	192
35	0,1	0	0	0,2	61,3	198
36	0,1	0	0	0,2	61,4	200
37	0,1	0	0	0,2	61,5	200
38	0,1	0	0	0,2	61,3	198
39	0,1	0	0	0,2	61,5	199

Таблица 9 – Уровни варьирования факторов по изучению влияния сухой закваски и ферментной композиции на качество хлеба

Характеристики планирования	Пределы изменения факторов	
	X_1	X_2
Основной уровень (0)	0,1	0,007
Интервал варьирования	0,05	0,003
Верхний уровень (+1)	0,15	0,010
Нижний уровень (-1)	0,05	0,004
Верхняя «звездная» точка (+1,41)	0,18	0,0113
Нижняя «звездная» точка (-1,41)	0,03	0,0027

Таблица 10 – Матрица планирования и результаты эксперимента по изучению влияния сухой закваски и ферментной композиции на качество хлеба

Номер опыта	Система опытов	X_1	X_2	Y_1, %	Y_2, см^3/100 г
1	Полный факторный эксперимент	1,15	0,004	60,2	201
2		0,05	0,004	59,6	199
3		1,15	0,010	63,7	209
4		0,05	0,010	62,9	205
5	Опыты в «звездных» точках	0,18	0,007	58,8	195
6		0,03	0,007	58,4	192
7		0,1	0,0113	64,2	211
8		0,1	0,0027	58,4	194
9	Опыты в центре плана	0,1	0,007	61,2	207
10		0,1	0,007	61,3	204
11		0,1	0,007	61,3	205
12		0,1	0,007	61,4	206
13		0,1	0,007	61,2	208

Таблица 11 – Характеристики планирования эксперимента по изучению влияния сухой закваски и солодовых препаратов на качество хлеба

Характеристики планирования	Пределы изменения факторов		
	X_1	X_2	X_3
Основной уровень (0)	1,0	0,1	4,0
Интервал варьирования	0,5	0,05	2,0
Верхний уровень (+1)	1,5	0,15	6,0
Нижний уровень (-1)	0,5	0,05	2,0
Верхняя «звездная» точка (+1,682)	1,84	0,18	9,4
Нижняя «звездная» точка (-1,682)	0	0	0,6

Таблица 12 – Матрица планирования и результаты эксперимента по изучению влияния сухой закваски и солодовых препаратов на качество хлеба

Номер опыта	Кодированные значения факторов			Y_1, %	Y_2, см^3/100 г
	X_1	X_2	X_3		
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
1	0,5	0,05	2,0	61,5	204
2	0,5	0,15	2,0	58,7	187
3	1,5	0,05	2,0	59,2	190
4	1,5	0,15	2,0	60,1	194

продолжение таблицы 12

1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
5	0,5	0,05	6,0	60,9	199
6	0,5	0,15	6,0	61,6	205
7	1,5	0,05	6,0	60,0	192
8	1,5	0,15	6,0	58,3	190
9	0	0,1	4,0	59,2	189
10	1,84	0,1	4,0	60,1	190
11	1,0	0	4,0	56,1	181
12	1,0	0,18	4,0	59,5	188
13	1,0	0,1	0,6	60,7	193
14	1,0	01	9,4	61,1	201
15	1,0	0,1	4,0	62,7	210
16	1,0	0,1	4,0	62,6	210
17	1,0	0,1	4,0	62,8	211
18	1,0	0,1	4,0	62,8	210
19	1,0	0,1	4,0	62,7	211
20	1,0	0,1	4,0	62,6	209

Таблица 13 – Характеристики планирования

Характеристики планирования	Пределы изменения факторов		
	X_1	X_2	X_3
Основной уровень (0)	2,5	45	0,1
Интервал варьирования	0,5	10	0,05
Верхний уровень (+1)	3,0	55	0,15
Нижний уровень (-1)	2,0	35	0,05
Верхняя «звездная» точка (+1,682)	3,4	62	0,18
Нижняя «звездная» точка (-1,682)	1,7	28	0

Таблица 14 – Матрица планирования и результаты эксперимента

Номер опыта	Кодированные значения факторов			Y_1, %	Y_2, $см^3$/100 г
	X_1	X_2	X_3		
1	2,0	35	0,05	63,2	231
2	2,0	55	0,05	64,0	235
3	3,0	35	0,05	61,1	210
4	3,0	55	0,05	60,4	204
5	2,0	35	0,15	59,5	200
6	2,0	55	0,15	63,1	231
7	3,0	35	0,15	59,7	203
8	3,0	55	0,15	59,1	198
9	1,7	45	0,1	62,1	223
10	3,4	45	0,1	60,3	218
11	2,5	28	0,1	58,8	191
12	2,5	62	0	59,9	203
13	2,5	45	0	60,2	221
14	2,5	45	0,18	59,6	200
15	2,5	45	0,1	64,8	239
16	2,5	45	0,1	64,6	237
17	2,5	45	0,1	64,6	240
18	2,5	45	0,1	64,6	239
19	2,5	45	0,1	64,8	239
20	2,5	45	0,1	64,8	240

Таблица 15 – Характеристики планирования

Характеристики планирования	Пределы изменения факторов		
	X_1	X_2	X_3
Основной уровень (0)	2,5	0,2	0,2
Интервал варьирования	0,5	0,1	0,1
Верхний уровень (+1)	3,0	0,3	0,3
Нижний уровень (-1)	2,0	0,1	0,1
Верхняя «звездная» точка (+1,41)	3,2	0,34	0,34
Нижняя «звездная» точка (-1,41)	1,8	0,06	0,06

Таблица 16 – Матрица планирования и результаты эксперимента по изучению влияния сукцината калия на качество зернового хлеба

Номер опыта	Система опытов	X_1	X_2	Y_1, %	Y_2, см^3/100 г
1	Полный факторный эксперимент	2,0	0,1	60,7	219
2		3,0	0,1	59,3	204
3		2,0	0,3	59,9	211
4		3,0	0,3	59,0	201
5	Опыты в «звездных» точках	3,2	0,2	60,5	214
6		1,8	0,2	60,2	210
7		2,5	0,06	61,7	225
8		2,5	0,34	59,4	204
9	Опыты в центре плана	2,5	0,2	63,7	234
10		2,5	0,2	63,8	235
11		2,5	0,2	63,6	234
12		2,5	0,2	64,0	237
13		2,5	0,2	63,8	236

Таблица 17 – Матрица планирования и результаты эксперимента по изучению влияния сукцината аммония на качество зернового хлеба

Номер опыта	Система опытов	X_1	X_3	Y_1, %	Y_2, см^3/100 г
1	Полный факторный эксперимент	2,0	0,1	61,6	226
2		3,0	0,1	60,3	209
3		2,0	0,3	60,7	217
4		3,0	0,3	59,8	205
5	Опыты в «звездных» точках	3,2	0,2	61,2	220
6		1,8	0,2	60,8	218
7		2,5	0,06	62,6	231
8		2,5	0,34	60,1	211
9	Опыты в центре плана	2,5	0,2	64,2	239
10		2,5	0,2	64,0	238
11		2,5	0,2	64,4	241
12		2,5	0,2	64,4	240
13		2,5	0,2	64,2	239

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Разработанная техническая документация

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»
(ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института пищевых производств
и биотехнологии
Сироткин А.С.
«11» января 2023г.

КРИОРЕЗИСТЕНТНАЯ ЗАКВАСКА ЛАКТОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 10.89.19.300 – 007 – 02069639 – 2023
(вводятся впервые)

дата введения 11.01.2023

РАЗРАБОТАНО:
проф. О.А. Решетник
доц. С.В. Китаевская

Казань, 2023

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ОАО «Объединенная хлебная компания»

_____ И. Замалеев /
20 января 2004г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
ТИ-001-13981212-2004

для приготовления ржано-пшеничного хлеба «Морозко»
на основе замороженных полуфабрикатов

срок введения с « 20 » января 2004 г.

Разработано:
Зав. кафедрой технологии пищевых производств КГТУ, д.т.н., профессор
О.А. Решетник

Аспирант кафедры ТПП КГТУ
С.В. Китаевская

Согласовано:
Главный технолог ОАО «ОХК»
Р.С. Таштабанова

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ОАО «Объединенная хлебная компания»
_____ Т.И. Замалеев /
«20» января 2004г.

РЕЦЕПТУРА

ржано-пшеничный хлеб «Морозко»
на основе замороженных полуфабрикатов
РЦ-001-13981212-2004

производится по технологической инструкции ТИ-001-13981212-2004

Разработано:
Зав. кафедрой технологии пищевых производств КГТУ, д.т.н., профессор
О.А. Решетник

Аспирант кафедры ТПП КГТУ
С.В. Китаевская

Согласовано:
Главный технолог ОАО «ОХК»
Р.С. Таштабанова

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

_____

РЖАНО-ПШЕНИЧНЫЙ ХЛЕБ «МОРОЗКО НОВЫЙ»
НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ТУ 10.72.19 – 011 – 2003968806 - 2022

(вводятся впервые)

дата введения 24 августа 2022

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ
ИП Саляхетдинова Э.Ф.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
для приготовления ржано-пшеничного хлеба «Морозко новый»
на основе замороженных полуфабрикатов

ТИ к ТУ 10.72.19 – 011 – 2003968806 - 2022

дата введения 24 августа 2022

РАЗРАБОТАНО:
ИП Саляхетдинова Э.Ф.:
_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:
_____ проф. О.А. Решетник
_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

РЕЦЕПТУРА

ржано-пшеничного хлеба «Морозко новый»

на основе замороженных полуфабрикатов

РЦ к ТУ 10.72.19 – 011 – 2003968806 - 2022

дата введения 24 августа 2022

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

САЛЯХЕТДИНОВА Эльвира Фанисовна

ИНН 165600905330 ОГРНИП 320169000136332

_____ 2022 г.

РЖАНО-ПШЕНИЧНЫЙ ХЛЕБ «ЯНТАРНЫЙ»
НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ТУ 10.72.19 – 014 – 2003968806 – 2022

(вводятся впервые)

дата введения 7 сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

_____ 2022 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

для приготовления ржано-пшеничного хлеба «Янтарный»

на основе замороженных полуфабрикатов

ТИ к ТУ 10.72.19 – 014 – 2003968806 – 2022

дата введения 7 сентября 2022 г

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

_____ 2022 г.

РЕЦЕПТУРА

ржано-пшеничного хлеба «Янтарный»

на основе замороженных полуфабрикатов

РЦ к ТУ 10.72.19 – 014 – 2003968806 – 2022

дата введения 7 сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____ 2022 г.

РЖАНО-ПШЕНИЧНЫЙ ХЛЕБ «ЭЛИТА»
НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ТУ 10.72.19 – 016 – 2003968806 – 2022

(вводятся впервые)

дата введения 12 сентября 2022

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

_____ 2022 г.

САЛЯХЕТДИНОВА Эльвира Фанисовна ИНН 165600905330 ОГРНИП 320169000136332

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

для приготовления ржано-пшеничного хлеба «Элита»

на основе замороженных полуфабрикатов

ТИ к ТУ 10.72.19 – 016 – 2003968806 – 2022

дата введения 12 сентября 2022

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

_____ 2022 г.

РЕЦЕПТУРА

ржано-пшеничного хлеба «Элита»

на основе замороженных полуфабрикатов

РЦ к ТУ 10.72.19 – 016 – 2003968806 – 2022

дата введения 12 сентября 2022

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

САЛЯХЕТДИНОВА Эльвира Фанисовна

ИНН 165600905330 ОГРНИП 320169000136332

_____ 2022 г.

РЖАНО-ПШЕНИЧНЫЙ ХЛЕБ «ЗЛАТА»
НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ТУ 10.72.19 – 017 – 2003968806 – 2022

(вводятся впервые)

дата введения 14 сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

САЛЯХЕТДИНОВА Эльвира Фанисовна

_____ 2022 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

для приготовления ржано-пшеничного хлеба «Злата»

на основе замороженных полуфабрикатов

ТИ к ТУ 10.72.19 – 017 – 2003968806 – 2022

дата введения 17 сентября 2022

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

_____ 2022 г.

РЕЦЕПТУРА

ржано-пшеничного хлеба «Злата»

на основе замороженных полуфабрикатов

РЦ к ТУ 10.72.19 – 017 – 2003968806 – 2022

дата введения 17 сентября 2022г.

РАЗРАБОТАНО:

ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

_____ Саляхетдинова Э.Ф.

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

Казань, 2022

УТВЕРЖДАЮ

ИП Рамеев Р.Р.

_____

_____ 2021 г.

ЗЕРНОВОЙ ХЛЕБ «БИОЗЛАК»

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ТУ 10.71.11 – 009 – 2005989134 - 2021

(вводятся впервые)

дата введения 2 декабря 2021 г.

РАЗРАБОТАНО:

ИП Рамеев Р.Р.:

_____ Р.Р. Рамеев

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

_____ асп. Д.Р. Камартдинова

Набережные Челны, 2021

УТВЕРЖДАЮ
ИП Рамеев Р.Р.
_____
_____ 2021 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРОИЗВОДСТВУ ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА «БИОЗЛАК»

ТИ к ТУ 10.71.11 – 009 – 2005989134 - 2021

дата введения 2 декабря 2021 г.

РАЗРАБОТАНО:
ИП Рамеев Р.Р.:
_____ Р.Р. Рамеев
ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:
_____ проф. О.А. Решетник
_____ доц. С.В. Китаевская
_____ асп. Д.Р. Камартдинова

Набережные Челны, 2021

УТВЕРЖДАЮ

ИП Рамеев Р.Р.

_____

_____ 2021 г.

РЕЦЕПТУРА

ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА «БИОЗЛАК»

РЦ к ТУ 10.71.11 – 009 – 2005989134 - 2021

дата введения 2 декабря 2021г.

РАЗРАБОТАНО:

ИП Рамеев Р.Р.:

_____ Р.Р. Рамеев

ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:

_____ проф. О.А. Решетник

_____ доц. С.В. Китаевская

_____ асп. Д.Р. Камартдинова

Набережные Челны, 2021

УТВЕРЖДАЮ
ИП Рамеев Р.Р.
_____
«25» февраля 2022 г.

ЗЕРНОВОЙ ХЛЕБ «ЯНТАРЬ»
НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ТУ 10.72.19 – 004 – 2005989134 - 2022

(вводятся впервые)

дата введения 25 февраля 2022г.

РАЗРАБОТАНО:
ИП Рамеев Р.Р.:
_____ Р.Р. Рамеев
ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:
_____ проф. О.А. Решетник
_____ доц. С.В. Китаевская
_____ асп. Д.Р. Камартдинова

Набережные Челны, 2022

УТВЕРЖДАЮ
ИП Рамеев Р.Р.
_____
_____ 2022 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРОИЗВОДСТВУ ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА «ЯНТАРЬ»
НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

ТИ к ТУ 10.72.19 – 004 – 2005989134 - 2022

дата введения 25 февраля 2022

РАЗРАБОТАНО:
ИП Рамеев Р.Р.:
_____ Р.Р. Рамеев
ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:
_____ проф. О.А. Решетник
_____ доц. С.В. Китаевская
_____ асп. Д.Р. Камартдинова

Набережные Челны, 2022

УТВЕРЖДАЮ
ИП Рамеев Р.Р.
_____
«25» февраля 2022 г.

РЕЦЕПТУРА
ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА «ЯНТАРЬ»
НА ОСНОВЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ
РЦ к ТУ 10.72.19 – 004 – 2005989134 - 2022

дата введения 25 февраля 2022г

РАЗРАБОТАНО:
ИП Рамеев Р.Р.:
_____ Р.Р. Рамеев
ФГБОУ ВО «КНИТУ» кафедра ТПП:
_____ проф. О.А. Решетник
_____ доц. С.В. Китаевская
_____ асп. Д.Р. Камартдинова

Набережные Челны, 2022

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Акты производственных испытаний

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ОАО «Объединенная хлебная
Компания»
_____ Т.И. Замалеев /
20 января 2004г.

АКТ

о проведении производственных испытаний способа приготовления ржано-пшеничного хлеба «Морозко» на основе замороженных полуфабрикатов

Мы нижеподписавшиеся, от ОАО - «Татхлеб» главный технолог Таштабанова Р.С., инженер-технолог Черкасова Л.П., инженер - технолог Гафурова И.М., от КГТУ– зав. кафедрой технологии пищевых производств, д.т.н., профессор Решетник О.А., аспирант Китаевская С.В., составили настоящий акт в том, что 20.01.2004 произведена производственная проверка способа приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов в количестве 500 кг, с целью промышленной апробации данного способа производства ржано-пшеничного хлеба.

При проведении выпечек использовали муку пшеничную первого сорта ГОСТ 26574-85 и муку ржаную обдирную ГОСТ 7045-90 (табл.1).

Таблица 1.

Физико-химические показатели качества муки

Вид муки	Показатели качества муки					
	Влажность, %	Кислотность град.	Газообразующая способность, $см^3/100г$	Количество клейковины %	Свойства клейковины ед.пр. ИДК	Число падения, с
Пшеничная I сорта	13,4	2,8	1430	29,5	80	230
Ржаная обдирная	14,5	5,0	—	—	—	160

В работе также использовали:

- ржаную густую закваску с влажностью $W_{закв}$=48 %, титруемой кислотностью 11,0 град. и подъёмной силой по «шарику» 20 мин;
- дрожжи прессованные отвечали требованиям ГОСТ 171-81 и имели подъемную силу 35—40 мин;
- соль поваренную пищевую, которая по органолептическим показателям отвечала требованиям ГОСТ 13830-84;
- сухое молоко, которое отвечало требованиям ГОСТ 4495;
- сухую закваску молочнокислых бактерий, состоящую из лиофилизированной культуры *Lactobacillus casei ТМБ-Д.* и муки в качестве наполнителя.

Клетки штамма *Lactobacillus casei ТМБ-D* имеют вид укороченных палочек с заостренными концами размером 1,5-2,0 мкм, располагающихся длинными цепочками, спор не образуют. *Lactobacillus casei ТМБ-Д* - факультативный анаэроб, граммположительный, каталазоотрицательный, не содержит цитохромы дыхательной цепи, не образует псевдокаталазу, индол, не восстанавливает нитраты в нитриты, не разжижает желатин и не пептонизирует молоко. Сбраживает сахарозу, глюкозу, лактозу, мелибиозу; слабо сбраживает рибозу, амагдолин; не сбраживает маннозу, галактозу, арабинозу, трегалозу, мальтозу, раффинозу. Гидролизует крахмал и декстрины. Штамм осуществляет гомоферментативное молочнокислое брожение.

Рецептура и режимы приготовления теста для ржано-пшеничного хлеба из замороженных полуфабрикатов на густой закваске представлена в таблице 2.

Испытания проводили на технологической линии, укомплектованной оборудованием фирмы «Miwe».

Таблица 2

Рецептура и режим приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры процесса приготовления теста	
	закваска	тесто
Закваска, кг	19	57
Мука в закваске на тесто, кг	—	33
Мука ржаная обдирная, кг	22	27
Пшеничная хлебопекарная I сорта	—	40
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	—	0,7
Соль поваренная пищевая, кг	—	1,4
Сухое молоко, кг	—	4
Сухая закваска молочнокислых бактерий, кг	—	0,1
Вода, кг	16	по расчёту
Влажность, %	49	48
Температура начальная, ^{0}C	25-28	5-10
Температура замораживания, ^{0}C	—	(-30)–(-32)^{0}C
Температура хранения, ^{0}C	—	(-18)–(-20)^{0}C
Температура дефростации, ^{0}C	—	45 ^{0}C
Продолжительность брожения, мин	180-240	—
Кислотность конечная, град	10-14	8-9
Продолжительность расстойки, мин	—	150-160
Температура выпечки, ^{0}C	—	240-260^{0}C

Замес теста влажностью 48 % осуществляли в тестомесильной машине, используя охлажденное сырье и воду, температура теста после замеса

составляла 5–10^{0}С. Соль поваренную, дрожжи прессованные и сухое молоко вносили в тесто при его замесе в жидком виде.

Замешанное на выброженной закваске ржано-пшеничное тесто разделывали на тестовые заготовки массой 0,2 кг, формовали их в пластины, упаковывали в полипропиленовую плёнку и, минуя стадию брожения, замораживали при температуре минус 30..32 ^{0}С, до достижения температуры в центре тестовой заготовки минус 18..20 ^{0}С. Хранение замороженных тестовых полуфабрикатов осуществляли при температуре морозильной камеры минус 18..20 ^{0}С в течение 4 дней. По истечению срока хранения тестовые заготовки дефростировали при температуре 45 ^{O}С до температуры в центре заготовки 20..23^{O}С. После дефростации тестовые заготовки формовали массой 0,6 кг, и направляли в расстойный шкаф. Расстойку тестовых заготовок осуществляли до готовности при температуре 38÷40^{0}С и относительной влажности воздуха 75÷80%. Формовой хлеб выпекали в печи при температуре 240÷265^{0}С в течение 45÷50 мин. Анализ ржано-пшеничного хлеба проводили через 14÷16 часов хранения.

Контрольными образцами ржано-пшеничного хлеба служили образцы, приготовленные из замороженных полуфабрикатов без внесения сухого молока и сухой закваски молочнокислых бактерий.

Готовые изделия анализировали по показателям ГОСТ 5669–96; 5670-96; 21094–75 пористость, титруемая кислотность и влажность соответственно, а также дополнительно определяли удельный объём и реологические характеристики мякиша на приборе «Структурометр СТ-1» по значениям пластической и упругой деформации.

Сравнительная оценка качества ржано-пшеничного хлеба, приготовленного из замороженных полуфабрикатов с внесением сухого молока и сухой закваски молочнокислых бактерий и без них, приведена в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Влияние добавок на физико-химические показатели качества хлеба

Показатель	Вариант эксперимента	
	Без внесения сухого молока и сухой закваски	С внесением сухого молока и сухой закваски
Пористость, %	53	62
Уд. объем, $см^3$/100 г	172,8	209,1
ΔНупр	1,8	1,9
ΔНпласт	2,0	1,9
ΔНобщ, мм	3,8	3,8

Таблица 4

Органолептические показатели качества хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов

Характеристика	Варианты эксперимента	
	Без внесения сухого молока и сухой закваски	С внесением сухого молока и сухой закваски
Поверхность	Выпуклая, крупные трещины и подрывы, не глянцевая	Гладкая, без трещин и подрывов, глянцевая
Окраска	Неравномерная	Равномерная
Форма	Правильная, без боковых выплывов	Правильная, без боковых выплывов
Структура пористости	Поры различной величины, со средней толщиной стенок, распределены неравномерно	Поры мелкие, тонкостенные, распределены достаточно равномерно
Структурно-механические свойства мякиша	Мякиш мягкий, заметно заминающийся, без следов непромеса	Мякиш мягкий, нежный, эластичный, незаминающийся

Выводы и рекомендации

Качество ржано-пшеничного хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов, по основным показателям соответствовало требованиям ТУ 9113-045-0206834-2000.

Качество ржано-пшеничного хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов с добавлением сухого молока и сухой закваски молочнокислых бактерий, по всем определяемым показателям лучше контрольных образцов:

- удельный объём увеличился на 21 % по сравнению контролем;
- упругие свойства мякиша опытных проб хлеба были на 1,2 % больше, чем хлеба, приготовленного без внесения сухого молока и сухой закваски молочнокислых бактерий;
- пористость увеличилась на 9 % по сравнению с контролем.

Опытные пробы были лучше контрольных по показателям, определяемым органолептически.

Анализируя результаты производственных испытаний по предлагаемой криотехнологии ржано-пшеничного хлеба, комиссия признала целесообразным использование данного способа в промышленности, как технологически оправданного, в целях выпуска указанных изделий и расширения ассортимента хлеба на основе замороженных полуфабрикатов.

Зав. кафедрой технологии пищевых производств КГТУ, д.т.н., профессор — О.А. Решетник

Гл. технолог ОАО «Татхлеб» — Р.С. Таштабанова

инженер - технолог — Л.П.Черкасова

инженер - технолог — И.М. Гафурова

Аспирант кафедры ТПП КГТУ — С.В. Китаевская

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

САЛЯХЕТДИНОВА Эльвира Фаниссовна

АКТ

производственных испытаний

способа приготовления ржано-пшеничного хлеба «Морозко новый» на основе замороженных полуфабрикатов

Мы, нижеподписавшиеся, представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.: директор Саляхетдинова Э.Ф., технолог Хуснутдинов И.И., пекарь Кадырова Д.А., и представители ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»: профессор кафедры технологии пищевых производств Решетник О.А., доцент кафедры технологии пищевых производств Китаевская С.В., провели выпуск опытно-промышленной партии ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением модифицированных крахмалов.

Для приготовления ржано-пшеничного хлеба использовали муку хлебопекарную - ржаную обдирную (ГОСТ 7045–2017) и пшеничную первого сорта (ГОСТ 26574-2017); дрожжи хлебопекарные прессованные (ГОСТ 171-81); кукурузный набухающий крахмал (ТУ 10.62.11-003-00343094-2016); соль поваренную пищевую (ГОСТ 51574-2018); воду питьевую (СанПиН.1.4.1074-01), а также сухую закваску молочнокислых бактерий *L. casei TMB-D.* Подготовку сырья к производству производили в соответствии с «Технологическими инструкциями по производству хлебобулочных изделий» (М, 1989).

Тесто готовили на густой закваске, рецептура и режим приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов представлены в табл. 1.

Сырье для замеса теста предварительно охлаждали до температуры 2-4 ^{0}С. Тесто замешивали в тестомесильной машине Sinmag SM влажностью 48 % в течение 10-12 минут. При замесе теста в готовую закваску вносили необходимые компоненты согласно рецептуре (соль поваренную, дрожжи прессованные, кукурузный набухающий крахмал в тесто вносили в виде водных растворов). Замешанное ржано-пшеничное тесто формовали весом 200 г, упаковывали в полипропиленовую пленку и, минуя стадию брожения,

замораживали при температуре минус 30-32 ^{0}С в шкафу шоковой заморозки Apach SH в течение двух часов. Хранение замороженных полуфабрикатов осуществляли при температуре минус 18 - 20 ^{0}С в течение 5 дней. Дефростацию замороженных тестовых полуфабрикатов проводили до полного размораживания при температуре помещения до температуры в центре тестовой заготовки 20–23 ^{0}С. После размораживания из теста формовали тестовые заготовки массой 0,6 кг, которые помещали в расстойный шкаф UNOX XEBPC с температурой 38–40 °С и относительной влажностью воздуха 75–80 %. Выпечку формового хлеба осуществляли в печи FIMAK ROKON при температуре 240–250 °С в течение 45 - 50 мин. Анализ ржано-пшеничного хлеба проводили через 16-18 часов после выпечки.

Таблица 1 - Рецептура и режим приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры технологического процесса	
	закваска	тесто
Закваска, кг	19	57
Мука в закваске на тесто, кг	-	33
Мука ржаная обдирная, кг	22	27
Мука пшеничная первого сорта, кг	-	40
Сухая закваска молочнокислых бактерий *L. casei TMB-D*	-	0,12
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	-	0,7
Крахмал кукурузный модифицированный набухающий, кг	-	1,3
Соль поваренная пищевая, кг	-	1,4
Вода, кг	16	по расчету*
Влажность, %	49	48
Температура начальная, ^{0}С	25 - 28	5 - 10
Температура замораживания, ^{0}С	-	-32
Температура хранения, ^{0}С	-	-18
Температура дефростации, ^{0}С		25-30
Продолжительность брожения, мин.	180-240	-
Конечная кислотность, град. не более	14	8
Продолжительность расстойки, мин.	-	160
Температура выпечки, ^{0}С	-	240-250
Продолжительность выпечки	-	45 - 50

* - исходя из влажности готовых изделий 47 %

Результаты анализа физико-химических и органолептических показателей качества контрольных и опытных образцов ржано-пшеничного хлеба представлены в табл. 2 (контрольными образцами ржано-пшеничного хлеба служили образцы, приготовленные из замороженных полуфабрикатов без применения сухой закваски молочнокислых бактерий и модифицированного крахмала).

Таблица 2 - Показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Показатели качества	Характеристика и значения показателей	
	контроль	опыт
Влажность, %	46,8	46,9
Кислотность, град.	7,8	7,8
Пористость, %	54,6	60,9
Удельный объем, $см^3$/100г	173,2	202,4
Внешний вид: форма	правильная, без боковых выплывов; слабо выпуклая	правильная, без боковых выплывов; выпуклая
поверхность	достаточно гладкая, на поверхности имеются подрывы	достаточно гладкая, без подрывов и трещин
окраска	неравномерная	равномерная
Состояние мякиша: пористость	поры различной величины, со средней толщиной стенок, распределены неравномерно	поры мелкие и средние, тонкостенные, распределены равномерно
пропеченность	пропеченный, с мягким заминающимся мякишем, без следов непромеса	пропеченный, с мягким незаминающимся мякишем, без следов непромеса
Вкус и запах	приятный, свойственный хлебу из смеси ржаной и пшеничной муки, без постороннего привкуса и запаха	

Заключение:

Анализ результатов определения показателей качества опытно-промышленной партии ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов свидетельствует о том, что образцы хлеба с применением сухой закваски молочнокислых бактерий и модифицированного кукурузного набухающего крахмала отличались улучшенными органолептическими и физико-химическими характеристиками по сравнению с контрольными образцами:

- опытные образцы имели более выпуклую верхнюю корку без трещин и подрывов, отличались развитой структурой пористости мякиша и улучшенными структурно-механическими свойствами мякиша;

- пористость мякиша удельный объем хлеба увеличились на 6,3 % и 17,0 % соответственно по сравнению с контролем.

Качество ржано-пшеничного хлеба, выработанного с применением криотехнологии, соответствовало требованиям ТУ 10.72.19 – 011 – 2003968806 – 2022.

Проведенные промышленные испытания способа приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением сухой закваски молочнокислых бактерий и модифицированного кукурузного набухающего крахмала показали его применимость для производства в условиях хлебозаводов, малых

хлебопекарных предприятий и целесообразность промышленного внедрения с целью повышения качественных характеристик рассматриваемой продукции и расширения ассортимента хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов.

Представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

технолог _____ И.И. Хуснутдинов

пекарь _____ Д.А. Кадырова

Представители ФГБОУ ВО КНИТУ:

зав. каф. технологии пищевых производств, д.т.н., проф. _____ О.А. Решетник

доцент каф. технологии пищевых производств, к.т.н. _____ С.В. Китаевская

УТВЕРЖДАЮ
ИП Саляхетдинова Э.Ф.
_____
2022 г.

АКТ

проведения опытно-промышленных испытаний

способа приготовления ржано-пшеничного хлеба «Янтарный» на основе замороженных полуфабрикатов с применением янтарной кислоты и ее солей

Мы, нижеподписавшиеся, представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.: директор Саляхетдинова Э.Ф., технолог Хуснутдинов И.И., пекарь Кадырова Д.А., и представители ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»: профессор кафедры технологии пищевых производств Решетник О.А., доцент кафедры технологии пищевых производств Китаевская С.В., составили настоящий акт о том, что в период с 1.09.22 по 7.09.22 были проведены совместные опытно-промышленные испытания по применению сухой закваски молочнокислых бактерий и янтарной кислоты для повышения качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. Были изготовлены опытная и контрольная партия ржано-пшеничного хлеба в условиях мини-пекарни в количестве 100 кг каждого образца.

Для выработки ржано-пшеничного хлеба использовали следующее сырье:

- муку хлебопекарную ржаную обдирную (ГОСТ 7045–2017);
- муку хлебопекарную пшеничную первого сорта (ГОСТ 26574-2017);
- дрожжи хлебопекарные прессованные (ГОСТ 171-81);
- соль поваренную пищевую (ГОСТ 51574-2018);
- сухую закваску молочнокислых бактерий *L. casei 32*;
- кислоту янтарную (ГОСТ 6341-75),
- сукцинаты калия и аммония (ТУ 2634-007-33880306-96);
- воду питьевую (СанПиН.1.4.1074-01).

Подготовку сырья к производству производили в соответствии с «Технологическими инструкциями по производству хлебобулочных изделий» (М, 1989).

Рецептура ржано-пшеничного хлеба «Янтарный» на основе замороженных полуфабрикатов с применением янтарной кислоты и ее солей представлена в табл. 1.

Таблица 1 - Рецептура ржано-пшеничного хлеба «Янтарный»

Наименование сырья и полуфабрикатов	Расход сырья на замес теста			
	контроль	опытные образцы с добавками		
		янтарная кислота	сукцинат калия	сукцинат аммония
Закваска густая, кг	57	57	57	57
Мука в закваске на тесто, кг	33	33	33	33
Мука ржаная обдирная, кг	27	27	27	27
Мука пшеничная первого сорта, кг	40	40	40	40
Сухая закваска молочнокислых бактерий *L. casei 32*	0,12	0,12	0,12	0,12
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	0,7	0,7	0,7	0,7
Янтарная кислота, кг		0,08	-	-
Сукцинат калия, кг		-	0,17	-
Сукцинат аммония, кг		-	-	0,15
Соль поваренная пищевая, кг	1,5	1,5	1,5	1,5
Вода, кг	по расчету*	по расчету*	по расчету*	по расчету*

* - исходя из влажности готовых изделий 47 %

Сырье для замеса теста предварительно охлаждали до температуры 2-4 ^{0}С. Тесто замешивали на густой закваске в тестомесильной машине Sinmag SM влажностью 48 % в течение 10-12 минут. При замесе теста в готовую закваску вносили необходимые компоненты согласно рецептуре (соль поваренную, дрожжи прессованные, янтарную кислоту или ее соли вносили в тесто в виде водных растворов). Замешанное ржано-пшеничное тесто формовали пластинами весом 200 г, упаковывали в полипропиленовую пленку и, минуя стадию брожения, замораживали при температуре минус 30-32 ^{0}С в шкафу шоковой заморозки Apach SH в течение двух часов. Хранение замороженных полуфабрикатов осуществляли при температуре минус 18 - 20 ^{0}С в течение 5 дней. Дефростацию тестовых полуфабрикатов проводили до полного размораживания при температуре помещения до достижения в центре тестовой заготовки температуры 20 – 23 ^{0}С. Затем из теста формовали тестовые заготовки массой 0,6 кг, которые помещали в расстойный шкаф UNOX XEBPC с температурой 38–40 °С и относительной влажностью воздуха 75–80 %, где производили расстойку полуфабрикатов в течение 140-160 мин. Выпечку формового хлеба осуществляли в печи FIMAK ROKON при температуре 240–250 °С в течение 45 - 50 мин. Анализ ржано-пшеничного хлеба проводили через 16-18 часов после выпечки.

Результаты оценки влияния добавок на физико-химические и органолептические показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Влияние добавок на показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Показатели качества	Характеристика и значения показателей			
	контроль	опытные образцы с добавками		
		янтарная кислота	сукцинат калия	сукцинат аммония
Влажность, %	46,9	46,8	46,9	46,9
Кислотность, град.	7,6	7,9	7,8	7,8
Пористость, %	58,2	61,5	62,1	62,4
Удельный объем, $см^3/100г$	182,7	204,4	207,6	206,3
Внешний вид: форма	правильная, без боковых выплывов; выпуклая			
поверхность	достаточно гладкая, без подрывов и трещин			
цвет	светло-коричневый	темно-коричневый		
Состояние мякиша: пористость	поры мелкие и средние, тонкостенные, распределены равномерно	поры мелкие, тонкостенные, распределены равномерно		
пропеченность	пропеченный, с мягким незаминающимся мякишем, без следов непромеса			
Вкус и запах	приятный, свойственный хлебу из смеси ржаной и пшеничной муки, без постороннего привкуса и запаха			

Заключение:

В ходе проведения опытно-промышленных испытаний было уставлено, что янтарная кислота и ее соли интенсифицируют процесс созревания дефростированных полуфабрикатов, что позволило сократить продолжительность брожения теста на 30 мин. по сравнению с контролем.

Качество ржано-пшеничного хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов по основным физико-химическим и органолептическим показателям соответствовало ТУ 10.72.19 – 014 – 2003968806 – 2022.

В результате анализа качества опытно-промышленной партии ржано-пшеничного хлеба было выявлено, что что внесение в рецептуру замороженных полуфабрикатов сухой закваски молочнокислых бактерий *L. casei 32* совместно с янтарной кислотой повысить пористость готовых изделий на 3,3 %, удельный объем на 11,9 % относительно контрольного образца, а также улучшить состояние мякиша ржано-пшеничного хлеба.

Комиссия отмечает, что опытные образцы отличались более выраженным вкусом и ароматом, имеют мягкий эластичный мякиш с хорошо развитой пористостью.

Эффективность продемонстрировали также соли янтарной кислоты - сукцинаты калия и аммония в дозировке 0,15 – 0,17 % к массе муки, применение которых привело к увеличению пористости и удельного объема ржано-пшеничного хлеба в среднем на 4,1 % и 13,2 % соответственно по отношению к контролю.

Результаты проведенных промышленных испытаний способа приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением сухой закваски молочнокислых бактерий и янтарной кислоты (сукцинатов калия и аммония) показали целесообразность применения данного способа в промышленности для интенсификации процесса брожения тестовых полуфабрикатов и повышения качества хлебобулочных изделий, вырабатываемых с применением криогенных технологий.

Представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

технолог _____ И.И. Хуснутдинов

пекарь _____ Д.А. Кадырова

Представители ФГБОУ ВО КНИТУ:

зав. каф. технологии пищевых производств, д.т.н., проф. _____ О.А. Решетник

доцент каф. технологии пищевых производств, к.т.н. _____ С.В. Китаевская

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

2022 г.

АКТ

производственных испытаний

способа приготовления ржано-пшеничного хлеба «Элита»

на основе замороженных полуфабрикатов

Мы, нижеподписавшиеся, представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.: директор Саляхетдинова Э.Ф., технолог Хуснутдинов И.И., пекарь Кадырова Д.А., и представители ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»: профессор кафедры технологии пищевых производств Решетник О.А., доцент кафедры технологии пищевых производств Китаевская С.В., провели выпуск опытно-промышленной партии ржано-пшеничного хлеба «Элита» на основе замороженных полуфабрикатов с применением ферментной композиции. Были изготовлены опытная и контрольная партия ржано-пшеничного хлеба в условиях мини-пекарни в количестве 120 кг каждого образца.

Для выработки ржано-пшеничного хлеба использовали следующее сырье: муку хлебопекарную ржаную обдирную (ГОСТ 7045–2017); муку хлебопекарную пшеничную первого сорта (ГОСТ 26574-2017); дрожжи хлебопекарные прессованные (ГОСТ 171-81); - соль поваренную пищевую (ГОСТ 51574-2018); сухую закваску молочнокислых бактерий *L. casei 32*; ферментные препараты Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG; воду питьевую (СанПиН.1.4.1074-01).

Опытные образцы производили с применением ферментных препаратов Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG (Novozims, Дания). Данные ферменты являются стандартизированными препаратами с использованием пшеничной муки, с узкими параметрами размера частиц от 50 до 300 микрон. Ферментные препараты представляют собой сыпучие не распыляющиеся агломерированные грануляты светло-коричневого цвета. Ферментную композицию готовили путем перемешивания ферментных препаратов Пентопан 500 BG, Новамил 1500 MG и Нейтраза 1,5 MG в соотношении 6:2,5:1 соответственно.

Характеристика ферментных препаратов представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика ферментных препаратов

Ферментный препарат	Активные компоненты	Оптимальные параметры		Активность	Оптимальная дозировка, г/100 кг муки
		температура, ^{0}C	pH среды		
Пентопан 500 BG	ксиланаза, гемицеллюлаза	40	5 - 6	2700 *	3 - 6
Новамил 1500 MG	α-амилаза	54 - 76	5,8 – 6,0	1500 **	7 - 15
Нейтраза 1,5 MG	протеаза	50 - 70	5,5–7,5	1,5 ***	0,2 - 0,5

* единиц активности ксиланазы / г препарата
** единиц активности мальтогенной амилазы / г препарата
*** единиц активности Ансона / г препарата

Подготовку сырья к производству производили в соответствии с «Технологическими инструкциями по производству хлебобулочных изделий» (М, 1989).

Тесто готовили на густой закваске, рецептура и режим приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Рецептура и режим приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры технологического процесса	
	закваска	тесто
Закваска, кг	19	57
Мука в закваске на тесто, кг	-	33
Мука ржаная обдирная, кг	22	27
Мука пшеничная первого сорта, кг	-	40
Сухая закваска молочнокислых бактерий *L. casei 32*	-	0,11
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	-	0,7
Ферментная композиция, кг	-	0,0085
Соль поваренная пищевая, кг	-	1,4
Вода, кг	16	по расчету*
Влажность, %	49	48
Температура начальная, ^{0}C	25 - 28	5 - 10
Температура замораживания, ^{0}C	-	-32
Температура хранения, ^{0}C	-	-18
Температура дефростации, ^{0}C		25-30
Продолжительность брожения, мин.	180-240	-
Конечная кислотность, град. не более	14	8
Продолжительность расстойки, мин.	-	120
Температура выпечки, ^{0}C	-	240-250
Продолжительность выпечки	-	45 - 50

* - исходя из влажности готовых изделий 47 %

Сырье для замеса теста предварительно охлаждали до температуры 2-4 ^{0}С. Тесто замешивали в тестомесильной машине Sinmag SM влажностью 48 % в течение 10-12 минут. При замесе теста в готовую закваску вносили необходимые компоненты согласно рецептуре (соль поваренную, дрожжи прессованные, ферментную композицию вносили в тесто в виде водных растворов). Ржано-пшеничное тесто формовали весом 200 г, упаковывали в полипропиленовую пленку и, минуя стадию брожения, замораживали при температуре минус 30-32 ^{0}С в шкафу шоковой заморозки Apach SH в течение двух часов. Хранение замороженных полуфабрикатов осуществляли при температуре минус 18 - 20 ^{0}С в течение 5 дней. Дефростацию замороженных тестовых полуфабрикатов проводили до полного размораживания при температуре помещения до температуры в центре тестовой заготовки 20–23 ^{0}С. После размораживания из теста формовали тестовые заготовки массой 0,6 кг, которые помещали в расстойный шкаф UNOX XEBPC с температурой 38–40 °С и относительной влажностью воздуха 75–80 %. Выпечку формового хлеба осуществляли в печи FIMAK ROKON при температуре 240–250 °С в течение 45 - 50 мин. Анализ ржано-пшеничного хлеба проводили через 16-18 часов после выпечки.

Результаты оценки влияния ферментной композиции на физико-химические и органолептические показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3 – Показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Показатели качества	Характеристика и значения показателей	
	контроль	опыт
Влажность, %	46,8	46,7
Кислотность, град.	7,8	7,8
Пористость, %	54,6	63,3
Удельный объем, см^3/100г	173,2	210,6
Внешний вид: форма	правильная, без боковых выплывов; слабо выпуклая	правильная, без боковых выплывов; выпуклая
поверхность	достаточно гладкая, на поверхности имеются подрывы	гладкая, без подрывов и трещин
окраска	неравномерная	равномерная
Состояние мякиша: пористость	поры различной величины, со средней толщиной стенок, распределены неравномерно	поры мелкие, тонкостенные, распределены равномерно
пропеченность	пропеченный, с мягким заминающимся мякишем, без следов непромеса	пропеченный, с мягким незаминающимся мякишем, без следов непромеса
Вкус и запах	приятный, свойственный хлебу из смеси ржаной и пшеничной муки, без постороннего привкуса и запаха	

Заключение:

Качество ржано-пшеничного хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов по основным физико-химическим и органолептическим показателям соответствовало ТУ 10.72.19 – 016 – 2003968806 – 2022.

Анализ качественных показателей хлебобулочных изделий, выработанных по криотехнологии показал, что ржано-пшеничный хлеб, приготовленный с применением ферментной композиции имел стабильные показатели качества (влажность, кислотность, пористость, удельный объем), применение данного препарата в технологии хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов привело к повышению пористости и удельного объема ржано-пшеничного хлеба на 8,7 % и 21,6 % соответственно. При этом опытная партия продукции отличалась высокими органолептическими характеристиками - изделия имели более выраженный вкус и запах, тонкостенную равномерную пористость, мягкий эластичный мякиш.

Проведенные производственные испытания способа приготовления ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением сухой закваски молочнокислых бактерий и ферментной композиции, а также результаты определения показателей качества ржано-пшеничного хлеба свидетельствуют о целесообразности и применимости предлагаемой технологии в промышленности.

Представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

технолог _____ И.И. Хуснутдинов

пекарь _____ Д.А. Кадырова

Представители ФГБОУ ВО КНИТУ:

зав. каф. технологии пищевых производств, д.т.н., проф. _____ О.А. Решетник

доцент каф. технологии пищевых производств, к.т.н. _____ С.В. Китаевская

УТВЕРЖДАЮ

ИП Саляхетдинова Э.Ф.

_____

САЛЯХЕТДИНОВА Эльвира Фанисовна

_____2022 г.

АКТ

проведения опытно-промышленных испытаний

способа приготовления ржано-пшеничного хлеба «Злата» на основе замороженных полуфабрикатов с применением солодовых препаратов

Мы, нижеподписавшиеся, представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.: директор Саляхетдинова Э.Ф., технолог Хуснутдинов И.И., пекарь Кадырова Д.А., и представители ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»: профессор кафедры технологии пищевых производств Решетник О.А., доцент кафедры технологии пищевых производств Китаевская С.В., составили настоящий акт о том, что в период с 12.09.22 по 17.09.22 были проведены совместные опытно-промышленные испытания по применению сухой закваски молочнокислых бактерий и солодовых препаратов для повышения качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов. Были изготовлены опытная и контрольная партия ржано-пшеничного хлеба в условиях мини-пекарни в количестве 100 кг каждого образца.

Для выработки ржано-пшеничного хлеба использовали следующее сырье: муку хлебопекарную ржаную обдирную (ГОСТ 7045–2017); муку хлебопекарную пшеничную первого сорта (ГОСТ 26574-2017); дрожжи хлебопекарные прессованные (ГОСТ 171-81); соль поваренную пищевую (ГОСТ 51574-2018); сухую закваску молочнокислых бактерий *L.casei ТМБ-Д*; пшеничный и ржаной солод; воду питьевую (СанПиН.1.4.1074-01).

Подготовку сырья к производству производили в соответствии с «Технологическими инструкциями по производству хлебобулочных изделий» (М, 1989).

Рецептура ржано-пшеничного хлеба «Злата» на основе замороженных полуфабрикатов с применением солодовых препаратов представлена в табл. 1. Сырье для замеса теста предварительно охлаждали до температуры 2-4 ^{0}С. Тесто замешивали на густой закваске в тестомесильной машине марки Sinmag SM влажностью 48 % в течение 10-12 минут. При замесе теста в готовую закваску вносили необходимые компоненты

согласно рецептуре (соль поваренную, дрожжи прессованные вносили в тесто в виде водных растворов). Замешанное ржано-пшеничное тесто формовали пластинами весом 200 г, упаковывали в полипропиленовую пленку и, минуя стадию брожения, замораживали при температуре минус 30-32 ^{0}С в шкафу шоковой заморозки Apach SH в течение двух часов. Хранение замороженных полуфабрикатов осуществляли при температуре минус 18 - 20 ^{0}С в течение 5 дней. Дефростацию тестовых полуфабрикатов проводили до полного размораживания при температуре помещения до достижения в центре тестовой заготовки температуры 20 – 23 ^{0}С. Затем из теста формовали тестовые заготовки массой 0,6 кг, которые помещали в расстойный шкаф UNOX XEBPC с температурой 38–40 °С и относительной влажностью воздуха 75–80 %, где производили расстойку полуфабрикатов в течение 140-160 мин. Выпечку формового хлеба осуществляли в печи FIMAK ROKON при температуре 240–250 °С в течение 45 - 50 мин. Анализ ржано-пшеничного хлеба проводили через 16-18 часов после выпечки.

Таблица 1 - Рецептура ржано-пшеничного хлеба «Злата» на основе замороженных полуфабрикатов

Наименование сырья и полуфабрикатов	Расход сырья на замес теста		
	контроль	опытные образцы	
		пшеничный солод	ржаной солод
Закваска густая, кг	57	57	57
Мука в закваске на тесто, кг	33	33	33
Мука ржаная обдирная, кг	27	27	27
Мука пшеничная первого сорта, кг	40	40	40
Сухая закваска молочнокислых бактерий *L. casei ТМБ-Д*	0,12	0,12	0,12
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	0,7	0,7	0,7
Пшеничный солод, кг	-	2,1	-
Ржаной солод, кг	-	-	2,1
Соль поваренная пищевая, кг	1,4	1,4	1,4
Вода, кг	по расчету*	по расчету*	по расчету*

* - исходя из влажности готовых изделий 47 %

Результаты оценки физико-химических и органолептических показателей качества ржано-пшеничного хлеба с применением солодовых препаратов представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Влияние солодовых препаратов на показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Показатели качества	Характеристика и значения показателей		
	контрольные образцы	опытные образцы	
		с пшеничным солодом	с ржаным солодом
Влажность, %	46,9	46,8	46,8
Кислотность, град.	7,6	7,8	7,8
Пористость, %	58,2	61,8	62,5
Удельный объем, $см^3$/100г	182,7	203,5	206,1
Внешний вид: форма	правильная, без боковых выплывов; слабо выпуклая	правильная, без боковых выплывов; выпуклая	
поверхность	достаточно гладкая, на поверхности имеются подрывы	достаточно гладкая, без подрывов и трещин	
цвет	светло-коричневый	темно-коричневый	
Состояние мякиша: пористость	поры различной величины, со средней толщиной стенок, распределены неравномерно	поры мелкие, тонкостенные, распределены равномерно	
пропеченность	пропеченный, с мягким заминающимся мякишем, без следов непромеса	пропеченный, с мягким незаминающимся мякишем, без следов непромеса	
Вкус и запах	приятный, свойственный хлебу из смеси ржаной и пшеничной муки, без постороннего привкуса и запаха		

Заключение:

Качество ржано-пшеничного хлеба, приготовленного на основе замороженных полуфабрикатов по основным физико-химическим и органолептическим показателям соответствовало ТУ 10.72.19 – 017 – 2003968806 – 2022.

Анализ данных, полученных в результате производственных испытаний, свидетельствует о положительном влиянии солодовых препаратов на физико-химические показатели качества ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов: увеличились пористость мякиша и удельный объем хлеба в среднем на 4,0 % и 11,2 % соответственно. Установлено, что при применении пшеничного и ржаного солода улучшились органолептические показатели продукции – хлеб отличался ярко-выраженным вкусом и ароматом, равномерно окрашенной корочкой, увеличенным объемом по сравнению с контрольными образцами.

Результаты исследования совместного влияния пшеничного солода и сухой закваски молочнокислых бактерий *L. casei ТМБ-Д* на качественные характеристики ржано-пшеничного хлеба на основе замороженных полуфабрикатов подтвердили

эффективность исследуемых добавок и показали целесообразность применения данного способа в условиях хлебозаводов и малых хлебопекарных предприятий для повышения качества хлебобулочных изделий, вырабатываемых с применением криогенных технологий.

Представители ИП Саляхетдинова Э.Ф.:

технолог _____ И.И. Хуснутдинов

пекарь _____ Д.А. Кадырова

Представители ФГБОУ ВО КНИТУ:

зав. каф. технологии пищевых производств,
д.т.н., проф. _____ О.А. Решетник

доцент каф. технологии пищевых производств,
к.т.н. _____ С.В. Китаевская

УТВЕРЖДАЮ

ИП Рамеев Р.Р.

17 ноября 2021 г.

АКТ

производственных испытаний

способа приготовления зернового хлеба «Биозлак»

Мы, нижеподписавшиеся, ИП Рамеев Р.Р. и представители ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», провели выпуск опытно-промышленной партии зернового хлеба «Биозлак» на основе ферментированной зерновой массы.

Для приготовления зернового хлеба «Биозлак» использовали следующее сырье: зерно пшеницы 3 класса (продовольственное), дрожжи хлебопекарные прессованные, соль поваренную пищевую, сухую закваску лактобактерий *L. casei 32*, воду питьевую. Подготовку сырья к производству производили в соответствии с «Технологическими инструкциями по производству хлебобулочных изделий» (М, 1989).

Тесто готовили на основе ферментированной молочнокислой закваской зерновой массы. Рецептура и режим приготовления теста для зернового хлеба «Биозлак» представлены в табл. 1.

Зерно пшеницы промывали водой, отволаживание проводили в течение 32 часов при температуре 18-20 ^{0}С, меняя воду 4 раза. Затем подготовленное зерно измельчали на роторном диспергаторе РДН-Х. В диспергированную зерновую массу вносили закваску молочнокислых бактерий в гидратированном виде (1:2) в количестве 10^7 КОЕ/г, замес осуществляли в тестомесильной машине HKN-M30SN2V. Ферментацию зерновой массы осуществляли при температуре 37 °С в течение 4 ч до достижения pH=4.

На основе ферментированной зерновой массы готовили тесто безопарным способом согласно рецептуре. Брожение теста осуществлялось при температуре 30 -32 ^{0}С. Разделку теста осуществляли при помощи тестоделителя, заготовки массой 0,35 кг укладывали в хлебопекарные формы. Расстойку тестовых заготовок осуществляли при температуре 38 ^{0}С и относительной влажности воздуха 75-80 % в расстоечном шкафу ШРЭ-2.1. в течение 40-

50 мин. Выпечку тестовых заготовок проводили при температуре пекарной камеры (Abat ЭШ-3К) 180 - 200 ^{0}С. Продолжительность выпечки составляла 35-40 мин.

Таблица 1 - Рецептура и режим приготовления теста для зернового хлеба «Биозлак»

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры технологического процесса	
	ферментированная зерновая масса	тесто
Пшеница 3 класса (продовольственное зерно), кг	100/155*	-
Сухая закваска молочнокислых бактерий *L. casei 32*	1,0	-
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	-	2,0
Соль поваренная пищевая, кг	-	1,5
Вода, кг	18,6**	по расчету***
Ферментированная зерновая масса, кг	-	174,6
Влажность, %, не более	46	49
Продолжительность ферментации, ч	4	-
Продолжительность брожения, мин.	-	60-90
Начальная температура, ^{0}С	38-40	30-32
Конечная кислотность, град. не более	8,0	5,5

* - масса набухшего зерна;
** - масса воды при применении набухшего зерна;
*** - исходя из влажности готовых изделий 48 %.

Готовые изделия анализировали через 14-16 ч после выпечки по органолептическим и физико-химическим показателям. Результаты анализа качественных характеристик зернового хлеба представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Показатели качества зернового хлеба «Биозлак»

Показатели качества	Характеристика и значения показателей
1	2
Физико-химические показатели	
Влажность, %	47,2
Кислотность, град.	4,0
Пористость, %	61,5
Формоустойчивость	0,26
Органолептические показатели	
Внешний вид: форма	правильная, хлеб с заметно выпуклой верхней коркой
поверхность	слегка шероховатая, без подрывов и трещин
цвет	золотисто-коричневый

Продолжение таблицы 2

1	2
Состояние мякиша: пористость	пористость развитая, без пустот и уплотнений, с вкраплением оболочек зерна
пропеченность	пропеченный, не заминающийся
Вкус и запах	приятный, свойственный зерновому хлебу, без постороннего привкуса и запаха

Заключение:

Проведенные промышленные испытания и результаты определения показателей качества зернового хлеба «Биозлак» установили, что технология приготовления зернового хлеба на основе ферментированной зерновой массы молочнокислыми бактериями *L. casei 32* применима для производства в условиях хлебозаводов и малых хлебопекарных предприятий.

Исследование основных параметров технологического процесса тестоприготовления зернового хлеба «Биозлак» показало целесообразность промышленного внедрения с разработкой соответствующей технической документацией, что позволит расширить ассортимент зернового хлеба и удовлетворить спрос населения в хлебобулочных изделиях повышенной пищевой ценности.

Представители ИП Рамеев Р.Р.:

Директор _____ Р.Р. Рамеев

Технолог _____ Д.А. Гараева

Представители ФГБОУ ВО КНИТУ:

Зав. каф. технологии пищевых производств, д.т.н., проф. _____ О.А. Решетник

Доцент каф. технологии пищевых производств, к.т.н. _____ С.В. Китаевская

УТВЕРЖДАЮ
ИП Рамеев Р.Р.
_____
_____ 2022 г.

АКТ

производственных испытаний

способа приготовления зернового хлеба «Янтарь» на основе замороженных полуфабрикатов с применением ферментированной зерновой массы

Мы, нижеподписавшиеся, представители ИП Рамеев Р.Р.: директор Рамеев Р.Р., технолог Гараева Д.А., и представители ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»: профессор кафедры технологии пищевых производств Решетник О.А., доцент кафедры технологии пищевых производств Китаевская С.В., провели выпуск опытно-промышленной партии зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением ферментированной зерновой массы .

Для приготовления зернового хлеба использовали следующее сырье: зерно пшеницы 3 класса (продовольственное), дрожжи хлебопекарные прессованные, соль поваренную пищевую, сухую закваску лактобактерий *L. casei 32*, воду питьевую, янтарную кислоту. Подготовку сырья к производству производили в соответствии с «Технологическими инструкциями по производству хлебобулочных изделий» (М, 1989).

Тесто готовили на основе ферментированной молочнокислой закваской зерновой массы. Рецептура и режим приготовления теста для зернового хлеба представлены в табл. 1.

Зерно пшеницы промывали водой, отволаживание проводили в течение 32 часов при температуре 18-20 ^{0}С, меняя воду 4 раза. Затем подготовленное зерно измельчали на роторном диспергаторе РДН-Х. В диспергированную зерновую массу вносили закваску молочнокислых бактерий в гидратированном виде (1:2) в количестве 10^7 КОЕ/г, замес осуществляли в тестомесильной машине HKN-M30SN2V. Ферментацию зерновой массы осуществляли при температуре 37 °С в течение 4 ч до достижения pH=4.

На основе ферментированной зерновой массы готовили тесто согласно рецептуре и сразу же осуществляли его разделку при помощи тестоделителя. Заготовки массой 0,3 кг

подвергали шоковому замораживанию при температуре -35 ^{0}С в течение 150 мин. и затем хранили при температуре -18 ^{0}С в течение 7 сут. Дефростацию полуфабрикатов осуществляли в условиях производственного цеха до температуры в центре тестовых заготовок 18 ^{0}С. Расстойку тестовых заготовок осуществляли готовности при температуре 38 - 40 ^{0}С и относительной влажности воздуха 75-80 % в расстоечном шкафу ШРЭ-2.1. Выпечку тестовых заготовок проводили при температуре пекарной камеры (Abat ЭШ-3К) 180 - 200 ^{0}С в течение 35-40 мин.

Таблица 1 - Рецептура и режим приготовления зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры технологического процесса		
	ферментированная зерновая масса	тесто	
		для хлеба «Биозлаковый»	для хлеба «Янтарь»
Пшеница 3 класса (продовольственное зерно), кг	100/155*	-	-
Сухая закваска молочнокислых бактерий *L. casei 32*	1,0	-	-
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	-	2,4	2,4
Соль поваренная пищевая, кг	-	1,5	1,5
Вода, кг	18,6**	по расчету***	по расчету***
Янтарная кислота, кг	-	-	0,1
Ферментированная зерновая масса, кг	-	вся	вся
Влажность, %, не более	46	49	49
Продолжительность ферментации, ч	4	-	-
Температура замораживания, ^{0}С	-	-35	-35
Температура хранения, ^{0}С	-	-18	-18
Температура дефростации, ^{0}С	-	20-25	20-25
Продолжительность брожения, мин.	-	60-90	-
Начальная температура, ^{0}С	38-40	18	18
Конечная кислотность, град. не более	8,0	5,5	5,5

* - масса набухшего зерна;
** - масса воды при применении набухшего зерна;
*** - исходя из влажности готовых изделий 48 %.

Готовые изделия анализировали через 14-16 ч после выпечки по органолептическим и физико-химическим показателям. Результаты анализа качественных характеристик зернового хлеба представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Показатели качества зернового хлеба «Биозлаковый» и «Янтарь»

Показатели качества	Характеристика и значения показателей	
	Хлеб «Биозлаковый»	Хлеб «Янтарь»
Влажность, %	46,9	47,0
Кислотность, град.	3,8	4,0
Пористость, %	60,6	62,4
Формоустойчивость	0,22	0,25
Внешний вид: форма	правильная, хлеб с заметно выпуклой верхней коркой	
поверхность	слегка шероховатая, без подрывов и трещин	
цвет	золотисто-коричневый	
Состояние мякиша: пористость	пористость развитая, без пустот и уплотнений, с вкраплением оболочек зерна	
пропеченность	пропеченный, не заминающийся	
Вкус и запах	приятный, свойственный зерновому хлебу, без постороннего привкуса и запаха	

Заключение:

Анализ проведенных промышленных испытаний и результатов определения показателей качества опытно-промышленной партии зернового хлеба на основе замороженных полуфабрикатов с применением ферментированной зерновой массы показал его применимость для производства в условиях хлебозаводов, малых хлебопекарных предприятий и целесообразность промышленного внедрения.

Применение ферментированной зерновой массы совместно с янтарной кислотой позволяет сократить продолжительность брожения теста на 40 мин. и улучшить качественные характеристики зернового хлеба (пористость, удельный объем, формоустойчивость).

Представители ИП Рамеев Р.Р.:

Директор _____ Р.Р. Рамеев

Технолог _____ Д.А. Гараева

Представители ФГБОУ ВО КНИТУ:

Зав. каф. технологии пищевых производств, д.т.н., проф. _____ О.А. Решетник

Доцент каф. технологии пищевых производств, к.т.н. _____ С.В. Китаевская

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Справка о внедрении результатов диссертационной работы
в учебный процесс ФГБОУ ВО «КНИТУ»

УТВЕРЖДАЮ:
Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО «КНИТУ»
Л.Н. Султанова
«14» 05 2023

КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Данные информационного письма о диссертационной работе Китаевской Светланы Владимировны на тему: «**Биотехнология криорезистентных молочнокислых бактерий и их применение в хлебопекарной промышленности**» рассмотрены на заседании кафедры технологии пищевых производств (протокол № 10 от 11.04.2023 г.) и приняты к использованию в учебном процессе в дисциплинах «Использование стартовых культур микроорганизмов, бактериальных заквасок и биопрепаратов», «Пищевая микробиология», «Современные подходы к созданию новых продуктов питания и проектированию технологических процессов их производства», «Функционально-технологические свойства сырья, пищевых добавок и пищевых систем», «Производство функциональных продуктов питания», научно-исследовательской работе и написании выпускных квалификационных работ при подготовке бакалавров и магистров при реализации основных образовательных программ по направлениям «Продукты питания из растительного сырья» и «Технология и организация продукции общественного питания» на кафедре технологии пищевых производств (ТПП) Института пищевых производств и биотехнологии ФГБОУ ВО «КНИТУ».

Заведующий каф. ТПП, д.т.н., проф. _____ З.Ш. Мингалеева