ГАЗООБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ
ЦИТРАТСБРАЖИВАЮЩИХ ЛАКТОКОККОВ

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Ирина Валентиновна Кучеренко, старший научный сотрудник
E-mail: i.kucherenko@fncps.ru
Елена Вячеславовна Кураева, старший научный сотрудник
E-mail: e.kuraeva@fncps.ru
Анна Юрьевна Дуганова, младший научный сотрудник
E-mail: a.duganova@fncps.ru
Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова, г. Углич

Подбор молочнокислых бактерий в состав микрофлоры бактериальных заквасок является одним из определяющих факторов в создании эффективных биологических средств управления микробиологическими процессами при производстве продуктов переработки молока. Однако до настоящего времени не проводилось разработки критериев формирования поливидовых заквасочных консорциумов, включающих кислотообразующие и ароматобразующие лактококки. В работе приведены экспериментальные данные о скорости газообразования и максимальном уровне продуцирования газа цитратсбраживающими лактококками при оптимальной и минимальной температуре; в условиях моделирования основных технологически значимых температурных режимов при производстве сыров с низкой температурой второго нагревания и кисломолочных продуктов. Анализ результатов исследований газообразующей активности лактококков при оптимальной температуре культивирования позволил разделить их на три группы по максимальному объему газа за 168 ч наблюдения. К первой группе относят 30,0 % культур от общего количества исследованных штаммов, которые имели слабую газообразующую активность, составляющую от 8,20 до 20,0 см^3 газа. Штаммы второй группы составили 50,0 % и проявили среднюю газообразующую активность – 20,0 до 30,0 см^3 газа. Третья группа составила 20,0 % культур, имеющих сильную газообразующую активность от 30,0 см^3 углекислого газа и выше. Установлены существенные различия этих показателей у разных штаммов, что позволяет выдвинуть гипотезу о возможности ранжирования культур по газообразующей активности с целью разработки критериев их подбора в состав бактериальных заквасок для различных кисломолочных продуктов и сыров. Приведены результаты статистической обработки данных влияния технологически значимых температурных режимов производства ферментированной молочной продукции и сыров на активность газообразования *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, а также представлены результаты ранжирования культур по уровню газообразующей активности в условиях изучаемых температур.

Ключевые слова: бактериальные закваски, коллекция микроорганизмов, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, цитратсбраживающий лактококк, газообразующая активность

Для цитирования: Газообразующая активность цитратсбраживающих лактококков / И. В. Кучеренко, Е. В. Кураева, А. Ю. Дуганова // Молочная промышленность. 2024. № 3. С. 30–35. https://www.doi.org/10.21603/1019-8946-2024-3-6

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее важных групп молочнокислых бактерий, используемых в молочной промышленности при изготовлении кисломолочных продуктов и сыров, являются лактококки вида *Lactococcus lactis*. До недавнего времени вид *Lactococcus lactis* подразделялся на подвиды, три из которых и используются в молочной промышленности: *L. lactis* subsp. *lactis* (далее *L. lactis*), *L. lactis* subsp. *cremoris* (далее *L. cremoris*), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis [1], [2].

Генетические исследования молочнокислых бактерий, включая род *Lactococcus*, начавшиеся еще в 1970-е годы, продолжаются и по сей день, а новые научные данные на протяжении последних десятилетий легли в основу целого ряда изменений в их таксономии и номенклатуре [3]. В утвержденных списках названий бактерий 1980 года [4] эти микроорганизмы относились к роду *Streptococcus*. В 1985 году *Streptococcus lactis* и родственные стрептококки были перенесены в род *Lactococcus* gen. nov. [5], а утилизирующие цитрат штаммы *L. lactis* subsp. *diacetylactis* получили статус подвида, поскольку основным отличием от родительского штамма является наличие у них цитратпермеазы, обеспечивающей транспорт цитрата внутрь клеток [2], [3].

В 1999 году японские ученые обнаружили способность штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* продуцировать гамма-аминомасляную кислоту, тогда как у штаммов *L. lactis* subsp. *cremoris* эта способность отсутствовала, что сочли еще одним эффективным признаком для отличия этих двух подвидов лактококков [6]. Очередное изменение произошло уже в 2019 году. Материалы исследований китайских ученых [7], основанные на генетическом анализе последовательностей генов 16S рРНК, rpoB, RecA и pheS, средних значений нуклеотидной идентичности и значений цифровой ДНК-ДНК гибридизации, позволили повысить подвид *L. lactis* subsp. *cremoris* до уровня вида *L. cremoris*.

Источник изображения: Freepik.com

При этом цитратсбраживающие лактококки пока остаются биовариантом *diacetylactis* подвида *L. lactis* subsp. *lactis*. Однако они продолжают оставаться одним из основных газо- и ароматообразующих элементов бактериальных заквасок. Оптимальная температура его развития в молоке составляет (25–30) °С, максимальная – (39–40) °С, минимальная – (8–10) °С; при температуре 45 °С рост отсутствует. Диацетильный лактококк для сбраживания цитратов в молоке нуждается в ионах Mn^{2+} [8], [9].

Коллекция микроорганизмов экспериментальной биофабрики ВНИИМС включает культуры лактококков *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, выделенные преимущественно из природных и производственных источников: сметана самопроизвольного брожения, сырое молоко и растения[1] [10]. Штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* в коллекции подразделены на две группы по характеру метаболизма и скорости развития в молоке:

– **активные штаммы** с высокой скоростью кислотообразования – имеют предельную кислотность 100–125 °Т, при внесении инокулята в количестве 1 % образуют сгусток через 8–12 ч и при внесении 3 % в пределах 6–9 ч;

– **слабые штаммы** с низкой скоростью кислотообразования – предельная кислотность составляет 70–100 °Т, при внесении инокулята в количестве 1 % сгусток образуется через 18–48 ч, при внесении 3 % в течение 14–36 ч.

Культуры с низкой скоростью роста в молоке обладают более высоким уровнем образования диацетила по отношению к образованию ацетоина, чем активные штаммы. По количеству диацетила слабые штаммы можно разделить на две группы: представители первой группы образовывали в молоке 0,5–0,75 мг% диацетила, штаммы второй группы – 0,139–0,233 мг%. Образующийся из цитрата ацетоин также учувствует в формировании вкуса и аромата сыров. Кроме этого, слабые и активные штаммы различаются и по протеолитической активности в молоке[2] [11].

Несмотря на способность образовывать диоксид углерода из цитратов, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis является гомоферментативным микроорганизмом, так как метаболизирует лактозу путем гликолиза с преимущественным образованием молочной кислоты. Из-за способности образования диацетила данную культуру относят к ароматообразующим, а лактококки *L. lactis* и *L. cremoris* – к кислотообразующим. Особую ценность представляют штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, обладающие высокой кислотообразующей и газообразующей способностью [8], [11].

Метаболизм цитрата важен для формирования вкуса и аромата мягких творожных сыров Коттедж, Кварк, а также многих кисломолочных продуктов из-за образования диацетила и ацетоина. Диацетил вносит свой вклад во вкус и аромат сыров с низкой температурой второго нагревания. Однако в результате метаболизма цитрата с образованием CO_2 в определенных условиях так же могут возникать и некоторые дефекты, например: нежелательные глазки у сыра Чеддер, а также открытая структура и всплывающий сгусток в сыре Коттедж[3] [11].

[1]Банникова, Л. А. Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Л. А. Банникова, Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

[2]Мамыкин, Д. С. Исследование композиционного состава бактериальных заквасок для полутвердых сыров Голландской группы / Д. С. Мамыкин, Д. С. Вахрушева // Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. 2023. № 1. С. 192–197. https://www.elibrary.ru/ntluwl

[3]Пономарев, А. Н. Роль заквасочных культур в производстве творога / А. Н. Пономарев, А. А. Мерзликина, Л. В. Голубева // Переработка молока. 2014. № 4 (174). С. 36–37. https://www.elibrary.ru/scoayl

Источник изображения: Freepik.com

После прессования в сырах с низкой температурой второго нагревания остается около 1 % лактозы, что вполне достаточно для накопления необходимого количества углекислого газа для формирования характерного для этих сыров рисунка. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis размножается и сбраживает цитраты как во время выработки сыров, так и во время созревания, когда температура и другие условия в сыре далеки от оптимальных, но не полностью подавляют рост и развитие [8], [12].

В бактериальные закваски для многих кисломолочных продуктов и сыров включают кислотообразующие и ароматообразующие лактококки, при подборе которых учитывается комплекс технологически значимых свойств. Однако в отношении показателя газообразующей активности культур на сегодняшний день отсутствуют четкие дифференцированные критерии подбора цитратсбраживающих лактококков для конкретных видов продуктов. В сыроделии газообразование имеет важное значение для формирования рисунка сыров, а в кисломолочных герметично упакованных продуктах оно может привести к порокам, особенно у продуктов с длительными сроками хранения при нарушении температурных режимов хранения в торговой сети и у потребителей.

Целью работы является изучение газообразующей активности цитратсбраживающих лактококков и совершенствование принципов подбора микрофлоры в состав бактериальных заквасок по этому признаку.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований являлись 60 штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis из коллекции микроорганизмов экспериментальной биофабрики ВНИИМС.

Газообразующую способность исследуемых культур определяли с использованием сосудов Дунбара. Для этого в бульон из гидролизованного молока, приготовленного по ГОСТ 33951-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых бактерий» и обогащенного марганцем сернокислым (0,16 г/л) и натрием лимоннокислым (10,0 г/л), вносили 1,0 % 16-часовой бульонной культуры. Инокулированную среду тщательно перемешивали и переливали в стерильный сосуд Дунбара.

Объем выделившегося газа фиксировали через 12 ч; 48 ч; 168 ч. Газообразующую активность выражали в объеме выделившегося газа в $см^3$ в пересчете на 100 $см^3$ питательной среды.

Влияние температурных режимов культивирования на газообразующую активность штаммов исследовали при оптимальной и минимальной температурах роста, а также в условиях моделирования основных технологически значимых температур при производстве сыров с низкой температурой второго нагревания и кисломолочной продукции:
– оптимальная для роста и развития: (30 ± 1) °С;
– минимальная температура роста и развития: (10 ± 1) °С;
– комбинированный режим, имитирующий температурный режим производства сыров с низкой температурой второго нагревания: культивирование в течение первых 2 ч при температуре (30 ± 1) °С, подогрев до температуры (40 ± 1) °С и выдержка при этой температуре в течение 1 ч, далее охлаждение до температуры (20 ± 1) °С с выдержкой в течение 6 часов с дальнейшим охлаждением и хранением в течение 168 ч при температуре (10 ± 1) °С;
– комбинированный режим, имитирующий температурный режим производства кисломолочной продукции: культивирование 10 ч при температуре (30 ± 1) °С, охлаждение до температуры (20 ± 1) °С в течение 2 ч, доохлаждение до температуры (10 ± 1) °С и выдержка в течение 168 ч.

Опыты проводились в 3-кратной повторности. Результаты математической обработки выполнены с доверительной вероятностью (P = 0,95). Статистическую обработку полученных данных и построение графиков проводили с использованием компьютерных программ «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов исследований газообразующей активности лактококков при оптимальной температуре культивирования (30 ± 1) °С, представленный на рисунке 1, показал различный уровень газообразующей способности у изученных культур и позволил разделить их на три группы по максимальному объему газа за 168 ч наблюдения:

– первая группа – 30,0 % культур (18 штаммов) имели слабую газообразующую активность от 8,20 до 20,0 см^3 газа;

– вторая группа – 50,0 % культур (30 штаммов) проявили среднюю газообразующую активность от 20,0 до 30,0 см^3 газа;

– третья группа – 20,0 % культур (12 штаммов) имели сильную газообразующую активность от 30,0 см^3 углекислого газа и выше.

На рисунке 2 представлены средние значения динамики газообразования слабых, средних и активных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis. Данные свидетельствуют о том, что скорость газообразования была наиболее высокой в первые 12 часов культивирования, а затем постепенно снижалась у штаммов всех трех групп, что может быть обусловлено снижением скорости развития культур и концентрации цитрата в питательной среде.

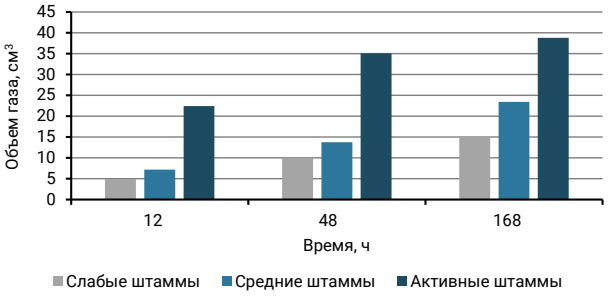

Рисунок 1. Газообразующая активность лактококков при температуре (30 ± 1) °С

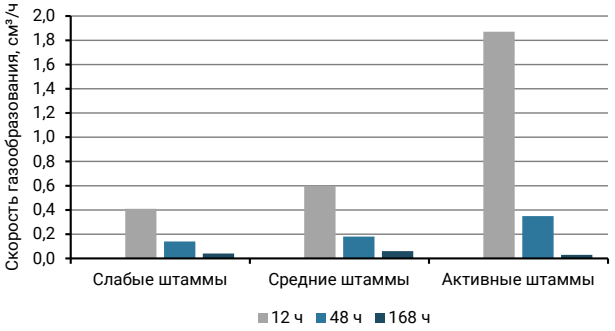

Рисунок 2. Динамика газообразования штаммов при температуре (30 ± 1) °С

Источник изображения: Freepik.com

Представленные на рисунке 3 результаты изучения динамики газообразования показали, что скорость выделения газа при температуре (10 ± 1) °С значительно ниже, чем при оптимальной температуре, и культуры, активно продуцирующие газ при оптимальной температуре, проявляли наиболее низкую активность газообразования при минимальной температуре роста. Средние и слабые штаммы имели достаточно низкие величины по объему выделенного газа при (10 ± 1) °С. За весь период культивирования этих культур наблюдалось постепенное, медленное нарастание газообразующей активности, в сравнении с активными культурами. Однако процесс сбраживания цитратов не прекращается полностью, изучаемые штаммы за весь период культивирования имели следующие значения по объему выделенного газа – от 1,87 до 9,00 см^3, что обеспечивает возможность формирования рисунка сыров при температуре не ниже (10 ± 1) °С.

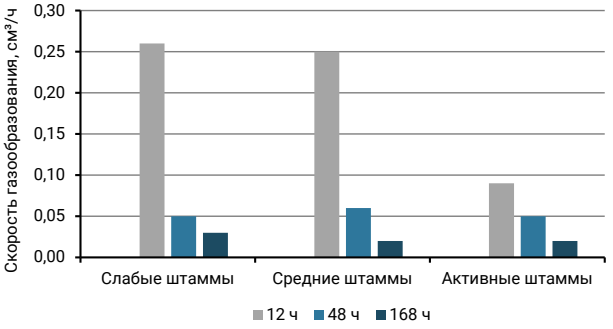

Рисунок3. Динамика газообразования штаммов при температуре (10 ± 1) °С

На рисунках 4 и 5 приведены средние данные объема газа при комбинированных режимах культивирования, имитирующих температурные режимы изготовления сыров с низкой температурой второго нагревания и кисломолочных продуктов. Исследования показали, что смоделированные температурные условия выработки сыров оказали негативное воздействие на газообразующую активность слабых культур – через 168 ч культивирования газообразование отсутствовало. Активные штаммы продуцировали на 27,1 % углекислого газа больше, чем средние штаммы. Следовательно, в состав заквасок для сыров необходимо включать цитратсбраживающие штаммы со средней и высокой активностью газообразования.

В результате проведенной серии экспериментов при комбинированном режиме, имитирующем условия изготовления кисломолочных продуктов, выявлено, что интенсивность газообразования активных штаммов лактококков является достаточно близкой к значениям, установленным при оптимальной температуре. Со статистически значимой достоверностью подтверждено, что охлаждение до температуры (20 ± 1) °С с последующим доохлаждением до температуры (10 ± 1) °С не оказало значимого влияния на процессы газообразования изучаемых культур (табл. 1). Процессы развития штаммов и их газообразующая активность замедлились несущественно. Дисперсионный анализ данных (табл. 1) подтверждает негативное влияние технологически значимых температурных режимов при изготовлении сыров и минимальной температуре роста на активность продуцирования углекислого газа относительно их развития при оптимальной температуре.

С целью ранжирования исследуемых образцов по уровню газообразующей способности на группы активных и слабых штаммов *L. diacetyllactis*, в условиях моделирования различных технологически значимых температур был проведен дисперсионный анализ данных. Результаты представлены в таблице 2. Выявлены статистически достоверные различия между данными группами коллекционных культур при всех режимах культивирования, что подтверждает корректность проведенного ранжирования. Данный подход к оценке газообра-

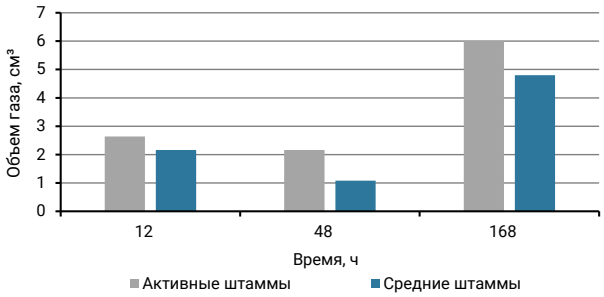

Рисунок 4. Газообразование при комбинированном режиме выработки сыров

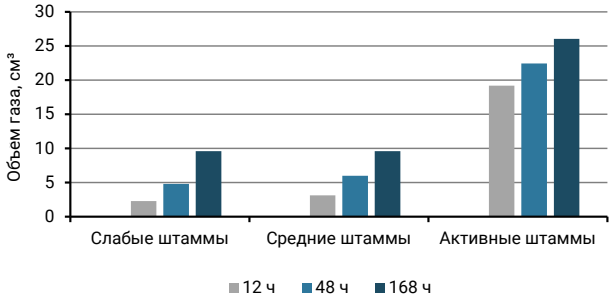

Рисунок 5. Газообразование при комбинированном режиме выработки кисломолочных продуктов

Таблица 1
Статистическая значимость влияния температурных режимов на газообразующую активность

Вид заквасочной микрофлоры	Комбинированный режим выработки сыра		Комбинированный режим выработки кисломолочных продуктов		Температура культивирования (10 ± 1) °С	
L. lactis subsp. *lactis* biovar diacetylactis	*F*эмп	*p*	*F*эмп	*p*	*F*эмп	*p*
	13,25	0,022	2,37[a]	0,20[a]	11,19	0,029

Примечание: Уровень статистической достоверности влияния фактора: ($p > 0,05$) – не достоверно; ($p < 0,05$) – достоверно.
Знаком [a] – отмечены величины, не имеющие статистической значимости. F-критическое для всех наблюдений = 7,71.

Таблица 2
Достоверность различий между слабыми и активными культурами при температурных режимах культивирования

Вид заквасочной микрофлоры	Температура культивирования (30 ± 1) °С		Комбинированный режим выработки сыра		Комбинированный режим выработки кисломолочных продуктов		Температура культивирования (10 ± 1) °С	
L. lactis subsp. *lactis* biovar diacetylactis	*F*эмп	*p*	*F*эмп	*p*	*F*эмп	*p*	*F*эмп	*p*
	10,37	0,03	14,71	0,02	29,89	0,01	11,21	0,03

Примечание: Уровень статистической достоверности влияния фактора ($p > 0,05$) не достоверно; ($p < 0,05$) достоверно. F-критическое для всех наблюдений = 7,71.

зующей активности *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis может использоваться при разработке дифференцированных критериев подбора штаммов в состав бактериальных заквасок для кисломолочных продуктов и сыров.

Источник изображения: Freepik.com

ВЫВОДЫ

Таким образом установлено, что коллекционные культуры цитратсбраживающих лактококков обладают различной скоростью газообразования. Достоверно показана возможность их ранжирования по газообразующей способности с разделением на три группы – со слабой, средней и высокой активностью.

Проанализировано влияние режимов культивирования, моделирующих температурные режимы изготовления кисломолочных продуктов и сыров с низкой температурой второго нагревания, на интенсивность газообразования лактококков, которое показало целесообразность разработки дифференцированных критериев подбора культур в состав бактериальных заквасок для различных продуктов по этому признаку. ■

GAS-FORMING CITRATE-FERMENTATION BY LACTOCOCCI

Irina V. Kucherenko, Elena V. Kuraeva, Anna Yu. Duganova
All-Russian Research Institute of Butter- and Cheesemaking, V. M. Gorbatov Federal Scientific Center for Food Systems, Uglich

ORIGINAL ARTICLE

In milk processing, effective microbiological control depends on the correct choice of lactic acid bacteria in the microflora of bacterial starters. However, polyspecific starter consortia of acid-forming and aroma-forming lactococci still have no distinct criteria. The experiment included the rate of gas formation and the maximal gas production by citrate-fermenting lactococci at optimal and minimal temperatures, as well as at production conditions used for thermally-processed cheeses with low-temperature second heating and fermented milk products. After 168 hours of observation at optimal cultivation temperature, the gas-forming lactococci were divided into three groups according to the maximal volume of gas produced. The first group included 30.0 % of cultures from the total number of strains; their gas-forming activity was weak and ranged from 8.20 to 20.0 cm^3 of carbon dioxide. The second group amounted to 50.0 % and showed an average gas-forming activity of 20.0–30.0 cm^3. The third group comprised 20.0 % and possessed a strong gas-forming activity of ≥ 30.0 cm^3. The strains differed in the abovementioned indicators and could be ranked by gas-forming properties to develop selection criteria for bacterial starter cultures to be used in fermented dairy products and cheeses. The article introduces statistics on the effect of production temperature on the gas-forming activity by *L. lactis* subsp. l*actis biovar diacetylactis*, which were ranked by their gas-forming activity under the processing conditions applied to fermented dairy products and cheese.

Keywords: bacterial starter cultures, microbial consortia, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, citrate-fermenting lactococci, gas-forming activity

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Demarigny, Y.** *Lactococcus lactis*, subspecies of *lactis* and *cremoris* / Y. Demarigny. – Encyclopedia of Food Products. Microbiology, vol. 2. – Elsevier Ltd, Academic Press, 2014. – P. 442–446. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00182-8
2. **Samaržija, D.** Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review / D. Samaržija [et al.] // Mljekarstvo. № 51 (1). 2001. P. 35–48.
3. **Vos, P.** Bergey's Manual of systematic bacteriology / P. Vos [et al.]. – Volume 3: The Firmicutes, 2nd ed. – New York: Springer-Verlag, 2009. – 1422 p.
4. **Skerman, V. B. D.** Approved Lists of Bacterial Names / V. B. D. Skerman [et al.] // international journal of systematic and evolutionary microbiology. 1980. Vol. 30 (1). P. 225–420. https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225
5. **Schleifer, K. H.** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. / K. H. Schleifer [et al.] // Systematic and Applied Microbiology. 1985. Vol. 6 (2). P. 183–195. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80052-7
6. **Nomura, M.** Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris* / M. Nomura [et al.] // International journal of systematic bacteriology. 1999. Vol. 49 (1). P. 1–163. https://doi: 10.1099/00207713-49-1-163
7. **Li, T. T.** Elevation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the species level as *Lactococcus cremoris* sp. nov. and transfer of *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* to *Lactococcus cremoris* as *Lactococcus cremoris* subsp. *tructae* comb. nov / T. T. Li [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2019. Vol. 71 (3). https:// doi.org/10.1099/ijsem.0.004727
8. **Гудков, А. В.** Сыроделие: технологические, биофизические и физико-химические аспекты / А. В. Гудков. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 804 с.
9. **Свириденко, Г. М.** Диацетильный лактококк как компонент бактериальных заквасок для ферментированных молочных продуктов, в том числе сыров / Г. М. Свириденко, О. М. Шухалова // Молочная промышленность. 2019. № 8. С. 21–25. https://doi.org/10.31515/1019-8946-2019-8-21-24; https://www.elibrary.ru/iyltyz
10. **Кучеренко, И. В.** Источники выделения культур лактококков для бактериальных заквасок / И. В. Кучеренко, Н. П., Сорокина, Е. С. Масежная [и др.] // Молочная промышленность. 2020. № 10. С. 36–38. https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-10-36-38; https://www.elibrary.ru/mutht
11. **Максуини, П. Л.** Сыр. Научные основы и технологии / П. Л. Максуини, П. Ф. Фокс, П. Д., Коттер, Д. У. Эверетт. – СПб.: ИД Профессия, 2019. – Т. 1. – 556 с.
12. **Орлова, Т. Н.** Мезофильные лактококки в составе бактериальных заквасок для сыров / Т. Н. Орлова, А. Н. Иркитова // Сыроделие и маслоделие. 2014. № 4. С. 28–30. https://www.elibrary.ru/sjdthd