

УДК 637.5.039

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ В МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
ПЕРСПЕКТИВНОЙ СТАРТОВОЙ КУЛЬТУРЫ НА ОСНОВЕ КОСУРИА VARIANS****М.Ю. Минаев, Е.А. Коноров***ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова, Москва, Россия*

Современное производство сырокопченых / сыровяленых мясных изделий сложно представить без применения стартовых культур. Традиционные технологии естественной ферментации сырокопченых или сыровяленых колбас все больше уступают долю рынка ферментированным мясным изделиям. Основным требованием к стартовым культурам является их безусловная безопасность для человека. И это понятие безопасности более широкое нежели отсутствие патогенности или токсигенности.

Европейское Агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) постоянно обновляет перечень микроорганизмов, имеющих статус презумптивно безопасных – Qualified Presumption of Safety (QPS)» [1]. В этот список входят как целые группы микроорганизмов, например, молочнокислые бактерии (*Lactococcus* и *Lactobacillus*), бифидобактерии, так и отдельные виды микроорганизмов, например, *Corynebacterium glutamicum*. Это означает, что любой производитель стартовых культур может включать данный микроорганизм в состав своей стартовой культуры без проверки ее безопасности и регистрации. В этот список включены микроорганизмы, которые на уровне рода или семейства не имеют патогенных или условно-патогенных видов, что подтверждается историей их применения, а также виды микроорганизмов, которые признаны безопасными в определенной технологической цепочке, например, производство глутамата натрия. [2]

Тем не менее, в качестве стартовых культур используются не только сертифицированные как безусловно безопасные микроорганизмы. В 1955 г. финским ученым Niinivaara [3,4] была разработана научная теория введения в рецептуру микрококков и практического использования стартовых культур на их основе в мясной промышленности. Его исследования показали, что при традиционной технологии изготовления сырокопченых и сыровяленых мясных изделий микрококки играют определяющую роль в формировании характерного качества готового продукта.

Позднее, ряд разработчиков стартовых культур заменил микрококки на непатогенные коагулазоотрицательные стафилококки. Наиболее распространенным видом непатогенных стафилококков в составе стартовых культур стал *Staphylococcus carnosus*, а микрококков – *Micrococcus varians*. Несмотря на продолжительную историю их применения в качестве стартовой культуры для производства сырокопченых колбас, эти виды микроорганизмов не попали в список QPS (EFSA) и GRAS (FDA USA). Связано это с тем, что *Staphylococcus carnosus* практически единственный вид в своем роде не являющийся патогенным или условно-патогенным. В составе рода *Micrococcus* ныне *Kocuria*, имеется один вид, относящийся к эмерджентным патогенам, *Kocuria kristinae*.

С развитием методов высокопроизводительного секвенирования и функционального анализа данных полногеномного секвенирования появилась возможность быстро получать информацию о наличии в геноме микроорганизма потенциальных факторов патогенности, вирулентности и резистентности к антибиотикам, а также исследовать на основании сравнения с базами данных особенности метаболических путей микроорганизма, представляющих интерес для исследователя.

В 2009 г. был полностью секвенирован штамм *Staphylococcus carnosus* TM300 и только в 2015 г. в базе данных NCBI появился полностью аннотированный его геном (AM295250). В результате были обнаружены ряд генов гомологичных генам патогенности *S.aureus*, *S.epidermidis* и т. п. Наиболее высокая гомология была к генам гемолизина – Putative hemolysin (NC_002951) на 79 % и экзотоксина – Exotoxin (YP_040552). Были также обнаружены гены осмоотолерантности и активный ген орнитин декарбоксилазы, который может способствовать образованию таких биогенных аминов как путресцин и кадаверин. [5]

Цель работы – получение полногеномной последовательности микроорганизма *Kocuria varians* 80 и на этой основе изучение возможных рисков его применения в качестве стартовой культуры.

Культура микроорганизма

Штамм *Micrococcus/Kocuria varians* 80 был выделен в 1973 г. из сырокопченного продукта скиландис (Литовская ССР) и заложен в лабораторную коллекцию микроорганизмов. В 1997 г. он

вошел в состав бактериального препарата ПБ МП для производства сырокопченых и сыровяленых колбас, на что был получен Патент RU 2 091 486 C1.

Выделение ДНК, приготовление библиотек и полногеномное секвенирование

Бактериальная ДНК была выделена с помощью GBD набора (Биосилика, Россия). Для приготовления библиотек были использованы NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit для секвенирования на платформе Illumina HiSeq2500 и SMRTbell Template Prep Kit 1.0 для секвенирования на Pacific Biosciences. Всего было получено 2,1 (2x250 п.о.) миллиардов чтений Illumina HiSeq2500 и более 158 тыс. чтений PacBio (средняя длина прочтения 10 тыс. п.о.)

Сборка и аннотация генома

После обрезания ошибочных чтений (phred-оценка менее 20) и удаления адаптерных последовательностей с помощью Trimmomatic геном *K. varians* был собран с помощью SPAdes v3.11. Поиск генов в геноме производился с помощью prokka, каждый предсказанный ген был функционально аннотирован с помощью BLASTP (база данных nr), InterProScan и BLAST2GO. Для поиска факторов вирулентности использовался поиск BLASTP по базам данных VSFB и VirulenceFinder2.

В геноме изучаемого штамма *K. varians sensu auct. (K. salsicia)* штамма 80 есть все необходимые для метаболизма D-глюкозы ферменты гликолиза, как и в геноме другого штамма *K. salsicia*, выделенного на скотобойне в Дании, при этом в изначальном описании как *K. varians*, так и *K. salsicia* не отмечена метаболизация D-глюкозы (Yun J.H. et al. 2011, Hans-Jurgen Busse, 2012). Данные полногеномного секвенирования говорят о потенциальной возможности превращения D-сорбитола и D-маннозы-6-фосфат в D-фруктозу-6-фосфат, но отсутствует фермент маннокиназа и фермент, отвечающий за включение в метаболизм внеклеточной маннозы manXa, что согласуется с данными биохимического теста, в котором *K. varians sensu auct. (K. salsicia)* штамма 80 не проявляла метаболической активности по отношению к маннозе и манниту. При этом, исходя из описания биохимических свойств музейных штаммов, оба вида утилизируют D-маннозу до кислоты (Yun J.H. et al. 2011, Hans-Jurgen Busse, 2012). Также в геноме изученного штамма отсутствует гомолог инвертазы, что объясняет отсутствие роста на сахарозе, однако потенциально возможен гидролиз крахмала из-за наличия гомолога мальтазы-глюкоамилазы. В фосфотрансферазной системе бактерий отсутствуют ЕПСВ/ЕПСВА компоненты для всех сахаров (включая глюкозу), кроме фруктозы как в геноме штамма 80, так и в других геномах *K. salsicia*. Обнаружена также гомологичная последовательность гена орнитин декарбоксилазы, однако, биохимический тест с лизином и орнитином показал отрицательный результат, кДНК с этого гена также не удалось получить.

Таким образом, только полногеномное секвенирование промышленно ценных штаммов позволяет в полной мере оценить все возможные риски его применения, оценить его потенциальные возможности, снять разночтения по биохимическим свойствам штамма.

ЛИТЕРАТУРА

1. EU Regulation. EFSA Journal, 3 February 2020. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 11: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019
2. Багрянцева О.В., Шатров Г.Н. О необходимости внесения изменений в законодательство Евразийского Экономического Союза в области нормирования ферментных препаратов. Сборник научных трудов ГНУ ВНИИПБ «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов», 2014, С. 101–108.
3. Анисимова И.Г., Терешина О.В., Солодовникова Г.И., Лагода И.В. Использование методов биотехнологии при производстве сырокопченых полусухих колбас: Обзор. информ. – М.: АгроНИИТЭИММП, 1989. – 30 с.
4. Минаев М.Ю. Разработка бактериального препарата с денитрифицирующими свойствами и его применение в технологии мясных продуктов. Автореферат диссертации, 2006.
5. Ralf Rosenstein, 1 * Christiane Nerz, 1 Lalitha Biswas, 1 Alexandra Resch, 1 Guenter Raddatz, 2 Stephan C. Schuster, 3 and Friedrich Goetzl. Genome Analysis of the Meat Starter Culture Bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2009, p. 811–822 Vol. 75, No. 3 //doi:10.1128/AEM.01982–08
6. Yun J.H. et al. *Kocuria salsicia* sp. nov., isolated from salt-fermented seafood //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2011. – Т. 61. – №. 2. – С. 286–289.
7. Aidan Parte, William B. Whitman, Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Wolfgang Ludwig, Kenichiro Suzuki. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria, 2012