

УДК 637.146.33.03 (047.31)(476)
https://doi.org/10.47612/2220-8755-2019-14-26-39

Поступила в редакцию 16 апреля 2020 года

Ю.С. Юдина, С.Л. Василенко, к.б.н., Н.К. Жабанос, к.т.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННО-ЦЕННЫХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛЕЙКОНОСТОКОВ ИЗ РЕСПУБЛИКАНСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР И ИХ БАКТЕРИОФАГОВ

Yu. Yudina, S. Vasylenko, N. Zhabanos, N. Furyk
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

INVESTIGATION OF PRODUCTION-VALUABLE AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LEUCONOSTOCS FROM THE REPUBLICAN COLLECTION OF INDUSTRIAL STRAINS OF STARTER CULTURES AND THEIR BACTERIOPHAGES

e-mail: yle4ka_usa@mail.ru, vasylenko@tut.by, nzhabanos@tut.by, furik_nn@tut.by

Изучены производственно-ценные свойства лейконостоков, позволяющие использовать их в составе заквасочных культур для молочной промышленности (сбраживающая и газообразующая активности, устойчивость к NaCl, pH, чувствительность к бактериофагам, антагонистическая активность по отношению к бактериям группы кишечной палочки). Предложена питательная среда для их культивирования с обоснованием углеводного компонента и температуры культивирования.

We investigated the industrial important properties of leuconostocs that make them possible to use it in starter cultures for the dairy industry (fermented and gas-forming activities, resistance for NaCl, pH, sensitivity to bacteriophages, antagonistic activity against coliform bacteria). We have developed the nutritional medium for their cultivation with the justification of the carbohydrate component and identified cultivation temperature of microorganisms.

Ключевые слова: лейконостоки; производственно-ценные свойства; заквасочные культуры; питательная среда.

Keywords: leuconostocs; industrial production-valuable properties; starter cultures; nutritional medium.

Введение. Важнейшей проблемой, стоящей перед молокоперерабатывающей промышленностью страны, является производство высококачественной продукции. В последние годы увеличение производства отмечено по всем видам молочной продукции. Следствием увеличения производства в Республике Беларусь групп ферментированных молочных продуктов является значительное повышение потребности белорусских производителей в бактериальных заквасках, являющихся необходимым компонентом их производства, определяющим органолептические свойства, пищевую и биологическую ценность продукта, а также безопасность для потребителя.

Молочнокислые бактерии играют важную роль при производстве широкого спектра продукции, определяя и формируя ее свойства. Несмотря на то, что наиболее часто для производства наиболее распространенных молочных продуктов (в частности, творога, сметаны, сыра и т.п.) применяют бактериальные закваски, в состав которых входят штаммы лактококков (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*) и термофильного стрептококка (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), лейконостоки также являются одной из важных составляющих поливидовых заквасок.

Бактерии рода *Leuconostoc* относятся к грамположительным микроорганизмам. Они принадлежат к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку

Lactobacillales, семейству *Leuconostocaceae*, которое включает три рода: *Oenococcus*, *Weissella* и *Leuconostoc*. Род *Leuconostoc* включает 10 видов: *Leu. argentinum*, *Leu. carnosum*, *Leu. citreum*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. gelidum*, *Leu. kimchii*, *Leu. lactis*, *Leu. mesenteroides* (включая три подвида: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* и *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) и *Leu. pseudomesenteroides*, у которых сходство последовательности 16S рРНК составляет 97,1–99,5%, а также *Leu. fallax*, который обладает 94–95% сходством последовательности гена 16S рРНК с другими лейкоостоками [1].

Генетически лейкоостоки находятся в наиболее тесном родстве не с лактококками, с которыми они схожи морфологически, а с некоторыми гетероферментативными молочнокислыми палочками (лактобациллами), от которых они отличаются по форме клеток. Лейкоостоки представляют собой сферические несколько вытянутые клетки размером 0,5–0,7 × 0,7–1,2 мкм, располагающиеся в виде коротких цепочек или попарно; неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно. При выращивании их в молоке или на средах с добавлением молока большинство штаммов образуют коккоподобные клетки в коротких цепочках. При культивировании в синтетических питательных средах клетки лейкоостоков удлиняются и могут иметь вид коротких палочек [2].

Культивирование лейкоостоков осуществляют на питательных средах сложного состава. Они медленно развиваются в молоке и для его ферментации необходимо добавление ростовых факторов, таких как, например, дрожжевой экстракт или глюкоза. Оптимальная температура развития находится в интервале +20...30°C, максимальная +35...39°C, минимальная +8...14°C. В то же время лейкоостоки выживают нагревание при температуре 65°C в течение 30 мин. По сравнению с лактококками лейкоостоки развиваются в молоке и снижают кислотность более медленно [2, 3].

Бактерии рода *Leuconostoc* являются газо- и ароматобразующими микроорганизмами: они сбраживают молочный сахар в молочную кислоту (до 60–80% сахара), а остальной превращают в летучие соединения. Наряду с накоплением молочной кислоты лейкоостоки образуют значительные количества уксусной кислоты, спирта (этанола), углекислого газа, продуцируют ацетон и диацетил. Лейкоостоки представляют интерес для изготовления творога и сыров, так как обладают газообразующей способностью при развитии в ферментируемом молоке или сырах после снижения рН до 4,5. Возможность взаимозамены лейкоостоков и *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis* обусловлена тем, что обе группы этих микроорганизмов образуют диацетил и CO₂, однако ароматобразующие лактококки образуют эти соединения только из цитратов молока, а лейкоостоки из лактозы и цитратов (в присутствии сбраживаемого углевода). У ароматобразующих лактококков способность образовывать диацетил и CO₂ может быть утрачена, у лейкоостоков она является стабильным свойством, так как закодирована в хромосоме. По этой причине эти микроорганизмы используют в сочетании с лактококковыми консорциумами в многоштаммовых заквасках в качестве газо-ароматобразующего компонента [2, 3].

Развитие лейкоостоков в молочном сырье во время выработки сыра стимулирует лактококковая микрофлора закваски путем образования низкомолекулярных азотистых соединений и, возможно, других факторов роста [4]. После прессования в сырах с низкой температурой и нагревания остается более 1% лактозы, что вполне достаточно для накопления лейкоостоками требуемого количества газа для формирования характерного для этих сыров рисунка [5]. Лейкоостоки не размножаются во время выработки сыров и могут образовывать газ во время созревания, когда температура и другие условия в сыре далеки от

оптимальных, но не подавляют их рост [6, 7].

После сбраживания лактозы в сырах рост лейконостоков прекращается. Чем больше лактозы в сырах остается после прессования, тем дольше продолжается развитие лейконостоков. При нормальной скорости сбраживания лактозы лейконостоки за время выработки сыра дают до 6 поколений. При избытке лактозы в сырах, например, в результате воздействия бактериофага на лактококки, лейконостоки могут вызывать раннее вспучивание сыра. Оно отличается от вспучивания, вызываемого бактериями группы кишечной палочки, тем, что вспученные сыры сохраняют вполне удовлетворительный вкус и аромат [3].

Бактериофаги лейконостоков менее распространены на сыродельных заводах, чем бактериофаги лактококков, так как лейконостоки начинают размножаться после свертывания молока, когда условия для репродукции бактериофагов неблагоприятны. В связи с этим, закваски, содержащие лейконостоки, более стабильно обеспечивают формирование рисунка в сыре, чем закваски, содержащие только лактококковую микрофлору [2, 3].

Лейконостоки оказывают влияние не только на рисунок, но и на другие органолептические показатели сыров. Введение в закваску лейконостоков улучшает вкус и запах, увеличивает содержание летучих жирных кислот, растворимых белков и т.д. Особенностью протеолитических систем штаммов лейконостоков является то, что они не дают горечи, что обусловлено низким уровнем образования в молоке пептидов и способностью разрушать горькие пептиды, образуемые другими микроорганизмами заквасок [8]. Более высокое содержание летучих кислот и более высокий pH в сырах с лейконостоками является следствием сбраживания ими части лактозы гетероферментативным путем [3, 8].

Передовой мировой опыт производителей концентрированных заквасок свидетельствует о том, что использование лейконостоков в составе заквасочной микрофлоры способствует получению ферментированных молочных продуктов, обладающих высокими органолептическими свойствами, а при изготовлении сыров с низкой температурой второго нагревания обеспечивает формирование правильного рисунка и отсутствие горечи в готовой продукции.

Таким образом, лейконостоки – один из важных компонентов заквасочной микрофлоры, поэтому изучение их характеристик и условий культивирования является актуальной задачей.

Целью исследования являлось изучение производственно-ценных и технологических свойств лейконостоков из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов.

Материалы и методы исследования. В работе использовали штаммы из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов, консорциумы на их основе, характеристика которых приведена в таблице 1, а также три культуры *Escherichia coli* и 27 коллекционных бактериофагов.

Таблица 1 – Молочнокислые бактерии, используемые в работе.

№ п/п	Штамм		Видовая принадлежность
1.	423 МН-ODG		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
2.	412 МН-ODG		<i>Leuconostoc lactis</i>
3.	417 МН-ODG		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
4.	Кислотообразующая основа А	1530 М-А	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
5.		2600 М-А	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
6.		2715 М-А	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
7.	Кислотообразующая основа Б	744 М-А	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
8.		1597 М-А	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
9.		1879 М-А	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

Источник данных: собственная разработка.

В работе использовали следующие питательные среды:

Среду МРС готовили согласно прописям, изложенным в [9].

МРС среду, содержащую NaCl. К компонентам МРС-среды добавляли NaCl в определенной концентрации (от 2,0% до 8,0%). Доводили pH до 6,2–6,4 ед. и стерилизовали автоклавированием при температуре $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин.

Для приготовления среды МРС разной активной кислотности в готовой стерильной среде устанавливали требуемый pH с помощью 40% раствора молочной кислоты.

Среду ВОМ-10 готовили согласно прописям, изложенным в [10].

Среда ВОМ-10 с добавлением 1% дрожжевого экстракта. В стерильную колбу вносили $(10\pm 0,1)$ г дрожжевого экстракта, объем раствора доводили дистиллированной водой до (100 ± 10) см³ и стерилизовали при $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (12 ± 2) мин. В асептических условиях $(1\pm 0,01)$ см³ раствора дрожжевого экстракта вносили в $(9\pm 0,01)$ см³ среды ВОМ-10.

Пастеризованное молоко – молоко, отвечающее требованиям [11], для молока не ниже высшего сорта, пастеризовали в автоклаве при $0,35\pm 0,05$ МПа в течение 25 мин.

Стерильное молоко – молоко, отвечающее требованиям [11], для молока не ниже высшего сорта, стерилизовали при $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (12 ± 2) мин.

Питательные среды для культивирования лейконостоков. Среда №1, №2, №3, №4, №5 готовили на основе обезжиренного молока, частично гидролизованного нейтральной и новозимом, с добавлением факторов роста (дрожжевого экстракта, пептона и/или натрия лимоннокислого и/или натрия уксуснокислого и/или натрия хлористого и/или железа сернокислого и/или магния сернокислого и/или марганца сернокислого и др.). Стерилизовали в автоклаве при $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 2) мин.

КОН 40%. В мерный стакан с 30 см³ дистиллированной воды вносили $(40\pm 0,1)$ г сухого гидроксида калия, объем раствора доводили дистиллированной водой до (100 ± 10) см³.

Используемые методы исследования:

Измерение pH проводили в соответствии с [12].

Получение (16 ± 2) часовых культур бактерий на среде МРС. 0,1 мл исследуемой культуры вносили в пробирки, содержащие 15 мл среды MRS. Инкубировали в термостате при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (16 ± 2) ч.

Получение (16 ± 2) часовых культур бактерий на среде ВОМ-10 с добавлением 1% дрожжевого экстракта. 0,1 мл исследуемой культуры вносили в пробирки, содержащие 10 мл среды ВОМ-10 с добавлением 1% дрожжевого экстракта. Инкубировали в термостате при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (16 ± 2) ч.

Определение времени сквашивания цельного молока. К 50 мл пастеризованного (или стерильного) цельного молока добавляли 5% исследуемой культуры и инкубировали при $(30\pm 1)^\circ\text{C}$. О сквашивающей активности судили по времени образования молочного сгустка.

Определение газообразования. Молочный сгусток тщательно перемешивали и по (20 ± 1) см³ наливали в пробирки диаметром 15–20 мм, которые помещали на водяную баню и нагревали до $(90\pm 1)^\circ\text{C}$. У активных по газообразованию культур сгусток становился губчатым и поднимался над сывороткой от первоначального уровня на 10 мм и более.

Определение наличия ароматообразования (продукция диацетила, ацетона). На предметное стекло, лежащее на белой бумаге, наносили 2 капли сыворотки, в которые добавляли такое же количество 40% водного раствора КОН. Образование ароматических веществ определяли по окрашиванию в розовый цвет (в мин).

Определение способности бактерий расти при различном рН среды. (16±2) часовые бактериальные культуры, выращенные в среде МРС, вносили по 0,1 мл в 10 мл среды МРС с определенной активной кислотностью (2,57 ед. рН; 3,0 ед. рН; 3,5 ед. рН; 4,0 ед. рН; 4,5 ед. рН; 5,0 ед. рН; 5,5 ед. рН, 6,0 ед. рН, 6,5 ед. рН или 7,0 ед. рН). Инкубировали в течении 48–72 ч при (30±1)°С. О способности бактерий расти и развиваться в среде с исследуемой активной кислотностью судили по наличию (отсутствию) помутнения среды.

Определение способности бактерий расти при различной концентрации NaCl в среде. (16±2) часовые бактериальные культуры, выращенные в среде МРС, вносили по 0,1 мл в 10 мл среды МРС с определенным содержанием NaCl. Инкубировали в течении 48–72 ч при (30±1)°С. О устойчивости / чувствительности бактерий к поваренной соли расти судят по наличию (отсутствию) помутнения среды.

Определение фагочувствительности культур. Исследуемую культуру выращивали в жидкой среде МРС при (30±1)°С в течение 16±1 ч. 1,0 мл полученной культуры смешивали с 5 мл среды МРС, содержащей 0,7% агара, предварительно расплавленной и охлажденной до 45°С. Смесь равномерно распределяли по поверхности среды МРС, содержащей 1,5% агара, предварительно разлитой по 20±5 мл в чашки Петри и подсушенной. После застывания верхнего слоя на приготовленные газоны с помощью репликатора наносили суспензии фаголизатов. Посевы инкубировали в термостате при (30±1)°С в течение (18±2) ч. О чувствительности исследуемых культур к бактериофагам судили по наличию зоны лизиса (прозрачных зон) или отдельных негативных колоний.

Определение антагонистической активности бактерий (метод отсроченного антагонизма). На поверхность агаризованной МРС-среды в чашке Петри штрихом высевали исследуемый штамм лейконостоков, инкубировали в анаэробных условиях в течение 24 ч при (30±1)°С, после чего перпендикулярным штрихом наносили (16±2) часовые тест-культуры условно-патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli*) и инкубировали при (37±1)°С в течение (24±2) часов. Об уровне антагонистической активности судили по размеру зоны задержки роста тест-культур.

Определение оптической плотности суспензии бактерий. Оптическую плотность определяли в пластиковых кюветах толщиной 1 см при длине волны 540 нм на спектрофотометре SOLAR.

Определение скорости роста бактерий на различных питательных средах. (16±2) часовые бактериальные культуры, выращенные в среде МРС, вносили в исследуемую среду в количестве 1%, инкубировали в термостате при (30±1)°С, периодически перемешивая суспензию бактериальных клеток. После 4 часов культивирования через каждые 2 часа отбирали пробы и регистрировали изменение оптической плотности и рН.

Определение влияния углеводов в различной концентрации на рост и развитие бактерий. (16±2) часовые бактериальные культуры, выращенные в среде МРС, вносили в исследуемую среду в количестве 1%, инкубировали в термостате при (30±1)°С, периодически перемешивая суспензию бактериальных клеток. Культуры выращивали в течении 12 ч, пробы отбирали через 0 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч культивирования и регистрировали изменение оптической плотности и рН.

Определение скорости роста бактерий при различных температурных режимах. (16±2) часовые бактериальные культуры, выращенные в среде МРС, вносили в исследуемую среду для промышленного культивирования в количестве 1%, тщательно перемешивали и в асептических условиях разливали в колбы по 100 мл, после чего инкубировали в термостате при следующих температурных режимах: (26±1)°С, (30±1)°С, (34±1)°С, (37±1)°С в течении 12 ч, периодически перемешивая

суспензию бактериальных клеток. После 4 часов культивирования через каждые 2 часа отбирали пробы и регистрировали изменение оптической плотности и pH.

Результаты и их обсуждение. Для трех используемых в исследовании штаммов лейконостоков определяли сквашивающую активность в молоке и оценивали их влияние на газо- и кислотообразование при совместной ферментации молока консорциумом лактококков и исследуемым штаммом лейконостока.

Поскольку штаммы *Leuconostoc* являются слабыми кислотообразователями, то проводили анализ сквашивающей активности монокультур на стерильном молоке, лейконостоков и сквашивающей основы, состоящей из трех штаммов активных кислотообразователей *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, - на пастеризованном молоке (таблица 2).

Таблица 2 – Определение сквашивающей и газообразующей активности лейконостоков.

Исследуемый штамм / комбинация		Время образования сгустка в молоке при (30±1)°С, ч	Газообразование, см	Окрашивание по щелочной пробе
423 МН-ODG		28	0,7	отсутствует
412 МН-ODG		28	5,5	отсутствует
417 МН-ODG		48	5,0	отсутствует
Кислотообразующая основа А		5 ч	0	отсутствует
Кислотообразующая основа Б		5 ч	0	отсутствует
Основа А	423 МН-ODG	5 ч	0,7	отсутствует
	412 МН-ODG	5 ч 30 мин	5,0	отсутствует
	417 МН-ODG	5 ч 10 мин	3,0	отсутствует
Основа Б	423 МН-ODG	5 ч	0,2	отсутствует
	412 МН-ODG	5 ч 45 мин	4,5	отсутствует
	417 МН-ODG	5 ч	2,5	отсутствует

Источник данных: собственная разработка.

Как видно из таблицы 2, три исследуемых штамма лейконостоков обладали невысокой сквашивающей активностью – ферментировали стерильное молоко за 28–48 ч. При этом у исследуемых культур газообразующая активность была выраженной – они обеспечивали поднятие молочного сгустка на 0,7 – 5,5 см. При добавлении к кислотообразующей основе лейконостоки незначительно увеличивали продолжительность сквашивания молока, насыщали сгусток диоксидом углерода, а также придавали молочному сгустку специфический щиплющий вкус, характерный для молока, ферментированного лейконостоками. При этом окрашивания по щелочной пробе у молока, сквашенного исследуемыми культурами, не регистрировали.

Изучена солеустойчивость лейконостоков на МРС-среде, содержащей NaCl в концентрации от 4% до 8% (с шагом 0,5%). Высокая устойчивость исследуемых микроорганизмов к поваренной соли дает возможным их использовать для изготовления заквасок для ферментированных продуктов, содержащих соль в достаточно высокой концентрации (например, некоторые виды сыров или творога). О толерантности бактерий к NaCl судили по наличию (отсутствию) помутнения среды. Установлена максимальная концентрация NaCl в среде МРС (5,5 – 6,0%), при которой возможен рост исследуемых штаммов (таблица 3).

Таблица 3 – Исследование устойчивости бактерий рода *Leuconostoc* к NaCl.

Наименование штамма	Концентрация NaCl, %								
	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
423 МН-ODG	+	+	+	+	–	–	–	–	–
412 МН-ODG	+	+	+	+	+	–	–	–	–
417 МН-ODG	+	+	+	+	+	–	–	–	–

Примечание: «+» - наличие роста; «–» - отсутствие роста.

Источник данных: собственная разработка.

Исследовано влияние рН среды культивирования на способность исследуемых культур развиваться в широком диапазоне активной кислотности (таблица 4).

Таблица 4 – Исследование влияния активной кислотности среды на рост и развитие лейконостоков.

Штамм	Рост в МРС-среде с рН									
	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0
423 МН-ODG	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
412 МН-ODG	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
417 МН-ODG	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–

Примечание: «+» - наличие роста; «–» - отсутствие роста.

Источник данных: собственная разработка.

Как видно из таблицы 4, при исследовании лейконостоков на способность к росту в средах с различными значениями активной кислотности установлено, что все исследуемые штаммы способны расти и развиваться в средах с диапазоном значений активной кислотности от 5,0 до 7,5 ед. рН.

При определении антагонистической активности по отношению к бактериям *E. coli* штаммов рода *Leuconostoc* использовали метод отсроченного антагонизма. Зоны задержки роста кишечной палочки не регистрировали. Таким образом, лейконостоки не обладают антагонистической активностью по отношению к бактериям группы кишечной палочки.

Исследование культур на чувствительность к 27 коллекционным бактериофагам показало, что лейконостоки устойчивы к бактериофагам, выделенным на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь.

Для изучения возможности культивирования штаммов лейконостоков в промышленных условиях исследовали рост и развитие штаммов на пяти различных промышленных средах, основой которой служит гидролизованное молоко, с добавлением различных факторов роста в разных концентрациях, в качестве контроля использовали среду МРС, являющуюся оптимальной для культур данного рода (рисунок 1).

Скорость роста и развития культур лейконостоков на разных питательных средах определяли по изменению оптической плотности и активной кислотности среды культивирования.

Как видно на рисунке 1, исследованные штаммы лейконостоков более интенсивно развивались на двух средах: среде МРС, используемой в качестве контроля, и среде №4 на основе гидролизованного молока с добавлением дрожжевого экстракта, натрия лимоннокислого, магния сернокислого, аскорбиновой кислоты, глюкозы.

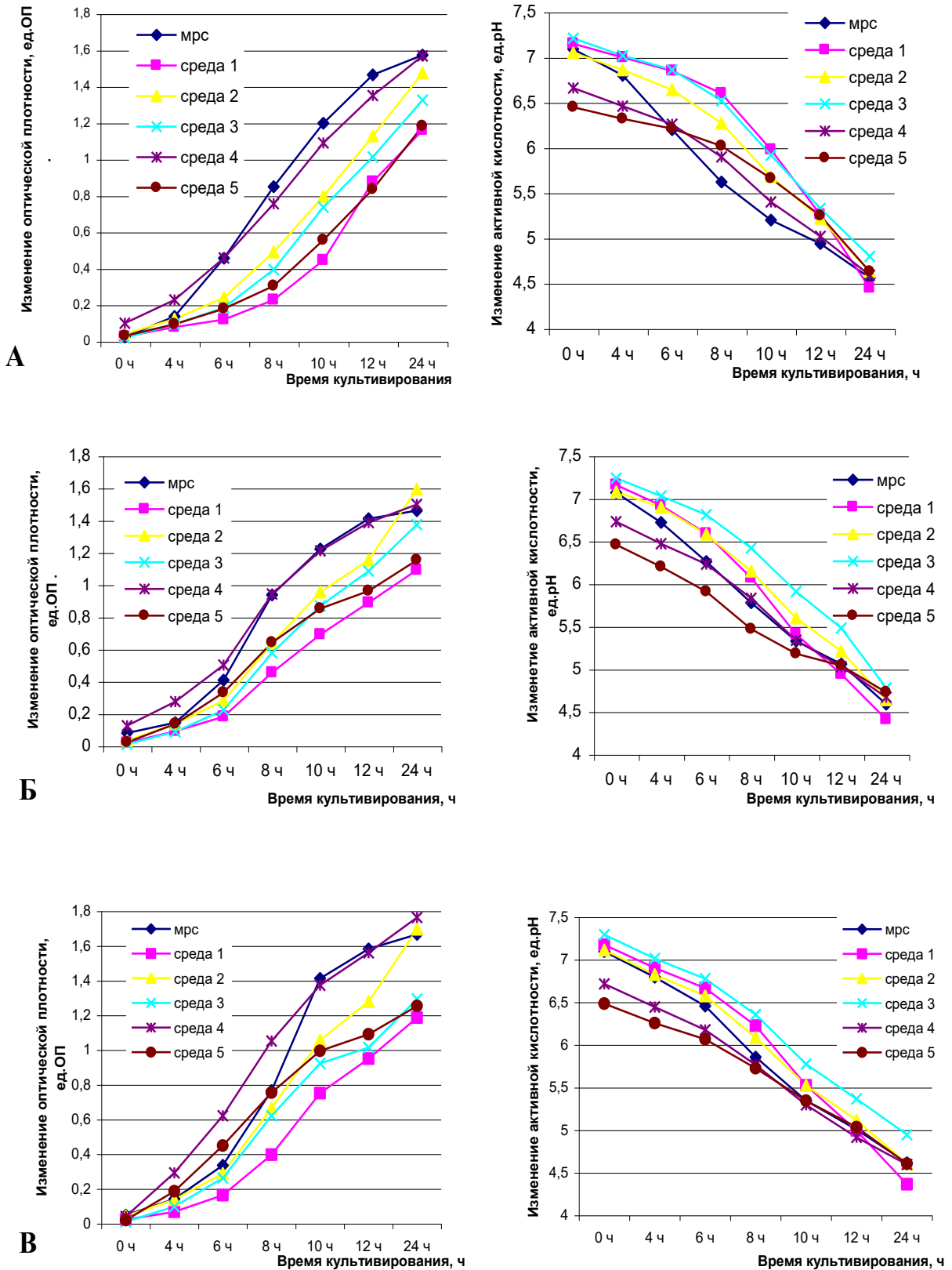


Рисунок 1 – Изменение оптической плотности и активной кислотности культуральной жидкости при культивировании штаммов лейконостоков на разных питательных средах.

А – штамм 423 МН-ODG, Б – штамм 412 МН-ODG, В – штамм 417 МН-ODG.

Источник данных: собственная разработка.

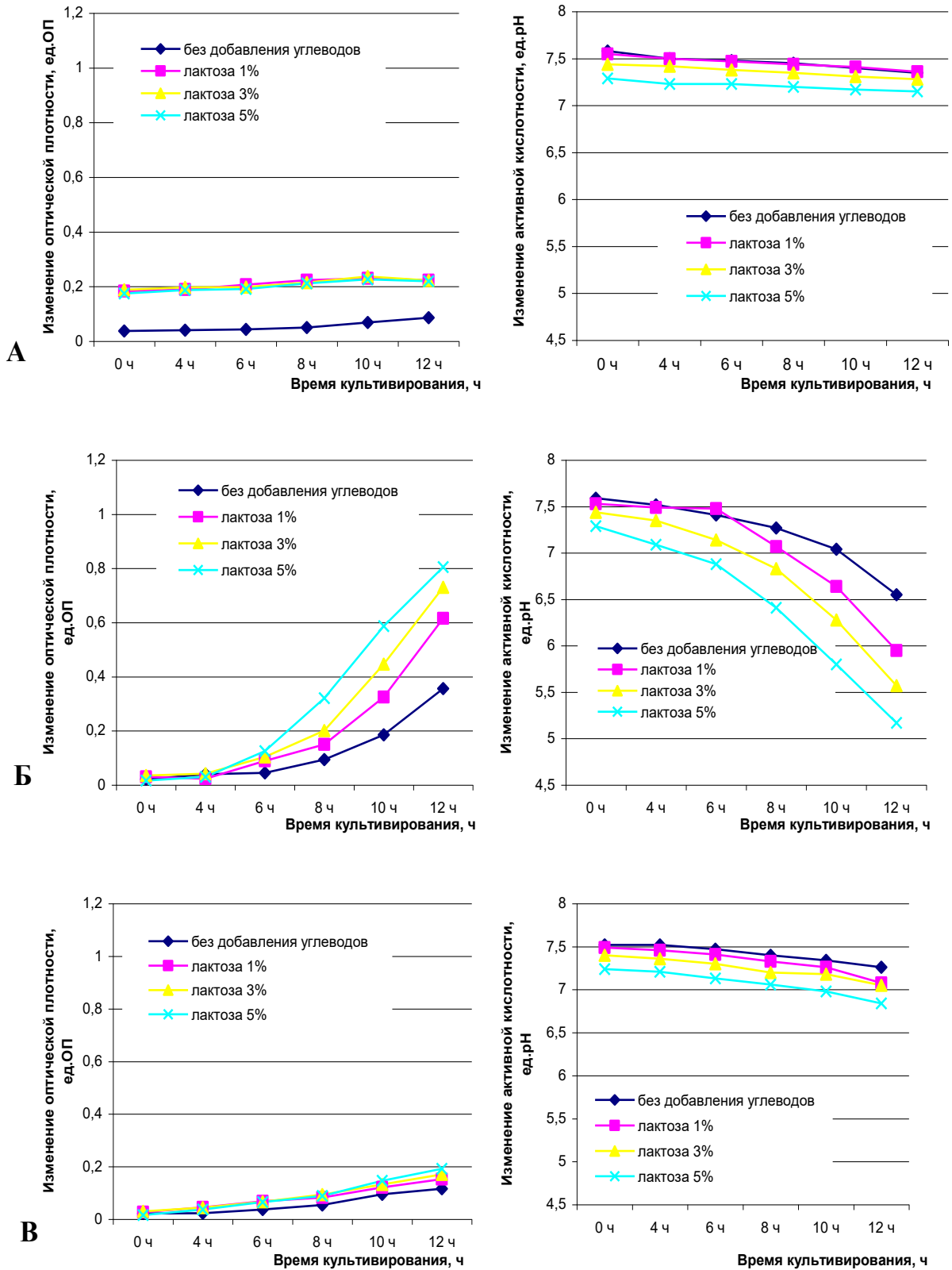


Рисунок 2 – Изменение оптической плотности и активной кислотности культуральной жидкости при культивировании штаммов лейконосток в среде, содержащей лактозу в различной концентрации. А – штамм 423 МН-ODG, Б – штамм 412 МН-ODG, В – штамм 417 МН-ODG.

Источник данных: собственная разработка.

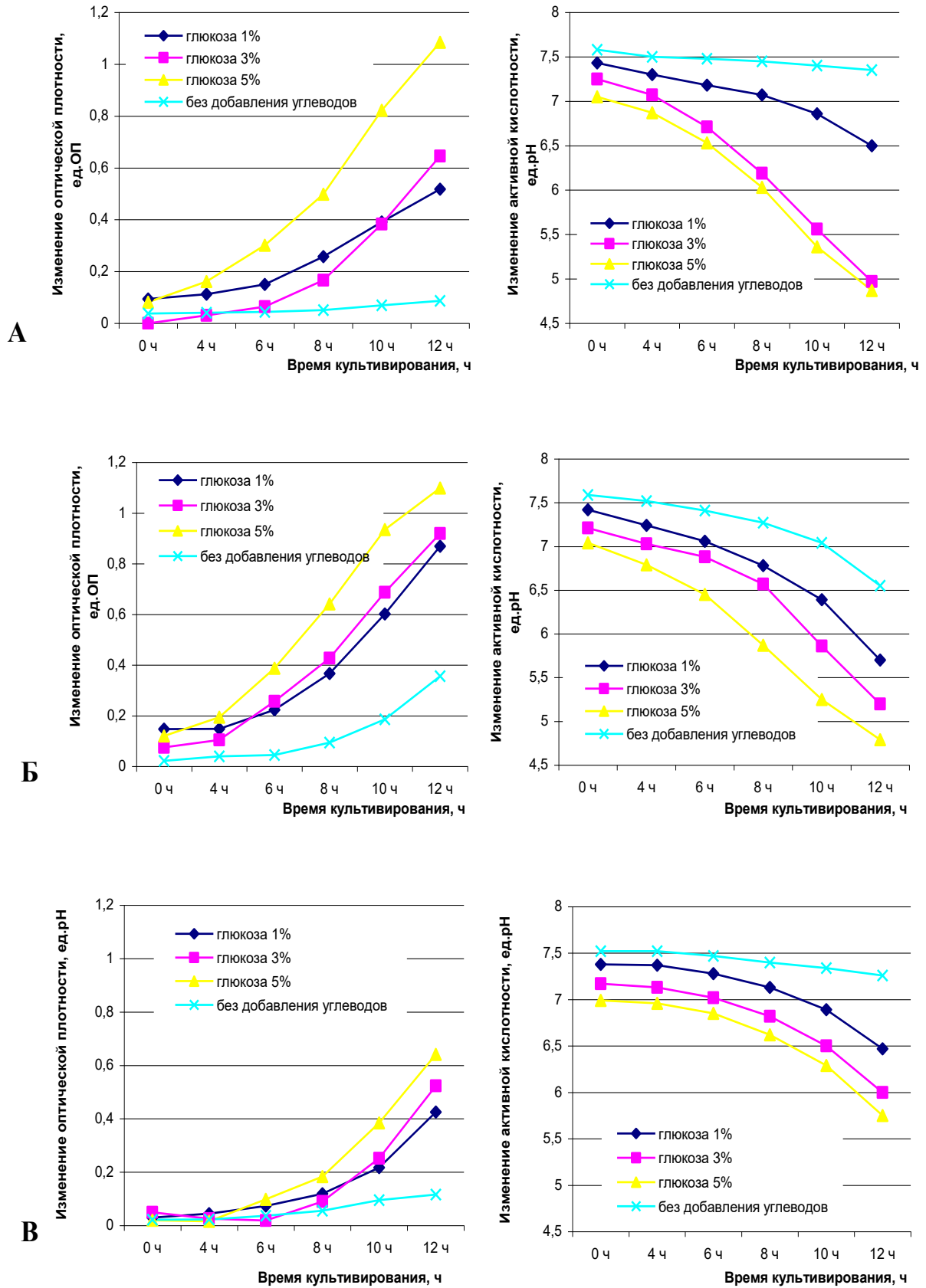


Рисунок 3 – Изменение оптической плотности и активной кислотности культуральной жидкости при культивировании штаммов лейконостоков в среде, содержащей глюкозу в различной концентрации.

А – штамм 423 МН-ODG, Б – штамм 412 МН-ODG, В – штамм 417 МН-ODG.

Источник данных: собственная разработка.

Таким образом, оптимальной для культивирования лейконостоков средой является среда №4, так как при ее использовании для выращивания культур нарастание оптической плотности культуральной жидкости и снижение ее активной кислотности максимальные для всех исследуемых микроорганизмов и сопоставимы с контролем.

Поскольку культуры лейконостоков могут ферментировать лактозу и глюкозу, то изучали их влияние при использовании в качестве источников углерода и энергии (в разной концентрации) на рост и развитие культур рода *Leuconostoc*. Анализировали рост бактериальных культур, используя в качестве основы разработанную среду №4, но содержащую разные концентрации сахаров: лактозы 1%, 3%, 5% (рисунок 2) и глюкозы 1%, 3%, 5% (рисунок 3). Для анализа влияния выбранных углеводов в исследуемой концентрации использовали среду, в которую не добавляли углеводы. О росте культур судили по изменению рН и оптической плотности культуральной жидкости исследуемых штаммов.

Как видно из рисунка 2, при использовании лактозы в разной концентрации в качестве источника углерода и энергии штаммы лейконостоков практически не развиваются. Исключение составил лишь штамм 412 МН-ODG у которого через 12 ч культивирования оптическая плотность увеличилась на 0,568 ед.ОП, 0,696 ед.ОП, 0,788 ед.ОП, соответственно, при использовании среды содержащей 1%, 3% или 5% лактозы.

Таким образом, лактозу активно сбразивал единственный штамм *Leuconostoc* 412 МН-ODG, развитие остальных двух исследуемых культур за 12 ч культивирования практически не регистрировали. В качестве источника углерода и энергии для роста и развития штаммов лейконостоков лактозу использовать нельзя.

Как видно на рисунке 3, для трех исследуемых культур лейконостоков при использовании в качестве источника углерода и энергии глюкозы в концентрации 1%, 3% и 5%, штаммы лейконостоков развивались: при содержании глюкозы в среде в концентрации 1% прирост оптической плотности составил для штамма *Leuconostoc* 423 МН-ODG 0,424 ед. ОП, штамма *Leuconostoc* 412 МН-ODG – 0,722 ед. ОП, для штамма *Leuconostoc* 417 МН-ODG – 0,395 ед. ОП, при содержании глюкозы в среде в концентрации 5% прирост оптической плотности составил для штамма *Leuconostoc* 423 МН-ODG 1,003 ед. ОП, штамма *Leuconostoc* 412 МН-ODG – 0,979 ед. ОП, для штамма *Leuconostoc* 417 МН-ODG – 0,621 ед. ОП.

Для культивирования бактерий рода *Leuconostoc* оптимально использовать в качестве источника углерода и энергии глюкозу в концентрации 5%.

При определении технологических параметров культивирования лейконостоков исследовали скорость роста и развития штаммов лейконостоков на подобранной среде, содержащей 5% глюкозы, при следующих температурных режимах (26±1)°С, (30±1)°С, (34±1)°С, (37±1)°С (рисунок 4).

Как видно на рисунке 4, все исследуемые штаммы лейконостоков одинаково хорошо развивались в разработанной среде как при (30±1)°С, так и при (34±1)°С. Увеличение или снижение температуры культивирования негативно влияло на рост исследуемых культур.

Таким образом, для культивирования лейконостоков в промышленных условиях можно использовать питательную среду №4 с глюкозой в качестве источника углерода и энергии при температурных режимах культивирования (30±1)°С – (34±1)°С.

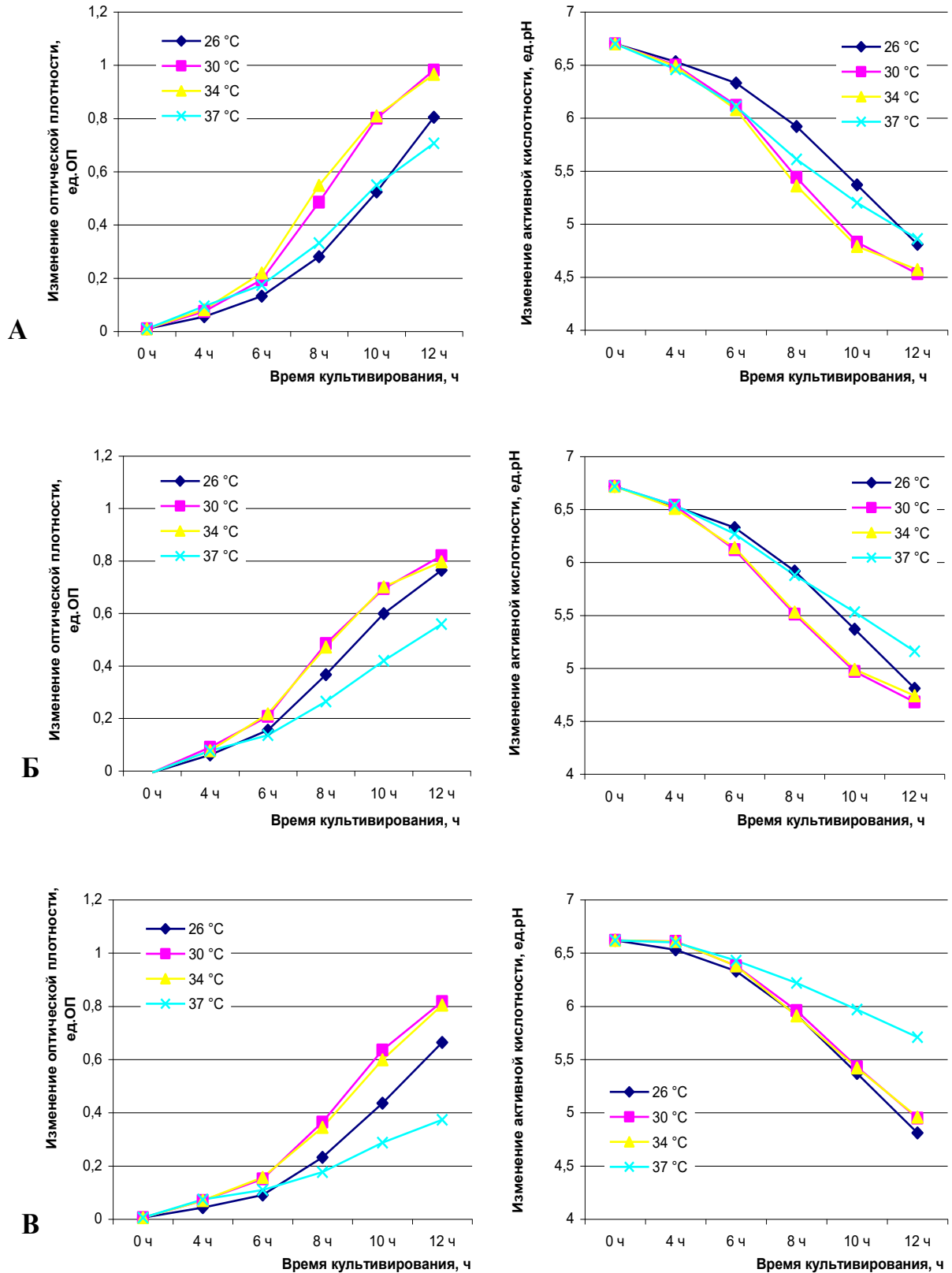


Рисунок 4 – Изменение оптической плотности и активной кислотности культуральной жидкости при культивировании штаммов лейконосток при различных температурных режимах.
 А – штамм 423 МН-ODG, Б – штамм 412 МН-ODG, В – штамм 417 МН-ODG.
 Источник данных: собственная разработка.

Заключение. Таким образом, в ходе выполнения исследования изучены производственно-ценные свойства лейконостоков, позволяющие их использовать в составе заквасочных культур для изготовления ферментированных молочных продуктов (сыров, творога): использованные в работе культуры лейконостоков обладали выраженной газообразующей способностью – обеспечивали поднятие молочного сгустка на 0,7 – 5,5 см, при слабой сквашивающей активности (ферментировали стерильное молоко за 28–48 ч) хорошо развивались с кислотообразующей основой, не удлинняя скорость кислотообразования, обладали высокой устойчивостью к бактериофагам, NaCl (рост штаммов регистрировали при концентрации (5,5–6%), обладали способностью развиваться в средах с диапазоном значений активной кислотности от 5,0 до 7,5 ед. рН.

В ходе научных исследований определена оптимальная для культивирования лейконостоков в промышленных условиях – питательная среда на основе гидролизованного молока с добавлением дрожжевого экстракта, натрия лимоннокислого, магния сернокислого, аскорбиновой кислоты, и глюкозы в качестве углеводного компонента. Установлена концентрация глюкозы (5%), позволяющая достигнуть высокого уровня оптической плотности при культивировании лейконостоков и подобрана оптимальная температура развития штаммов, которая составила (30±1)°С – (34±1)°С.

Список использованных источников

1. Björkroth, J. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* / J. Björkroth, W. Holzapfel // In: *The Prokaryotes*. – Dworkin M. (Eds.), Falkow S., Rosenberg E., Karl-Heinz Schleifer K.-H., Erko Stackebrandt E., 3rd ed., Springer-Verlag, New York, NY. – 2006. – Vol. 4, chapter 1.2.9. – P. 2670–319.
2. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. Учебник для ВУЗов. / П.П. Степаненко. – Сергиев Посад: ООО «Все для Вас – Подмосковь», 1999. – 415 с.
3. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / Под ред. С.А. Гудкова. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800 с.
4. Libudzisz, Z. Characteristics of mixed-strain starters of *Streptococcus cremoris* and *Leuconostoc cremoris*. / Z. Libudzisz, J. Pajek-Bilska // *Acta Alim. Polon*, – 1980. – Vol. 4. – P. 259–267.
5. Гудков, А.В. Особенности микробиологических процессов в советском сыре / А.В. Гудков, И.П. Анищенко, Л.А. Остроумов, М.А. Алексеева // *Молочная промышленность*, 1980. – № 2. – С. 13–17.
6. Parente, E. Starter Cultures: General Aspects. / E. Parente, T.M. Cogan // In: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. – 3rd ed. – Vol. 1: General aspects – UK: Elsevier Academic Press, 2004 – P. 123–148.
7. Beresford, T. The Microbiology of Cheese Ripening / T. Beresford, A. Williams // In: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. – 3rd ed. – Vol. 1: General aspects – UK: Elsevier Academic
2. Stepanenko, P.P. Mikrobiologija moloka i molochnyh produktov. Uchebnik dlja VUZov. [Microbiology of milk and dairy products] / P.P. Stepanenko – Sergiev Posad: ООО «Vse dlja Vas – Podmoskov'e», 1999. – 415 s.
3. Gudkov, A.V. Syrodellie: tehnologicheskie, biologicheskie i fiziko-himicheskie aspekty [Cheesemaking: technological, biological and physico-chemical aspects] / Pod red. S.A. Gudkova. – M.: De-Li print, 2003. – 800 s.
5. Gudkov A.V., Anishchenko I.P., Ostroumov L.A., Alekseyeva M.A. Osobennosti mikrobiologicheskikh protsessov v sovetskom syre [Features of microbiological processes in Soviet cheese] // *Molochnaya promyshlennost'*, 1980. – № 2. – S. 13–17.

Press, 2004 – P.287-318.

8. Шергин, Н.А. Улучшение качества сыров группы голландского путем совершенствования отбора лейконостоков в закваски: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04. / Н.А. Шергин; Углич, 1985. – 149 с.

9. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.

10. Акбулатова, М.М. Солеустойчивость лактобацилл – основа использования штаммов в бактериальных концентратах для производства сыров / М.М. Акбулатова, С.Л. Василенко, Н.Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. Вып. 5. РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелешеня [и др.] – Минск, РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 2011. – С. 108–119.

11. Молоко коровье сырое. Технические условия: СТБ 1598-2006. – Введ. 31.01.2006. – Минск : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2015. – 24 с.

12. Молоко. Метод измерения pH : ГОСТ 26781-85. – Введ. 20.12.85. – Минск : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2004. – 4 с.

8. Shergin, N.A. Uluchshenie kachestva syrov gruppy gollandskogo putem sovershenstvovaniya otbora lejkonostokov v zakvaski [Improving the quality of Dutch cheeses by improving the selection of leukonosts in the starter cultures] : avtoref. dis. ... kand. tehn. nauk: 05.18.04. / N.A. Shergin; Uglich, 1985. – 149 s.

10. Akbulatova, M.M. Soleustojchivost' laktobacill – osnova ispol'zovanija shtammov v bakterial'nyh koncentratah dlja proizvodstva syrov [Salt tolerance of lactobacilli is the base for strains using in bacterial starter cultures for cheese production] / M.M. Akbulatova, S.L. Vasylenko, N.N. Furik // Aktual'nye voprosy pererabotki mjasnogo i molochnogo syr'ja. Vyp. 5. RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti»; redkol.: A.V. Meleshchenja [i dr.] – Minsk, RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti», 2011. – S. 108–119.

11. Moloko korov'e syroe. Tehnicheskie uslovija [Raw cow's milk. Specification] : STB 1598-2006. – Vved. 31.01.2006. – Minsk : Belorus. gos. in-t standartizacii i sertifikacii, 2015. – 24 s.

12. Moloko. Metod izmerenija rN [Milk. method of pH measuring] : GOST 26781-85. – Vved. 20.12.85. – Minsk : Belorus. gos. in-t standartizacii i sertifikacii, 2004. – 4 s.