

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2371>
<https://elibrary.ru/VKFRCF>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Исследование бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии



В. И. Ганина^{1,*}, Н. Г. Машенцева², И. И. Ионова²

¹ Московский государственный университет технологий и управления им. К. Г. Разумовского
(Первый казачий университет), Москва, Россия

² Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Поступила в редакцию: 04.05.2022
Принята после рецензирования: 30.05.2022
Принята в печать: 14.06.2022

*В. И. Ганина: vigan5428@yandex.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-3119-7016>
Н. Г. Машенцева: <https://orcid.org/0000-0002-9287-0585>
И. И. Ионова: <https://orcid.org/0000-0002-3118-3554>

© В. И. Ганина, Н. Г. Машенцева, И. И. Ионова, 2022



Аннотация.

Явление бактериофагии на пищевых производствах приводит к нарушению биотехнологического процесса ферментированных видов продукции и резкому ухудшению ее качества, а также к экономическим потерям. Цель исследования – изучение биоразнообразия и эволюции свойств бактериофагов, способных лизировать молочнокислые бактерии и применяемых в биотехнологии ферментированных видов молочной и мясной продукции.

Исследовались образцы молочной и мясной продукции и бактериофаги, выделенные из них. Образцы отбирались на предприятиях, где выявлены случаи торможения процессов ферментации сырья. В работе использовали микробиологические, органолептические, физико-химические, генетические и математические методы исследования, а также методы электронной микроскопии и оптической реассоциации.

Анализ результатов свидетельствует о наличии бактериофагов в продукции с нарушением технологии процесса ферментации. Из исследованных образцов кисломолочных продуктов, творожной сыворотки, сыровяленых и сырокопченых колбас выделено 20 бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии рода *Lactococcus* ssp., 11 – *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 5 – *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Изучено разнообразие выделенных бактериофагов и их молекулярно-биологические характеристики. Определены титр и диапазон новых хозяев. Выявлены отличия вновь выделенных бактериофагов от коллекционных. Установлено, что бактериофаги могут поражать широкий круг молочнокислых бактерий.

Установлено изменение биоразнообразия и эволюции бактериофагов за счет расширения спектра их литического действия и вирулентности, независимо от питательной среды (молочное или мясное сырье), в которой они могут лизировать молочнокислые бактерии. Расширена коллекция бактериофагов и линейка тест-культур для их выявления. Полученные результаты позволят достоверно выявлять бактериофаги на ранних стадиях их развития в ферментированных видах продукции и своевременно осуществлять корректирующие мероприятия.

Ключевые слова. Бактериофаги, лизис, молочнокислые бактерии, закваски, стартовые культуры, ферментированные продукты

Для цитирования: Ганина В. И., Машенцева Н. Г., Ионова И. И. Исследование бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 2. С. 361–374. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2371>

Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria

Vera I. Ganina^{1,*}, Natalia G. Mashentseva², Inna I. Ionova²

¹ K.G. Razumovsky Moscow State University of Technology and Management
(the First Cossack University), Moscow, Russia

² Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia

Received: 04.05.2022
Revised: 30.05.2022
Accepted: 14.06.2022

*Vera I. Ganina: vigan5428@yandex.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-3119-7016>
Natalia G. Mashentseva: <https://orcid.org/0000-0002-9287-0585>
Inna I. Ionova: <https://orcid.org/0000-0002-3118-3554>

© V.I. Ganina, N.G. Mashentseva, I.I. Ionova, 2022



Abstract.

Bacteriophages harm food production, disrupt fermenting, spoil dairy products, and cause financial loss. The article describes the biodiversity and properties of bacteriophages capable of lysing lactic acid bacteria used in fermented dairy and meat products. The research featured bacteriophages obtained from fermented meat and dairy products. The methods included microbiological analyses, sensory evaluation, physico-chemical tests, genetic studies, electron microscopy, optical reassociation, and mathematical data processing.

Violation of the fermentation process always resulted in bacteriophages in the finished products, e.g., fermented dairy products, curd whey, raw smoked and dry-cured sausages, etc. The list of bacteriophages of lactic acid bacteria included 20 bacteriophages of *Lactococcus* ssp., 11 – of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, and 5 – of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The study revealed the diversity of the isolated bacteriophages, their molecular and biological profile, the titer and range of their new hosts, and the differences from standard ones. The bacteriophages proved to be able to infect a wider range of lactic acid bacteria.

The article describes the change in the biodiversity and evolution of bacteriophages depending on their lytic action and virulence. The improved collection of bacteriophages and their detection cultures contribute to an earlier and more effective identification of bacteriophages in fermented products.

Keywords. Bacteriophages, lysis, lactic acid bacteria, starter cultures, fermented products

For citation: Ganina VI, Mashentseva NG, Ionova II. Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(2):361–374. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2371>

Введение

Ферментированные виды пищевой продукции (кисломолочные продукты, сыры, сырокопченые колбасы и др.) играют важную роль в питании населения, оказывают положительное влияние на организм человека и пользуются популярностью у многих людей [1–8]. Производство качественной и безопасной продукции – важнейшая задача пищевых предприятий. Однако на предприятиях могут возникать факторы, приводящие к нарушению биотехнологического процесса ферментированной продукции и увеличивающие риск снижения ее качества. К важнейшим микробиологическим причинам, влияющим на процесс ферментации сырья, относят лизис бактериофагами молочно-

кислых бактерий, которые входят в состав заквасок для кисломолочной продукции и стартовых культур для колбас.

Бактериофаги широко распространены в природе и заражают все формы жизни: от прокариот до эукариот. Ферментация пищевых продуктов осуществляется микробными консорциумами в высоком титре, которые представляют собой резервуар для развития бактериофагов, поражающих микроорганизмы [9]. Исследования ученых показали наличие вирусов, поражающих бактерии, во многих ферментированных пищевых продуктах, включая сыры, йогурт и другие кисломолочные продукты, закваску и мясо. Бактериофаги наносят вред производству, т. к. снижают ферментативную способность молочнокислых бактерий. Это приводит

к замедлению, а иногда к полной остановке процесса ферментации и выработке нестандартной продукции.

Разнообразие бактериофагов в ферментированных пищевых продуктах варьируется в зависимости от географии, климата, окружающей среды, типа сырья, технологии, оборудования и микробного состава стартовых культур [10]. Бактериофаги можно обнаружить у разных хозяев. Они имеют небольшие размеры (изометрические головки обычно имеют диаметр 45–170 нм) и состоят из одного типа нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК, одно- или двунитевые), защищенной белком или липопротеиновым капсидом [11]. Пути заражения молочнокислых бактерий бактериофагами исследуются и считаются основной причиной нарушения ферментации в биотехнологии молочной и мясной продукции.

Представители родов *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и др. используются в ферментированных продуктах [9, 12]. Молочнокислые бактерии могут предотвращать инвазию бактериофагов путем развития систем устойчивости к ним или она может быть генетически сконструирована. Наличие бактериофагов в микробных культурах недостаточно для воздействия на процессы ферментации. Это зависит от микробного состава закваски или стартовой культуры: чем разнообразнее микрофлора, тем меньше вероятность остановки процесса ферментации. Объясняется это тем, что бактерии имеют разный уровень и специфическую чувствительность к бактериофагам, которые способны поражать гомологичные им бактерии. При нападении бактериофагов на клетки некоторые бактерии оказываются устойчивыми и осуществляют ферментацию пищевого сырья. Помимо этого, контаминация связана с консистенцией пищевой матрицы, в которой жидкие пищевые среды более восприимчивы к быстрому распространению бактериофагов, чем твердые или полутвердые. Некоторые ученые полагают, что твердое состояние мяса в салями является ключевым фактором снижения возможности возникновения атак бактериофагами [13].

Присутствие бактериофагов в ферментированных пищевых продуктах традиционно изучается культуральными методами. Развитие молекулярных методов и появление секвенирования нового поколения (NGS) позволяют выявлять разнообразие бактериофагов, присутствующих в ферментированных пищевых продуктах. Применение современных молекулярно-генетических методов позволяет успешно характеризовать бактериофаги, лизирующие молочнокислые бактерии [14–17].

Увеличение производственных мощностей по переработке сырья и ассортимента продукции обостряет проблему бактериофагии, поскольку расширяется линейка применяемых заквасок и стартовых культур различного микробиологичес-

кого состава. Микрофлора заквасок и стартовых культур разнообразна и зависит от продукции, в биотехнологии которой она применяется. Наиболее широко в биотехнологии ферментированных видов молочной продукции применяют молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* (*lactis*, *cremoris*, *diacetylactis*), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus* (*acidophilus*, *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *plantarum*, *helveticus*), а в биотехнологии сыровяленых и сырокопченых колбас – *L. acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactilactobacillus* (*curvatus*, *sakei*), *Lacticaseibacillus* (*paracasei*, *rhamnosus*), *Limosilactobacillus fermentum*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Levilactobacillus brevis*, *Pediococcus* (*acidilactici*, *pentosaceus*), денитрифицирующие, грамположительные и каталазо-положительные кокки *Staphylococcus* (*xylosum*, *carnosum*) и др. Роль микрофлоры в биотехнологии ферментированных видов продукции велика: синтез ферментов, участвующих в биохимических процессах и приводящих к формированию физико-химических, органолептических и микробиологических показателей; ингибирование развития технически вредной, патогенной и условно-патогенной микрофлоры; синтез витаминов, бактериоцинов, полисахаридов и других биологически активных веществ; повышение пищевой ценности [18, 19]. Штаммы молочнокислых бактерий, входящие в состав заквасок и стартовых культур, на производстве подвергаются действию бактериофагов. От устойчивости заквасок и стартовых культур к бактериофагам, присутствующим в биотехнологическом цикле конкретного продукта и на определенном предприятии, зависит качество и безопасность готового продукта.

Проблема бактериофагии известна и изучается давно, но полностью ее решить в биотехнологии ферментированных видов продукции не удастся [20–22]. Это обусловлено изменчивостью бактериофагов при действии различных факторов, что диктует необходимость постоянного мониторинга и изучения их свойств [23–25]. На предприятиях России большинство не имеет возможности и не осуществляет мониторинг бактериофагов в ходе производства продукции с применением заквасок и стартовых культур. Это обуславливает необходимость фагового мониторинга другими организациями.

Для снижения возникновения рисков фаговых атак в биотехнологии ферментированных видов молочной и мясной продукции была поставлена цель изучения биоразнообразия и эволюции свойств бактериофагов, способных лизировать молочнокислые бактерии, которые входят в состав заквасок и стартовых культур.

Научная новизна полученных результатов заключается в установлении изменения биоразнообразия и эволюции бактериофагов за счет расширения спектра их литического действия и

вирулентности, независимо от питательной среды (молочное или мясное сырье), в которой они могут лизировать молочнокислые бактерии. Практическая значимость исследования состоит в расширении коллекции бактериофагов, которая необходима при создании заквасок и стартовых культур с высокой фагоустойчивостью для получения ферментированных видов молочной и мясной продукции.

Результаты исследования позволили увеличить линейку тест-культур, используемых для обнаружения бактериофагов в биотехнологии ферментированных видов молочной и мясной продукции. Это будет способствовать выявлению бактериофагов на ранних этапах их накопления в пищевых системах и своевременному принятию и выполнению корректирующих мероприятий, обеспечивающих выпуск продукции с требуемыми показателями качества и безопасности.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись образцы кисломолочной продукции и молочной сыворотки, отобранные на предприятиях, на которых отмечались случаи торможения процессов ферментации; бактериофаги, выделенные из ферментированных видов молочной и мясной продукции и молочной сыворотки. В работе для выявления бактериофагов в кисломолочных продуктах и молочной сыворотке использовали следующие тест-культуры: АТСС 11454 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), ВКПМ В 4461 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), 6 штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* – 15, Л102, Л36с, Л18М, ЛА-2, ЛА-Е2 и 3 штамма *L. lactis* subsp. *cremoris* – К 52, КН-98, КН-96; АТСС 19258 и 7 штаммов *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* – СТ138, СТ9, СТ14, СТ132, Т24, ТР20, Т48; *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ-9644 (штамм АСТ-41), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ВКПМ-8554 (штамм БГ-Г), а также культуры *L. acidophilus* (штаммы АЕ-5, АД-3, БВ-7, Б-259) и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (штамм Б-ЛГ) из коллекции МГУПП.

Исследования фильтратов, полученных из сыровяленых полусухих и сырокопченых колбас, проводили с применением тест-культур *L. acidophilus* АСТ-41 (ВКПМ-9644), *Lactiplantibacillus plantarum* ssp. *plantarum* ГВИ-16 (ВКПМ-855) и культур из коллекции МГУПП: *Lacticaseibacillus paracasei* LC-3, *L. acidophilus* АЕ-5, АД-3, БВ-7, Б-259, *L. plantarum* ssp. *plantarum* 7К (В-2663), *Latilactobacillus curvatus* (В-8889), *Latilactobacillus sakei* ssp. *sakei* 104 (В-8936), *Lacticaseibacillus casei* 10 (В-8890), *Pediococcus acidilactici* 38 (В-8902), *Pediococcus pentosaceus* 28 (В-8888) и *Staphylococcus carnosus* 108 (В-8953).

Вновь выделенные бактериофаги сравнивали с коллекционными бактериофагами: ВКПМ Ph-1624, ВКПМ Ph-1625, ВКПМ Ph-1623 и ВКПМ Ph-1622, которые ранее были выделены и изучены в МГУПП

с последующим депонированием во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), а также с бактериофагами Р001, Р008, Р335 (из международной коллекции Тойбера, Германия) и бактериофагом Т4 *Escherichia coli*, предоставленными БРЦ ВКПМ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Для выявления наличия бактериофагов в исследуемых образцах применяли метод поверхностного посева на чашки Петри. На чашки Петри с подсушенной средой наносили 0,1 см³ коллекционной тест-культуры в фазе логарифмического роста, которая развивалась на среде М17 с лактозой (HiMedia, Индия), растирали на поверхности чашки шпателем Дригальского и оставляли на 10–15 мин для впитывания влаги в агар. Затем на чашку наносили каплю образца, закрывали крышкой и оставляли на 10–15 мин при комнатной температуре. После чего чашки переворачивали и термостатировали в течение 16–18 ч при температуре 28 ± 1 °С при выявлении бактериофагов лактококков и при 37 ± 1 °С при выявлении бактериофагов, лизирующих термофильные молочнокислые стрептококки и палочки. Если после указанного времени термостатирования наблюдали зону угнетения роста (образование прозрачных зон лизиса) в месте нанесения исследуемого образца, то устанавливали перевиваемость литического агента. Для этого в пробирку с 3 см³ стерильного физиологического раствора помещали кусочек агара, взятый из зоны лизиса, добавляли 0,3 см³ хлороформа, тщательно взбалтывали и оставляли на 24 ч при температуре 4 ± 2 °С для более полного выхода частиц фага из агара. Затем каплю суспензии из пробирки наносили на свежеприготовленный газон тест-культуры и термостатировали 16–18 ч. В случае появления негативной (прозрачной) зоны считали, что угнетение роста культуры вызвано действием бактериофага.

Для получения генетически чистого бактериофага титровали выделенные из промышленных образцов смеси бактериофагов. Далее добавляли 1 см³ бактериальной культуры к 3 см³ полужидкого агара и выливали суспензию в мягком агаре на чашку с плотной питательной средой. Затем погружали прямую стерильную проволоку в препарат бактериофага, полученный из отдельной блешки, и осторожно наносили штрихи на поверхности застывшей агаризованной среды. Переворачивали чашки и инкубировали при оптимальной температуре в течение 16–18 ч. После получения полос лизиса бактериальных культур кусочки агара вырезали при помощи шпателя из зоны лизиса, не затрагивая бактериальные клетки. Вносили его в 100 мкл дистиллированной воды, далее вносили 0,1 см³ хлороформа, перемешивали с помощью смесителя

Vortex и оставляли при 4 ± 1 °С на ночь для более полного выхода фаговых частиц.

Для накопления бактериофагов в 10 см^3 среды М17 с лактозой вносили 1–2 петли чувствительной культуры (КОЕ 10^8 – 10^9 в 1 см^3) и термостатировали до получения культуры в фазе логарифмического роста. Затем в эту же пробирку вносили кусочек агара с зоной лизиса либо $0,1 \text{ см}^3$ лизата бактериофага (10^8 БОЕ в 1 см^3) и термостатировали в течение 16–18 ч при температуре 28 ± 1 °С при накоплении бактериофагов лактококков и при 37 ± 1 °С при накоплении бактериофагов, лизирующих термофильные молочнокислые стрептококки и палочки. Фильтровали через установку Стерифил 250 с фильтром (размер пор $0,46 \text{ мкм}$). Полученные лизаты переносили в стерильные пробирки.

Для количественного учета бактериофагов использовали метод определения титра фага (двухслойный метод). Для этого 3 см^3 полужидкой среды (0,75 %), 1 см^3 тест-культуры в фазе логарифмического роста и 1 см^3 разведения фага перемешивали при 42 °С. Затем выливали на чашку Петри с подсушенной плотной питательной средой (1,5 %). Термостатировали в течение 16–18 ч при температуре 28 ± 1 °С при выявлении бактериофагов лактококков и при 37 ± 1 °С при выявлении бактериофагов, лизирующих термофильные молочнокислые стрептококки и палочки. На следующий день по числу негативных колоний с учетом разведений определяли титр бактериофага [26, 27].

Диапазон хозяев для выделенных бактериофагов определяли путем нанесения их лизатов с помощью репликатора на агаризованную среду (М17 с лактозой) с газонем предполагаемого штамма-хозяина в фазе логарифмического роста. Стандартной мерой служили лизаты бактериофагов, титр которых составлял не менее 10^8 БОЕ/ см^3 . Количество клеток штамма-хозяина составляло 10^8 – 10^9 КОЕ в 1 см^3 . Посевы термостатировали в течение 16–18 ч при температуре 28 ± 1 °С для молочнокислых бактерий рода *Lactococcus* и при 37 ± 1 °С для *S. salivarius* subsp. *thermophilus* и *Lactobacillus* spp.

Генетические исследования (выделение ДНК и плазмидной ДНК, их рестрикция и гибридизация при определении гомологии) осуществляли общеизвестными методами [28–31]. В исследованиях использовали ферменты производства «Fermentas», Литва, химические реактивы – «Sigma-Aldrich», США. Рестрикцию плазмидной ДНК проводили, используя ферменты рестрикции производства «Fermentas». Фрагменты плазмиды анализировали путем электрофореза в агарозном геле.

Конъюгативный перенос ДНК проводили следующим образом. Ночные культуры донора и реципиента разводили, выращивали до середины логарифмической фазы роста и смешивали в

отношении 1:2. $0,2 \text{ см}^3$ смеси высевали на поверхность чашки с питательным агаром. Чашки инкубировали при температуре 30 °С в течение 18–20 ч. После этого материал, выросший на чашке, ресуспендировали в 1 см^3 жидкой питательной среды. Различные разведения высевали на селективные среды.

Элюирование плазмидной ДНК с ДЭА7-мембраны проводили следующим образом. Полоску мембраны помещали в пробирку Эппендорф, добавляли 150–250 мкл буфера (1 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 20 М трис, рН 8,0), чтобы вся полоска была покрыта буфером, и центрифугировали 5 с. Затем инкубировали 45 мин при температуре 65 °С. После чего полоску промывали еще раз в 50 мкл буфера. Чтобы удалить бромистый этидий, надо экстрагировать его тремя объемами водонасыщенного изобутанола, высадить ДНК 2,5 объемами этанола (5 ч при 20 °С) и переосадить с 3 М ацетатом натрия для удаления остатков NaCl.

Дополнительно определяли уровень гомологии ДНК методом оптической реассоциации. Биомассу осаждали центрифугированием с последующим двукратным промыванием раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 0,1 М Na ЭДТА. Выделение ДНК проводили по методу Мармура с модификациями, включающими обработку ДНК проназой после воздействия РНКазой А и центрифугирование очищенных препаратов. Промытую биомассу переводили в буфер для лизиса, который проводили путем добавления яичного лизоцима («Serva», Германия) с последующей инкубацией при 37 °С в течение 1 ч и внесением 1 % додецилсульфата натрия. Перед отделением ДНК от полисахаридов и РНК с помощью изопропилового спирта проводили обработку препарата проназой («Serva», Германия) в концентрации 50 мкг/мл. О степени очистки высокополимерной ДНК судили по спектрофотометрическому показателю E_{260}/E_{280} (тест на очистку от балластных белков), который должен составлять 1,7–1,8. Эта величина у всех препаратов находилась в пределах 2,0–2,2. Это свидетельствовало об удалении основной массы полисахаридов.

Электронную микроскопию бактериофагов проводили на микроскопе JEM-100 (Япония) в БРЦ ВКПМ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика. Препараты бактериофагов для электронной микроскопии готовили методом негативного контрастирования 1 % водным раствором уранил-ацетата. Суспензию бактериофагов и контрастер наносили на формваровые пленки-подложки, укрепленные углеводом.

Результаты и их обсуждение

Проведен анализ проб кисломолочной продукции и молочной сыворотки на наличие бактериофагов, отобранных на предприятиях, на которых наблюдались случаи торможения процесса ферментации сырья или

Таблица 1. Результаты анализа образцов кисломолочной продукции на наличие бактериофагов

Table 1. Fermented dairy products and bacteriophages

№ образца	Наименование образцов	Количество исследованных образцов, шт.	Количество образцов, в которых обнаружены бактериофаги, шт.	Количество фаговых частиц в образцах, БОЕ/г или см ³
1.	Творог, производимый периодическим способом	37	37	От 10 ² до 10 ⁷
2.	Творог, производимый поточным методом	26	19	От 10 ² до 10 ⁵
3.	Зерненный творог	19	13	От 10 ⁴ до 10 ⁷
4.	Молочная сыворотка из под творога	79	79	От 10 ³ до 10 ⁷
5.	Сметана*	22	16	От 10 ⁴ до 10 ⁶
6.	Йогурт*	29	14	От 10 ² до 10 ⁶
7.	Ряженка*	27	12	От 10 ³ до 10 ⁶
8.	Снежок*	14	6	От 10 ³ до 10 ⁶

* – продукция, произведенная резервуарным способом.

* – products produced by the tank method.

его полной приостановки. Выявление бактериофагов в образцах кисломолочной продукции, производимой с применением заквасок, содержащих лактококки, осуществляли с использованием коллекционных тест-культур АТСС 11454 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), В 4461 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), а также 6 штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* – 15, Л1102, Л36с, Л18М, ЛА-2, ЛА-Е2 и 3 штаммов *L. lactis* subsp. *cremoris* – К 52, КН-98, КН-96 из коллекции МГУПП. Результаты анализа 253 проверенных образцов кисломолочной продукции свидетельствовали о наличии бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии (табл. 1).

Установлено, что образцы содержали разное количество бактериофагов, которое составляло от 10² до 10⁷ БОЕ/г или см³ продукта. Присутствующие в исследованных образцах бактериофаги тормозили ход процесса ферментации и отрицательно влияли на формирование органолептических, физико-химических и других показателей качества готовой продукции. В технологии творога, зерненого творога и сметаны на предприятиях использовали закваски, в состав которых входили лактококки (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) или мезофильные лактококки и термофильные молочнокислые стрептококки (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). Закваски, применяемые в технологии йогурта и продукта «Снежок», состояли из молочнокислых палочек (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) и термофильных молочнокислых стрептококков, а в технологии ряженки – *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Частота выявления бактериофагов в изученных образцах кисломолочной продукции и молочной сыворотке приведена на рисунке 1.

Наибольшее количество бактериофагов выявили в образцах творога, производимого периодическим

способом, зерненого творога и молочной сыворотке. Это обусловлено тем, что в данных технологиях используются емкости открытого типа, что увеличивает риски попадания бактериофагов из воздуха и других источников. Большое количество бактериофагов, обнаруженных в молочной сыворотке, подтверждает ранее полученные результаты и свидетельствует о необходимости обязательной максимальной ее изоляции из помещений, в которых получают творог разных видов. В образцах творога, зерненого творога, молочной сыворотки и сметаны выявляли бактериофаги, способные инактивировать лактококки и термофильные молочнокислые стрептококки, поскольку они входили в состав заквасок, применяемых в биотехнологии данных видов продукции. В образцах йогурта и кисломолочного продукта «Снежок» выявляли бактериофаги, способные лизировать термофильные молочнокислые стрептококки и культуры болгарской палочки, а в ряженке – термофильные молочнокислые стрептококки.

Выделение бактериофагов из исследованных образцов кисломолочной продукции, молочной сыворотки и фильтратов колбас проводили после проверки перевиваемости литического агента. На первом этапе исследований осуществляли выделение бактериофагов, способных лизировать лактококки. Изучение молекулярно-биологической характеристики выделенных 20 бактериофагов лактококков с применением электронной микроскопии показало, что бактериофаги идентичны по морфологии. Они имели вытянутые капсиды размером 55–66×35–50 нм и несокращающиеся исчерченные отростки длиной 100–133 нм и шириной 6–10 нм. Число полос на отростке около 20. Отростки заканчивались небольшой базальной пластинкой, незначительно выступающей за его пределы. В качестве контроля для

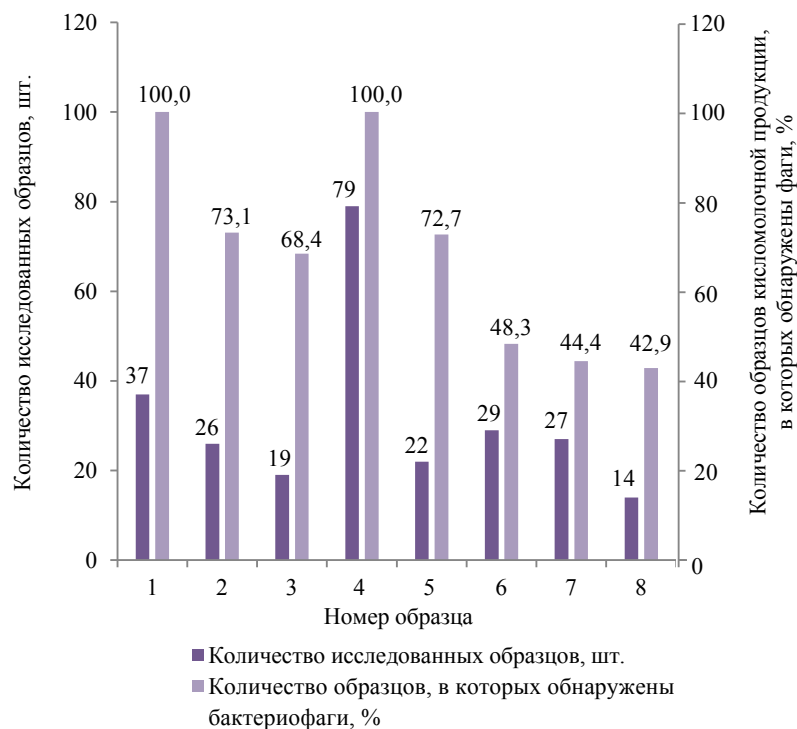


Рисунок 1. Частота выявления бактериофагов в образцах кисломолочной продукции и молочной сыворотке: 1 – творог, производимый периодическим способом; 2 – творог, производимый поточным методом; 3 – зерненный творог; 4 – молочная сыворотка из под творога; 5 – сметана; 6 – йогурт; 7 – ряженка; 8 – продукт «Снежок»

Figure 1. Bacteriophages in fermented dairy products and whey: 1 – cottage cheese produced by batch method; 2 – cottage cheese produced by the in-line method; 3 – grained cottage cheese; 4 – whey from cottage cheese; 5 – sour cream; 6 – yogurt; 7 – Ryazhenka fermented baked milk; 8 – Snezhok fermented dairy product

определения молекулярных размеров бактериофагов использовали фаг T4 *Escherichia coli*.

Проведено сравнение бактериофагов лактококков из международной коллекции (P001, P008, P 335) с выделенными бактериофагами. Выявлено, что бактериофаг P001 имеет сходные морфологию и размеры частиц с некоторыми выделенными бактериофагами. Среди бактериофагов, выделенных с предприятий, обнаружили схожие по морфологии с бактериофагами P008 и P335. Выделенные бактериофаги лактококков, которые отличались размерами при электронной микроскопии, условно разделили на 3 группы: 1 – морфотип P001, 2 – морфотип P008 и 3 – морфотип P335. Выборочно у бактериофагов этих 3 групп (1Ф, 2Ф, 3Ф, 4Ф, 7Ф, 9Ф, 12Ф, 14Ф, 17Ф) методом рестрикционного анализа изучили фаговую ДНК. В качестве маркеров при оценке молекулярных масс фрагментов использовали *EcoRV*, *EcoR III* и *EcoRI* фрагмента фага λ . ДНК изученных бактериофагов была чувствительна к рестриктазам *EcoRI* и *EcoRV*. При гидролизе рестриктазой *EcoRV* образовывалось 7–9 фрагментов. Суммированием молекулярных масс рестрикт

определяли молекулярную массу ДНК бактериофагов, которая находилась в интервале: для фагов группы 1 (морфотип P001) от 33,8 до 36,41 т.п.н., группы 2 (морфотип P008) от 26,45 до 26,71 т.п.н., группы 3 (морфотип P335) от 29,35 до 30,90 т.п.н. (табл. 2). К бактериофагам второй группы были отнесены 3Ф и 14Ф, к бактериофагам третьей группы – 4Ф, 12Ф и 17Ф, а все оставшиеся бактериофаги, лизирующие лактококки, отнесены к первой группе.

Выявлено, что большая часть выделенных бактериофагов, лизирующих лактококки, относилась к морфотипу P001 – 15 фагов (76 %), а меньшая – к морфотипам P008 – 2 фага (11,8 %) и P335 – 3 фага (17,6 %). Полученные данные были подтверждены путем изучения сравнительной характеристики геномов бактериофагов лактококков и выявления родства между ними с помощью ДНК/ДНК гибридизации. В качестве меченой ДНК использовали 32-Р-ДНК бактериофагов P001, P008 и P335. В качестве контроля использовали бактериофаги из международной коллекции P001, P008 и фаг P335.

В результате проведенных исследований были получены «отпечатки» негативных колоний

Таблица 2. Размеры фрагментов ДНК бактериофагов, лизирующих лактококки

Table 2. DNA fragments of bacteriophages of lactococci

Номер фрагмента	Размеры фрагментов ДНК после гидролиза <i>EcoRV</i> , т.п.н.								
	1Ф	2Ф	3Ф	4Ф	7Ф	9Ф	12Ф	14Ф	17Ф
1	7,60	7,40	6,85	7,10	7,50	7,45	7,05	6,90	6,70
2	6,65	5,60	5,60	5,40	6,40	6,55	5,55	5,20	5,45
3	5,60	4,70	4,26	4,35	5,45	5,40	4,45	4,35	4,30
4	4,30	4,30	3,30	3,90	4,20	4,20	4,15	3,40	3,60
5	3,30	3,50	2,90	3,20	3,20	3,60	3,30	2,90	3,15
6	3,00	3,00	2,35	2,25	2,90	2,80	2,70	2,40	2,60
7	2,35	2,20	1,45	1,90	2,30	2,15	2,10	1,30	2,00
8	2,10	1,80	–	1,40	2,00	1,85	1,60	–	1,55
9	1,51	1,30	–	–	1,45	1,20	–	–	–
Суммарная молекулярная масса	36,41	33,8	26,71	29,50	35,40	35,20	30,90	26,45	29,35

Таблица 3. Диапазон хозяев выделенных бактериофагов, лизирующих термофильные молочнокислые стрептококки

Table 3. Hosts of bacteriophages of thermophilic lactic streptococci

Наименование выделенного фага	Источник выделения	Титр фагов, БОЕ в 1 см ³							
		Штаммы-хозяева							
		Тест-культура	СТ138	СТ9	СТ14	СТ132	T24	TP20	T48
1F ST	Творог-31	1,3×10 ⁵	н/о	1,2×10 ⁴	1,6×10 ⁵	н/о	1,7×10 ²	н/о	1,4×10 ³
2F ST	Творог-52	1,4×10 ⁵	н/о	1,7×10 ³	1,5×10 ⁵	н/о	1,2×10 ⁵	н/о	1,8×10 ²
3F ST	Молочная сыворотка-18	2,5×10 ⁷	н/о	1,4×10 ⁴	4,3×10 ⁵	н/о	3,6×10 ⁴	н/о	6,9×10 ⁵
4F ST	Молочная сыворотка-65	8,4×10 ⁶	н/о	1,3×10 ⁵	1,2×10 ⁵	н/о	1,7×10 ³	н/о	1,5×10 ⁴
5F ST	Молочная сыворотка-76	7,7×10 ⁶	н/о	1,4×10 ⁵	1,1×10 ⁵	н/о	1,2×10 ³	н/о	1,2×10 ⁵
6F ST	Сметана-9	9,7×10 ⁵	3,5×10 ⁴	н/о	н/о	1,3×10 ⁴	7,6×10 ⁴	н/о	6,9×10 ⁵
7F ST	Сметана-18	2,1×10 ⁶	4,9×10 ⁴	н/о	н/о	2,7×10 ⁴	3,8×10 ⁴	н/о	7,0×10 ⁵
8F ST	Йогурт-4	1,9×10 ⁶	н/о	5,8×10 ⁴	3,6×10 ⁴	н/о	1,4×10 ³	4,1×10 ⁵	1,3×10 ²
9F ST	Йогурт-19	8,8×10 ⁵	н/о	2,1×10 ⁵	4,9×10 ⁴	н/о	3,3×10 ³	7,7×10 ⁴	1,8×10 ²
10F ST	Ряженка-22	3,7×10 ⁶	н/о	8,3×10 ⁴	9,9×10 ⁴	н/о	1,1×10 ⁵	1,5×10 ³	5,1×10 ⁴
11F ST	Снежок-6	1,8×10 ⁶	н/о	7,7×10 ⁴	5,5×10 ⁴	н/о	1,9×10 ⁴	2,8×10 ³	4,6×10 ⁴

н/о – на данной культуре фаги не были обнаружены.

н/о – no bacteriophages detected.

исследуемых бактериофагов. Как следует из полученных данных, бактериофаги, отнесенные к 1 группе, являются родственными, поскольку их ДНК гибридизируется с 32-Р-ДНК фага Р001. ДНК бактериофагов 2 группы гибридизовалась с 32-Р-ДНК фага Р008, а ДНК бактериофагов 3 группы гибридизовалась с 32-Р-ДНК фага Р335.

Проведенное изучение спектра литического действия выделенных бактериофагов показало, что отечественные закваски лактококков поражались фагами морфотипа Р001, а закваски из зарубежных стран – фагами морфотипа Р008 и Р335. Циркуляцию бактериофагов, отличающихся по морфотипам, можно объяснить применением на предприятиях заквасок,

содержащих лактококки, от разных производителей России и западных стран. Это связано с тем, что каждый производитель использует в составе заквасок определенные штаммы лактококков, которые отличаются по фагоустойчивости к разным типам бактериофагов.

Большинство выделенных бактериофагов одновременно могли лизировать *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, т. е. являются поливалентными. Ранее выделяемые бактериофаги чаще лизировали только один конкретный вид или подвид лактококков. Можно сделать заключение о появлении и увеличении со временем числа поливалентных

Таблица 4. Диапазон хозяев и титр выявленных бактериофагов, лизирующих штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, в образцах йогурта и продукта «Снежок»Table 4. Hosts and titer of detected bacteriophages of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in yoghurt and Snezhok fermented dairy product

Наименование выделенного фага	Источник выделения	Титр фагов, БОЕ в 1 см ³						
		Тест-культуры						
		ВКПМ-9644	ВКПМ-8554	АЕ-5	АД-3	БВ-7	Б-259	Б-ЛГ
ФБП-312	Йогурт	н/о	4,7×10 ⁶	7,2×10 ²	2,1×10 ³	3,4×10 ⁴	8,6×10 ⁴	8,9×10 ⁵
ФБП-319	Йогурт	1,3×10 ²	2,2×10 ⁵	2,3×10 ³	5,4×10 ⁴	4,8×10 ³	7,3×10 ⁴	1,7×10 ⁵
ФБП-334	Йогурт	н/о	9,3×10 ⁴	1,2×10 ³	4,4×10 ³	2,6×10 ³	6,8×10 ⁴	7,4×10 ⁴
ФБП-347	Снежок	1,2×10 ³	3,4×10 ⁶	3,7×10 ³	2,5×10 ³	6,1×10 ³	5,9×10 ⁴	6,9×10 ⁵
ФБП-353	Снежок	н/о	8,5×10 ⁵	4,6×10 ³	3,7×10 ³	5,3×10 ³	8,2×10 ⁴	4,8×10 ⁵

н/о – на данной культуре фаги не были обнаружены.

н/о – no bacteriophages detected.

бактериофагов лактококков, выявляемых на предприятиях, выпускающих кисломолочную продукцию. Расширение биоразнообразия бактериофагов, поражающих молочнокислые бактерии рода *Lactococcus* ssp., подтверждается данными и других авторов [21, 32].

Выявление бактериофагов в образцах кисломолочной продукции, производимой с применением заквасок, содержащих штаммы термофильных молочнокислых стрептококков, осуществляли с использованием коллекционной тест-культуры АТСС 19258 и 7 штаммов *S. salivarius* subsp. *thermophilus* – СТ138, СТ9, СТ14, СТ132, Т24, ТР20, Т48 из коллекции МГУПП. В результате проведенной работы было выделено 11 бактериофагов, лизирующих *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Установлено, что большее число изолятов бактериофагов имели не только первичного хозяина (тест-культура), но и новых общих вторичных хозяев (табл. 3).

Тестирование выделенных бактериофагов, лизирующих термофильные молочнокислые стрептококки, с помощью анализа диапазона хозяев позволило выявить большее количество бактериофагов, лизирующих разных хозяев. Отмечено, что на разных штаммах, применяемых в качестве тест-культур, обнаруживали или не обнаруживали бактериофаги, лизирующие термофильный молочнокислый стрептококк. Титр обнаруженных бактериофагов на разных тест-культурах варьировался от 1,7×10² до 2,5×10⁷ БОЕ в 1 см³. Подтверждена целесообразность применения коллекционных тест-культур для выявления бактериофагов, лизирующих штаммы термофильного молочнокислого стрептококка, в кисломолочной продукции, хотя спектр хозяев бактериофагов увеличился.

Установлено, что штаммы СТ138 и СТ132 можно использовать в качестве тест-культур для выявления бактериофагов в сметане, но их не

следует применять для индикации бактериофагов в разных видах творога, молочной сыворотки, йогурта, ряженки и продукта «Снежок». Штаммы СТ9 и СТ14 можно применять для выявления бактериофагов в проверенных видах кисломолочной продукции, за исключением сметаны. Использование штамма ТР20 позволило выявить бактериофаги в йогурте, ряженке и продукте «Снежок». Штаммы Т24 и Т48 выступали в качестве хозяев для всех выделенных бактериофагов, способных лизировать культуры термофильного молочнокислого стрептококка.

Таким образом, были определены дополнительные штаммы, которые можно использовать при индикации бактериофагов, способных лизировать *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, применяющиеся в биотехнологии ферментированных видов продукции.

Выявление бактериофагов, способных лизировать молочнокислые термофильные палочки в образцах йогурта и продукта «Снежок», осуществляли с использованием коллекционной тест-культуры *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ-9644 (штамм АСТ-41), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ВКПМ-8554 (штамм БГ-G), а также культуру *L. acidophilus* (штаммы АЕ-5, АД-3, БВ-7, Б-259) и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (штамм Б-ЛГ) из коллекции МГУПП. В ходе проведенной работы выделено 5 бактериофагов, лизирующих молочнокислые термофильные палочки, входящие в состав заквасок, которые применяются в биотехнологии йогурта и продукта «Снежок». Диапазон хозяев и титр выявленных бактериофагов приведен в таблице 4.

Анализ полученных результатов свидетельствовал о наличии бактериофагов, которые поражают молочнокислые термофильные палочки, в частности *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, используемых в составе заквасок для йогурта и продукта «Снежок». Установлено, что выделенные бактериофаги имели в качестве хозяев не только коллекционные тест-культуры, но и другие штаммы молочнокислых

термофильных палочек. Это свидетельствует об увеличении биоразнообразия фагов, циркулирующих на предприятиях. Предложено при выявлении бактериофагов, способных лизировать *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, дополнительно использовать в качестве тест-культуры штамм Б-ЛГ, поскольку титр бактериофагов при его применении составлял $7,4 \times 10^4$ – $8,9 \times 10^5$ БОЕ в 1 см³.

Таким образом, бактериофаги представляют собой основную микробиологическую угрозу для производства ферментированных пищевых продуктов. Эта проблема в большей степени затрагивает молочную промышленность, т. к. бактериофаги присутствуют в сыром молоке, на поверхностях оборудования, резервуарах, полах и стенах производственных помещений, а также распространяются воздушным путем. Распознавание источников загрязнения и правильный мониторинг бактериофагов на заводах позволяют своевременно применять соответствующие меры контроля. К ним относятся общие меры, такие как надлежащее проектирование завода, применение современного асептического оборудования, эффективные программы санитарной обработки, необходимая обработка молочного сырья и изолирование молочной сыворотки. Кроме того, использование культур молочнокислых бактерий должно быть адекватным и с применением схем ротации.

Исследования, проводимые по изучению бактериофагии в других странах, подтверждают актуальность и важность этой проблемы. В исследовании K. Lavelle и др. изучалось биоразнообразие и эволюция фагов на ирландском предприятии по выпуску ферментированных молочных продуктов в течение 11-летнего периода. Это привело к выделению 17 генетически различных

фагов, которые относятся к cos группе. Были проанализированы и идентифицированы в дистальном хвосте, белках базовой пластины и варибельных областях лизина, связанных с хвостовым отростком, белки, ответственные за распознавание хозяина: домены VR1 и VR2, связывающие углеводы. Это подтверждает идею о том, что фаги *S. thermophilus* распознают углеводный рецептор на клеточной поверхности своего хозяина [33].

Ученые продолжают проводить исследования вновь выявляемых бактериофагов, которые лизируют молочнокислые бактерии при ферментации пищевых сред и сравнивать их с ранее выделенными. В работе польских исследователей показано, что вновь выявленные бактериофаги на молочных заводах, хотя и сохранили общий геном с ранее выделенными, имеют несколько отличительных признаков, включая наличие и расположение генов эндонуклеазы HNH [34].

В исследованиях X. Chen с соавторами приводится характеристика и адсорбция вирулентного бактериофага, поражающего *Lactobacillus plantarum* [35]. В исследовании M. Eller и др. был выделен и охарактеризован литический бактериофаг IL-P1 *Lactococcus lactis* из сыворотки при неудавшейся ферментации. Бактериофаг выделяли и культивировали в *L. lactis* subsp. *cremoris* на среде M17. Анализ вирусного генома показал, что он состоит из ДНК длиной 48 т.п.н., а ПЦР и микроскопия подтвердили принадлежность IL-P1 к группе бактериофагов типа 936 семейства *Siphoviridae*, которое является наиболее распространенным типом лактококкового вируса в молочных продуктах во всем мире [36].

Проводимые исследования сосредоточены на выделении и характеристике вновь появляющихся

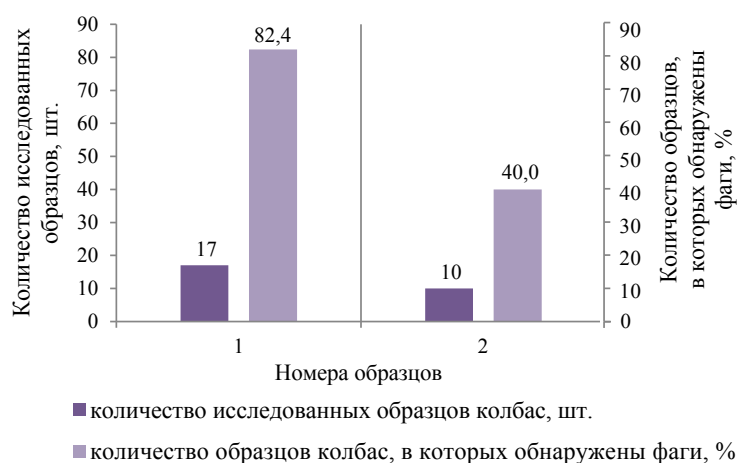


Рисунок 2. Частота выявления фагов в образцах сыровяленых и сырокопченых колбас:
1 – сыровяленые колбасы; 2 – сырокопченые колбасы

Figure 2. Bacteriophages in dry-cured and raw-smoked sausages: 1 – dry-cured sausages; 2 – raw smoked sausages

бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии, которые используются в разных пищевых системах (например, в молочном и мясном сырье и др.) и приводят к ухудшению качества продукции и экономическим потерям.

Расширение в нашей стране производства колбас, вырабатываемых с применением стартовых культур, состоящих из молочнокислых бактерий, привело к возникновению вопросов у сотрудников предприятий о причинах нарушения процессов ферментации мясного сырья. В этой связи в рамках проведения исследования была поставлена задача по определению факторов, влияющих на развитие молочнокислых бактерий в мясном сырье, в том числе возможности воздействия на них бактериофагов. Проведенный анализ 27 образцов сыровяленых и сырокопченых колбас свидетельствовал о наличии в некоторых из них бактериофагов (рис. 2).

Стартовые культуры, применяемые в биотехнологии изученных образцов сыровяленых и сырокопченых колбас, состояли из микроорганизмов, разрешенных для применения в России, а именно *Latilactobacillus curvatus*, *Latilactobacillus sakei* ssp. *sakei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici* и *Pediococcus pentosaceus*. В работе были исследованы фильтраты сыровяленых полусухих и сырокопченых колбас: Брауншвейгская, Еврейская и Зернистая. При исследовании сыровяленых полусухих колбас количество образцов, в которых выявлены бактериофаги, лизирующие молочнокислые палочки, составило 14 (82,4 %), а сырокопченых – 4 (40 %). Дополнительные технологические операции при выработке сырокопченых колбас способствуют снижению количества бактериофагов в готовой продукции. В исследованных образцах колбас определено наличие бактериофагов, лизирующих культуры *Lactiplantibacillus plantarum* ssp. *plantarum* и *L. sakei* ssp. *sakei*, которые входили в состав применяемых стартовых культур.

Исследования бактериофагов в мясном сырье в других странах проводятся, но их не много [37, 38]. Новый бактериофаг (фаг ggg) и его хозяин *Leuconostoc gelidum* LRC-BD были выделены из свиной корейки в вакуумной упаковке. Гомогенаты ткани свиной корейки обогащали *L. gelidum* LRC-BD для выделения бактериофагов. Электронно-микроскопическое наблюдение показало, что бактериофаг ggg относится к семейству *Siphoviridae*. Диапазон хозяев был ограничен изолятами *L. gelidum* из мяса [37]. В тайской ферментированной свиной колбасе Nham был обнаружен бактериофаг Ф22 семейства *Podoviridae*, поражающий молочнокислые бактерии. Электронные микрофотографии показали, что головка бактериофага была икосаэдрической размером 92×50 нм и длиной хвоста 27 нм. Исходя из морфологии, этот бактериофаг был отнесен к семейству *Podoviridae*. Бактериальный изолят, чувствительный к инфекции бактериофага

Ф22, был идентифицирован как *Weissella cibaria*. Определение диапазона хозяина показало, что бактериофаг Ф22 не был способен инфицировать другие 40 изолятов лабораторных и эталонных штаммов *Weissella* [38]. Малочисленные источники литературы о поражении стартовых культур при получении мясной продукции свидетельствуют о том, что явление бактериофагии встречается реже, чем при производстве ферментированных видов молочной продукции. Однако это не означает, что исследование в данном направлении не следует проводить.

Результаты исследований, представленные в данной статье, обуславливают необходимость проведения дальнейшего изучения бактериофагов, поражающих стартовые культуры в биотехнологии ферментированных видов мясной продукции.

Следовательно, и закваски для кисломолочной продукции, и стартовые культуры для сыровяленых и сырокопченых колбас с высокой фагоустойчивостью, содержащие молочнокислые бактерии, могут подвергаться фаголизису. Проведение широкого мониторинга обусловило выявление большого числа бактериофагов, лизирующих разных хозяев не только коллекционных тест-культур, но и вторичных хозяев.

Выводы

В результате проведенного исследования установлено изменение биоразнообразия и эволюции бактериофагов за счет расширения спектра их литического действия и вирулентности, независимо от питательной среды (молочное или мясное сырье), в коорой они могут поражать молочнокислые бактерии.

Выделено 20 бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии рода *Lactococcus* ssp., 11 – *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 5 – *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Выделенные и охарактеризованные бактериофаги включены в коллекцию для отбора культур молочнокислых бактерий, применяемых для составления заквасок и стартовых культур. Результаты исследования позволили расширить линейку тест-культур, используемых для обнаружения бактериофагов в биотехнологии ферментированных видов молочной и мясной продукции. Полученные результаты исследования будут способствовать выявлению бактериофагов на ранних этапах нарушения биотехнологических процессов, а также своевременному принятию и выполнению корректирующих мероприятий, обеспечивающих выпуск продукции с требуемыми показателями качества и безопасности.

Критерии авторства

В. И. Ганина осуществляла общее руководство при проведении всех исследований; проводила анализ литературных источников по вопросу бактериофагии

в молочной отрасли, выделение и изучение бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии, а также анализ полученных данных. Н. Г. Машенцева анализировала источники литературы, касающиеся фаголизиса стартовых культур, применяемых в мясной отрасли; осуществляла подготовку тест-культур и образцов колбас для выявления бактериофагов и их изучения; проводила анализ полученных результатов. И. И. Ионова осуществляла поиск литературы и подготовку тест-культур и штаммов молочнокислых бактерий из коллекции МГУПП для проведения исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Выражаем благодарность руководителю и сотрудникам БРЦ ВКПМ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика и учебно-вспомогательному персоналу кафедры технология молока, пробиотических молочных продуктов и сыроделия Московского

государственного университета пищевых производств за помощь в организации экспериментальных исследований.

Contribution

V.I. Ganina supervised the research, reviewed scientific publications, isolated bacteriophages and analyzed the data. N.G. Mashentseva reviewed publications on phagolysis of starter cultures in the meat industry, prepared test cultures and sausage samples, and analyzed the obtained results. I.I. Ionova selected publications for the review and prepared test cultures and strains of lactic acid bacteria from the collection of the Moscow State University of Food Production.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors express their deepest gratitude to the Kurchatov Institute GosNIIGenetika and the Department of Technology of Milk, Probiotic Dairy Products, and Cheesemaking of the Moscow State University of Food Production.

References/Список литературы

1. Chaplygina TV, Prosekov AYu, Babich OO, Pavsky VA, Ivanova SA. Functional dairy products are protection during pandemic. Dairy Industry. 2020;(6):26–28. (In Russ.). <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-06-26-28>
2. Belmer SV. Fermented milk products: from history to the present. Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics. 2019;64(6):119–125. (In Russ.). <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2019-64-6-119-125>
3. Zobkova ZS. Dependence of the relative biological value of fermented milk drinks on the type of starter microorganisms. Dairy Industry. 2020;(8):36–37. (In Russ.).
Зобкова З. С. Зависимость относительной биологической ценности кисломолочных напитков от вида заквасочных микроорганизмов // Молочная промышленность. 2020. № 8. С. 36–37.
4. Goroshchenko LG. Dynamics of fermented milk products' production in 2020. Dairy Industry. 2021;(8):63–64. (In Russ.).
Горощенко Л. Г. Динамика производства кисломолочных продуктов в 2020 г // Молочная промышленность. 2021. № 8. С. 63–64.
5. Khrundin DV, Ponomarev VYa, Yunusov ESh. Fermented oat milk as a base for lactose-free sauce. Foods and Raw Materials. 2022;10(1):155–162. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-1-155-162>
6. Gavrilova N, Chernopolskaya N, Molyboga E, Shipkova K, Dolmatova I, Demidova V, et al. Biotechnology application in production of specialized dairy products using probiotic cultures immobilization. International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering. 2019;8(6):642–648.
7. Zakharova LM, Gorbunchikova MS. A new synbiotic fermented dairy product: technological production features. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(1):17–28. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-17-28>
8. Martinchik AN, Keshabyants EE, Peskova EV, Mikhaylov NA, Baturin AK. Dairy products and obesity: pro and contra, Russian experience. Problems of Nutrition. 2018;87(4):39–47. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10040>
9. Vinicius de Melo Pereira G, de Carvalho Neto DP, Junqueira ACO, Karp SG, Letti LAJ, Magalhães Júnior AI, et al. A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. Food Reviews International. 2020;36(2):135–167. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1630636>
10. Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, et al. Fermented foods in a global age: East meets West. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2020;19(1):184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>

11. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*. 2018;4(4):665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
12. Yang Y, Babich OO, Sukhikh SA, Zimina MI, Milentyeva IS. Identification of total aromas of plant protein sources. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(2):377–384. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-377-384>
13. Maske BL, de Melo Pereira GV, da Silva Vale A, Marques Souza DS, De Dea Lindner J, Soccol CR. Viruses in fermented foods: are they good or bad? Two sides of the same coin. *Food Microbiology*. 2021;98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103794>
14. Muhammed MK, Kot W, Neve H, Mahony J, Castro-Mejía JL, Krych L, *et al.* Analysis of dairy bacteriophages: Extraction method and pilot study on whey samples derived from using undefined and defined mesophilic starter cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017;83(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.00888-17>
15. McDonnell B, Mahony J, Hanemaaijer L, Neve H, Noben J-P, Lugli GA, *et al.* Global survey and genome exploration of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01754>
16. de Melo Pereira GV, de Carvalho Neto DP, Maske BL, de Dea Lindner J, Vale AS, Favero GR, *et al.* An updated review on bacterial community composition of traditional fermented milk products: what next-generation sequencing has revealed so far? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020;62(7):1870–1889. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1848787>
17. Garmeaeva S, Sinha T, Kurilshikov A, Fu J, Wijmenga C, Zhernakova A. Studying the gut virome in the metagenomic era: Challenges and perspectives. *BMC Biology*. 2019;17(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0704-y>
18. Dugat-Bony E, Lossouarn J, de Paepe M, Sarthou A-S, Fedala Y, Petit M-A, *et al.* Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. *Food Microbiology*. 2020;85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103278>
19. Laranjo M, Potes ME, Elias M. Role of starter cultures on the safety of fermented meat products. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00853>
20. Ganina VI. Bacteriophages and ways to reduce their quantities. *Dairy Industry*. 2016;(2):41–43. (In Russ.).
Ганина В. И. Бактериофаги и способы снижения их количества // *Молочная промышленность*. 2016. № 2. С. 41–43.
21. Briggiler Marcó M, Mercanti DJ. Bacteriophages in dairy plants. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2021;97:1–54. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.015>
22. Pujato SA, Quiberoni A, Mercanti DJ. Bacteriophages on dairy foods. *Journal of Applied Microbiology*. 2018;126(1):14–30. <https://doi.org/10.1111/jam.14062>
23. Briggiler Marcó M, Suárez VB, Quiberoni A, Pujato SA. Inactivation of dairy bacteriophages by thermal and chemical treatments. *Viruses*. 2019;11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050480>
24. Sorokina NP, Kuraeva EV, Kucherenko IV, Cheshun KA. The spectrum of lytic activity of collection bacteriophages infecting lactococci. *Dairy Industry*. 2020;(11):27–29. (In Russ.).
Спектр литической активности коллекционных бактериофагов, инфицирующих лактококки / Н. П. Сорокина [и др.] // *Молочная промышленность*. 2020. № 11. С. 27–29.
25. Ganina VI. The temperature effect on the survival of bacteriophages in the biotechnology of fermented milk products. *Dairy Industry*. 2020;(3):31–33. (In Russ.). <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-03-32-33>
26. Buslenka AV, Barunova SB, Shpanikava EV, Vasylenko SL, Zhabanos NK, Furyk NN. Investigation of the collection bacteriophages biological properties of lactic acid bacteria. *Topical Issues of Processing of Meat and Milk Raw Materials*. 2019;(13):47–55. (In Russ.).
Изучение биологических свойств коллекционных бактериофагов молочнокислых бактерий / А. В. Бусленко [и др.] // *Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья*. 2019. № 13. С. 47–55.
27. Tkachenko VV, Odegov NI, Dorofeev RV. Preparation of the “sterile” phagelysates. *Dairy Industry*. 2017;(1):48–49. (In Russ.).
Ткаченко В. В., Одегов Н. И., Дорофеев Р. В. Приготовление «стерильных» фаголизатов // *Молочная промышленность*. 2017. № 1. С. 48–49.
28. Ackermann H-W, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Research in Microbiology*. 2007;158(7):555–566. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.006>
29. Andreou L-V. Isolation of plasmid DNA from bacteria. *Methods in Enzymology*. 2013;529:135–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00010-0>
30. Esteban-Torres M, Ruiz L, Sanchez-Gallardo R, van Sinderen D. Isolation of chromosomal and plasmid DNA from bifidobacteria. *Methods in Molecular Biology*. 2021;2278:21–29. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1274-3_3

31. Plata CA, Marni S, Maritan A, Bellini T, Suweis S. Statistical physics of DNA hybridization. *Physical Review E*. 2021;103(4). <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.103.042503>
32. Oliveira J, Mahony J, Hanemaaijer L, Kouwen TRHM, van Sinderen D. Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(1):96–105. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13403>
33. Lavelle K, Murphy J, Fitzgerald B, Lugli GA, Zomer A, Neve H, et al. Decade of *Streptococcus thermophilus* phage evolution in an Irish dairy plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018;84(10). <https://doi.org/10.1128/AEM.02855-17>
34. Chmielewska- Jeznach V, Bardowski JK, Szczepankowska AK. Molecular, physiological and phylogenetic traits of *Lactococcus* 936-type phages from distinct dairy environments. *Scientific Reports*. 2018;8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30371-3>
35. Chen X, Guo J, Liu Y, Chai S, Ma R, Munguntsetseg B. Characterization and adsorption of a *Lactobacillus plantarum* virulent phage. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(5):3879–3886. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16019>
36. Eller MR, Dias RS, de Moraes CA, de Carvalho AF, Oliveira LL, Silva EAM, et al. Molecular characterization of a new lytic bacteriophage isolated from cheese whey. *Archives of Virology*. 2021;157(12):2265–2272. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1432-6>
37. Greer GG, Dilts BD, Ackermann H-W. Characterization of a *Leuconostoc gelidum* bacteriophage from pork. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;114(3):370–375. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.021>
38. Pringsulaka O, Patarasinpaiboon N, Suwannasai N, Atthakor W, Rangsiruji A. Isolation and characterisation of a novel *Podoviridae*-phage infecting *Weissella cibaria* N 22 from Nham, a Thai fermented pork sausage. *Food Microbiology*. 2011;28(3):518–525. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.011>