

УДК 578.81

О.І. Потемська,
О.В. Науменко,
канд. техн. наук,
Н.Ф. Кігель, д-р техн. наук
Національний університет
харових технологій

РОЗРОБКА РОТАЦІЙНОЇ АНТИФАГОВОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА РЯЖАНКИ

Розроблено ротаційну антифагову систему *S. thermophilus* для виробництва ряжанки. Проведено скринінг штамів *S. thermophilus* за маркером фагорезистентності до вірулентних фагів, виділених за промислових умов. Досліджено лізигенних стан бактерій з використанням техніки індукції хлороформом. Відібрано та запропоновано залучати до складу заквашувальних композицій для ряжанки у ротаціях фагостійкі штами *Streptococcus thermophilus*, які не містять індукцибельних профагів.

Ключові слова: бактеріофаги, фагорезистентність, лізогенність, фаговий контроль, ротація.

За останні роки вітчизняна молочна промисловість зіткнулася зі зростанням фагової проблеми, пов'язаної з ураженням бактерій виду *Streptococcus thermophilus*. Рідкість антифагових бар'єрів, як плазмідного так і хромосомного розташування, робить складнішим завдання розробки стратегій для фагового контролю у *S. thermophilus*. Загалом фаговий контроль полягає у застосуванні різних практичних засобів: удосконаленні санітарних умов (окремі приміщення, адекватна вентиляція і т.д.), розробці спеціальних середовищ для культивування закваски (наприклад, з агентами контролю фагів), використанні фагорезистентних культур тощо. Можливою альтернативою є перенесення антифагових механізмів *Lactococcus* у *S. thermophilus*. Так, нещодавно було продемонстровано експресію R/M системи *Lactococcus* у *S. thermophilus*. Ця генетична модифікація надає сильної резистентності проти двох основних груп фагів, які атакують *S. thermophilus*. Ще одним методом контролю бактеріофагів може бути заміна штамів *S. thermophilus* у заквашувальній композиції іншими молочнокислими бактеріями. Так, штами *Pediococcus*, генетично модифіковані для ферментації лактози, були запропоновані для заміни *S. thermophilus* (Патент США № 5677166) [4].

Розроблено антифагову стратегію, що базується на ротації ізогенних штамів. Вони створюються шляхом внесення різних антифагових систем (які кодуються плазмідами) у ті ж вихідні штами [5]. Присутня різноманітність антифагових бар'єрів серед ізогенних штамів має, теоретично, лімітувати небезпеку появи нових фагів, обмежити різноманітність фагової популяції на виробництві, чим забезпечить постійну якість продукту. Отже, ротаційні схеми, базовані на чергуванні механізмів фагостійкості в межах одного хазяїна — ще одна концепція, яку можна застосувати до програм селекції комерційних стартових культур.

Одним із поширеніших способів, які використовують для обмеження фагового розвитку на виробництві, є ротації заквашувальних штамів на основі їх фаговидової чутливості [3]. Труднощі ідентифікації істинних фагостійких штамів, поряд з нерівномірною ферментацією через варіативність цих штамів є проблемами, що асоційовані з ротаційними програмами. Використання великої кількості штамів також опосередковує виникнення гетерологічної фагової популяції.

© О.І. Потемська, О.В. Науменко, Н.Ф. Кігель, 2012

Оскільки багато фагів *S. thermophilus* має обмежене коло хазяїв, традиційні ротаційні системи заквасок та створення фагостійких мутантних штамів (коли це можливо) — є методами, що широко використовуються у біотехнологіях молочної промисловості.

Метою роботи було розробити ротаційну антифагову систему *S. thermophilus* для виробництва ряжанки.

Матеріали і методи: Виділення з природних джерел та титрування фагів проводили на твердому поживному середовищі — агаризованому гідролізованому молоці, використовуючи техніку двох шарів [2]. Проби обробляли хлороформом та центрифугували для вилучення білка та присутньої мікрофлори. Реєстрували наявність чи відсутність зон лізису тест-культури — так званих негативних колоній (НК). Визначення титру фагів проводили за кількістю негативних колоній у см³ та виражали у пляшкоутворювальних одиницях БУО/см³. Стійкість культур до бактеріофагів визначали шляхом нанесення лізатів бактеріофагів на чашку Петрі з твердим поживним середовищем на основі гідролізованого молока та досліджуваною культурою в логарифмічній фазі росту. Чутливими вважали ті штами, на газонах яких у місцях нанесення фаголізату спостерігали наявність зони лізису. Дослідження бактерій на лізогенність — шляхом обробки хлороформом (1:10) упродовж 30 хв. Оброблені клітини витримували у термостаті за 37 °С упродовж 1,5 год, потім вилучали бактеріальні клітини центрифугуванням і досліджували центрифугат на наявність фагів.

Результати та їх обговорення. Було проаналізовано 20 штамів молочнокислих бактерій *S. thermophilus* з колекції відділу біотехнології Технологічного інституту молока та м'яса НААН за фагостійкістю. Для визначення фагочутливості культур в роботі використовували 34 фагові ізоляти, з колекції промислових вірулентних фагів ТІММ.

Літичну активність фагів було підтверджено на індикаторних культурах, на бактеріальному газоні тест-культури у місці нанесення фаголізату утворювались характерні зони лізису, приклад (рис. 1). Титр фагів на відповідній тест-культурі становив не менше 10⁷ БУО/см³.

За результатами досліджень обраховували індекс фагочутливості культур, який відповідав частці бактеріофагів, які лізують даний штам.

Встановлено, що досліджувані штами *S. thermophilus* характеризувались різним ступенем фагочутливості.

Як показано у табл. 1, стійкими до фагів були 45 % від загальної кількості проаналізованих культур.

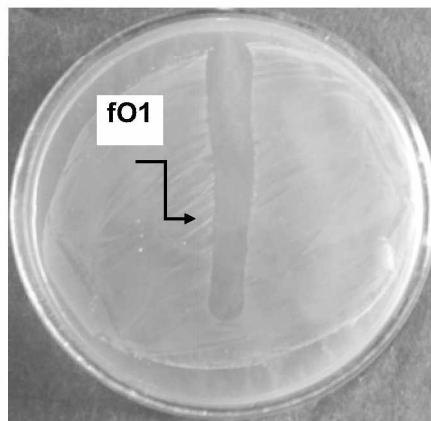


Рис. 1. Зона лізису *S. thermophilus* під впливом фага fO1 «метод збігаючої краплі»

Таблиця 1. Відбір фагостійких промислових штамів *S. thermophilus*

Група	Фаги вірулентні, шт.	Штами, % від заг.	Індекс фагочутливості, %
I	—	45	—
II	1	35	2,9
III	4	15	11,8
IV	6	5	17,6

Необхідно зауважити, що використання у виробництві штамів, які мають індекс фагочутливості більше 10 %, є недоцільним. Такі штами здатні підтримувати репродукцію великої кількості фагів і, таким чином, сприятимуть інфікуванню виробництва різними бактеріофагами. Вірогідність лізису цих штамів досить висока, оскільки вони є чутливими до значної кількості фагів. Крім того, всі штами з високим індексом фагочутливості подібні між собою за фаготипом. Тому заквашувальна культура, яка буде складатись із таких штамів, може бути лізована навіть одним бактеріофагом.

Отримані дані дозволили відібрати фагостійкі штами *S. thermophilus*. Для підтвердження цих результатів було проведено серію експериментів. Відібрані штами *S. thermophilus* інфікували видоспецифічними вірулентними фагами, що характеризувались високою інфекційністю. Досліджували динаміку росту штамів у знежиреному стерильному молоці з та без додавання фага. Контролем росту фагів слугували фагочутливі тест-культури *S. thermophilus*.

Встановлено, що упродовж культивування інфікованої тест-культури вміст гомологічного до неї фага поступово збільшувався і на 6 год його титр становив максимальне значення — $(8,6 \pm 0,5) \cdot 10^8$ БУО/ см³ (приклад, рис. 2).

Починаючи з 2,5-ої години ріст клітин припинявся і на 4 год після інфікування відбувався масованій лізис клітин фагочутливої культури. Таким чином було підтверджено високу ступінь інфекційності відібраних до колекції фагів.

Дослідження динаміки росту фагостійких штамів *S. thermophilus* (попередньо відібраних за фагостійкістю методом «збігаючої» краплі) показало, що навіть за умови враження тим чи іншим фагом вони розвивались поступово за класичними законами росту у періодичній культурі — тобто були дійсно фагорезистентними (див. рис. 2).

Другим етапом відбору штамів для ротації є встановлення лізогенного стану бактерій, оскільки такі культури є потенційно небезпечними для застосування у біотехнологіях кисломолочних продуктів. Відомо, що хлороформ руйнує оболонки клітин, це в свою чергу сприяє вивільненню профагів. Тому наявність лізогенного стану лактобактерій досліджували, застосовуючи техніку індукції хлороформом.

Встановлено, що 16 % від загальної кількості проаналізованих штамів за такої обробки вивільняли профаги (табл. 2).

Аналогічні результати отримано іншими науковцями [1], лізогенний стан було встановлено у 20 % досліджених штамів лактобактерій після обробки їх хлороформом.

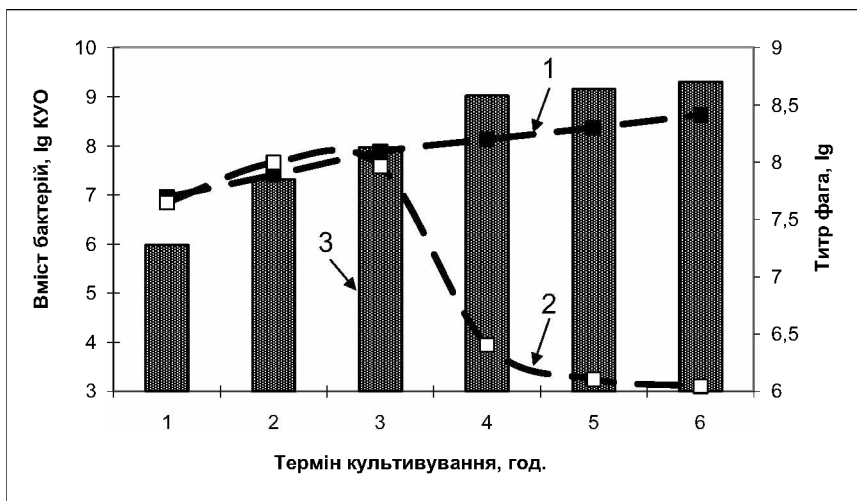


Рис. 2. Динаміка вмісту фагостійкої, фагочутливої (тест-культури) культури, фага
1 — досліджувана культура; 2 — тест-культура; 3 — титр фага на тест-культурі

ПРОЦЕСИ ТА АПАРАТИ ХАРЧОВИХ ВИРОБНИЦТВ

Виявлення лізогенних бактерій має дуже важливе значення. Якщо до складу комплексної заквашувальної культури входить лізогенний штам, то ймовірність того, що вивільнені ним профаги будуть інфікувати той чи інший чутливий до них штам закваски є дуже високою. У результаті буде порушено співвідношення між компонентами закваски, або взагалі втрачено якусь чутливу культуру, і, як наслідок, ферментаційний процес буде мати неконтрольований характер. Тому такі лізогенні штамми лактобактерій рекомендовано вилучати з ротаційних програм. Крім того нами встановлено, що нелізогенні культури не завжди є стійкими до фагів (див. табл. 2).

Таблиця 2. Відбір промислових штамів *S. thermophilus* за лізогенністю та спектром фагостійкості

№ штаму	Лізогенний статус*	Стійкість до бактеріофагу**							
		4Ф	5Ф	6Ф	7Ф	8Ф	9Ф	12Ф	16Ф
2177	нл	+	+	+	+	+	-	+	+
2103	нл	+	+	+	+	+	-	+	+
2163	нл	+	+	+	-	-	-	-	нд
2171	нл	+	+	+	+	+	-	+	+
2138	нл	+	+	+	+	+	+	+	+
2170	л	+	+	+	-	-	-	-	нд
2164	нл	+	+	+	-	-	-	-	нд
2100	л	-	нд	-	нд	-	-	нд	нд
2102	л	-	нд	-	нд	-	-	-	-
2196	нл	+	+	+	+	+	-	+	+
2168	нл	+	+	+	+	+	+	+	+
2169	нл	+	+	+	+	+	-	+	+
2161	нл	+	+	+	+	+	-	+	+
381	нл	+	+	+	+	+	+	+	+
2120	нл	+	+	+	+	+	+	+	+
2178	нл	+	+	+	+	+	+	+	+
2193	нл	+	+	+	+	+	+	+	+
2192	нл	+	+	+	+	+	+	+	+
2184	нл	+	+	+	+	+	-	+	+
2185	нл	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки. * нл- нелізогенна культура; л- лізогенна культура; ** + — фагостійка культура, — чутлива до бактеріофага.

Висновки. Розроблено ротаційну антифагову систему *S. thermophilus* для виробництва ряжанки, яка передбачає:

- скринінг штамів *S. thermophilus* за маркерами фагорезистентності до вірулентних фагів, виділених за промислових умов. Використання у складі заквашувальних культур таких фагорезистентних штамів дозволяє стабілізувати молочно-кислий процес і в значній мірі знизити вірогідність фаголізу навіть в умовах фагової інфекції.

- застосування принципу залучення штамів із різним фаготипом: необхідно враховувати специфічність впливу фагу і створювати заквашувальні культури таким чином, щоб у разі інфікування одного штаму, процес ферментації не сповільнювався за рахунок розвитку інших штамів — стійких до цього фагу.

- виявлення лізогенного стану штамів *S. thermophilus*. Рекомендовано залучати до заквашувальних культур нелізогенні штамми, тобто які не містять помірні фаги

(профаги можуть за певних умов переходити до літичного циклу розвитку та інфікувати інші штами закваски).

ЛІТЕРАТУРА

1. Davidson B.E., Powell I.B., Hillier A.J. Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria // FEMS Microbiol. Rev. — 1990. — 87, N1. — P. 79—90.
2. Everson T.C. Control of phage in dairy plant // Bull. IDF. — 1991. — 263. — P. 24—28.
3. Klaenhammer T.R., Sing W. D., Hill C.J. Phage defense rotation strategy // North Carolina State University. Pat. № US — 5593885 — надрук. 14.01.1997.
4. Moineau S. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria // Antonie van Leeuwenhoek. — 1999. — 76. — P. 377—382.
5. Sing W.D., Klaenhammer T.R. A strategy for rotation of different bacteriophage defenses in a lactococcal single-strain starter culture system // Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — 59. — P. 365—372.

*О.И. Потемская, О.В. Науменко,
Н.Ф. Кизель*

Разработка ротационной антифаговой системы для производства ряженки

*Разработана ротационная антифаговая система *S. thermophilus* для производства ряженки. Проведен скрининг штаммов *S. thermophilus* по маркеру фагоустойчивости к вирулентным фагам, выделенным в промышленных условиях. Изучено лизогенное состояние бактерий с использованием техники индукции хлороформом. Отобрано и рекомендовано вводить в склад заквасочных композиций для ряженки в ротациях фагоустойчивые штаммы *Streptococcus thermophilus*, которые не содержат индуцибельных профагов.*

Ключевые слова: бактериофаги, фагоустойчивость, лизогенность, фаговый контроль, ротация.

*O. Potemskya, O. Naumenko,
N. Kigel*

Development of rotational antiphage system for production of ryazhanka

*Rotational anti-phage system *S. thermophilus* for the production of ryazhenka (sour milk) is developed. A screening of *S. thermophilus* strains is done by the marker of phage-resistance to virulent phages, selected in an industrial environment. Lysogenic state of bacteria is studied using the technique of induction with chloroform. It is selected and suggested to attract to starter cultures composition for ryazhanka in rotations phage-resistant strains of *Streptococcus thermophilus*, which do not contain inducible prophages.*

Key words: bacteriophages, phage-resistant, lysogenes, rotational.

e-mail: jimp@ukr.net

Надійшла до редколегії 16.04.2012 р.