УДК 637.3.056 https://doi.org/10.21603/1019-8946-2023-6-18

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИНАМИКИ РАЗВИТИЯ И КИСЛОТООБРАЗОВАНИЯ ЛАКТОКОККОВ ПРИ ТЕХНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Галина Михайловна Свириденко, д-р техн. наук, руководитель направления микробиологических исследований, главный научный сотрудник
E-mail: vniims@fncps.ru
Ольга Михайловна Шухалова, младший научный сотрудник
Денис Станиславович Мамыкин, младший научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова, г. Углич

Мезофильные лактококки *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus cremoris* используются для производства многих ферментированных молочных продуктов, в том числе сыров, как основной кислотообразователь в составе бактериальных заквасок. В данной статье проводится сравнительная оценка динамики процессов развития и кислотообразования производственных штаммов лактокков в зависимости от технически значимой температуры. В результате проведенных исследований сделан вывод, что мезофильные лактококки видов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus cremoris* при оптимальных режимах термостатирования не демонстрируют значительных различий между штаммами в условиях глубинного жидкофазного культивирования в молоке по интенсивности развития культуры, а также кислотообразующей активности, характеризующейся приростом титруемой кислотности (°Т) и падением активной кислотности (pH). Исследуемые мезофильные лактококки обладают способностью развиваться и метаболизировать углеводы при температуре (10 ± 1) °С, что дает возможность протекания процессов кислотообразования во время созревания сыров. Все исследованные штаммы имеют значительную психротрофность, при этом их развитие и метаболизм прерываются при тепрературе (4 ± 1) °С, что дает возможность избежать риски снижения хранимоспособности ферментированных молочных продуктов под действием заквасочных лактококков. Наибольшие риски применения заквасочных культур *Lactococcus cremoris* связаны с их низкой термостабильностью, что отражается в чувствительности штаммов к температурам выше (40 ± 1) °С.

Ключевые слова: бактериальные закваски, молочнокислые микроорганизмы, лактококки, кислотообразующая активность, технически значимые температуры

ВВЕДЕНИЕ

Современные методы исследования молочнокислых бактерий в производстве заквасок позволяют определять их технологически значимые свойства. Используются как устоявшиеся микробиологические способы, так и новые молекулярно-генетические методики. Все это способствует выявлению перспективных культур, которые отвечают требованиям производителей ферментированных молочных продуктов, в том числе сыров [1–3].

Для подбора видового состава бактериальных заквасок с целью производства ферментированных молочных продуктов стабильно высокого качества необходимо учитывать не только метаболизм заквасочных культур, но и температурные режимы развития, включающие возможность протекания процессов роста при низких температурах, интенсивность кислотообразования и ряд других показателей, индивидуальных для каждого вида ферментированных молочных продуктов [4, 5].

Интенсивность кислотообразования характеризуется скоростью метаболизма лактозы и приростом молочной кислоты, что является основополагающей характеристикой при составе бактериальных заквасок, ведь отклонение процесса кислотообразования от оптимального может отразиться на качестве готового продукта [6–9].

При низкой активности кислотообразователей возникает большая вероятность негативных отклонений в ходе технологического процесса, усугубления микробиологических рисков, связанных с развитием и метаболизмом технически вредной микробиотой, как следствие, выпуска продукции низкого качества [10, 11]. Это может быть вызвано ошибочным подбором видового состава микроорганизмов; нарушениями в режимах хранения и подготовки производственных заквасок; заражением бактериофагами; задержкой развития культур; несоответствием характеристик молочнокислых микроорганизмов технологическим режимам производства.

Лактококки, развиваясь в молочной среде, обеспечивают интенсивный процесс гликолиза, образуя молочную кислоту, летучие кислоты и ароматические вещества, формируют при этом вкус, аромат, консистенцию и рисунок сыров. При этом ферментные системы мезофильных лактококков оказы-

вают влияние на физико-химические и биохимические процессы во время выработки и созревания сыров. Так, интенсивный метаболизм молочного сахара лактококками приводит к ингибированию роста посторонних микроорганизмов, для которых источником энергии служат углеводы, в том числе бактерии группы кишечных палочек, стафилококков и других. Благодаря накоплению молочной кислоты и снижению уровня активной кислотности (pH) инактивируются щелочные протеазы, реализуя неспецифический протеолиз [12–15].

Несмотря на то, что *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus cremoris* представляют собой близкородственные микроорганизмы, при видовом конструировании бактериальных заквасок для производства различных ферментированных молочных продуктов, необходимо принимать во внимание специфику каждого вида. Так, *Lactococcus cremoris* отличается от *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* не только менее интенсивным метаболизмом, но и более слабой резистентностью по отношению к внешним условиям, в особенности к содержанию в молочной среде хлорида натрия, активности воды и температурному режиму [16]. Согласно исследованиям А. В. Гудкова, изменение температурных режимов в сторону увеличения, повышенные концентрации поваренной соли и H+ снижают интенсивность процессов развития у *Lactococcus cremoris*. При этом полная остановка метаболизма *Lactococcus cremoris* зафиксирована в присутствии NaCl концентрацией более 3 % и температуре культивирования (39 ± 1) °C [17].

Применение мезофильных лактококков в процессе производства большинства ферментированных молочных продуктов обуславливает необходимость проводить исследования для оценки технологически значимых свойств (кислотообразующая активность, психротрофность, термостойкость и т. д.) заквасочных культур, относящихся к различным видам, учитывая штаммовые особенности.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной статье рассматривается динамика роста и кислотообразования 10 коллекционных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и 10 штаммов *Lactococcus cremoris*, используемых в составе бактериальных заквасок, применяемых производителями ферментированных молочных продуктов. Исследования развития и метаболизма молочнокислых микроорганизмов проведены в условиях глубинного жидкофазного культивирования в стерильном восстановленном молоке с содержанием сухих веществ (10,0 ± 0,1) %, при следующих температурных режимах:
– оптимальный для роста и развития – (30 ± 1) °C;
– используемый в процессе производства большинства полутвердых сыров с низкой температурой второго нагревания – (40 ± 1) °C;
– используемый в процессе созревания, а также имитирующий нарушение температурного регламента хранения – (10 ± 1) °C;
– регламентированный режим хранения готовых ферментированных молочных продуктов – (4 ± 1) °C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 1–6 показаны средние значения динамики количества жизнеспособных клеток мезофильных лактококков (lg КОЕ/см^3), а также кислотообразующей активности, представленной приростом титруемой кислотности (°T) и падением активной кислотности (pH) при различных температурных режимах глубинного жидкофазного культивирования в молочной среде.

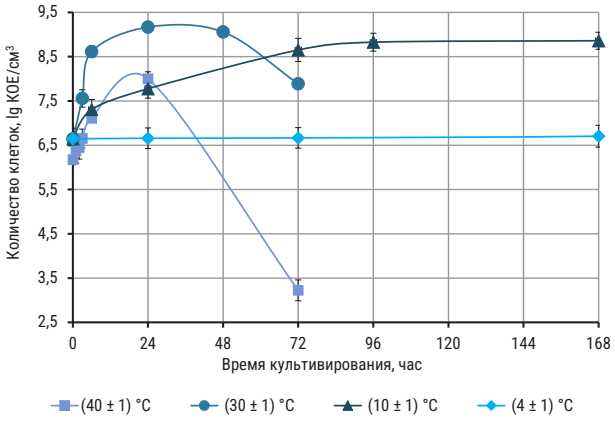

Рисунок 1. Динамика развития *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* при разных режимах культивирования

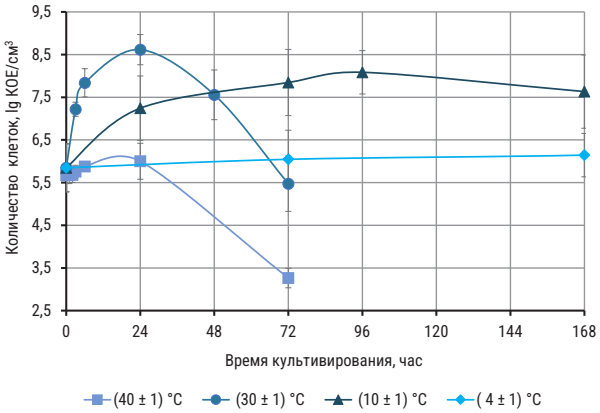

Рисунок 2. Динамика развития *Lactococcus cremoris* при разных режимах культивирования

Для установления влияния технически значимых температур (40 ± 1), (10 ± 1) и (4 ± 1) °С на динамику развития штаммов исследуемых культур в молочных средах относительно их развития при оптимальных температурных режимах (30 ± 1) °С проведен дисперсионный анализ данных, представленный в таблице 1.

Таким образом, в результате проведенной серии экспериментов на молочных средах с высоким уровнем статистической достоверности доказано, что температура второго нагревания (40 ± 1) °С, принятая в сыроделии для производства полутвёрдых сыров с низкой температурой второго нагревания, оказывает негативное влияние на развитие исследуемых штаммов культуры *Lc. lactis* subsp. lactis и подавляет развитие штаммов *Lc. cremoris*, при этом наблюдается значительное ускорение процесса вымирания обоих видов лактококков. Температура культивирования (10 ± 1) °С оказывает негативное влияние на прирост жизнеспособных клеток лактококков во времени, однако процессы развития не останавливаются, а стационарная фаза продлевается, что говорит о возможности развития данных культур в условиях созревания сыров и на торговой полке при нарушении режимов хранения молочных продуктов. При данной температуре лимитирующим фактором для развития лактококков является наличие в молочной среде лактозы и кислотность среды. Следует отметить, что для штаммов *Lc. lactis* subsp. *lactis* разброс ростовых показателей крайне незначителен, тогда как для штаммов *Lc. cremoris* он существенный, что говорит о необходимости контроля психротрофных свойств отдельных штаммов *Lc. cremoris* при их подборе в состав заквасок для созревающих сыров. При температуре (4 ± 1) °С лактококки закономерно не развиваются и увеличения количества жизнеспособных клеток не происходит.

Как указывалось выше, важнейшей характеристикой штаммов лактококков, как основной кислотообразующей микрофлоры бактериальных заквасок, является способность осуществлять процесс сбраживания лактозы, отражающий интенсивность кислотообразования.

Данные, характеризующие процесс гидролиза лактозы в молочных средах под действием культур *Lc. lactis* subsp. *lactis* и *Lc. cremoris* при температурах (30 ± 1) и (10 ± 1) °С представлены в таблице 2.

Таблица 1
Статистическая значимость влияния температуры культивирования на количество жизнеспособных клеток лактококков

Вид лактококков	Температура культивирования					
	(40 ± 1) °С		(10 ± 1) °С		(4 ± 1) °С	
	$F_{эмп.}$	*p*	$F_{эмп.}$	*p*	$F_{эмп.}$	*p*
Lc. lactis subsp. *lactis*	172,24	0,00019	340,13	0,00005	2509,34	0,00001
Lc. cremoris	34,49	0,0033	33,88	0,0043	35,71	0,0039

Примечание: Уровень статистической достоверности оценки влияния фактора: ($p > 0,05$) не достоверно; ($p < 0,05$) достоверно; F критическое для всех наблюдений = 7,7086

Таблица 2
Процесс гликолиза под действием штаммов лактококков в молочных средах при технически значимых температурах

Вариант	Лактоза, %	Молочная кислота, %
Контроль молоко	5,16 ± 0,07	–
Температура культивирования (30 ± 1) °С, время 24 часа		
Lc. lactis subsp. *lactis*	4,42 ± 0,05[a]	0,65 ± 0,08[a]
Lc. cremoris	4,35 ± 0,09[a]	0,76 ± 0,11[a]
Температура культивирования (10 ± 1) °С, время 168 часов		
Lc. lactis subsp. *lactis*	4,50 ± 0,04[b]	0,43 ± 0,05[b]
Lc. cremoris	4,52 ± 0,02[b]	0,41 ± 0,02[b]

Данные, отмеченные одинаковым индексом внутри одного столбца, не имеют статистически значимых отличий ($p > 0,05$)

Источник изображения: Freepik.com

Анализ состава углеводов молочной среды с внесенными культурами лактококков (табл. 2) показывает, что статистически значимого различия между уровнем сбраживания лактозы и накоплением молочной кислоты исследуемыми культурами *Lc. lactis* subsp. *lactis* и *Lc. cremoris* при одинаковых температурных режимах не выявлено. Однако при (10 ± 1) °С процессы гликолиза под действием штаммов обоих видов лактококков существенно замедляются и достигают тех же значений только через 7 суток культивирования в сравнении с уровнем гликолиза при (30 ± 1) °С через 1 сутки культивирования.

В то же время, анализ данных средних значений прироста титруемой кислотности, отражающих активность процесса кислотообразования под действием штаммов *Lc. lactis* subsp. *lactis* и *Lc. cremoris* при разных температурах (рис. 3 и 4) и падения активной кислотности (рис. 5 и 6) говорит о значительных различиях в метаболической активности культур двух видов лактококков при разных температурных режимах.

При температуре культивирования (40 ± 1) °С штаммы *Lc. cremoris* не только не размножаются, но и не проявляют кислотообразующую активность. В то же время для штаммов *Lc. lactis* subsp. *lactis* скорость процесса кислотообразования при (40 ± 1) °С в первые 24 часа культивирования остается на уровне процесса при оптимальном температурном режиме (30 ± 1) °С. Однако затем процесс кислотообразования замедляется, что приводит к снижению предельной кислотности. С другой стороны, штаммы *Lc. cremoris* проявляют более выраженные свойства психротрофности, осуществляя процессы кислотообразования более интенсивно при (10 ± 1) °С, чем штаммы Lc. lactis subsp. *lactis*. Следует отметить большой разброс данных, как по титруемой, так и активной кислотности у штаммов *Lc. lactis* subsp. *lactis*, что говорит о штаммовой зависимости процессов метаболизма углеводов при температурах, соответствующих температурам созревания сыров.

Статистическая достоверность полученных результатов подтверждается данными таблицы 3.

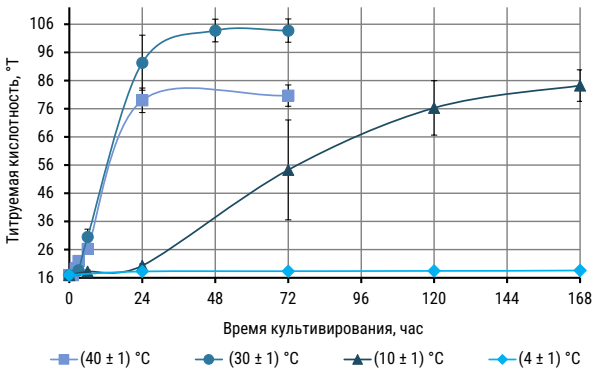

Рисунок 3. Титруемая кислотность *Lc. lactis* subsp. *lactis* при разных температурах культивирования

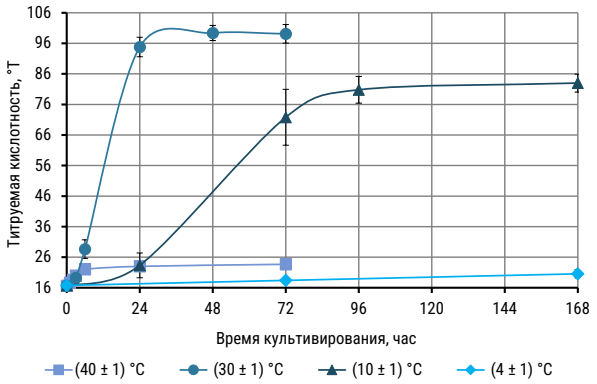

Рисунок 4. Титруемая кислотность (°Т) *Lactococcus cremoris* при разных температурах культивирования

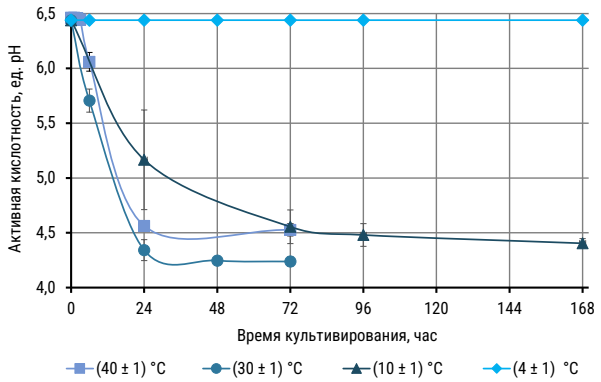

Рисунок 5. Активная кислотность *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* при разных температурах культивирования

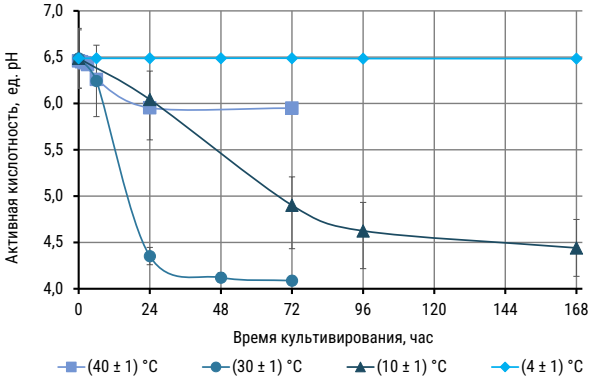

Рисунок 6. Активная кислотность *Lactococcus cremoris* при разных температурах культивирования

Таблица 3
Статистическая значимость влияния температуры культивирования на процесс кислотообразования под действием лактококков по показателям титруемой и активной кислотности

Вид заквасочной микрофлоры	Температура культивирования					
	(40 ± 1) °C		(10 ± 1) °C		(4 ± 1) °C	
	$F_{эмп.}$	*p*	$F_{эмп.}$	*p*	$F_{эмп.}$	*p*
Титруемая кислотность, °Т						
Lc. lactis subsp. *lactis*	21,16	0,011	1065,60	0,000005	1181,45	0,000004
Lc. cremoris	2943,06	0,0000007	1119,99	0,000005	2832,84	0,0000007
Активная кислотность, ед. pH						
Lc. lactis subsp. *lactis*	46,33	0,002	12,47	0,02	5139,80	0,0000002
Lc. cremoris	422,33	0,00003	28,07	0,006	836,25	0,000009

Примечание: Уровень статистической достоверности оценки влияния фактора: ($p > 0,05$) не достоверно; ($p < 0,05$) достоверно; F критическое для всех наблюдений = 7,7086

Результаты проведенных исследований показали, что мезофильные лактококки видов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus cremoris*, при оптимальных режимах термостатирования не демонстрируют значительных различий между штаммами в условиях глубинного жидкофазного культивирования в молоке по интенсивности развития культуры, а также кислотообразующей активности, представленной приростом титруемой и падением активной кислотностей.

Исследуемые мезофильные лактококки обладают способностью развиваться и метаболизировать углеводы при (10 ± 1) °C, что дает возможность протекания процессов кислотообразования в течение созревания сыров. Все исследованные штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus cremoris* имеют значительную психротрофность, при этом их развитие и метаболизм прерывается при (4 ± 1) °C, что дает возможность избежать рисков снижения хранимоспособности ферментированных молочных продуктов под действием заквасочных лактококков. Наибольшие риски применения заквасочных культур *Lactococcus cremoris* связаны с их низкой термостабильностью, что отражается в чувствительности штаммов к температурам выше (40 ± 1) °C.

ВЫВОДЫ

Резюмируя вышесказанное можно сказать, что результаты исследований подтверждают необходимость проведения оценки производственно ценных свойств заквасочных культур, особенно при использовании различных температурных режимов. Это поможет оптимизировать процесс выработки сыров, повысить их качество и хранимоспособность. ■

DEVELOPMENT AND ACID FORMATION OF LACTOCOCCI AT TECHNICALLY SIGNIFICANT TEMPERATURES: COMPARATIVE ANALYSIS

Galina M. Sviridenko, Olga M. Shukhalova, Denis S. Mamykin
All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking, Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Uglich

ORIGINAL ARTICLE

Mesophilic lactococci strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus cremoris* are part of many fermented dairy products, including cheeses. As a rule, they serve as the main acid agents in bacterial starter cultures. Throughout all technological stages of cheese production, these microorganisms encounter various factors that affect their growth and metabolism. Despite its widespread industrial use and accumulated scientific knowledge, the question still remains of how lactococci behave during production. This article provides a comparative assessment of temperature-related development processes and acid formation in lactococci *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus cremoris*. The strains showed no differences in culture development rate or acid-forming activity under optimal thermostating conditions during the deep liquid-phase cultivation in milk. These variables were measured by the increase in titratable acidity (°T) and the decrease in active acidity (pH). The lactococci developed and metabolized carbohydrates at (10 ± 1) °C, which allowed for acid formation processes during the cheese ripening stage. Both strains showed significant psychrotrophy. Their development and metabolism were interrupted at (4 ± 1) °C, which made it possible to avoid the risk of reducing the storage capacity of fermented dairy products under the effect of lactococci starter. The greatest risks of using *Lactococcus cremoris* starter cultures were associated with their low thermal stability, which made the strains sensitive to temperatures above (40 ± 1) °C.

Key words: bacterial starter cultures, lactic acid microorganisms, lactococci, acid forming activity, technically significant temperatures

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Wedajo, B.** Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food / B. Wedajo // Journal of Probiotics & Health. 2015. № 03(02). P 1–9. https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000129
2. **Klaenhammer, T.** Discovering lactic acid bacteria by genomics / T. Klaenhammer, E. Altermann, F. Arigoni [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. 2002. № 82(1–4). P. 29–58. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_3
3. **Johansen, E.** Use of Natural Selection and Evolution to Develop New Starter Cultures for Fermented Foods / E. Johansen // Annu Rev Food Sci. Technol. 2018. № 25. P. 411–428. https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012450
4. **Nicosia, F. D.** Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains for Potential Use in Cheese Manufacture / F. D. Nicosia, A. Pino, G. L. R. Maciel [et al.] // Foods. 2023. № 12. 1154. https://doi.org/10.3390/foods12061154
5. **Ayad, E. H. E.** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria / E. H. E Ayad, S. Nashat, N. El-Sadek [et al.] // Food Microbiology. 2004. V. 21. I. 6. P. 715–725. https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.009
6. **Мордвинова, В. А.** Факторы, влияющие на качество сыров типа "Маасдам" / В. А. Мордвинова, Г. М. Свириденко // Сыроделие и маслоделие. 2015. № 3. С. 28–30.
7. **Мордвинова, В. А.** Качество и хранимоспособность продуктов сыроделия: основные факторы / В. А. Мордвинова // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 5. С. 9–11.
8. **Pessione, A.** Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria / A. Pessione, C. Lambertia, E. Pessione // Molecular BioSystems. 2010. I. 8. P. 1419–1430. https://doi.org/10.1039/C001948H
9. **Хамитова, А. Р.** Факторы внешней среды, влияющие на процесс брожения / А. Р. Хамитова // Наука и образование: проблемы и тенденции развития. 2016. № 1. С. 10–12.
10. **Свириденко, Г. М.** Оценка микробиологических рисков в производстве молочных продуктов / Г. М. Свириденко // Переработка молока. 2010. № 4. С. 6–9.
11. **Грунская, В. А.** Анализ микробиологических рисков при производстве кисломолочных продуктов / В. А. Грунская, С. В. Иванова, А. А. Абабкова // Молочнохозяйственный вестник. 2013. № 2 (10). С. 30–35.
12. **Samaržija, D.** Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review / D. Samaržija, N. Antunac, J. L. Havranek // Mljekarstvo. 2001. T. 51. № 1. P. 35–48.
13. **Carr, F. J.** The lactic acid bacteria: a literature survey / F. J. Carr, D. Chill, N. Maida // Critical reviews in microbiology. 2002. T. 28. №. 4. P. 281–370.
14. **Bintsis, T.** Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics / T. Bintsis // AIMS microbiology. 2018. T. 4. № 4. P. 665.
15. **Ibrahim, S. A.** Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention / S. A. Ibrahim, R. D. Ayivi, T. Zimmerman [et al // Foods. 2021. № 10. https://doi.org/10.3390/foods10123131
16. **Свириденко, Г. М.** Развитие и метаболизм *Lc. lactis* subsp. *cremoris* при различных технологических приемах производства созревающих сыров / Г. М. Свириденко, О. М. Шухалова // Молочная промышленность. 2022. № 8. С. 36–38.
17. **Гудков, А. В.** Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А. В. Гудков. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800 с.