

Газообразующая активность коллекционных культур лейконостоков*

Ирина Валентиновна Кучеренко, старший научный сотрудник

E-mail: i.kucherenko@fnpcps.ru

Елена Вячеславовна Кураева, старший научный сотрудник

E-mail: e.kuraeva@fnpcps.ru

Анна Юрьевна Дуганова, младший научный сотрудник

E-mail: a.duganova@fnpcps.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова, г. Углич

В статье представлены результаты исследований газообразующей активности культур лейконостоков из коллекции микроорганизмов экспериментальной биофабрики ВНИИМС. Исследования проводились при оптимальной и минимальной температурах их роста и развития в питательных средах с различным содержанием цитратов натрия. Установлены значительные штаммовые различия в интенсивности газообразования лейконостоков в зависимости от температурных режимов и содержания цитратов. Показана возможность дифференцированного отбора газообразующих культур лейконостоков в состав бактериальных заквасок для производства сыров с низкой температурой второго нагревания и творога, используя индивидуальные особенности штаммов.

Ключевые слова: бактериальные закваски, коллекция микроорганизмов, лейконостоки, газообразующая активность

Для цитирования: Кучеренко, И. В. Газообразующая активность коллекционных культур лейконостоков / И. В. Кучеренко, Е. В. Кураева, А. Ю. Дуганова // Сыроделие и маслоделие. 2024. № 4. С. 28–33. <https://doi.org/10.21603/2073-4018-2024-4-7>

Введение

Основными компонентами газообразующей микрофлоры мезофильных заквасок для производства сыров с низкой температурой второго нагревания являются лейконостоки и цитратсбраживающие лактококки.

Данные культуры микроорганизмов образуют углекислый газ и диацетил. При этом диацетильный лактококк продуцирует эти соединения только из цитратов, а лейконостоки из лактозы и цитратов. Лейконостоки сбраживают глюкозу и лактозу с образованием D-лактата, CO₂ и этанола. Культуры *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* могут утрачивать способность образовывать углекислый газ и диацетил, в то время как лейконостоки обладают стабильностью этих свойств, закодированных в их хромосомах. Главным отличием лейконостоков от лактококков является гетероферментативный способ сбраживания лактозы и медленный рост в молоке¹ [1, 2].

Лейконостоки имеют более сложные питательные потребности чем лактококки и нуждаются в комплексе факторов роста, различных аминокислот, витаминов и пептидов. При совместном развитии лейконостоков с лактококками

стабилизируется содержание диацетила, снижается уровень ацетоина, увеличивается уровень этанола и уксусной кислоты и снижается накопление горьких пептидов в сырах [3].

В результате генетических исследований в 2020 г. семейства *Lactobacillaceae* и *Leuconostocaceae* были объединены, и все роды семейства *Leuconostocaceae* вошли в семейство *Lactobacillaceae*. Лейконостоки относятся к семейству *Lactobacillaceae*, входят в группу *Lactobacilli*, куда также включены род *Lactobacillus* и *Pediococcus*, они состоят в более тесном родстве с некоторыми гетероферментативными палочками, чем с лактококками [3].

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*), *Leu. pseudomesenteroides*, *Leu. fallax*. Благодаря методам генетического анализа, установлено, что вид *L. oenos* имеет ряд значимых отличий от остальных представителей рода *Leuconostoc*. В связи с этим было предложено перенести его в новый род *Oenococcus* как *O. oeni*².

*Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FRFF-2023-0001 Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук.

¹Свириденко, Г. М. Исследование свойств диацетильных лактококков с целью использования в составе бактериальных заквасок для сыров / Г. М. Свириденко, О. М. Шухалова, Д. С. Мамыкин // Молоко и молочная продукция: актуальные вопросы производства. Сборник материалов международной научно-практической конференции. Углич: ВНИИМС. 2021. С. 93–98. <https://elibrary.ru/yfwjqqr>

²Whitman, W. B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 5: The Actinobacteria / W. B. Whitman [et al.]. – Springer New York, 2012. 2083 p.

Бактерии рода *Leuconostoc* являются грамположительными факультативно-анаэробными микроорганизмами. Оптимальная температура их развития составляет от 20 до 30 °С. Снижение температуры до 12 ± 2 °С значительно замедляет скорость роста лейконостоков по сравнению с оптимальной температурой культивирования. Лейконостоки развиваются в сыре при температуре 8–10 °С, при этом интенсивность их развития является штаммовым признаком. Минимальная температура роста составляет от 4 до 10 °С. Негативное влияние на продуцирование газа лактококками и лейконостоками оказывает снижение температуры с 14 до 10 °С. Микроорганизмы рода *Leuconostoc* развиваются в молоке медленно, не сворачивают молоко и не обесцвечивают лакмус в молоке за исключением отдельных подвидов, являются слабыми кислотообразователями. Предельная титруемая кислотность лейконостоков составляет от 40 до 80 °Т. Согласно литературным данным, наиболее часто в производстве сыров используют два вида микроорганизмов: *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*, который включает три подвида: *dextranicum*, *mesenteroides*, *cremoris*³ [1].

Закваски для творога, в состав которых включены бактерии рода *Leuconostoc* успешно используются на молокоперерабатывающих предприятиях, где установлены современные автоматизированные линии, на которых предусмотрено всплытие сгустка. Газ, выделяемый лейконостоками в процессе их жизнедеятельности, влияет на всплытие творожного зерна на поверхность сыворотки при отваривании сгустка, что является неотъемлемой частью для правильного процесса обсушки и контроля готовности творожного зерна [4–7].

Лейконостоки являются одним из главных компонентов заквасочной микрофлоры, участвующей в формировании органолептического профиля и рисунка сыров с низкой температурой второго нагревания. Лейконостоки могут образовывать значительно большее количество CO₂ в сыре, чем диацетильный лактококк. Рост данного вида микроорганизма зависит от наличия в среде марганца, который оказывает сильное стимулирующее действие на размножение и кислотообразование лейконостоков. В коровьем молоке средняя концентрация

Mn находится в пределах 30 мкг/кг с колебаниями от 5 до 65 мкг/кг [1]. Содержание Mn в весеннем молоке значительно ниже оптимального уровня, поэтому лейконостоки хуже развиваются в весеннем молоке, что может привести к ухудшению качества и рисунка в сырах. Из-за медленного роста в молочной среде и низкой кислотообразующей активности лейконостоки не успевают развиться во время выработки, основной процесс развития культуры происходит в период созревания сыра⁴ [8–10]. Несмотря на их весомый вклад в создание вкусо-ароматической гаммы сыров с низкой температурой второго нагревания, их излишне интенсивное развитие в сыре (например, при поражении лактококков бактериофагами) может привести к нехарактерному, рваному рисунку и даже вспучиванию головок [1].

Бактериофаги, обладающие специфичностью к лейконостокам, менее распространены на молокоперерабатывающих предприятиях, чем бактериофаги диацетильного лактококка. Среди бактерий рода *Leuconostoc* часто встречаются культуры с выраженным ингибирующим действием против БГКП. Некоторые штаммы лейконостоков обладают антибиотической активностью, в том числе по отношению к психротрофам при температуре 7 °С [1, 10].

Целью работы является разработка критериев методики подбора коллекционных культур лейконостоков в состав бактериальных заквасок для сыров и творога по газообразующей активности.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований являлись 10 штаммов лейконостоков из коллекции экспериментальной биофабрики микроорганизмов ВНИИМС. Газообразующую способность исследуемых культур определяли с использованием сосудов Дунбара.

Влияние температурных режимов культивирования на газообразующую активность штаммов исследовали в условиях моделирования основных технологически значимых температурных режимов при производстве сыров и кисломолочной продукции:

- оптимальная для роста и развития – 30 ± 1 °С;
- пограничная для роста и развития – 10 ± 1 °С.

³Зарицкая, В. В. Микробиология молока и молочных продуктов: учебное пособие / В. В. Зарицкая, Ю. И. Держапольская. – Благовещенск: Изд-во Дальневосточного гос. аграрного ун-та, 2017. – С. 89.

⁴Свириденко, Г. М. Исследование свойств лейконостоков с целью использования в составе бактериальных заквасок для сыров / Г. М. Свириденко, О. М. Шухалова, Т. В. Комарова // Молоко и молочная продукция: актуальные вопросы производства. Сборник материалов международной научно-практической конференции. Углич: ВНИИМС, 2021. – С. 103–108. <https://elibrary.ru/bbmglg>

С целью накопления жизнеспособных микроорганизмов использовали жидкую питательную среду на основе гидролизованного молока – гидролизованный бульон, приготовленный по ГОСТ 33951-2016, разлитый в пробирки по 10,0 см³. Данную среду инокулировали 0,1% молочной культурой лейконостоков, выдерживали в термостате в течение 18–20 часов при температуре 30 °С. При определении газообразующей способности исследуемых культур использовали питательную среду без добавления и с добавлением цитрата в количестве – 10 г/л; СОМ – 30 г/л; лактоза – 10 г/л; дрожжевой автолизат-1,1 г; марганец сернокислый – 0,16 г/л; аммоний хлористый – 0,15 г/л.

Для моделирования процесса производства сыров и творога вносили 1,0% 18–20-часовой бульонной культуры лейконостоков в пробирки с 15 ± 0,5 см³ питательной среды, тщательно перемешивали и с соблюдением правил асептики переливали в стерильные сосуды Дунбара. Далее культивировали при температуре 10 ± 1 °С и 30 ± 1 °С в течение 7 суток. Объем выделившегося углекислого газа фиксировали ежедневно в течение всего времени проведения эксперимента. Газообразующую активность выражали в объеме выделившегося газа в см³ в пересчете на 100 см³ питательной среды. Исследования проводились в 3-кратной повторности.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы исследовали газообразование лейконостоков при оптимальной температуре 30 ± 1 °С в среде с цитратом натрия и без цитрата натрия в сосудах Дунбара. Образование газа в среде с цитратом натрия проходило интенсивнее и максимальные значения находились в пределах от 30 до 60 см³ (рис. 1), тогда как в среде без цитрата

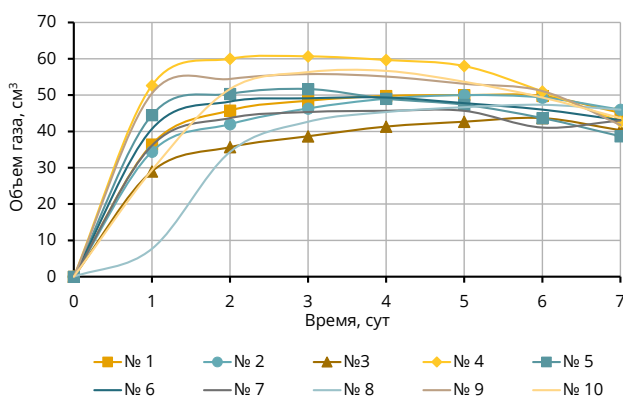


Рисунок 1. Динамика газообразования лейконостоков в среде с цитратом натрия при 30 °С

натрия – от 20 до 40 см³ (рис. 2). Исследования других ученых подтверждают зависимость газообразующей активности лейконостоков от содержания цитратов в молоке, которое в среднем составляет от 0,1 до 0,2% в зависимости от сезона [1]. Штамм № 8 в среде с цитратом в первые сутки образовывал газ менее интенсивно, чем остальные штаммы. Это можно объяснить индивидуальными особенностями штаммов. На образование газа штаммами № 2 и № 10 слабо повлияло отсутствие цитрата, а штамм № 1, наоборот, снизил свою газообразующую активность в среде без добавления цитрата, что также является индивидуальными свойствами этих штаммов.

Из данных, представленных на рисунке 3, можно заметить, что выделение газа культурами в среде с цитратом натрия достигало максимума на 3–6 сутки, тогда как в среде без цитрата натрия на 6–7 сутки, кроме штаммов № 10 (3-и сутки) и штамма № 2 (4-е сутки). Штаммы № 3 и № 8 достигали своего максимального значения в газообразовании на 6-е сутки независимо от наличия или отсутствия цитрата в среде. Штаммы № 4 и № 5

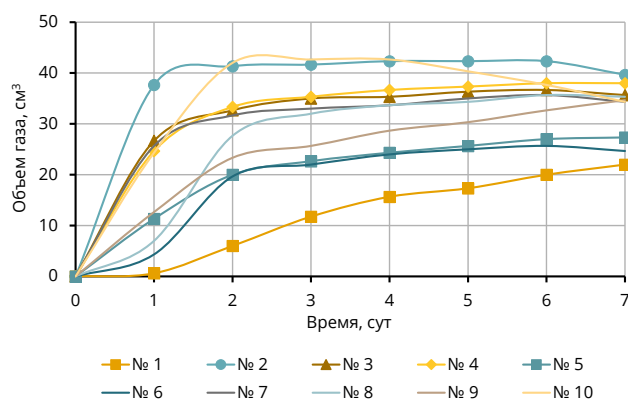


Рисунок 2. Динамика газообразования лейконостоков в среде без цитрата натрия при 30 °С

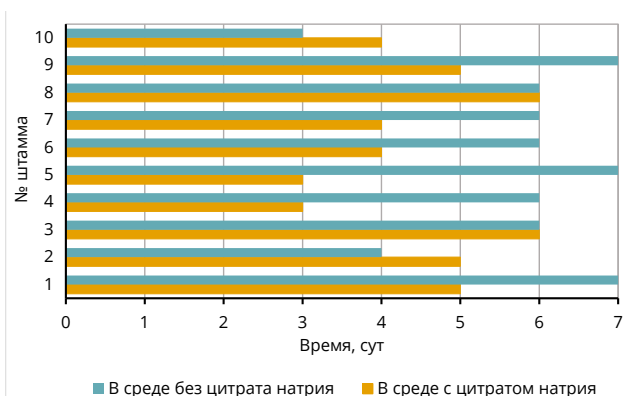


Рисунок 3. Время максимального газообразования лейконостоками в среде с цитратом и без цитрата при 30 °С

в среде с цитратом натрия достигали максимального объема газа уже на третьи сутки, а в среде без цитрата натрия только на седьмые сутки.

На рисунке 4 показаны максимальные значения объема газа, образованного лейконостоками в опытных средах. В среде без цитрата натрия наименьшее количество газа продуцировали штаммы № 1, 5, 6, но в среде с цитратом натрия эти штаммы давали высокий прирост газа, так же как и штаммы № 2, 4, 8, 9, 10. Объем углекислого газа, образованный штаммами № 2, 10 в среде без цитрата, был максимальным среди всех изученных культур.

Анализируя данные, представленные на рисунках 1–4 следует отметить, что отсутствие в питательной среде цитрата натрия при $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ меньше всего сказывалось на газообразующей активности штамма № 10. Сильнее всего на низкое содержание цитратов реагировали штаммы № 1, 5, 6. Так, в среде с добавлением цитрата штамм № 1 продуцировал газа больше в 2,27 раза, № 5 – в 1,92 раза, а № 6 – в 1,88 раза.

Содержание цитратов в молоке меняется в зависимости от сезона года – меньше всего концентрация в молоке, собранном в апреле, октябре и ноябре. В эти периоды в сыре часто наблюдается отсутствие развитого правильного рисунка [1], поэтому, исходя из полученных данных, в такие периоды в состав бактериальных заквасок следует включать лейконостоки с низкой чувствительностью к низкой концентрации цитрата в молоке.

На втором этапе исследований изучена динамика газообразующей активности лейконостоков при $10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (минимальная температура для созревания полутвердых сыров в средах с цитратом натрия

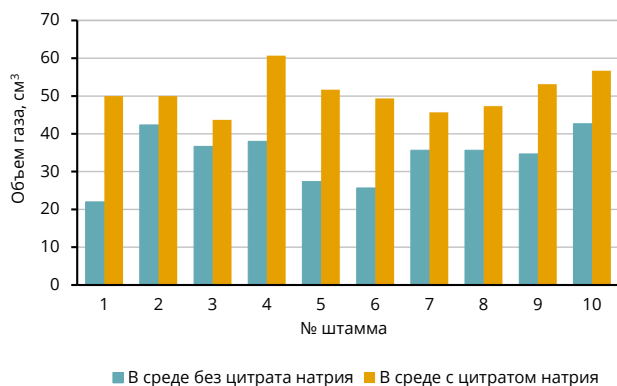


Рисунок 4. Максимальный объем углекислого газа в опытных средах при 30 °C

и без цитрата натрия). Установлено, что образование газа в среде с цитратом натрия при $10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ так же как и при $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ проходило интенсивнее и максимальные значения находились в пределах от 5,0 до 25 см³ (рис. 5), тогда как в среде без добавления цитрата натрия – от 2,0 до 10 см³ (рис. 6). Самая низкая газообразующая активность в среде без добавления цитрата натрия наблюдалась у штаммов № 3 – 2,0 см³ и № 6, 9, 10 – 3,33 см³. Штамм № 7 показал самую высокую динамику газообразования (10,67 см³) в отсутствие цитрата натрия среди всех изучаемых штаммов. В среде с цитратом натрия высокие значения газообразования были у штаммов 1, 4, 6, которые составили 21,33, 18,67 и 16,0 см³ соответственно, а минимальные у штамма № 10 – 4,67 см³.

Газообразование в среде с цитратом натрия у штаммов № 3, 4, 5 начиналось раньше других штаммов – на 2-е сутки, штамм № 10 начинал газообразование на 5-е сутки, остальные штаммы на 3–4 сутки. Максимальных значений газообразования за время исследований при температуре $10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ штаммы достигали на 7-е сутки во всех опытных средах.

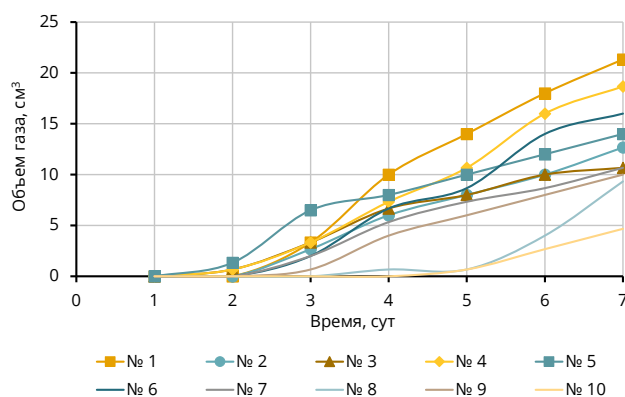


Рисунок 5. Динамика газообразования лейконостоков в среде с цитратом натрия при 10 °C

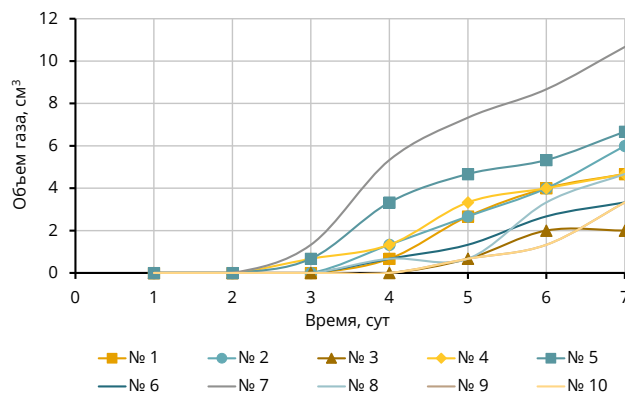


Рисунок 6. Динамика газообразования лейконостоков в среде без цитрата натрия при 10 °C

На рисунке 7 представлены максимальные значения объема газа по каждому штамму в опытных средах при температуре 10 ± 1 °С. Штамм № 10 показал самые низкие результаты газообразования в опытных средах: в среде без цитрата натрия объем газа составил – $3,33 \text{ см}^3$, в среде с добавлением цитрата – $4,67 \text{ см}^3$. На штамм № 7 не оказало влияние пониженное содержание цитрата в среде ($10,67 \text{ см}^3$ в среде с цитратом и без цитрата). Высокая чувствительность наблюдалась у штаммов № 1, 3, 4, 6, зафиксировано снижение газообразующей способности данных штаммов в среде без цитратов на 78, 81, 75, 79% соответственно. Полученные данные указывают на различную реакцию коллекционных культур лейконостоков на условия культивирования и свидетельствуют о том, что газообразующая активность является индивидуальным штаммовым признаком и согласуется с ранее опубликованными результатами исследований [8].

На рисунке 8 представлены сводные данные максимального газообразования в первые сутки при температуре 30 ± 1 °С и максимальный объем газа за весь период наблюдения при температуре 10 ± 1 °С.

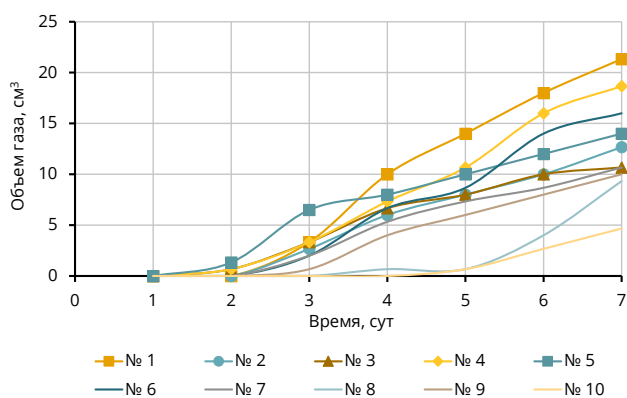


Рисунок 5. Максимальный объем углекислого газа в опытных средах при 10 °С

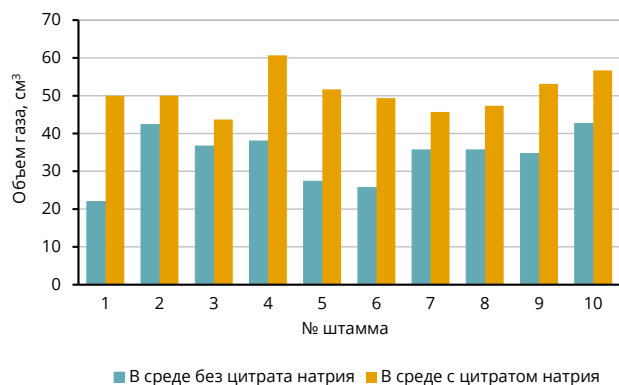
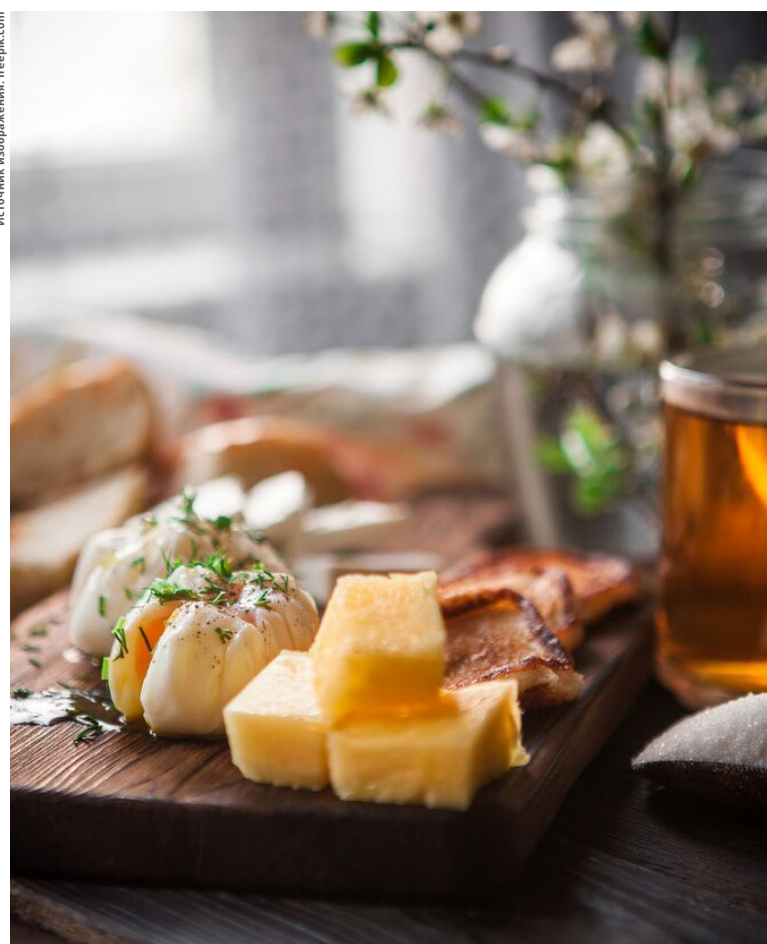


Рисунок 8. Максимальное газообразование при 10 °С и 30 °С

При производстве полутвердых сыров важно, чтобы в первые сутки интенсивность продуцирования газа микроорганизмами заквасочной микрофлоры была незначительной, а продолжалась после формирования головок и образования замкнутой поверхности головок сыра в последующем процессе созревания при пониженных температурах для правильного формирования рисунка. Учитывая эти требования и анализируя полученные опытные данные, можно выделить штаммы лейконостоков № 1 и 6, которые максимально соответствуют этим условиям выработки сыров и являются наиболее перспективными для включения в состав сырных заквасок.

Для производства творога кислотным способом на современном оборудовании, где по технологии требуется всплытие сгустка, целесообразно использовать культуры лейконостоков, которые имеют максимальную газообразующую активность в первые сутки и низкие показатели газообразования при холодильном хранении готовой продукции в герметичной упаковке. При этом образовавшийся в процессе скваши-



Источник изображения: freerik.com

вания молока газ после разрезки и вымешивания сгустка частично улетучится, в творожной массе снизится концентрация цитратов и после ее охлаждения и упаковки интенсивность газообразования будет незначительной. Это предотвратит вздутие герметичных упаковок даже при хранении в бытовых холодильниках при температуре 10 ± 1 °С. Данным требованиям более всего отвечают штаммы лейконостоков № 4, 5, 9.

Таким образом представленные данные указывают на необходимость изучения газообразующей активности всех коллекционных культур лейконостоков и разработки дифференцированных критериев для их подбора в состав бактериальных заквасок для различных ферментированных молочных продуктов с последующим проведением экспериментальных выработок на производстве.

Выводы

Полученные результаты исследований интенсивности газообразования коллекционных культур лейконостоков на опытных средах при температуре 10 ± 1 °С и 30 ± 1 °С, позволяют сделать вывод о том, что их газообразующая активность зависит от температурных условий культивирования и содержания цитратов в молоке, а также является характерным штаммовым признаком.

Установлена возможность отбора газообразующих культур лейконостоков в состав бактериальных заквасок для производства сыров с низкой температурой второго нагревания и творога на основе данных об индивидуальных особенностях штаммов. Учитывая полученные результаты и дальнейшие исследования, будет совершенствоваться методика подбора штаммов в состав бактериальных заквасок. ■

Gas-Forming Activity of *Leuconostoc* Collection Cultures

Irina V. Kucherenko, Elena V. Kuraeva, Anna Y. Duganova

All-Russian Research Institute of Butter and Cheese Production, Gorbатов Federal Scientific Center for Food Systems, Uglich

Leuconostoc bacteria are known to possess gas-forming properties. This research featured microorganisms from the experimental biofactory at the Federal Scientific Center for Food Systems, Uglich. The samples were subjected to optimal and minimal temperatures in nutrient media with different sodium citrate contents. The intensity of gas formation depended on the *leuconostoc* strain, as well as on the temperature conditions and citrate content. The gas-forming properties of *leuconostocs* proved to be an important variable for selecting proper bacterial starters during the production of low-temperature cheeses and cottage cheese.

Keywords: bacterial starter cultures, collection of microorganisms, *leuconostoc*, gas-forming activity

Список литературы

- Гудков, А. В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А. В. Гудков. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800 с.
- Кучеренко, И. В. 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>; <https://elibrary.ru/dzvlqv>
- Дымар, О. В. Производственные закваски. Основы организации процесса / О. В. Дымар, Н. П. Сорокина. – Москва: ИП Лишук С. С., 2022. – 96 с.
- Горина, Т. А. Актуальные вопросы и решения для производства творога / Т. А. Горина, Н. А. Токарева // Молочная промышленность. 2020. № 8. С. 29–31. <https://elibrary.ru/dlztqr>
- Свириденко, Г. М. Лейконостоки как газо-ароматобразующий компонент бактериальных заквасок для ферментированных молочных продуктов, в том числе сыров / Г. М. Свириденко, О. М. Шухалова // Молочная промышленность. 2019. № 7. С. 16–19. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2019-7-16-19>; <https://elibrary.ru/zlshskm>
- Юдина, Ю. С. Изучение производственно-ценных и технологических свойств лейконостоков из республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов / Ю. С. Юдина, С. Л. Василенко, Н. К. Жабанос, Н. Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. 2020. № 14. С. 26–39. <https://doi.org/10.47612/2220-8755-2019-14-26-39>; <https://elibrary.ru/edzufo>
- Бирюк, Е. Н. Физиолого-биохимические и производственно-ценные свойства бактерий рода *Leuconostoc* / Е. Н. Бирюк, Н. Н. Фурик, С. Л. Василенко // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. 2017. № 11. С. 38–43. <https://elibrary.ru/vluafh>
- МакСуини, П. Л. Сыр. Научные основы и технологии: в 2-х т. / под ред. П. Л. МакСуини, П. Ф. Фокса, П. Д. Коттера, Д. У. Эвертта. – СПб.: Профессия, 2019. – Т. 1. – 554 с.
- Свириденко, Г. М. Влияние микроорганизмов рода *Leuconostoc* на формирование потребительских показателей сыров пониженной жирности / Г. М. Свириденко, В. А. Мордвинова, И. Н. Делицкая, Д. С. Вахрушева // Сыроделие и маслоделие. 2020. № 5. С. 14–16. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-5-14-16>; <https://elibrary.ru/zyuxvu>
- Ахметова, Л. И. Бактерии рода *Leuconostoc*: клиническое значение, идентификация, чувствительность к антибиотикам / Л. И. Ахметова, С. М. Розанова, Е. Ю. Перевалова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 3(1). С. 48–53.