

# Znaczenie bakterii rodzaju *Leuconostoc* dla przemysłu mleczarskiego

MAŁGORZATA ZIARNO

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Technologii Żywności SGGW,  
ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

Ziarno M.

## Role of bacteria of the genus *Leuconostoc* for the dairy industry

Summary

Lactic acid bacteria of the genus *Leuconostoc* play an important role in the dairy industry because of their ability to produce aroma compounds and carbon dioxide through lactose heterofermentation and citrate utilization. *Leuconostocs* ferment hexoses by the pentose phosphate pathway, producing D-lactate, ethanol and CO<sub>2</sub>. The carbon dioxide produced is responsible for eye formation in certain types of cheese. Citrate utilization by these bacteria leads to the production of diacetyl (and other substances such as acetoin and ethanol), which is considered a main flavor compound of a range of fermented dairy products such as cultured butter, cultured sour cream, buttermilk and some acid and rennet cheeses. Many strains of *Leuconostoc* synthesize extracellular polysaccharides (EPS). Exopolysaccharide producing *leuconostocs* can enhance the functional properties of fermented milk products. In addition, many *leuconostocs* produce bacteriocins that may or may not be active against other lactic acid bacteria, but all include *Listeria* spp. in their activity spectra. The use of *leuconostocs* as starter bacteria in controlled fermentations make the bacteriocins produced by these bacteria of interest as possible food preservatives for dairy products, especially raw milk products. Bacteriophage contamination is an important problem that is common in food fermentations, especially in the dairy industry. Among the bacteriophages that infect lactic acid bacteria, those specific for other LAB have been investigated most extensively, but little information is available on bacteriophages of species of the genus *Leuconostoc*.

**Keywords:** *Leuconostoc* spp., dairy industry, dairy products

Bakterie rodzaju *Leuconostoc* są najczęściej stosowanymi w mleczarstwie heterofermentatywnymi bakteriami fermentacji mlekowej. Dzięki zdolności fermentowania cytrynianów przyczyniają się do tworzenia właściwego aromatu większości fermentowanych produktów mleczarskich, takich jak: sery podpuszczkowe i twarogowe, śmietana, masło, zsiadłe mleko, kefir. Oprócz tego w procesie fermentacji cytrynianów wytwarzają ditlenek węgla, odpowiedzialny za powstawanie oczek w niektórych typach serów. Innymi ważnymi cechami bakterii rodzaju *Leuconostoc* jest rozkładanie w produktach fermentowanych nadmiaru aldehydu octowego i wytwarzanie bakteriocyn. Dlatego wraz z kwaszającymi paciorkowcami mlekowymi rodzaju *Lactococcus* wchodzi w skład większości mezofilnych kultur starterowych, stosowanych w zakładach mleczarskich.

### Systematyka i ogólna charakterystyka

Obecnie rodzaj *Leuconostoc* obejmuje 13 gatunków i 3 podgatunki. Środowiskiem bytowania tych bakterii są przede wszystkim rośliny (*Ln. fallax*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides*

subsp. *dextranicum*), żywność (*Ln. argentinum*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. lactis*, *Ln. fallax*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*) oraz szpitala (*Ln. citreum*, *Ln. pseudomesenteroides*). Dwa gatunki, wcześniej nazywane *Ln. oenos* i *Ln. paramesenteroides*, obecnie są klasyfikowane jako *Oenococcus oeni* i *Weissella paramesenteroides* (1, 8, 12, 17, 21, 23, 32-35).

Są to bakterie mezofilne, o optymalnej temperaturze wzrostu 20-30°C (rozwijają się nawet w 10°C, ale w 45°C już nie), Gram-dodatnie, katalazoujemne, nieruchliwe, względnie beztlenowce, obligatoryjnie heterofermentatywne. Nie są ciepłooporne, chociaż *Ln. lactis* wykazuje pewną oporność i może przetrzymać działanie temperatury 60°C przez 30 min. (9, 12, 22, 23, 33).

Są paciorkowcami zwykle występującymi w dwonkach lub łańcuszkach, chociaż czasem ich komórki przybierają kształt elipsoidalny. Pod względem żywieniowym są wymagające, zwykle dobrze rosną na podłożu MRS (Mana, Rogosa i Sharpe'a), jednak często do wzrostu wymagają wzbogacenia podłoża w wita-

miny z grupy B (np. kwas foliowy), składniki mineralne ( $Mg^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ ) i aminokwasy (aspartam, glutaminian, walina, leucyna, izoleucyna, czasami histydyna, metionina, tryptofan, arginina i cysteina) (5, 6, 10, 14-17, 33). W mleku rosną słabo, nie ukwaszając go silnie, chociaż niektóre szczepy *Ln. lactis* mogą dobrze rozwijać się w mleku i go ukwaszać (5, 6). W praktyce mleczarskiej, podczas ukwaszania mleka bakterie rodzaju *Leuconostoc* rosną w mleku w obecności paciorkowców mlekowych (laktokoków), dlatego obserwuje się współdziałanie między tymi dwoma rodzajami bakterii mlekowych, chociaż natura tego zjawiska nie jest do końca wyjaśniona (5, 6, 15, 16).

Wszystkie stosowane w mleczarstwie gatunki rodzaju *Leuconostoc* wytwarzają kwas mlekowy D(-), metabolizują cytryniany i fermentują zarówno laktozę, jak i galaktozę (2-5, 9, 12, 21, 24, 31). Niektóre gatunki rodzaju *Leuconostoc* wytwarzają egzopolisacharydy (na przykład *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i subsp. *dextranicum*).

Do izolowania i selektywnego oznaczania liczby bakterii rodzaju *Leuconostoc* w fermentowanych produktach mleczarskich oraz kulturach starterowych stosuje się podłoże agarowe zawierające dodatek wankomycyny (gdyż wszystkie gatunki rodzaju *Leuconostoc* są wankomycynooporne) lub tetracykliny. Jednakże niektóre pałeczki mlekowe również mogą być odporne na wankomycynę. Dlatego w obecności pałeczek mlekowych i/lub drożdży zalecane jest stosowanie bardziej złożonego podłoża selektywnego zawierającego równocześnie wankomycynę, tetracyklinę, azydek sodu i kwas sorbowy (27, 28).

### Zastosowanie w przemyśle mleczarskim

Dotychczas nie wiadomo dokładnie, jakie gatunki bakterii rodzaju *Leuconostoc* są wykorzystywane w fermentacji artykułów mleczarskich (8, 12, 17). Pewne jest, że dwa gatunki, *Ln. lactis* i *Ln. mesenteroides* (podgatunki: subsp. *mesenteroides*, subsp. *cremoris* i subsp. *dextranicum*) na pewno są stosowane w kulturach starterowych (2, 12, 34, 37). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* jest podgatunkiem najczęściej stwierdzanym zarówno w mleczarskich mezofilnych kulturach starterowych, jak i w fermentowanych produktach mleczarskich. Natomiast nie są stosowane w termofilnych kulturach starterowych (9, 21, 32, 37, 38).

Bakterie *Leuconostoc* są wykorzystywane przede wszystkim w celu wytworzenia w produktach fermentowanych właściwego i charakterystycznego aromatu oraz, w mniejszym stopniu, również w celu przeprowadzenia fermentacji mlekowej, przy współdziałaniu innych mezofilnych bakterii mlekowych (głównie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* lub *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) (3, 4, 10, 20-22, 24, 30-32). Produktami otrzymywanymi z wykorzystaniem bakterii *Leuconostoc* są różnego rodzaju sery podpuszczkowe dojrzewające i kwasowe (twarogi, serki typu cottage cheese, sery typu feta, gouda, edam, havarti, pleśniowe z prze-

rostem pleśni, sery pielęgnowane na maź), śmietana, masło, oraz mlekne napoje fermentowane (np. zsiadłe mleko, maślanka). W przypadku produkcji niektórych serów podpuszczkowych dojrzewających *Leuconostoc* przyczyniają się także do powstania pożądanego i prawidłowego oczkowania. Mezofilne kultury starterowe, określane jako typu L lub DL, stosowane w produkcji wymienionych artykułów mleczarskich, zawierają *Leuconostoc* jako jedyne bakterie aromatyzujące, najczęściej w liczbie 1-10% ogólnej mikroflory startera (3, 6, 12, 21, 37).

*Leuconostoc*, wytwarzając ditlenek węgla, może przyczynić się tym samym do zahamowania rozwoju mikroflory niepożądaney. Wytwarzając ditlenek węgla, bakterie wytwarzają warunki sprzyjające rozwojowi innych bakterii fermentacji mlekowej – beztlenowych pałeczek mlekowych (2, 9, 37).

Ponadto, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* są składnikami ziaren kefirowych i kefirowych kultur starterowych wykorzystywanych do produkcji kefiru. W ziarnach kefirowych, wraz z pozostałymi paciorkowcami mlekowymi, mogą stanowić nawet do 12% masy ziaren. Wymienione podgatunki *Leuconostoc* wytwarzając egzopolisacharydy (np. dekstran), istotnie przyczyniają się do utworzenia dużych zlepieńców grzybków kefirowych (2, 12, 37).

Zdolność do wytwarzania egzopolisacharydów (EPS) jest cechą możliwą do wykorzystania również w przypadku produkcji innych mleknych napojów fermentowanych, gdyż pozwala na modelowanie ich konsystencji bez konieczności stosowania stabilizatorów czy zagęstników (2, 37). Z drugiej strony, nadmierny rozwój *Leuconostoc* wytwarzających EPS powoduje powstanie ciągliwości skrzepu, szczególnie przy prowadzeniu fermentacji w zbyt niskiej temperaturze lub przez zbyt długi czas, chociaż brak danych, aby bakterie rodzaju *Leuconostoc* powodowały zepsucie się fermentowanych lub niefermentowanych produktów mleczarskich.

### Fermentacja cytrynianów

Podstawowym zadaniem *Leuconostoc* jest nadanie charakterystycznego zapachu maślanego produktom fermentowanym przez wytworzenie diacetylu w procesie fermentacji cytrynianów. Generalnie, nie wszystkie bakterie rodzaju *Leuconostoc* wykorzystują cytryniany. Te gatunki, które są stosowane w mleczarstwie, mają tę zdolność. Wytwarzają zazwyczaj do 5 mg diacetylu/litr lub więcej, w przypadku rozwoju w symbiozie z paciorkowcami mlekowymi, pomimo że mleko zawiera niewielkie ilości cytrynianów (około 0,15-0,2%) (2-4, 12, 20, 31, 32, 37, 38).

Metabolizm cytrynianów przez bakterie fermentacji mlekowej jest dokładnie poznany i wiadomo, że *Leuconostoc* spp., podobnie jak laktokoki metabolizujące cytryniany, nie mogą wykorzystywać cytrynianów jako jedynej źródła energii, gdyż do tego po-

trzebują jeszcze przyswajalnych cukrów (10, 20, 24, 25). Jednoczesne zużywanie cytrynianów i cukrów prowadzi do stymulacji wzrostu przez wytwarzanie dodatkowej energii (a dokładniej, dodatkowej ilości ATP) w szlaku kinazy octanowej. Okazuje się, że proces metabolizmu cytrynianów przez bakterie rodzaju *Leuconostoc* przebiega tym samym szlakiem, jak i u innych paciorkowców mlekowych (np. *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*). Szlak ten obejmuje następujące etapy: (a) pobranie cytrynianów ułatwione przez permeazę cytrynianową zlokalizowaną w błonie komórkowej; (b) przekształcenie cytrynianów na octan i szczawiooctan pod działaniem liazy cytrynianowej; (c) utworzenie pirogronianu przez dekarboksylację szczawiooctanu i (d) redukcja pirogronianu do mlecza i/lub przekształcenie nadmiaru pirogronianu w octan, diacetyl, acetoinę i 2, 3-butanediol (2-4, 9, 20, 22). Ponieważ permeaza cytrynianowa wykazuje najwyższą aktywność w pH 4,5-5,5, dopiero wówczas obserwuje się intensywne zużywanie cytrynianów i wytwarzanie diacetylu, będącego głównym składnikiem zapachowym większości fermentowanych produktów mleczarskich (4, 12, 25, 30). Ponieważ *Leuconostoc* same nie są w stanie ukwasić mleka do podanej wartości pH, uzasadnione jest prowadzenie fermentacji z wykorzystaniem wielogatunkowych kultur starterowych, zawierających w składzie również kwaszące paciorkowce mlekowe (9, 24, 37). Chociaż z drugiej strony, czasami obserwuje się zahamowanie wzrostu niektórych szczepów *Leuconostoc* w kulturach mieszanych wraz z *Lactococcus* spp., wynikające m.in. ze współzawodnictwa o składniki odżywcze, głównie substancje azotowe (5, 6, 15, 16).

Bakterie rodzaju *Leuconostoc* mogą wytwarzać także inną lotną substancję składającą się na aromat mlecznych produktów fermentowanych – aldehyd octowy (9, 12, 21, 24, 26, 31, 32). Aldehyd octowy wytwarzany przez bakterie mlekowe jest głównym składnikiem aromatu młodych serów, kwaśnej śmietany, mleka zsiadłego. Jednak jego nadmiar może być odbierany przez konsumentów jako zbyt ostry, a czasami przyczynia się również do powstania wady określanej jako zapach trawiasty. Dla *Leuconostoc* spp. aldehyd octowy jest stymulatorem wzrostu, gdyż odgrywa istotną rolę w procesie regeneracji  $\text{NAD}^+$  z  $\text{NADH}$ , czego efektem jest szybki rozkład aldehydu octowego do etanolu. Zdolność *Leuconostoc* spp. do szybkiego usuwania nadmiaru aldehydu octowego wytwarzanego także przez kultury paciorkowców kwaszących jest ważną funkcją użytkową tych bakterii. *Leuconostoc* mogą bowiem być stosowane jako dodatek w produkcji jogurtów, właśnie w celu redukcji zawartości aldehydu octowego i modyfikowania aromatu produktu w kierunku bardziej pożądanym przez konsumentów.

Stwierdzone w praktyce osłabienie lub zanik wytwarzania aldehydu octowego podczas fermentacji mleka przez *Leuconostoc* może być spowodowane niedostatecznym obniżeniem pH, zbyt wysoką tempera-

turą (ponad 25°C), brakiem mikroelementów (przede wszystkim Mn), zbyt dużą przewagą bakterii kwaszących lub obcej mikroflory rozkładającej wytwarzany aldehyd octowy (4, 24, 26, 29, 31, 37).

Inny produkt metabolizmu cytrynianów,  $\text{CO}_2$ , ma znaczenie zarówno dla powstawania oczek w serach typu gouda i edam oraz serów z przerostem pleśni, jak również jest odpowiedzialny za musowanie niektórych produktów mlecznych napojów fermentowanych (np. kefiru i zsiadłego mleka) (3, 9, 12, 21, 31, 32).

### Fermentacja cukrów

Bakterie rodzaju *Leuconostoc* potrafią produkować aldehyd octowy także w procesie fermentacji cukrów, co również przyczynia się do ogólnego wrażenia smakowo-zapachowego mlecznych produktów fermentowanych. Rodzaj *Leuconostoc*, posiadający aktywną dehydrogenazę alkoholową, potrafi łatwo przekształcić kwas octowy w etanol, a ten, tworząc z tłuszczami obecnymi w mleku różnego rodzaju estry, modyfikować smak i zapach produktów fermentowanych (2, 9, 10, 21, 32).

Do metabolizmu heksoz (np. glukozy i galaktozy) *Leuconostoc* spp. wykorzystują szlak fosfoketolazy (zwany szlakiem heterofermentacji mlekowej), wytwarzając D(-)-mleczan, etanol i  $\text{CO}_2$  jako produkty końcowe: 1 glukoza (galaktoza)  $\rightarrow$  1 D(-)-mleczan + 1 etanol + 1  $\text{CO}_2$  + 1 ATP. W obecności zewnętrznych akceptorów elektronów, takich jak tlen (w warunkach tlenowych), aldehyd octowy lub pirogronian, zamiast etanolu i dodatkowych ilości ATP, wytwarzany jest w znacznych ilościach kwas octowy. Pentozy natomiast metabolizowane są przez bakterie rodzaju *Leuconostoc* szlakiem pentofoforanowym: 1 pentoza  $\rightarrow$  1 mleczan + 1 octan + 2 ATP. W tym przypadku nie dochodzi do tworzenia etanolu i  $\text{CO}_2$  (9, 10).

Głównym enzymem biorącym udział w hydrolizie laktozy przez *Leuconostoc* jest  $\beta$ -galaktozydaza. Transport wolnej laktozy do komórek jest umożliwiony przez permeazę laktozową zlokalizowaną w błonie cytoplazmatycznej. Wewnątrz komórek laktoza jest hydrolizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę do glukozy i galaktozy. Glukoza jest następnie fosforylowana i metabolizowana w szlaku fosfoketolazy. Natomiast galaktoza najpierw jest fosforylowana do galaktozo-1-fosforanu, który następnie jest przekształcany w glukozo-1-fosforan i metabolizowany tym samym szlakiem co glukoza (2, 9, 10, 12, 37).

### Zdolności proteolityczne i lipolityczne

*Leuconostoc* spp. są powszechnie uważane za bakterie nie posiadające zdolności proteolitycznych i lipolitycznych. Jak wskazują dane piśmiennictwa, bakterie z tego rodzaju wykazują jednak pewną aktywność proteolityczną, peptydolityczną, esterolityczną i lipolityczną (5, 6, 11-13, 16, 37, 38). Najprawdopodobniej aktywność ta jest wewnątrzkomórkowa lub związana ze ścianą komórkową. Wiadomo, że aktyw-

ność wewnątrzkomórkowych proteinaz i peptydaz u *Leuconostoc* jest znacznie słabsza niż u laktokoków, zaś aktywność wewnątrzkomórkowych esteraz i lipaz jest podobna, przy czym z uprzywilejowaniem na estry krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (7, 11, 32, 37, 38). Oznacza to, że potencjał rozkładania białek i lipidów mleka przez *Leuconostoc* spp. jest niewielki (2, 12). Nieliczne publikacje wskazują, że wewnątrzkomórkowy system proteolityczny *Leuconostoc* jest bardzo bogaty, ale dotychczas nie został on zbadany (13).

Bakterie rodzaju *Leuconostoc* wymagają do wzrostu aminokwasów i posiadają dobrze rozbudowany system pozyskiwania aminokwasów ze środowiska bytowania (13, 16, 17, 19). Badania wskazują, że u *Leuconostoc mesenteroides* występują trzy mechanizmy transportu różnych aminokwasów, przy czym różne aminokwasy mogą być transportowane przy wykorzystaniu tego samego systemu transportu (14-17, 19). Aminokwasy są pozyskiwane w efekcie słabej proteolizy i autolizy bakterii.

Warto podkreślić, iż autoliza komórek bakterii mlekowych odgrywa istotną rolę w procesie dojrzewania serów podpuszczkowych, bowiem przyczynia się do uwolnienia wewnątrzkomórkowych enzymów (7, 11, 12, 22). Okazuje się, że zdolność bakterii *Leuconostoc* do lizy komórek silniej zależy od szczepu niż od gatunku bakterii. W błonie komórkowej szczepu *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L stwierdzono obecność glikozydazy i amidazy N-acetyl-muramyl-L-alaninowej lub endopeptydazy. Niektórzy autorzy (7) sugerują, by zdolność do autolizy komórek przyjąć jako kryterium przydatności *Leuconostoc* do stosowania jako kultury starterowe przeznaczone do produkcji serowarskiej.

Brak jest szczegółowych informacji o katabolizmie i biosyntezie aminokwasów przez *Leuconostoc* (16). Wiadomo jednak, że z biosyntezą aminokwasów u *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* związany jest metabolizm cytrynianów. Szczawiooctan wytwarzany z cytrynianów może bowiem zostać przekształcony do aspartamu w procesie transaminacji. Proces transaminacji może również dotyczyć biosyntezy innych aminokwasów z ketokwasów (np. glutaminianu z ketoglutaranu, leucyny z ketoizokapronianu).

### Wytwarzanie bakteriocyn przez rodzaj *Leuconostoc*

Gatunki rodzaju *Leuconostoc*, stosowane w mleczarstwie, znane są z wytwarzania składników działających hamująco lub niszcząco na patogeny i mikroflorę zanieczyszczającą. Jednakże aktywność hamująca tych bakterii mlekowych (jak i w przypadku innych bakterii fermentacji mlekowej) zwykle jest związana z obniżaniem pH, wytwarzaniem kwasów organicznych (kwas octowy, mlekowy), CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12, 33). Na przykład, wiadomo, że szczepy *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* posiadają pewną aktywność antagonistyczną wobec innej mikroflory, jednak dotąd brak

informacji, czy aktywną substancją jest bakteriocyna, czy inna substancja przeciwdrobnoustrojowa.

Bakteriocyny wytwarzane przez *Leuconostoc* spp. zostały odkryte już w latach 50. ubiegłego stulecia, jednak dopiero od 1984 r., gdy wykryto ich aktywność antagonistyczną wobec bakterii patogennych, rozpoczęto szczegółowe ich badania. Dlatego nadal jest niewiele informacji na temat izolacji i charakterystyki bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie *Leuconostoc* spp. stosowane w przemyśle mleczarskim (12, 33). Dostępne dane piśmiennictwa dotyczą mesenterycyny Y105, wytwarzanej przez *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, leukocyny A-UAL 187, wytwarzanej przez *Ln. gelidum*, karnozyny 44A, wytwarzanej przez *Ln. camosum* oraz leukocyny S, wytwarzanej przez *Ln. paramesenteroides*. Gatunek *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105, wyizolowany z produktów z mleka koziego, wytwarza względnie ciepłolabilną (60°C, 120 min., pH 4,5) bakteriocynę, mesenterycynę Y105, o działaniu przeciwlisteryjnym. Z kolei *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UL5, izolowany z sera cheddar, wytwarza ciepłostabilną mesenterycynę Y105 (100°C, 30 min.), o podobnej aktywności jak mesenterycyna szczepu Y105.

Generalnie, bakteriocyny wytwarzane przez *Leuconostoc* spp. mogą być skierowane przeciw innym, spokrewnionym lub nie, bakteriom mlekowym, chociaż nie jest to regułą. Według obecnej wiedzy, wszystkie badane bakteriocyny wytwarzane przez *Leuconostoc* spp., wykazują głównie aktywność przeciw *Listeria monocytogenes*, ważnemu patogenowi stwierdzanemu w żywności (12, 33).

Nie wiadomo również, czy szczepy bakterii rodzaju *Leuconostoc* posiadają właściwości probiotyczne, tak często badane i stwierdzane u innych bakterii fermentacji mlekowej stosowanych w mleczarstwie. Nie jest zbadana zdolność *Leuconostoc* spp. do zasiedlania jelit ludzi lub zwierząt. Wiadomo, że bakterie mlekowe zasiedlające jelita oraz niektóre probiotyczne szczepy bakterii mlekowych wytwarzają enzym hydrolazę soli żółciowych (BSH), który katalizując reakcję hydrolizy wiązania aminowego łączącego kwasy żółciowe z tauryną lub glicyną, prowadzi do rozpadu soli żółciowych na wolne reszty aminokwasowe i zhydrolizowane (wolne) kwasy żółciowe, stanowiąc tym samym mechanizm obrony komórek bakteryjnych przed szkodliwym działaniem koniugowanych soli żółciowych (38). Odnośnie do aktywności BSH u *Leuconostoc* spp. wykorzystywanych w produkcji mleczarskiej, brak jest danych piśmiennictwa.

### Bakteriofagi atakujące rodzaj *Leuconostoc*

Znanych jest wiele bakteriofagów atakujących niektóre gatunki *Leuconostoc* spp. stosowane w mleczarstwie, jednak brak szczegółowej charakterystyki bakteriofagów atakujących te bakterie. Być może, wiele bakterii rodzaju *Leuconostoc* nie jest wrażliwych na bakteriofagi. Innym wytłumaczeniem rzadkiego stwier-

dziania działania bakteriofagów na bakterie *Leuconostoc* może być powolny rozwój tych bakterii w mleku i niewielka ich liczba podczas fermentacji produktów mleczarskich. Niestety, najczęściej działanie bakteriofagów jest zauważane zbyt późno, gdyż dopiero w chwili stwierdzenia, że bakterie *Leuconostoc* nie wytworzyły właściwego aromatu lub ditlenku węgla w produktach fermentowanych (12).

### Aspekty genetyczne

Niewiele wiadomo o genetyce bakterii rodzaju *Leuconostoc*. Wiadomo, że posiadają ograniczoną liczbę plazmidów (w liczbie 1-6) o masie od 1 do 76 MDa, z czego większość to plazmidy ochronne (21, 28, 33). Możliwość koniugacyjnego przenoszenia plazmidów pomiędzy bakteriami rodzajów *Enterococcus*, *Leuconostoc* i *Lactococcus* wskazuje na duży potencjał modyfikacji genetycznych wymienionych bakterii. Geny kodujące transport laktozy i jej hydrolizę, wytwarzanie bakteriocyn i oporność są zlokalizowane głównie na plazmidach (24, 25, 28, 29). Permeaza zaangażowana w metabolizm cytrynianów jest kodowana również na plazmidzie. Podobnie jest kodowana zdolność do produkcji mesenterycyny Y105 przez *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105. Także sekwencje insercyjne, stosowane w inżynierii genetycznej do modyfikacji niektórych *Leuconostoc* spp. są obecne w niskiej liczbie kopii.

Rozpowszechnienie rodzaju *Leuconostoc* w wielu procesach spontanicznej fermentacji żywności oraz zastosowanie tych bakterii jako składnika kultur starterowych w kontrolowanych fermentacjach sprawiają, że wytwarzanie bakteriocyn przez te bakterie można byłoby wykorzystać jako dodatkowy mechanizm ochronny żywności. Niestety, komercyjne zastosowanie w mleczarstwie tych bakteriocyn lub szczepów *Leuconostoc* je wytwarzających nie zostało dotychczas udokumentowane badaniami naukowymi, w przeciwieństwie do ich roli w fermentowanych produktach mięsnych (33).

### Piśmiennictwo

1. Antunes A., Rainey F. A., Nobre M. F., Schumann P., Ferreira A. M., Ramos A., Santos H., Da Costa M. S.: *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002, 52, 647-655.
2. Bamforth C. W.: Food, Fermentation, and Micro-organisms. Blackwell Sciences Publishing, Kundli 2005, 31-33.
3. Bellengier P., Foucaud C., Hemme D.: Carbon dioxide production from citrate and glucose in *Leuconostoc* species determined by an adapted enzymatic method. *Milchwissenschaft* 1993, 48, 548-551.
4. Bellengier P., Hemme D., Foucaud C.: Citrate metabolism in sixteen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains. *J. Appl. Bacteriol.* 1994, 77, 54-60.
5. Bellengier P., Richard J., Foucaud C.: Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. *J. Dairy Sci.* 1997, 80, 1520-1527.
6. Bellengier P., Richard J., Foucaud C.: Nutritional requirements of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* for growth in milk. *J. Dairy Res.* 1997, 64, 95-103.
7. Cibik R., Chapot-Chartier M. P.: Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89, 862-869.
8. Cibik R., Lepage E., Tailliez P.: Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Sys. Appl. Microbiol.* 2000, 23, 267-278.
9. Cogan T. M., Jordan K. N.: Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 2704-2717.
10. Cogan T. M.: Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: Effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* 1987, 63, 551-558.
11. Crow V. L., Coolbear T., Gopal P. K., Martley F. G., McKay L. L., Riepe H.: The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 1995, 5, 855-875.
12. Devoyod J. J., Poullain F.: The leuconostocs. Characteristics. Their role in dairy technology. *Lait* 1988, 68, 249-280.
13. El-Shafei H., El-Soda M., Ezzat N.: The peptide hydrolase system of the *Leuconostoc*. *J. Food Prot.* 1990, 53, 165-169.
14. Foucaud C., Francois A., Richard J.: Development of a chemically defined medium for the growth of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 301-304.
15. Foucaud C., Furlan S., Bellengier P., Juillard V., Richard J.: Nutritional value of the non-protein N that accumulates during growth of proteinase-positive strains of *Lactococcus lactis* in milk for dairy lactococcal and leuconostoc isolates. *J. Dairy Res.* 1998, 65, 491-501.
16. Foucaud C., Hemme D., Desmazeaud M.: Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 32, 20-25.
17. Gendrot F., Ferchichi M., Winters D., Hemme D.: Valine transport and biodiversity of *Leuconostoc* wild strains from French raw milk cheeses. *Sys. Appl. Microbiol.* 2000, 23, 461-468.
18. Gendrot F., Foucaud-Scheuemann C., Ferchichi M., Hemme D.: Characterization of amino acid transport in the dairy strain *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CNRZ 1273. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, 35, 291-295.
19. Germain-Alpeltaz V., Foucaud-Scheuemann C.: Identification and characterization of an oligopeptide transport system in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CNRZ 1463. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, 35, 68-73.
20. Hugenholtz J., Starrenburg M. J. C.: Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 38, 17-22.
21. Johansen E., Kibenich A.: Characterization of *Leuconostoc* isolates from commercial mixed strain mesophilic starter cultures. *J. Dairy Sci.* 1992, 75, 1186-1191.
22. Jordan K. N., O'Donoghue M., Condon S., Cogan T. M.: Formation of diacetyl by cell-free extracts of *Leuconostoc lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, 143, 291-297.
23. Leisner J. J., Vancanneyt M., Van Der Meulen R., Lefebvre K., Engelbeen K., Hoste B., Laursen B. G., Bay L., Rusul G., De Vuyst L., Swings J.: *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005, 55, 1267-1270.
24. Levata-Jovanovic M., Sandine W. E.: Citrate utilization and diacetyl production by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* 1996, 79, 1928-1935.
25. Lin J., Schmitt P., Divies C.: Characterization of a citrate-negative mutant of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*: metabolic and plasmidic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 34, 628-631.
26. Liu S. Q., Asmundson R. V., Holland R., Crow V. L.: Acetaldehyde metabolism by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* under stress conditions. *Int. Dairy J.* 1997, 7, 175-183.
27. Mathot A. G., Kihal M., Prevost H., Divies C.: Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *Int. Dairy J.* 1994, 4, 459-469.
28. Orberg P. K., Sandine W. E.: Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 48, 1129-1133.
29. Rattray F. P., Myling-Petersen D., Larsen D., Nilsson D.: Plasmid-encoded diacetyl (acetoin) reductase in *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 304-311.
30. Rattray F. P., Walfridsson M., Nilsson D.: Purification and characterization of a diacetyl reductase from *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Int. Dairy J.* 2000, 10, 781-789.
31. Starrenburg M. J. C., Hugenholtz J.: Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* ssp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57, 3535-3540.
32. Stiles M. E., Holzapfel W. H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 36, 1-29.
33. Stiles M. E.: Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 2718-2724.
34. Thunnebl R. K.: Taxonomy of the *Leuconostocs*. *J. Dairy Sci.* 1995, 78, 2514-2522.
35. Vancanneyt M., Zamfir M., De Wachter M., Cleenwerck I., Hoste B., Rossi F., Dellaglio F., De Vuyst L., Swings J.: Reclassification of *Leuconostoc argentinum* as a later synonym of *Leuconostoc lactis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, 56, 213-216.
36. Varnam A. H., Sutherland J. P.: Milk and milk products. Technology, chemistry and microbiology. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland 2001.
37. Vedamuthu E. R.: The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 2725-2737.
38. Ziarno M.: Bakterie rodzaju *Enterococcus* w mleku i przetworach mlecznych. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 145-148.

Adres autora: dr inż. Małgorzata Ziarno, ul. Nowoursynowska 159c; e-mail: malgorzata\_ziarno@sggw.pl