

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАКТОКОККОВ И ТЕРМОФИЛЬНОГО СТРЕПТОКОККА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАКВАСОК С ЗАДАНЫМ УРОВНЕМ ПОСТФЕРМЕНТАЦИИ

Дуганова А.Ю., м.н.с., Rogov G.N., канд. техн. наук

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова», РАН, Российская Федерация, г. Углич

Аннотация. Целью работы являлась оценка динамики роста и метаболической активности 40 коллекционных штаммов лактококков и термофильного стрептококка для создания бактериальных заквасок с заданным уровнем постферментации. Для достижения поставленной цели был проведён спектрофотометрический и потенциометрический мониторинг при оптимальных режимах культивирования, а также в условиях моделирования промышленных режимов охлаждения и хранения ферментированной молочной продукции. В результате проведённой работы была осуществлена классификация штаммов по изменению активной кислотности в период охлаждения и 21 день холодильного хранения при температуре 6 ± 1 °С. Проведено ранжирование штаммов на группы по уровню постферментативной активности. Проведена оценка динамики роста культур при оптимальных условиях культивирования. В результате исследований отобрано 16 перспективных штаммов с разным уровнем постацидофикации для дальнейших исследований и включения в консорциумы при разработке новых концентрированных бактериальных заквасок прямого внесения для производства кисломолочных продуктов и сыров.

Ключевые слова: ферментированная молочная продукция, качество, безопасность, заквасочные культуры, постферментативная активность, метаболизм, *Lactococcus*, *Streptococcus thermophilus*.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке национального проекта по обеспечению технологического лидерства «Новые материалы и химия», тема FGUS-2025-0006.

STUDY OF THE METABOLIC ACTIVITY OF LACTOCOCCUS AND STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS TO CREATE BACTERIAL FLUORESCENT LEAVES WITH A SPECIFIED POSTFERMENTATION LEVEL

Duganova A.Y., Research assistant, Rogov G.N., PhD in Engineering

*All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking –
Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems,
Russian Federation, Uglich*

Abstract. The aim of the work was to evaluate the dynamics of growth and metabolic activity of 40 collection strains of lactococci and thermophilic streptococci to create bacterial starters with a given level of post-fermentation. To achieve this goal, spectrophotometric and potentiometric monitoring was carried out under optimal cultivation conditions, as well as under conditions of simulating industrial cooling and storage conditions for fermented dairy products. As a result of the work, the strains were classified by changes in active acidity during the cooling period and 21 days of re-

frigeration storage at a temperature of 6 ± 1 °C. The strains were ranked into groups by the level of post-fermentative activity. The dynamics of culture growth under optimal cultivation conditions was assessed. As a result of the research, 16 promising strains with different levels of post-acidification were selected for further research and inclusion in consortia in the development of new concentrated bacterial starters for direct application for the production of fermented milk products and cheeses.

Keywords: fermented dairy products, quality, safety, starter cultures, post-fermentative activity, metabolism, *Lactococcus*, *Streptococcus thermophilus*.

Funding. The research was supported by the national project for ensuring technological leadership «New Materials and Chemistry», topic FGUS-2025-0006.

Введение

Производство ферментированных молочных продуктов основано на применении заквасочных культур, ключевыми компонентами которых являются молочнокислые бактерии (МКБ), в частности *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* и *Streptococcus thermophilus* [1]. Метаболическая активность штаммов представляет собой способность осуществлять биохимические реакции, необходимые для жизнедеятельности клетки. Ферментативная активность определяет не только процесс сквашивания, но и последующие изменения в продукте при хранении, объединяемые понятием «постферментационная активность» (ПФА). ПФА проявляется в процессе ферментации лактозы, протеолизе, липолизе, накоплении продуктов метаболизма, например молочной кислоты, диацетила, ацетальдегида и т.д., что может приводить как к положительным, так и к негативным последствиям: повышенной кислотности, появлению пороков вкуса и консистенции, вспучиванию упаковки при производстве сметаны или творога [2, 3]. В контексте производства продуктов с длительным сроком хранения и стабильным качеством актуальной задачей является разработка заквасок с регулируемым уровнем ПФА.

Кислотообразующая активность микроорганизмов является ключевым параметром формирования консорциумов для их последующего включения в состав бактериальных заквасок. Во время основного процесса ферментации активность заквасочной микробиоты должна обеспечивать достаточный молочнокислый фон при получении продукта стабильного качества. Накопление молочной кислоты ингибирует развитие вредных микроорганизмов, однако во время хранения увеличение кислотности следует ограничивать. Вариации кислотообразования от оптимальных параметров могут ухудшать качество и безопасность продукта. Кислотообразующий потенциал бактериальных заквасок в первую очередь определяется видовым и штаммовым составом микробиоты [4, 5].

Важным критерием селекции штаммов в состав заквасок является скорость роста и накопления биомассы. Штамм должен демонстрировать достаточную интенсивность развития и стабильность в питательной среде во время ферментации. Для оценки динамики роста бактерий применяется спектрофотометрический метод измерения оптической плотности суспензий. Данный метод позволяет осуществлять скрининг динамики роста популяции, что является эффективным инструментом для управления ферментационным процессом [6, 7].

В ходе ранее проведенных исследований была проанализирована постферментационная активность культур лактококков и термофильного стрепто-

кокка с использованием титриметрического метода определения кислотности, в условиях, имитирующих температурные режимы, характерные для производства ферментированных молочных продуктов. В результате проведенной работы исследуемые штаммы были ранжированы на три группы по величине прироста титруемой кислотности за период длительного холодильного хранения [8, 9, 10].

Настоящее исследование направлено на комплексное изучение метаболической активности изучаемых культур лактококков и термофильного стрептококка после многократных пассажей по критерию постацидофикации с использованием потенциометрического и спектрофотометрического метода для выявления перспективных штаммов обладающих стабильными свойствами постферментационной активности.

Цель данной работы: исследование динамики роста и метаболического потенциала коллекционных штаммов *Lactococcus spp.* и *S. thermophilus* для создания заквасок с заданным уровнем постферментации.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись 40 штаммов молочнокислых бактерий из коллекции ВНИИМС:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*L. lactis*);
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (*L. cremoris*);
- *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (*L. diacetylactis*);
- *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*).

Для оценки метаболической активности применялся комплекс методов.

-**потенциометрический метод определения активной кислотности:**

Для проведения эксперимента использовалось восстановленное обезжиренное молоко с содержанием сухих веществ 10-% по ГОСТ Р 52791-2007 «Консервы молочные. Молоко сухое», с тепловой обработкой 113 °С в течении 15 минут. Доза инокулята составляла 3% 16-часовой молочной культуры. Активную кислотность определяли по ГОСТ 32892-2014 «Молоко и молочная продукция. Метод измерения активной кислотности». С целью моделирования многоступенчатых температурных режимов производства кисломолочной продукции измерения проводили после окончания ферментации и охлаждения в течение 2 часов до температуры 20±2 °С, затем доохлаждения до температуры 6±1 °С и хранения при этой температуре в течение 21 суток.

-**спектрофотометрический метод:**

Измерение оптической плотности осуществлялось с применением фотометра фотоэлектрического модели КФК-3-ЗОМЗ. Для этого в бульон из гидролизованного молока, приготовленного по ГОСТ 33951-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых бактерий» вносили 1,0 % 16-часовой молочной культуры. Контрольные точки измерений: 0, 4, 8 и 24 часа при оптимальной температуре культивирования.

Результаты и обсуждение

Критерием контроля уровня постферментации молочной продукции считается падение активной кислотности на не более, чем 0,30 ед. рН в конце срока хранения [4, 11-13]. Ранжирование культур осуществлялась по разнице между максимальным значением падения активной кислотности за период наблюдения

в течение 21 суток при температуре 6 ± 1 °С и величиной титруемой кислотности в конце ферментации после окончания процесса охлаждения (рисунок 1).

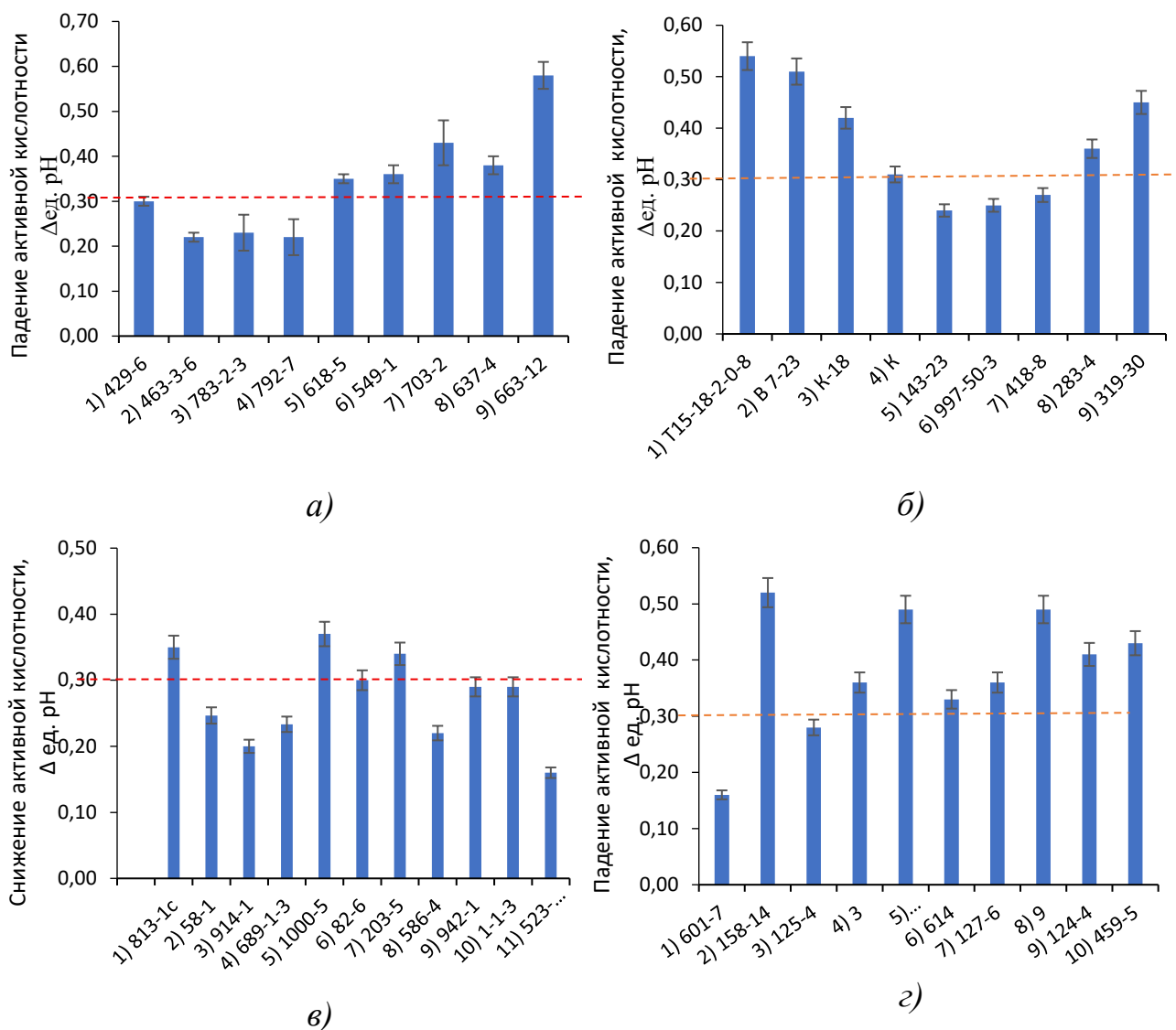


Рисунок 1. Изменение активной кислотности исследуемых штаммов по окончании ферментации и холодильного хранения при температуре 6 ± 1 °С в течение 21 суток: а) *L. lactis*; б) *L. cremoris*; в) *L. diacetylactis*; г) *S. thermophilus*

Все исследованные штаммы демонстрировали достаточный уровень молочнокислого брожения в период ферментации, характерный для производства ферментированной молочной продукции, составляющий от 4,60-4,80 ед. рН.

На основании полученных данных, культуры были классифицированы на две основные группы с низкой ПФА (группа I) и высокой ПФА (группа II) по критерию $\text{ПФА} \leq 0,30$ ед. рН по окончании срока хранения. У остальных штаммов наблюдались промежуточные результаты, поэтому их нельзя отнести ни к одной из групп, так как значения постферментативной активности данных штаммов находятся на предельном уровне падения активной кислотности.

Установлено, что среди культур лактококков I группы наблюдалась низкая постферментативная активность. Величина изменения рН составила от

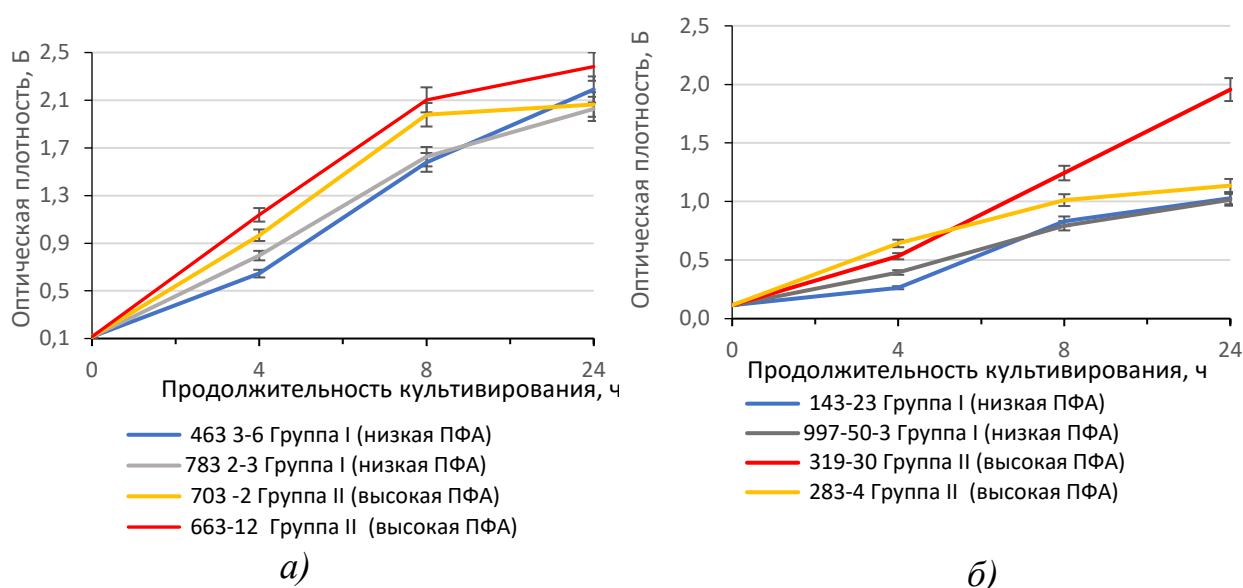
0,16±0,02 до 0,30±0,03 ед. рН Культуры *S. thermophilus* также продемонстрировали стабилизацию роста кислотности в пределах от 0,18±0,02 до 0,30±0,05 ед. рН. Штаммы с низкой ПФА показали незначительное изменение рН в течение 21 суток хранения, что свидетельствует о сниженной постферментационной активности.

Среди штаммов II группы по окончании хранения наблюдалось устойчивое снижение активной кислотности лактококков в течение 21 дневного периода хранения. Величина изменения рН составила от 0,30±0,02 до 0,54±0,06 единиц. Аналогично, в культурах *S. thermophilus* также зафиксировано интенсивное снижение рН в тот же период хранения (0,30±0,02 до 0,52±0,08 ед.рН). В первые 24 часа у штаммов данной группы наблюдалось быстрое снижение активной кислотности с последующим снижением скорости кислотообразования. Штаммы с повышенной ПФА демонстрировали более значительное снижение рН в период хранения.

В результате проведённой работы были установлены штаммы со стабильными свойствами постферментативной активности после проведения 72 пассажей. Данные культуры были отобраны для дальнейших исследований динамики роста и накопления биомассы с помощью спектрофотометрического анализа.

Для оценки активности роста и развития проводили исследования оптической плотности штаммов при оптимальной температуре культивирования.

Установлено, что штаммы группы I (с низкой ПФА), обладающие пониженной постферментативной активностью, демонстрируют умеренную скорость роста оптической плотности при оптимальной температуре инкубирования (рисунок 2). Учитывая выявленные умеренные постферментативные свойства исследуемых штаммов при оптимальной температуре культивирования, а также в период холодильного хранения при одновременном обеспечении достаточного молочнокислого процесса в период основной ферментации, рекомендуется включение данных штаммов в состав заквасок для кисломолочной продукции, что позволит обеспечить их соответствие установленным требованиям нормативно-технической документации и потребительским предпочтениям.



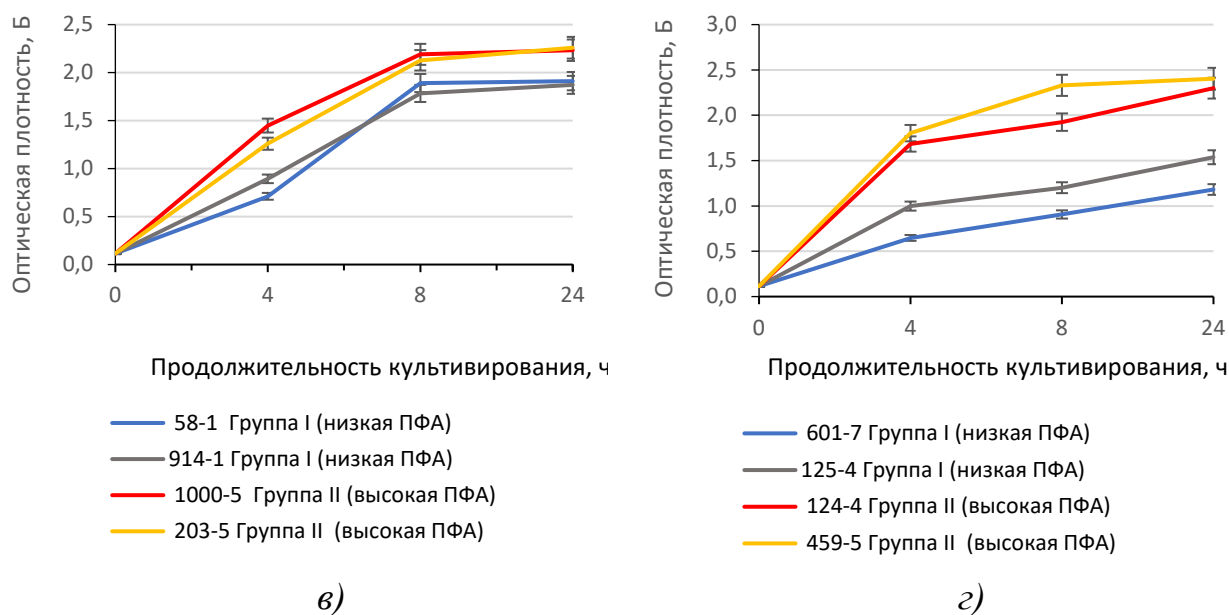


Рисунок 2. Динамика изменения оптической плотности исследуемых штаммов при оптимальной температуре культивирования: а) *L. lactis*; б) *L. cremoris*; в) *L. diacetylactis*; г) *S. thermophilus*

У штаммов II группы (с высокой ПФА), наблюдалось активное накопление биомассы в логарифмической фазе роста микроорганизмов, достижение логарифмической фазы и переход к стационарной фазе происходит с более высокой скоростью. Поэтому использование штаммов второй группы в составе заквасок для производства кисломолочной продукции приведёт к несоответствию конечного продукта переработки молока требованиям таможенного законодательства. Штаммы данной группы рекомендуется включать в состав заквасок для производства сыров с целью обеспечения высокой интенсивности молочнокислого процесса в сыродельной ванне. Буферная ёмкость сыров позволяет нейтрализовать избыточную кислотность на этапе производства. Включение активных культур в состав заквасок для сыров оказывает положительное влияние на формирование вкусоароматических характеристик продукта в процессе созревания [14, 15].

Применение комплекса методов оценки метаболической активности позволяет не только прогнозировать поведение штаммов, но и создавать консорциумы, адаптированные под требования по стабильности активной кислотности и вкусовым характеристикам [16].

Выводы

Проведен комплексный скрининг 40 штаммов *Lactococcus spp.* и *S. thermophilus* по динамике роста и метаболической активности в условиях моделирующих основные температурные режимы промышленного производства кисломолочной продукции.

Выделены две основные группы культур по уровню ПФА: низкая ПФА (группа I) и высокая ПФА (группа II).

Штаммы группы I показывают умеренную скорость роста в логарифмической фазе и стабильность кислотности в хранении, что благоприятно для кисломолочных продуктов.

Штаммы группы II характеризуются более высоким приростом биомассы и более резким снижением активной кислотности в период хранения, что может быть нецелесообразно для некоторых кисломолочных продуктов, но полезно для сыров, где буферная система может нивелировать избыточную кислотность. Добавление активных культур в состав бактериальных заквасок для производства сыров положительно повлияет на развитие вкусоароматических качеств продукта в процессе его созревания.

Результаты позволяют прогнозировать биотехнологические характеристики заквасочных культур и формировать консорциумы для производства конкретных видов молочной продукции, обеспечивая стабильность качества и безопасности на протяжении срока годности.

Литература

1. Гудков А.В. Сыроделие: технологические и физико-химические аспекты. М.: ДеЛи принт, 2003. 800 с.
2. Зарицкая В.В., Держапольская Ю.И. Микробиология молока и молочных продуктов. Благовещенск: ДальГАУ, 2017. 89 с.
3. Тамим А.Й., Робинсон Р.К. Йогурт и другие кисломолочные продукты. Санкт-Петербург: Профессия, 2003 661 с.
4. Deshwal, G.K., Tiwari, S., Kumar, A., Raman, R.K., & Kadyan, S. Review on factors affecting and control of post-acidification in yoghurt and related products // Trends in Food Science & Technology. 2021. Vol. 109. P. 499-512. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.057>.
5. Guan, Y., Cui Y., Qu X., Li B., Zhang L. Post-acidification of fermented milk and its molecular regulatory mechanism // International Journal of Food Microbiology. 2024. Vol. 426. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110920>.
6. Hutkins R.W. Metabolism of starter cultures // Food science and technology- new york-marcel dekker. 2001. Vol. 2. P. 207-242.
7. Bezie, A., Regasa H. The role of starter culture and enzymes / rennet for fermented dairy products manufacture—a review // Nutr. Food Sci. Int. J. 2019. Vol. 9. P. 21–27.
8. Дуганова А.Ю., Шпак А.В. Постокислительная активность коллекционных культур термофильного стрептококка // Молочная промышленность. 2022. № 12. С. 18-19. DOI 10.31515/1019-8946-2022-12-18-19. – EDN LHSXQK.
9. Дуганова А.Ю., Шпак А.В. Скрининг культур лактококков с низкой постокислительной активностью // Пищевая промышленность. 2024. № 2. С. 33-37. DOI 10.52653/PPI.2024.2.2.006.
10. Дуганова А.Ю., Шпак А.В. Сравнительная оценка кислотообразующей активности культур мезофильных лактококков и термофильного стрептококка // Передовые достижения науки в молочной отрасли : Сборник научных трудов по результатам работы V Международной научно- практической конфе-

ренции, Вологда-Молочное, 26 октября 2023 года. Том 1. Вологда-Молочное: Вологодская государственная молочнохозяйственная академия им. Н.В. Верещагина, 2023. С. 46-51.

11. Vinicius D. M., Pereira G. et al A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry // Food reviews international. 2020. Vol. 36(2). P. 135-167.

12. Свириденко Г.М. , Шухалова О.М. Молочнокислые лактококки как основной кислотообразующий компонент // Молочная промышленность. 2019. №4. С. 30-33.

13. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Раскошная Т.А., Абрамова А.А. Разработка заквасок для кисломолочных продуктов // Молочная промышленность. 2013. №11. С. 30-31.

14. Comunian R., Chessa L. Development and Application of Starter Cultures // Fermentation. 2024. Vol. 10(10). P. 512. DOI: 10.3390/fermentation10100512

15. Tsisaryk O., Slyvka I., Musiy L. Screening of technological properties of natural strains of lactic acid bacteria // Scientific Messenger LNUVMB. 2017. Vol. 19(80). P. 88–92. DOI: 10.15421/nvlvet8018.

16. Меркулова Н. Г. Подбираем заквасочные культуры // Переработка молока. 2014. № 10(180). С. 52-53.