

ФАГОЧИПИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ЗАЩИТЫ ПРАВ НА ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

И.С. Полянская, А.В. Салахутдинова

*Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина,
Вологда, Россия*

Развитие биотехнологий ферментированных молочных продуктов, в частности сыроделия, непрерывно развивается. В настоящее время часто производители используют в качестве заквасочных собственные патентованные культуры, которые необходимо защищать не только от несанкционированного использования другими производителями, но оберегать марку самого продукта от подделок-имитаций [1]. Ясно, что такая защита должна быть многоуровневой.

В частности в настоящее время исследования по способам защиты своих культур ведутся в Цюрихском университете, Швейцарском государственном техническом институте ETH, Федеральной исследовательской станция Agroscope [1].

В том случае, если регламентируется запрет на применение и отсутствие ГМО микроорганизмов в продукте (как в России), получение новых штаммов с улучшенными свойствами включает [2,3]:

1. Селекцию посредством естественного отбора практически ценных форм. После выделения из природных или производственных источников штамма микроорганизмов, обладающих полезными свойствами, проводится отбор наиболее продуктивных штаммов среди них.
2. Применение искусственного мутагенеза, позволяющего усилить появление различных мутаций. В качестве мутагенов используются ионизирующие излучения, некоторые химические вещества, а также ультрафиолетовое излучение, обладающее хотя и низкой проникающей способностью, но достаточной для появления мутаций у микроорганизмов.
3. Генетические методы рекомбинации между близкородственными видами (конъюгация, трансформация, трансдукция т. д.).

При селекции посредством естественного отбора практически ценных форм используют естественную изменчивость с отбором групп генетически идентичных клеток – клонов. При применении естественного отбора отдельный клон подвергается многократному пересеву на питательную среду с контролем на образование требуемого продукта. Цель такого многократного клонирования – получение наиболее однородной популяции клеток. После получения продуктивных штаммов приступают к накоплению биомассы. Использование данной технологии позволило селекционерам получить штаммы, продуктивность которых в сотни и тысячи раз выше по сравнению с исходными штаммами микроорганизмов, взятыми из природы.

Для выделения микроорганизмов выбирают объекты, где обитание того или иного вида микроорганизмов наиболее предпочтительно в связи с выбранными для него критериями оценки (сырое молоко, молочная сыворотка, силос, квашеные продукты, молочные продукты, части растений (листья, ягоды), фрукты, овощи, stercus и др.) [3].

Известно, что даже среди природных культур одного вида могут быть уникальные культуры, обладающие более высокими качествами, среди которых определяющими их производственную и пробиотическую ценность могут быть [2–5]:

- антагонистическая активность заквасочных бактерий в отношении технической, патогенной и условно-патогенной микрофлоры обусловленная их способностью синтезировать антибиотические вещества (лактаины, лантабиотики и др.), перекись водорода, лизоцим и др.;
- кислотообразование, высокая кислотообразующая активность в сочетании со стоп-окислительным эффектом, или способность к ограничительному накоплению кислых продуктов ферментации; сообщающих готовому продукту излишне кислый вкус;
- образование ароматических веществ;
- иммуномодулирующие свойства с помощью различных механизмов;
- способность образовывать супероксиддисмутазу;
- особенности протеолитических или липолитических свойств штаммов,
- кислото-, желче- и ферментативную устойчивость в требуемом диапазоне значений, характеризующим ЖКТ группы лиц, для которых пробиотик предназначен;
- возможность использования штаммов в консорциуме, без подавления, как друг друга, так и отсутствие угнетения индигенной нормобиоты человека;

– другие производственно-ценные свойства штаммов: фагоустойчивость, устойчивость в лиофилизированном виде, возможность капсулирования или «квазикапсулирования» как методы повышения выживаемости в ЖКТ и/или уменьшения возможных антагонистических взаимоотношений с индигенной нормобиотой у некоторых лиц;

– колонизационная резистентность (КР), или способность заселять (с некоторой степенью постоянства – аутохтонно) слои, прилежащие к клеткам ворсинок в дистальных отделах тонкого и толстого кишечника, участвуя в процессах пищеварения, детоксикации субстратов, обеспечивая питание клеток слизистой оболочки, препятствуя её заселению патогенной и условно-патогенной микрофлорой.

Известно, что аллохтонные микроорганизмы, не способные колонизировать кишечник, также могут оказывать некоторый пищеварительный, антагонистический, иммуногенный и др. пробиотические эффекты [3].

При отборе культур с несколькими названными качествами методом естественной селекции надземные части растений (стебли, листья, цветы), особенно прикорневая зона, является одним из объектов выделения молочнокислых бактерий, бифидобактерий, пропионовокислых культур и др.

При отборе образцов для выделения, исходит из следующего основного положения: эпифитная микрофлора культурных растений, ягод, овощей и фруктов представлена большим разнообразием видов и большей плотностью популяции (до 10^6 КОЕ/г), чем диких (до 10^3 КОЕ/г) [3].

Лучшим источником выделения новых штаммов естественной селекцией являются самоквасные кисломолочные продукты. В некоторых случаях ценные пробиотические штаммы получены естественной селекцией от биотопов здоровых особей (людей, животных).

Еще более гетерогенны по перечисленным свойствам культуры, отобранные индуцированной селекцией. Так, например, методами индуцированной селекции (которые не превращают микроорганизмы в ГМО, т. к. не используется межвидовой перенос генов) получали увеличение протеолитической активности в 2,5–4,6 раза, повышение кислотообразования в 3–4 раза, увеличение образования ароматических веществ (диацетила, ацетоина) в 2–5 раз [3].

К методам исследования безопасности пробиотических штаммов относят также изученный профиль внехромосомных элементов (плазмид, транспозонов, бактериофагов и др.). При наличии внехромосомных элементов должна быть охарактеризована и доказана их неспособность к генному трансферу и др. [5].

В последнее время для более четкой дифференцировки микроорганизмов на уровне рода и вида (подвида), когда биохимические и основанные на молекулярно-биологических подходы ПЦР-диагностики недостаточны, предлагают использовать, наряду с определением последовательностей нуклеотидов (секвенированием), многокоординатную таксономию. Более тонким методом оценки генетического сходства организмов является метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот, с помощью которого определяют число и степень сходства гомологичных участков в геномах сравниваемых видов [7].

Фагочипирование предложено нами, как дополнительный метод многоуровневой защиты ферментированного продукта от подделки.

Основные положения, характеризующие актуальность использования такого способа:

– многие виды сыров (кроме свежих) к концу своего созревания не содержат в своём составе исходные заквасочные микроорганизмы, которые можно бы было выделить, то же относится к термизованным продуктам;

– бактериофаг, как показали наши исследования, при 73 ± 1 в течение 20–30 с, так и при 65 ± 1 в течение 30 мин, в целом более жизнеспособен, по сравнению с заквасочной культурой и может быть, сравнительно чаще выделен из ферментированных продуктов;

– не имея лицензированных культур (из сыра с длительным сроком созревания их не выделить), бактериофаг к этим культурам поддельному производителю не размножить с целью имитации оригинального продукта;

– многие производители стартовых заквасочных культур определяют фаготип культур (рис. 1), из которых подбирают консорциумы для многоштабных производственных заквасок (бактериальных концентратов);

– многие производители стартовых заквасочных культур имеют коллекцию гомологичных коллекционным культурам бактериофагов, для которых периодически перепроверяют спектр литической активности.

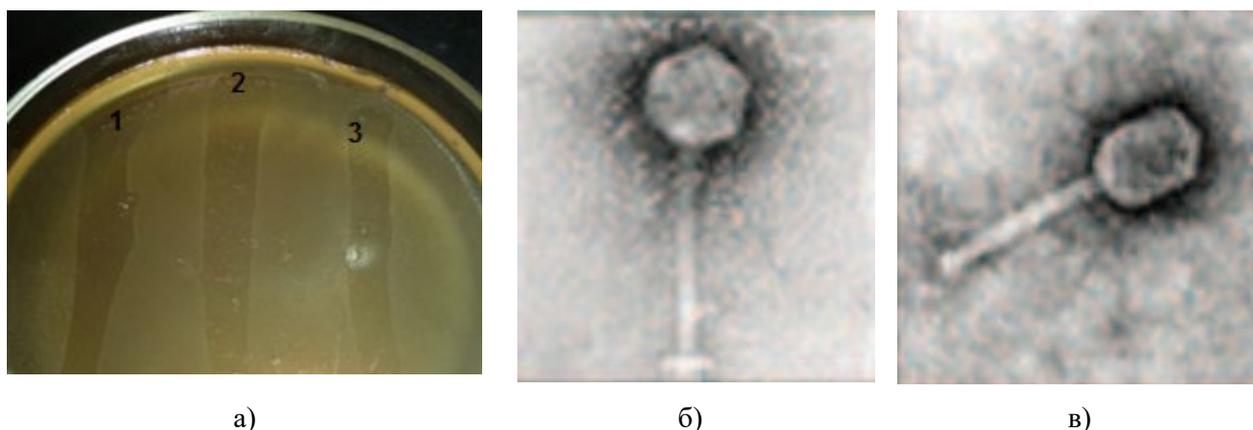


Рисунок 1. Бактериофаги заквасочных микроорганизмов: а) индикация чашечным методом, б) бактериофаг В1 типа, в) бактериофаг В2 типа (электронное фото: Смыков И.Т.)

Чип (гомологичный бактериофаг) к заквасочной культуре в данном случае не нужно вводить специально, это сделала природа. Для работы с бактериофагом, как вирусом, абсолютно безопасным для человека, и представляющим собой природный механизм обмена удачными «эволюционными находками» [1], не требуется аккредитация работающим с ним лаборатории, на том уровне, как для работы с патогенными микроорганизмами.

Развитие относительно недорогих методов ПЦР-диагностики, предполагающих амплификацию генетического материала, предрасполагает к последующей унификации этого метода (фагочипирования) для выявления в торговой сети продуктов-фальсификатов, в том числе для продуктов, не содержащих заквасочные культуры, но содержащих гомологичный к ним бактериофаг.

Предлагаем следующее определение фагочипирования заквасочных микроорганизмов:

Фагочипирование лицензионных стартовых заквасочных культур с целью идентификации ферментированных продуктов – подтверждение, что продукт произведён именно с данной лицензионной культурой на основе выделения бактериофага из продукта, исследования спектра его литической активности, возможно с последующим применением других методов идентификации: микрофотографирования (рис. 2), ПЦР и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agroscope создаёт ДНК швейцарских сыров <http://nashagazeta.ch/news/le-coin-du-gourmet/agroscope-sozdaet-dnk-shveycarskih-syrov>
2. Polyanskaya I, Semenikhina V, Popova V. QUASICAPSULATION OF PROBIOTICS // Journal of Hygienic Engineering and Design. – 2018. – Vol. 24, no. September. – P. 31–38. <http://jhed.mk/filemanager/JHED%20Vol.%2024/03.%20FPP/01.%20Full%20paper%20-%20Irina%20Polyanskaya.pdf>
3. Тераевич А.С., Полянская И.С., Корюкина М.В. Эффективные пробиотики в животноводстве. Подбор, получение и применение // Saarbrücken, – 2016. – P.
4. FUNCTIONAL FOOD PRODUCTS. CLASSIFICATION. Bio-elements in functional foods / I. Polyanskaya, A. Teraevich, P. Valentina et al. / *Journal of Hygienic Engineering and Design*. – 2017. – Vol. 21. – P. 70–76. <http://jhed.mk/filemanager/JHED%20Vol.%2021/03.%20FPP/05.%20Full%20paper%20-%20Irina%20Polyanskaya.pdf>
5. МУ 2.3.2.2789–10. 2.3.2. Продовольственное сырье и пищевые продукты. Методические указания, по санитарно-эпидемиологической оценке, безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. – Законодательство России, подп. Онищенко Г.Г. – 2010 г.
6. Лысак В.В. Микробиология: учеб. пособие / В.В. Лысак. – Минск БГУ. – 2007. – 426 с.