

Е.Н. Бирюк, к. с-х. н., Н.Н. Фурик, к.т.н., С.Л. Василенко, к.б.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ПРОИЗВОДСТВЕННО-ЦЕННЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *LEUCONOSTOC*

A. Biruk, N. Furik, S. Vasylenko
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

THE PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND INDUSTRIALLY-VALUABLE PROPERTIES OF THE BACTERIA OF THE GENUS *LEUCONOSTOC*

e-mail: biohimbel@rambler.ru, furik_nn@tut.by, vasylenko@tut.by

Исследованы физиолого-биохимические и производственно-ценные свойства коллекционных культур лейконостоков. Изучен метаболизм углеводов производственных штаммов лейконостоков с применением стрип-тестов. Проведены исследования по определению скорости роста штаммов лейконостоков при различных температурных режимах, установлены оптимальная и пороговые температуры для их культивирования.

The physiological, biochemical and industrially-valuable properties of *Leuconostoc* were studied. The metabolism of carbohydrates of the collection strains of *Leuconostoc* was studied using strip tests. Studies to determine the growth rate of the collection strains of *Leuconostoc* under different temperature regimes were studied. The optimal and threshold temperatures of cultivation for the cultures of *Leuconostoc* were established.

Ключевые слова: *Leuconostoc* sp.; предельная кислотность; активная кислотность; оптическая плотность; газообразование; антагонистическая активность; температура культивирования.

Keywords: *Leuconostoc* sp.; limiting acidity; active acidity; optical density; gassing; antagonistic activity; temperature of cultivation.

Введение. Лейконостоки представляют интерес для сыроделия, так как обладают выраженной газообразующей способностью в молоке и сырах. Ряд штаммов лейконостоков обладая специфическими протеолитическими свойствами, могут уменьшать концентрацию пептидов и, как следствие, снижать выраженность горечи в сырах. Некоторые штаммы лейконостоков обладают антагонистической активностью по отношению к технически вредной и патогенной микрофлоре. Наиболее часто в сыре встречаются *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* и *Leuconostoc lactis* [1–3].

Бактерии рода *Leuconostoc* представители ароматообразующих микроорганизмов. Образование диацетила и ацетоина в заметных количествах наблюдается только у *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* и *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*.

Возможность взаимозамены лейконостоков и ароматообразующего лактококка обусловлена тем, что обе группы этих микроорганизмов образуют диацетил и CO₂, т.е. относятся к газообразующей микрофлоре заквасок, однако диацетильный лактококк образует эти соединения только из цитратов, а лейконостоки из лактозы и цитратов. У диацетильного лактококка способность образовывать диацетил и CO₂ может быть утрачена, у лейконостоков она является стабильным свойством [4]. Кроме того, бактериофаги лейконостоков менее распространены на сыродельных заводах, чем бактериофаги диацетильного лактококка, следовательно закваски с лейконостоками более стабильно обеспечивают формирование рисунка в сыре [5].

В производстве сыров обычно используют *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. От других видов и подвидов его отличает низкая метаболитическая активность, повышенная чувствительность к внешним факторам и очень сложные питательные потребности, особенно в аминокислотах, отсутствие хотя бы одной из них делает рост его невозможным.

Согласно литературным данным, лейконостоки медленно развиваются в молоке, их предельная кислотность колеблется в пределах 40–80°Т. *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum* является слабым кислотообразователем, свертывает молоко через 2–3 суток, а *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* медленно развивается и молоко не сквашивает, а его предельная кислотность не превышает 40–50 °Т.

Оптимальная температура роста для *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* и *Leuconostoc lactis* 22–26°С. Максимальная температура роста для сливочного лактококка 37°С. Температура второго нагревания, при выработке сычужных сыров составляет 40–41°С. Снижение температуры до 14°С – верхней границы созревания сыров с низкими температурами второго нагревания – уменьшает скорость роста лейконостоков по сравнению со скоростью роста при оптимальной температуре в 2,2–7,3 раза, при 10°С она снижается в 10 раз. Минимальная температура для роста лейконостоков зависит от штамма и при прочих оптимальных условиях равняется 4–10°С [2].

Целью наших исследований было изучение физиолого-биохимических и производственно-ценных свойств коллекционных штаммов рода *Leuconostoc*, а также изучение скорости роста лейконостоков при различных температурных режимах для установления оптимальной и пороговых температур их культивирования, и возможности использования исследованных штаммов в производстве заквасок для сыров с низкими температурами второго нагревания.

Материалы и методы исследований. В качестве объектов исследования в работе использовали штаммы лейконостоков из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности»: 423 МН-ODG (*Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*), 412 МН-ODG (*Leuconostoc lactis*), 417 МН-ODG (*Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum*).

Исследование метаболизма углеводов коллекционных культур лейконостоков проводили с использованием стрип-систем производства BioMerieux (Франция).

При оценке производственно-ценных свойств исследуемых культур лейконостоки культивировали совместно с лактококками в соотношении 1:1.

Исследования по определению скорости роста штаммов лейконостоков проводили при следующих температурных режимах: 10±1°С, 15±1°С, 20±1°С, 25±1°С, 30±1°С, 34±1°С, 37±1°С, 40±1°С, 42±1°С.

Определение способности культур образовывать и разрушать горечь определяли по степени выраженности горечи в молоке с молокосвертывающим препаратом после 7-суточной выдержки исследуемой культуры при (30±1)°С.

Результаты и их обсуждение. Для исследования метаболизма углеводов лейконостоков, использовали стрип-систему API 50 CH (BioMerieux). Все исследуемые культуры были сходны по своим биохимическим профилям и ферментировали: D-галактозу, D-глюкозу, N-ацетил-глюкозамин, D-мальтозу и D-лактозу (таблица 1).

Интерпретацию полученных данных осуществляли при помощи специального программного обеспечения АТВ-plus. Все штаммы по результатам оценки биохимического профиля относятся к виду *Leu. mesenteroides*.

Так как лейконостоки являются слабыми кислотообразователями и молоко часто не свертывают, при исследовании органолептических показателей и характера молочного сгустка использовали в качестве основы молочный лактококк. При определении свертывающей активности вносили 5% инокулята в пастеризованное цельное молоко и выдерживали при 30°С до образования сгустка.

Таблица 1 – Способность лейконостоков к ферментации углеводов и их производных

тест	штаммы			тест	штаммы		
	423 MH-ODG	412 MH-ODG	417 MH-ODG		423 MH-ODG	412 MH-ODG	417 MH-ODG
Контроль	-	-	-	ESC	-	-	-
GLY	-	-	-	SAL	-	-	-
ERY	-	-	-	CEL	-	-	-
DARA	-	-	-	MAL	+	+	+
LARA	-	-	-	LAC	+	+	+
RIB	-	-	-	MEL	-	-	-
DXYL	-	-	-	SAC	-	-	-
LXYL	-	-	-	TRE	-	-	-
ADO	-	-	-	INU	-	-	-
MDX	+	+	+	MLZ	-	-	-
GAL	+	+	+	RAF	-	-	-
GLU	-	-	-	AMD	-	-	-
FRU	-	-	-	GLYG	-	-	-
MNE	-	-	-	XLT	-	-	-
SBE	-	-	-	GEN	-	-	-
RHA	-	-	-	TUR	-	-	-
DUL	-	-	-	LYX	-	-	-
INO	-	-	-	TAG	-	-	-
MAN	-	-	-	DFUC	-	-	-
SOR	-	-	-	LFUC	-	-	-
MDM	-	-	-	DARL	-	-	-
MDG	-	-	-	LARL	-	-	-
NAG	+	+	+	GNT	-	-	-
AMY	-	-	-	2KG	-	-	-
ARB	-	-	-	5KG	-	-	-

Согласно полученным результатам время образования молочного сгустка в варианте с основой составило 5 ч – 5 ч 40 мин. В варианте без основы два штамма 423 MH-ODG (*Leu. mesenteroides ssp. cremoris*), 412 MH-ODG (*Leu. lactis*) свертывали молоко за 28 ч, 417 MH-ODG (*Leu. mesenteroides ssp. dextranicum*) не сквасил молоко за 2 суток. Во всех вариантах образовавшийся молочный сгусток имел удовлетворительный внешний вид и кисломолочный запах. Наибольшее газообразование зарегистрировано у *Leu 8₁* (*Leuconostoc lactis*) – 3,0 см в варианте с основой и 1,0 см в варианте без основы. У остальных штаммов уровень газообразования не превышал 0,5 см.

Согласно литературным данным [5–7] *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* медленно развивается в молоке и не сквашивает его, так как предельная кислотность достигает только 40–50°Т. *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum* предельную кислотность доводит до 70–80°Т.

При определении предельной кислотности коллекционных культур лейконостоков только один штамм - 412 MH-ODG (*Leuconostoc lactis*) свертывал молоко на 3 сутки и доводил предельную кислотность до 116–122°Т (на 7 сутки). Остальные штаммы не свертывали молоко по истечении 7 суток. Предельная кислотность достигала 40–46°Т для штамма 423 MH-ODG (*Leu. mesenteroides ssp. cremoris*), и 48–50°Т для штамма 412 MH-ODG (*Leu. mesenteroides ssp. dextranicum*).

Исследованные штаммы лейконостоков не обладают антагонистической активностью к БГКП, не образуют горечь в молоке с сычужным ферментом. При совместном культивировании с «горькими» лактококками штамм 412 MH-ODG (*Leu. mesenteroides ssp. dextranicum*) полностью нейтрализовал горький вкус.

Скорость роста бактерий определяли по нарастанию оптической плотности (ОП) и снижению уровня активной кислотности в процессе культивирования в среде МРС.

Для штаммов 417 МН-ODG и 412 МН-ODG зарегистрирована максимальная скорость увеличения оптической плотности при температуре $30\pm 1^\circ\text{C}$, а для штамма 423 МН-ODG при температуре $34\pm 1^\circ\text{C}$.

Наибольшее снижение уровня кислотности в процессе культивирования для штамма 423 МН-ODG отмечено при температуре $34\pm 1^\circ\text{C}$. Для штаммов 417 МН-ODG и 412 МН-ODG практически идентично снижалась активная кислотность при температурах культивирования $30\pm 1^\circ\text{C}$ и $34\pm 1^\circ\text{C}$.

Температура $42\pm 1^\circ\text{C}$ оказалась не благоприятной для роста и развития штаммов 423 МН-ODG и 417 МН-ODG. В тоже время, для штамма 412 МН-ODG зарегистрирован рост при температуре культивирования $42\pm 1^\circ\text{C}$.

Изучение скорости роста при температурах 10 и 15°C проводили в течение 8 суток. Температура 10°C применяется при созревании сыров с низкими температурами второго нагревания. Согласно литературным данным [5] лейконостоки способны размножаться при температуре $8\text{--}10^\circ\text{C}$, однако интенсивность их роста при этих температурах в значительной степени зависит от штамма.

В течение первых суток культивирования при температуре 10°C отмечено незначительное снижение pH (на $0,03\text{--}0,2$ ед.) у всех образцов. При температуре культивирования 15°C активная кислотность снизилась на $0,3\text{--}0,4$ ед. pH. После пяти суток культивирования у всех образцов активная кислотность находилась в пределах $4,1\text{--}4,7$ и дальнейшее ее снижение было незначительное (рисунок 1).

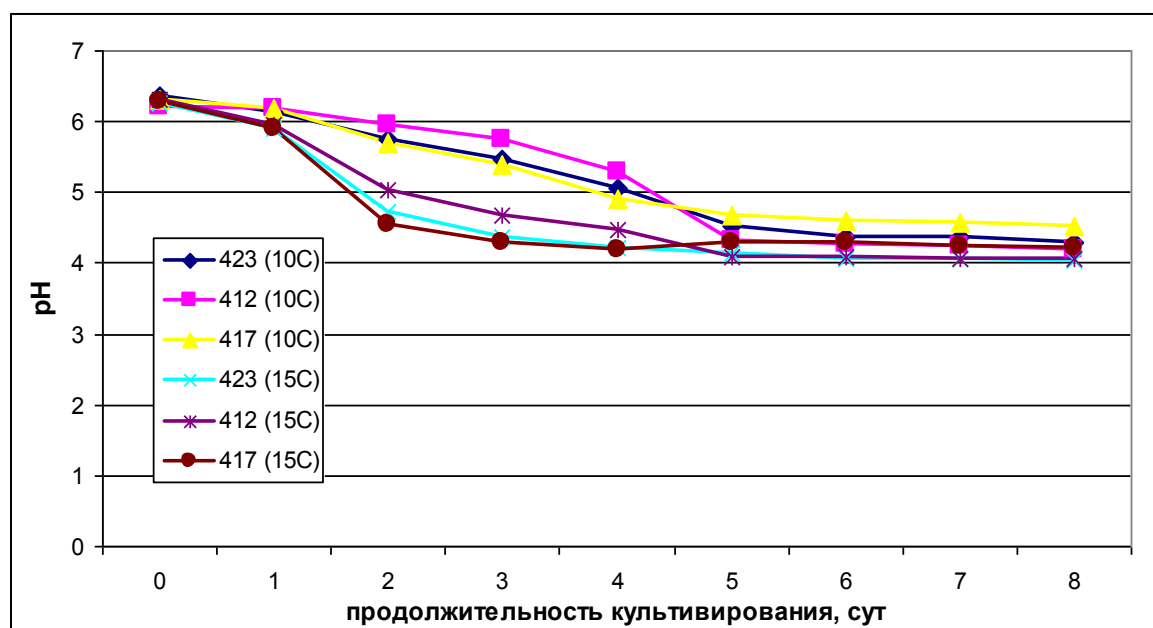


Рисунок 1 – Характеристика роста штаммов рода *Leuconostoc* на среде МРС при различных температурных режимах культивирования

Оптическая плотность увеличилась также незначительно в первые сутки культивирования: при температуре 10°C на $0,01\text{--}0,03$ ед., при температуре 15°C на $0,2\text{--}0,3$ ед. Увеличение продолжительности культивирования до 2 суток привело к значительному увеличению оптической плотности у всех образцов при температуре 15°C , тогда как при температуре 10°C оптическая плотность не превысила значение $0,8$ ед. (рисунок 2).

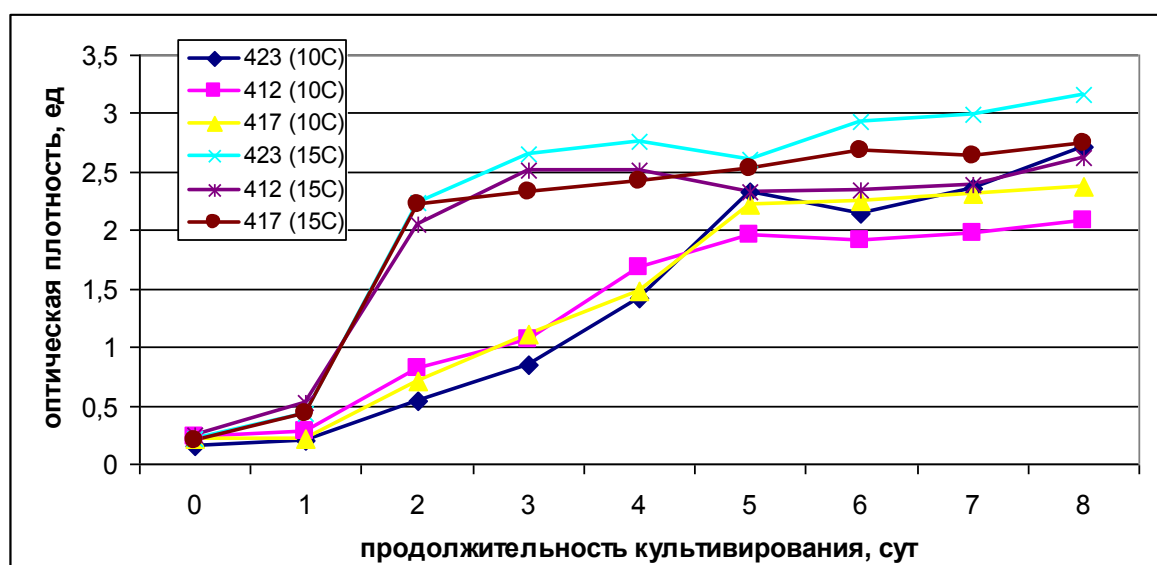


Рисунок 2 – Характеристика роста штаммов рода *Leuconostoc* при различных температурных режимах культивирования

При дальнейшем увеличении продолжительности культивирования отмечен рост оптической плотности у всех исследуемых штаммов. После 5 суток культивирования у всех штаммов оптическая плотность достигла 2 ед. Дальнейшее культивирование показало увеличение оптической плотности до 2,1–2,7 ед. И только у штамма 423 МН-ODG на 8 сутки культивирования оптическая плотность составила 3,16 ед.

Заключение. Исследованы физиолого-биохимические и производственно-ценные свойства коллекционных культур лейконостоков. Изучен метаболизм углеводов производственных штаммов лейконостоков с применением стрип-тестов.

Исследованные штаммы не обладают антагонистической активностью к БГКП, не образуют горечь в молоке с сычужным ферментом.

Проведены исследования по определению скорости роста штаммов лейконостоков при различных температурных режимах. Установлена оптимальная температура культивирования ($34 \pm 1^\circ\text{C}$) для штамма 423 МН-ODG (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*), и ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) для штаммов 412 МН-ODG (*Leuconostoc lactis*), 417 МН-ODG (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*).

Пороговыми температурами для штаммов 423 МН-ODG и 417 МН-ODG являются $10 \pm 1^\circ\text{C}$ и $40 \pm 1^\circ\text{C}$, а для штамма 412 МН-ODG – $10 \pm 1^\circ\text{C}$ и $42 \pm 1^\circ\text{C}$.

Список использованных источников

1. Буянова, И.В. Требования к сырью и готовой продукции в сыроделии Алтайского края / И.В. Буянова, С.А. Дьяченко // Техника и технология пищевых производств. – 2013. – №4. – с.3–8.
2. Bujanova, I.V. Trebovanija k syr'ju i gotovoj produkcii v syrodellii Altajskogo kraja [Requirements for raw materials and cheese products in cheesemaking of the Altai Territory] / I.V. Bujanova, S.A. D'jachenko // Tehnika i tehnologija pishhevyh proizvodstv. – 2013. – №4. – с.3–8.
3. Kihal, M. Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skimmed milk / M. Kihal, H. Prevost, D.E. Henni, Z. Benmechernene, C. Divies // World Journal of Dairy and Food Sciences. – 2007. – № 2 (2). – P.62–68.
3. Мирошникова, Е.П. Микробиология молока и молочных продуктов: эл. учебн. пособие. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. – 135 с.
4. Miroshnikova, E.P. Mikrobiologija moloka i molochnyh produktov [Microbiology of the milk and the milk products]: el. uchebn. posobie. – Orenburg: GOU OGU, 2005. – 135 s.
4. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов // Учебник для ВУЗов. – Сергиев Посад: ООО «Все для Вас – Подмоскowie», 1999. – 415 с.

- Stepanenko, P.P. Mikrobiologija moloka i molochnyh produktov [Microbiology of the milk and the milk products] // Uchebnik dlja VUZov. – Sergiev Posad: ООО «Vse dlja Vas – Podmoskov'e», 1999. – 415 s.
5. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / Под ред. С.А. Гудкова. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800 с.
- Gudkov, A.V. Syrodelie: tehnologicheskie, biologicheskie i fiziko-himicheskie aspekty [Cheesemaking: technological, biological and physico-chemical aspects] / Pod red. S.A. Gudkova. – М.: DeLi print, 2003. – 800 s.
6. Azadnia, P. Isolation and Identification of *Leuconostocs* from Traditional Yoghurt in Tribes of Kazerun / P. Azadnia, A. Babaki Khalegh Shah Ahmad Ghasemi M., Karimi Jashni M., M.H. Zamani, N. Taarof // Journ. of Animal and Veterinary Advances. – 2011. – № 10 (4). – P. 552–554.
7. Effects of Acetaldehyde on Growth, Substrates and Products by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* // Biotechnol. Prog. – 1990. – №6. – P. 421–424.