УДК 579.67

Нгуен Тхи Минь Кхань

НОВАЯ СТАРТОВАЯ КУЛЬТУРА ENTEROCCOCUS THAILANDICUS, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ НАЦИОНАЛЬНОЙ КОЛБАСЫ ВЬЕТНАМА «НЕМ-ЧУА»*

Штамм *Enteroccocus thailandicus* КПБ-2 был выделен из национальной ферментированной колбасы Вьетнама «Нем-Чуа». Идентификация штамма проводилась на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Штамм депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика под номером В-10684. Гены патогенности методом ПЦР-генотипирования штамма обнаружены не были. Результаты исследований фенотипических, молекулярно-генетических, технологических и пробиотических свойств позволили рекомендовать данный штамм в качестве стартовой культуры для мясной промышленности и пробиотика для пищевой биотехнологии.

Энтерококки, *Enteroccocus thailandicus*.

Введение

Одним из перспективных направлений на сегодняшний день является создание и использование для производства мясных изделий биологически активных веществ на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Активность большинства микроорганизмов обусловлена их основными свойствами: высокой приспособляемостью к меняющимся условиям жизни, способностью быстро размножаться и широким спектром возможных биохимических реакций. В качестве стартовых культур в основном используются денитрифицирующие микрококки, гомоферментативные молочнокислые бактерии и педиококки, дрожжи и нетипичные молочнокислые бактерии в виде чистых или смешанных культур. В настоящее время энтерококки рассматривают как стартовые культуры благодаря их большему потенциалу для применения в качестве пробиотиков, также в качестве стартовых культур при производстве ферментированных мясных продуктов. Но с другой стороны, ученые сталкиваются с проблемой пищевой безопасности микроорганизмов рода *Enterococcus* (наличие факторов патогенности как штаммоспецифический признак). В связи с этим целью работы было изучение свойств штамма рода *Enterococcus*, выделенного из национальной ферментированной колбасы «Нем-Чуа» (Вьетнам), для оценки возможности использования его в качестве стартовой культуры и пробиотика.

Энтерококки были отделены от стрептококков и выделены в самостоятельный род в 1984 г. Энтерококки входят в состав нормальной микрофлоры кишечника человека (в содержимом толстой кишки их концентрация достигает 10^6 КОЕ/г), они обнаруживаются у 90 % здоровых взрослых людей, а также у новорожденных как при естественном, так и при искусственном вскармливании [1].

В последние годы изучение энтерококков как биологических объектов и оценка их роли в физиологии и патологии человека чаще всего рассматриваются сквозь призму участия энтерококков в возникновении инфекционных заболеваний, количество которых постоянно нарастает. Однако односторонняя оценка микроорганизмов зачастую не позволяет объективно оценить их значение, так как многие из них являются составной частью нормальной микрофлоры и обязательными компонентами привычных пищевых продуктов [2].

Штаммы молочнокислых энтерококков в последнее время все чаще предлагается использовать в качестве пробиотиков для улучшения микробного баланса тонкого кишечника. Это связано с тем, что энтерококки в полной мере удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к пробиотикам, а именно принадлежат к микрофлоре здорового человека, устойчивы к воздействию высоких температур, отличаются поразительной выживаемостью в соляной кислоте желудочного сока, желчи двенадцатиперстной кишки, обладают устойчивостью к высоким концентрациям солей, повышают устойчивость к инфекционным заболеваниям, подавляют патогенные микроорганизмы, синтезируют витамины и понижают уровень холестерина в крови [1].

За счет своих высокотехнологических свойств, в том числе устойчивости к высоким температурам, низким значениям pH, высоким концентрациям NaCl, синтеза бактериоцинов и антагонизма к санитарно-показательной микрофлоре (штаммы энтерококков вырабатывают бактериальные антибиотики энтероцины, обладающие выраженной антагонистической активностью практически ко всем видам патогенных бактерий, дрожжей и вирусов), определенные штаммы энтерококков применяются в составе заквасок при изготовлении различных ферментированных продуктов питания, например таких, как салями, испанских сосисок, традиционных итальянских сыров, брынзы, чеддера, феты, китайской тофы, японской пасты мизо, малазийской национальной еды темпех, зеленых оливок и многих других пищевых продуктов [3].

* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ № МД-3302.2012.4.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования являлся штамм *Enterococcus thailandicus* КПБ-2, выделенный из национальной вьетнамской ферментированной колбасы «Нем-Чуа». Она изготовлена из нежирной свинины, специй, сахара, соли, нитрита натрия и т.д., которые смешиваются с вареной свиной шкурой, нарезанной на тонкие полоски. Фарш формируется в форме кубов (2×3×3 см) с тонкими ломтиками чеснока и черного перца горошком, используемых в качестве украшения и для аромата. Мясные кубики заворачивают в банановые листья, которые создают особый аромат, и затем обматывают шпагатом. Банановые листья, как правило, используются в качестве внешнего покрытия. Ферментация длится около 3–4 дней при температуре плюс 28–30 °С. Ферментация происходит за счет естественной микрофлоры, содержащейся в мясном сырье, и привнесенной с банановыми листьями [4, 5].

Для идентификации данного штамма были определены основные фенотипические признаки чистой культуры при использовании общепринятых в микробиологии методов анализа:

– морфологические свойства (культуральные свойства колоний, морфология клеток, окраска по Граму);

– физиолого-биохимические свойства (рост при различных значениях pH, температуры, наличие каталазы, пероксидазы, разжижение желатина, восстановление лакмусового молока, утилизация углеводов, образование индола, образование аммиака, чувствительность к антибиотикам);

– технологические свойства (активная и предельная кислотность в процессе сквашивания молока, время образования сгустка в молоке, устойчивость к разным концентрациям поваренной соли, денитрифицирующая способность).

Молекулярно-генетическая идентификация штамма базировалась на определении последовательностей информационного гена 16S рРНК. Выделение ДНК бактерий для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили согласно протоколу Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва). Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи гель-электрофореза.

Для определения присутствия в геноме исследуемого микроорганизма генов вирулентности использовали праймеры, представленные в в табл. 1.

Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол», Россия. Матрицей для ПЦР в данном исследовании служила ДНК бактериальных штаммов. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 % геле на основе трисборатного буфера и агарозы фирмы «Хеликон» (Россия) при напряженности электрического поля 15 В/см [1].

При определении пробиотических свойств штамма, обусловливающих их выживание в пищеварительном тракте организма человека, была изучена устойчивость штаммов к неблагоприятным факторам, созданным *in vitro* – к кислой (pH 3,9; 5,5) и щелочной (pH 8,3; 9,2) реакциям среды.

Таблица 1

Праймеры, используемые для выявления генов, ассоциированных с патогенностью энтерококков [2]

Название гена		Последовательность ДНК праймера (5'–3')	Размер ампликона (нп)
*gel*E	*gel*E 1	ACCCCGTATCATTGGTTT	419
	*gel*E 2	ACGCATTGCTTTTCCATC	
esp	*esp* 1	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933
	esp 2	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	
spr E	*spr* E 1	GCGTCAATCGGAAGAATCAT	233
	spr E 2	CGGGGAAAAAGCTACATCAA	
*fsr*B	*fsr*B 1	TTTATTGGTATGCGCCACAA	316
	*fsr*B 2	TCATCAGACCTTGGATGACG	
agg	*agg 1*	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1,553
	agg 2	AAACGGCAAGACAAGTAAATA	
cyl A	*cyl* A 1	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517
	cyl A 2	ACCCCGTATCATTGGTTT	

Было исследовано одно из важных свойств пробиотических микроорганизмов – адгезивность. Для изучения адгезивных свойств штамма *E. Thailandicus* КПБ-2 использовали линию клеток Caco-2 (эпителеподобные клетки аденокарценомы ободочной кишки человека) в монослое. Клеточную культуру выращивали на 6-луночном планшете в условиях 5 % CO_2 до образования монослоя в течение 5–7 суток. Образовавшийся монослой клеток Caco-2 инокулировали 1 мл бактериальной культуры определенной концентрации. После инокуляции культуры выдерживали в течение 1 ч при 37 °С, затем отмывали физраствором для удаления несвязанных бактериальных клеток. Снятие монослоя со связанными бактериальными клетками осуществлялось растворами Версена 0,02 % и трипсина 0,25 % в соотношении 3:1. Для подсчета связанных бактериальных клеток использовали метод разведений при выращивании клеток на плотной среде MRS. Адгезивные свойства микроорганизмов определяются по числу бактерий, связывающихся с 1000 клетками Caco-2: от 1010 до 3000 бактериальных клеток – высокоадгезивный штамм; от 210 до 1000 – среднеадгезивный; от 0 до 200 – низкоадгезивный [7].

Результаты и их обсуждение

Из колбасы «Нем-Чуа», изготовленной в условиях естественной ферментации мясного сырья, был выделен на среде MRS, предназначенной для культивирования молочнокислых микроорганизмов, штамм КПБ-2.

При изучении морфологических свойств штамма было установлено, что данный микроорганизм представляет собой клетки шаровидной или овальной формы диаметром 0,5–1 мкм, соединенные попарно или в короткие цепочки, грамположителен, неподвижен, спор и капсул не образует. В среде MRS через 24 ч образует сильное помутнение, исчезающее на 2 сут., и плотный белый трудноразбивающийся осадок. На плотных питательных средах образует мелкие колонии круглой формы с ровными краями и гладкой поверхностью молочного цвета диаметром 1–2 мм. Хорошо растет при pH 3,5–5,0 и в диапазоне температур 30–45 °С. Желатин не разжижает. Через 24 ч обесцвечивает лакмусовое молоко, образуя отдельный трубчатый сгусток. Способен сбраживать Д-глюкозу, Д-лактозу, Д-сахарозу, Д-фруктозу, Д-мальтозу. Каталазо- и пероксидазоотрицателен. Аммиак, сероводород и индол не образует. Титруемая кислотность на 1 сут. – 75 °Т, время образования сгустка – 24 ч, предельная кислотность на 7 сут. – 101 °Т. Растет на MRS-агаре + 2–8 % NaCl. Денитрифицирующей способностью не обладает (табл. 2).

С помощью дискодиффузионного метода определено отношение данного микроорганизма к антибиотикам разных групп. Установлено, что штамм проявляет природную устойчивость к клоксациллину, умеренно устойчив к эритромицину, ко-тримоксазолу. Природная устойчивость может быть полезной для стабилизации микрофлоры кишечника при проведении антибиотикотерапии. В то же время при рекомендации к использованию в пищевой промышленности штаммов молочнокислых микроорганизмов необходимо учитывать опасность переноса генов антибиотикоустойчивости от молочнокислых бактерий к патогенным микроорганизмам.

Результаты секвенирования вариабельных участков 16S рРНК позволили отнести изучаемый микроорганизм к виду *Enterococcus thailandicus*. При секвенировании вариабельных участков 16S рДНК получена следующая нуклеотидная последовательность для исследуемого штамма:

GTACGCTTTTTCTTTCACCGGAAGCTTGCTCCACC
GAAAGAAAAGGAGTTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCCATCAGAAAGGGGATAACACTTGGAAA
CAGGTGCTA.ATACCGTATTAACAATCGAAACCGCATG
GTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCACTGATGG
ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCCACG.ATGCATAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGA
CGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG
GTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACA
AGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG
CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AGAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACT
GGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTG
AGG.CTCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAAGGATTAGAT
ACCGCTGNTACGTCCACCGCACGTAGACCNGAATGAGG
TGCCTAAGTTGTTTGGA

Таблица 2

Фенотипические свойства штамма КПБ-2, выделенного из ферментированной колбасы «Нем-Чуа»

Признаки		Штамм *Enteroccocus thailandicus* КПБ-2
Морфологические свойства	Форма клеток под микроскопом	Шаровидная или овальная форма, клетки расположены по парам или цепочкам, размер клеток 0,6–0,8 × × 1,0–2,0 мкм
	Рост на MRS-агаре	Круглая форма колоний, ровный край, выпуклый рельеф, гладкая поверхность, кремово-белый цвет, однородная структура, пастообразная консистенция
	Рост на жидкой среде MRS	Мутный цвет среды
Физиолого-биохимические свойства	Рост при pH 3,5–5,0	++++
	Рост при pH 6,0–9,6	+
	Рост при температуре 30 °С	+
	Рост при температуре 45 °С	++++
	Тест на каталазу	± (возможна псевдокаталаза)
	Тест на активность пероксидазы	–
	Тест на разжижение желатина	–
	Отношение к лакмусовому молоку	Через 24 ч обесцвечивает лакмусовое молоко; образует отдельный трубчатый сгусток
	Утилизация углеводов Д-глюкоза Д-лактоза Д-мальтоза Д-фруктоза Д-сахароза	 ++ + + + +
	Образование индола	–
	Образование аммиака	–
Технологические свойства	Титрируемая кислотность, °Т	75 (24 ч – время образования сгустка)
	Предельная кислотность на 7 сут., °Т	101
	Рост при содержании NaCl 2–8 %	+
	Рост при содержании NaCl 10–15 %	–
	Денитрифицирующая способность	–

По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (рис. 1).

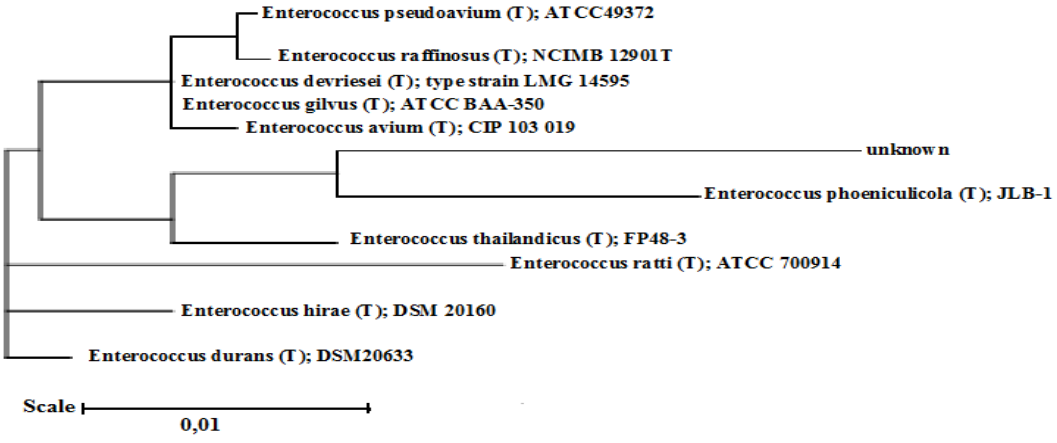

Рис. 1. Филогенетическое дерево штамма *Enterococcus thailandicus*: unknown – исследуемый штамм

Первичный скрининг по базе данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Lactobacillales*; *Enterococcaceae*; *Enterococcus*, причем гомология с некоторыми видами рода *Enterococcus* составляет 97,5 %.

По совокупности фенотипических (с учетом литературных данных [8]) и молекулярно-генетических свойств штамм был идентифицирован как *Enteroccocus thailandicus* и депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика как *Enteroccocus thailandicus* под номером В-10684.

Был проведен поиск генов, отвечающих за различные признаки патогенности энтерококков: прикрепление бактерий к поверхности эукариотической клетки (*agg*, 1553 п.н.); синтез токсина, обеспечивающего гемолиз эритроцитов (*gel*E, 419 п.н.); *spr*E (233 п.н.) – синтез сериновой протеиназы; *cyl*A (517 п.н.) – активация цитолизина; *esp* (933 п.н.) – внеклеточный поверхностный протеин; *fsr*B (316 п.н.) – феромон, способствующий конъюгативной передаче плазмидной ДНК от штамма к штамму. Для сравнения был взят штамм *Enterococcus faecalis* 55 (В-8652), у которого ранее в геноме были обнаружены гены вирулентности *gel*E и *agg*. Результаты показали отсутствие генов вирулентности в геноме исследуемого микроорганизма *Enterococcus thailandicus* КПБ-2 (рис. 2).

Как известно из литературных источников [3], у энтерококков, выделенных от больных, количество выявляемых детерминантов вирулентности существенно выше, чем у штаммов, выделенных из различных объектов внешней среды. Предположительно средой обитания исследуемого нами штамма является местная флора Вьетнама, в частности, листья банановых деревьев, которые используются при производстве ферментированной колбасы «Нем-Чуа». Для выживания в растительной среде обитания гены патогенности, позволяющие конкурировать с другими штаммами, не нужны.

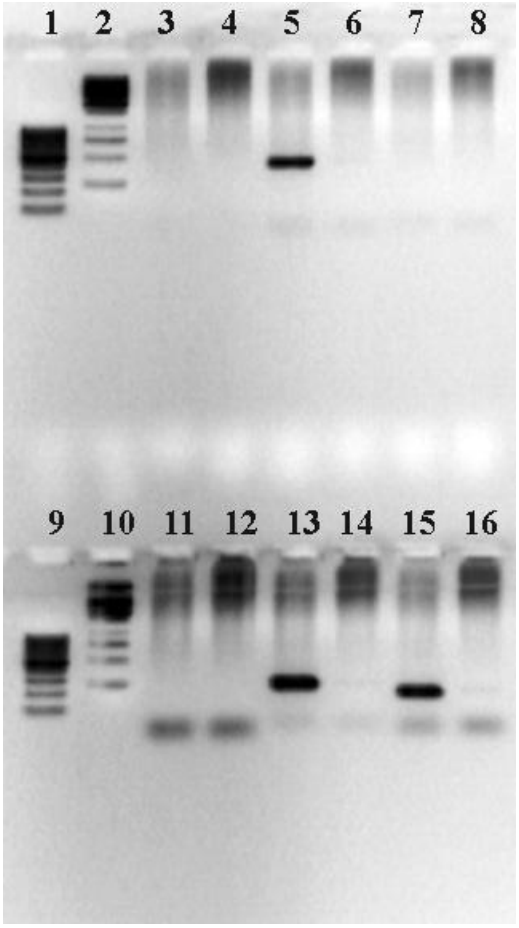

Рис. 2. Электрофорез фрагментов генов: 1 – маркер 100 bp DNA Ladder SM1143 (Fermentas); 2 – маркер 1 kb DNA Ladder SM 1163 (Fermerntas); 3 – *agg* (В-8652); 4 – *agg* (В-10684); 5 – *gelE* (В-8652); 6 – *gelE* (В-10684); 7 – *cylA* (В-8652); 8 – *cylA* (В-10684); 9 – маркер 100 bp DNA Ladder SM1143 (Fermentas); 10 – маркер 1 kb DNA Ladder SM 1163 (Fermentas); 11 – *esp* (В-8652); 12 – *esp* (В-10684); 13 – *sprE* (В-8652); 14 – *sprE* (В-10684); 15 – *fsrB* (В-8652); 16 – *fsrB* (В-10684)

При исследовании адгезивных свойств в качестве контроля был выбран штамм *Enterococcus faecalis* 55 (ВКПМ В-8652), в геноме которого обнаружен ген вирулентности *agg* (прикрепление бактерий к поверхности эукариотической клетки). Результаты исследования показали, что с 1000 клетками Caco-2 связывается 27×10^3 клеток *E. Thailandicus* КПБ-2 и 109×10^3 клеток *E. Faecalis* 55. Из этого следует, что *E. thailandicus* характеризуется высокоадгезивными свойствами, хотя ниже, чем у штамма *E. Faecalis*.

Выводы

1. По результатам изучения физиолого-биохимических свойств следует, что данный штамм относится к группе молочнокислых микроорганизмов, т.е. он способен сбраживать углеводы до молочной кислоты, поэтому мы можем использовать его в дальнейшем для производства кисломолочных и мясных ферментированных продуктов.

2. По технологическим свойствам установлено, что новый штамм *Enterococcus thailandicus* КПБ-2 является промышленно ценной стартовой культурой благодаря своей устойчивости к высоким концентрациям NaCl до 8 %, росту при температуре до 45 °С и в диапазоне pH от 3,5 до 9,6. Данный штамм имеет высокое значение кислотности (титрируемая кислотность – 75 ºТ, предельная кислотность – 101 ºТ), которое, помимо быстрых ферментативных свойств, обусловливает способность ингибировать рост патогенных микроорганизмов.

3. Результаты показали отсутствие генов вирулентности в геноме исследуемого микроорганизма *Enterococcus thailandicus* КПБ-2, что позволяет использовать его в качестве стартовой культуры и пробиотика. Применение данного подхода к изучению и отбору энтерококков позволяет создавать качественные и безопасные отечественные бактериальные препараты.

4. *E. Thailandicus* КПБ-2 имеет высокоадгезивную способность, которая является одним из важных свойств пробиотических штаммов.

По совокупности полученных результатов данный микроорганизм можно рекомендовать для использования в качестве стартовых культур и пробиотиков в пищевой биотехнологии, в частности, в молочной и мясной промышленности.

Список литературы

1. Машенцева, Н.Г. Функциональные стартовые культуры в мясной промышленности / Н.Г. Машенцева, В.В. Хорольский. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 108 с.
2. Бондаренко, В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов. – URL: http://medi.ru/
3. Суворов, А.Н. Энтерококки как пробиотики выбора / А.Н. Суворов, С.М. Захаренко, Г.Г. Алехина // Клиническое питание. – 2003. – № 1. – С. 26–29.
4. Чан, Тхи Со. Технологический проект традиционных мясных продуктов Вьетнама / Чан Тхи Со, Во Чьонг Тхасх. – Ханой: КН&КТ Ханой, 2001. – С. 1–18.
5. Ho, T.N.T. The impact of Lactobacillus brevis and Pediococcus pentosaceus on the sensorial quality of “nem chua” – a Vietnamese fermented meat product / T.N.T. Ho, N.T. Nguyen, A. Deschamps, A. Hadj Sassi, M. Urdaci and R. Caubet // International Food Research Journal. – 2009. – № 16. – P. 71–81.
6. Tracy, J. Eaton Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates / Tracy J. Eaton and Michael J. Gasson // Applied and Environmental Microbiology, Apr. 2001. – P. 1628–1635.
7. МУК 4.2.2602-10.4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. Методические указания.
8. Somboon, Tanasupawat. Enterococcus thailandicus sp.nov., isolated from fermented sausage (‘mum’) in Thailan / Somboon Tanasupawat, Sirapan Sukontasing, Jung-Sook Lee // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – № 58. – P. 1630–1634.

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств»,
109316, Россия, г. Москва, ул. Талалихина, 33.
Тел./факс: 8(495) 677-07-23
8(495) 677-03-90
e-mail: techmol@inbox.ru

SUMMARY

Nguyen Thi Minh Khanh

NEW STARTER CULTURE *ENTEROCCOCUS THAILANDICUS* ISOLATED FROM VIETNAMESE NATIONAL FERMENTED SOUR PORK ROLL “NEM CHUA”

The strain *Enteroccocus thailandicus* KPB-2 was isolated from the Vietnamese national fermented sour pork roll “Nem chua”. The strain was identified on the basis of the 16S rRNA nucleotide sequence analysis and deposited under number B-10684 in the Russian National Collection of Industrial Microorganisms of the State Research Institute of Ge-

netics and Selection of Industrial Microorganisms («Genetika»). Pathogenicity genes were not found using the method of PCR-based genotyping of the strain. The results of researches of phenotypic, molecular genetic, technologic and probiotic properties make it possible to recommend using this strain as a starter culture in meat industry and as a probiotic in food biotechnology.

Enterococci, *Enteroccocus thailandicus*.

Moscow State University of Food Production
33, Talalikhina street, Moscow, 109316, Russia
Phone/Fax: +7(495) 677-07-23
+7(495) 677-03-90
e-mail: techmol@inbox.ru