

# Изучение микробиологических показателей ферментированного продукта из байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775), изготовленного с применением молочнокислых бактерий

DOI

Кандидат технических наук, доцент **А.П. Никифорова** – старший научный сотрудник кафедры Стандартизация, метрология и управление качеством;

Доктор технических наук **И.С. Хамагаева** – заведующий кафедрой Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров – Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления (ФГБОУ ВО «ВСГУТУ»)

@ anna.p.nikiforova@gmail.com

**Ключевые слова:** ферментация, байкальский омуль, качество, безопасность пищевых продуктов, микробиологические показатели, молочнокислые бактерии, микрофлора, 16S рРНК

**Keywords:** fish, baikal omul, quality, food safety, microbiological indicators, lactic acid bacteria, microflora, 16S rRNA

## MICROBIOLOGICAL PARAMETERS OF THE FERMENTED PRODUCT FROM BAIKAL O MUL *COREGONUS MIGRATORIUS* (GEORGI, 1775), MADE WITH THE USE OF LACTIC ACID BACTERIA

Candidate of Technical Sciences, Associate Professor **A.P. Nikiforova** – Senior Researcher of the Department of Standardization, Metrology and Quality Management; Doctor of Technical Sciences **I.S. Khamagaeva** – Head of the Department of Dairy Products Technology. Commodity science and examination of goods – East Siberian State University of Technology and Management (VSGUTU)

The work is devoted to the study of the effect of the fermentation process on the microflora composition of fermented product from the Baikal omul (*Coregonus migratorius* (Georgi, 1775)), produced with the use of bacterial concentrate of lactic acid bacteria *Latilactobacillus sakei* ((Katagiri et al. 1934) Zheng et al. 2020). It has been established that, according to microbiological indicators, fermented Baikal omul meets the requirements of regulatory documentation. The microflora of the control (without the use of bacterial preparations) and experimental (with the use of a bacterial concentrate of lactic acid bacteria) batches had significant differences.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что ферментация является одним из старейших способов консервирования, который широко применяется для производства молочных (кефир, кумыс, йогурт), зерновых (хлеб, ферментированные каши), овощных (квашеная капуста, кимчи) продуктов. Применение ферментации для производства рыбных продуктов имеет давние традиции. Так, ферментированный рыбный соус под названием гарум производился еще в Древнем Риме

[14]. В странах Северной Европы традиционные рыбные продукты производятся промышленно и пользуются популярностью у местного населения [14]. В странах Азии ассортимент ферментированных рыбных продуктов очень широк и в основном представлен рыбными соусами и рыбными пастами [1].

В последние годы большой научный интерес представляет применение специально подобранных стартовых культур для производства рыбных про-

дуктов. В этом направлении активно ведутся исследования зарубежных ученых. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение бактериальных культур способствует улучшению органолептических характеристик, сокращению продолжительности технологического процесса, повышает безопасность рыбных продуктов [1; 15]

Роль микробиологических показателей при формировании качества и безопасности рыбных продуктов велика. Состав микрофлоры ферментированных рыбных продуктов служил объектом исследования многих ученых, в том числе Bjerke, G.A и др., Belleggia L. и др [4; 5; 11]. При определении видового состава микрофлоры различных объектов исследования используются современные молекулярно-генетические методы, которые имеют высокую точность.

Молочнокислые бактерии активно применяются в качестве бактериальных стартовых культур для производства рыбных продуктов. Одним из перспективных видов молочнокислых бактерий, для использования в рыбоперерабатывающей промышленности, является вид *Latilactobacillus sakei*, адаптированный к условиям роста в рыбной и мясной средах и обладающий потенциальными пробиотическими свойствами [18].

В результате ранее проведенных нами исследований, был разработан бактериальный концентрат, обладающий высокой биохимической активностью, предназначенный для применения при ферментации рыбных продуктов. Была доказана его высокая эффективность в процессе ферментации байкальского омуля, разработаны оптимальные условия производства ферментированного рыбного продукта [2].

В связи с вышеизложенным, целью исследования является изучение влияния процесса ферментации на состав микрофлоры ферментированного омуля.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные исследования проводились на кафедре «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров» ФГБОУ ВО «Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления» (ВСГУТУ). Изучение состава микрофлоры рыбных продуктов проводилось в ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН).

Объектами экспериментальных исследований служили ферментированные продукты, изготовленные из байкальского омуля (*Coregonus migratorius* (Georgi, 1775)). При проведении исследования изучали две партии:

а) контрольную, при изготовлении которой не применялся бактериальный концентрат молочнокислых бактерий;

б) опытную, при производстве которой применялся бактериальный концентрат молоч-

Работа посвящена изучению влияния процесса ферментации на состав микрофлоры ферментированного продукта из байкальского омуля (*Coregonus migratorius* (Georgi, 1775)), произведенного с применением бактериального концентрата молочнокислых бактерий *Latilactobacillus sakei* ((Katagiri et al. 1934) Zheng et al. 2020). Установлено, что по микробиологическим показателям ферментированный продукт из байкальского омуля соответствует требованиям нормативной документации. Микрофлора контрольной (без применения бактериальных препаратов) и опытной (с применением бактериального концентрата молочнокислых бактерий) партий имели существенные отличия.

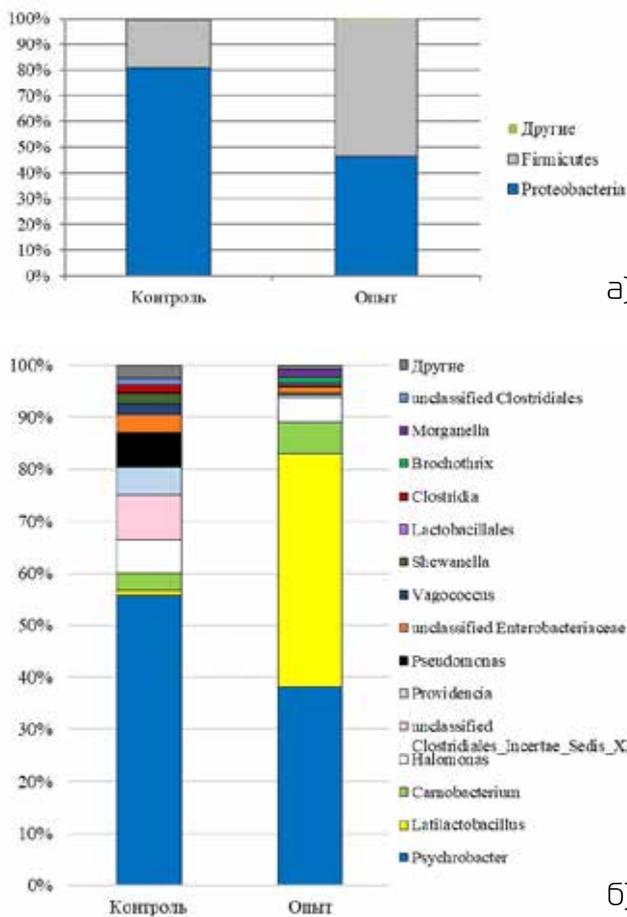


нокислых бактерий, произведенный с применением штамма *Latilactobacillus sakei* LSK-104. Штамм был получен из коллекции Национального биоресурсного центра – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (НБЦ ВКПМ) ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (ГосНИИгенетика).

При производстве ферментированного рыбного продукта применяли мороженый байкальский омуль по ГОСТ 32366-2013. Посол проводился тузлучным способом с применением солевого раствора с концентрацией хлорида натрия 7%. В состав тузлука опытной партии также входила глюкоза (1%). Ферментация проводилась при следующих режимах: 24 ч при температуре 20°C, затем – 27 суток при температуре 6-8 С.

Отбор образцов проводили по окончании ферментации, согласно требованиям ГОСТ 31339-2006.

Количественный учет молочнокислых бактерий проводили с применением метода предельных разведений на плотной питательной среде MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) при температу-



**Рисунок 1.** Состав бактериального сообщества ферментированного продукта из байкальского омуля, по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК: а) на уровне бактериальных фил, б) на уровне рода

**Figure 1.** The composition of the bacterial community of fermented product from Baikal omul, according to the analysis of sequences of fragments of 16S rRNA genes: а) at the level of bacterial phyla, б) at the level of the genus

ре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Подсчет колоний проводили через 48 часов.

Оценку микробиологических показателей безопасности (бактерии группы кишечных палочек ферментированного рыбного продукта (БГКП), коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*, сульфитредуцирующих клостридий, патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл, *Listeria monocytogenes*) проводили в соответствии с требованиями действующей нормативной документацией (ГОСТ 31747-2012, ГОСТ 31746-2012, ГОСТ 29185-2014, ГОСТ 31659-2012, ГОСТ 32031-2012).

Определение состава микрофлоры проводилось с применением метода 16S рРНК, в соответствии с Vrouchkov A. и др. [6]. Все реагенты, использованные для выделения ДНК и дальнейших анализов, имели класс для молекулярной биологии. Растворы и буферы не содержали ДНКазы и были стерилизованными. Все

процедуры проводились в ламинарных боксах I класса.

ДНК из образцов (из 0,25 г продукта) была извлечена и проанализирована с помощью набора PowerSoil DNA Isolation Kit (MO-Bio), в соответствии с протоколом производителя. В этих экспериментах три эквивалентные подпробы из одной исходной пробы осадка были выделены путем помещения их в стерильные флаконы емкостью 50 мл. Таким образом, для данного исследования использовали три биологические повторности, которые, перед проведением исследования, смешивали до однородности.

Регион V3-V4 гена 16S рРНК амплифицировали с применением праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), содержащих адаптерные последовательности Illumina, линкер и баркод. Амплификацию проводили в соответствии с Vrouchkov A. и др. [6].

Секвенирование проводили в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) на секвенаторе MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle) (Illumina).

Полученные парные последовательности были проанализированы с помощью UPARSE скриптов [8] при использовании USEARCH версии 8.1.1861. Биоинформатическая обработка включала в себя следующее: перекрывание парных прочтений, фильтрация по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглов, удаление химер и получение ОТЕ (операционные таксономические единицы) с помощью алгоритма кластеризации UPARSE. Таксономическая принадлежность последовательностей ОТЕ определялась с применением классификатора RDP classifier 2.11 [17] и базы данных NCBI 16S с использованием BLASTN [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На первом этапе исследований проводили оценку микробиологических показателей качества и безопасности ферментированных рыбных продуктов из байкальского омуля (табл. 1). При этом показатели безопасности сравнивали с нормативными значениями по ТР ЕАЭС 040/2016 «О безопасности рыбы и рыбной продукции».

Установлено, что ферментированный продукт из байкальского омуля содержит высокое количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий ( $2 \cdot 10^8$  КОЕ/г), а по показателям безопасности продукт из омуля опытной и контрольной партий соответствует требованиям ТР ЕАЭС 040/2016.

Состав микрофлоры является важной характеристикой, определяющей качество и безопасность ферментированной рыбы. В связи с этим, на втором этапе исследований проводили оценку состава микрофлоры ферментированных рыбных продуктов (рис. 1).

В результате проведенных исследований установлено, что доминирующими филумами

**Таблица 1.** Микробиологические показатели качества и безопасности ферментированного продукта из байкальского омуля / **Table 1.** Microbiological indicators of quality and safety of fermented product from Baikal omul

Показатели качества и безопасности	Нормативное значение	Полученные результаты	
		контроль	опыт
Молочнокислые бактерии, КОЕ/г, не менее	-	не измерялось	2·10 <sup>8</sup>
Бактерии группы кишечных палочек (колиформы) (БГКП)	не допускаются в 0,1 г продукта	не обнаружено	
<i>S. aureus</i>	не допускаются в 0,1 г продукта	не обнаружено	
Сульфитредуцирующие клостридии	не допускаются в 0,1 г продукта	не обнаружено	
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	не допускаются в 25 г продукта	не обнаружено	
<i>L. monocytogenes</i>	не допускаются в 25 г продукта	не обнаружено	

в образцах являются *Proteobacteria* (81,09% – в контрольном образце, 46,71% – в опытном образце) и *Firmicutes* (18,62% – в контрольном образце, 53,15% – в опытном образце). На долю других филумов приходится лишь 0,29% – в контрольном образце и 0,14% – в опытном образце (рис. 1а). При дальнейшем анализе были выявлены доминирующие ОТЕ бактерий на уровне родов (рис. 1б). Так, основными родами филы *Firmicutes* в опытном образце являлись *Latilactobacillus* и *Carnobacterium*. *Proteobacteria* в сообществе были представлены родами *Psychrobacter* и *Halomonas*. В контрольном образце к основным родам филы *Firmicutes* относятся *Clostridiales incertae sedis XI* и *Carnobacterium*, а филы *Proteobacteria* – *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas* и *Providencia*.

Из представленных на рисунке 1 данных можно сделать вывод о том, что микрофлора опытной и контрольной партий ферментированного рыбного продукта имела существенные различия, к которым можно отнести следующее:

а) увеличение доли бактерий рода *Latilactobacillus* в опытном образце, что объясняется применением бактериального концентрата молочнокислых бактерий при ферментации;

б) снижение количества бактерий отдельных родов, в опытном образце (например, бактерий рода *Psychrobacter* и *Pseudomonas*). Такая закономерность может быть обусловлена тем, что штамм синтезирует комплекс бактериоцинов и обладает высокой антагонистической активностью. Следует отметить высокую значимость этого свойства в связи с тем, что некоторые из штаммов видов *Psychrobacter* и *Pseudomonas* могут вызывать инфекции у человека и животных;

в) относительное количество бактерий *Halomonas* практически одинаково в опытном и контрольных образцах, а бактерий рода *Carnobacterium* увеличивается в опытном образце.

Доминирующими видами бактерий в контрольной партии являются: *Psychrobacter*

*cibarius*, *Urmitella timonensis*, *Halomonas zhanjiangensis*, *Providencia burhodogranariae*, *Psychrobacter pulmonis*, *Carnobacterium gallinarum*. Доминирующими видами бактерий опытной партии являются *Latilactobacillus sakei*, *Psychrobacter cibarius*, *Carnobacterium gallinarum*, *Halomonas zhanjiangensis*. Некоторые из доминирующих в продуктах бактериальных видов и штаммов являются характерными для рыбы и рыбных продуктов: например, штамм *Psychrobacter cibarius* JG-219 (идентичность 100%) является аэробной мезофильной грамотрицательной бактерией, впервые выделенной из корейского ферментированного рыбного продукта jeotgal [10]; аэробный мезофильный грамотрицательный штамм *Halomonas zhanjiangensis* JSM 078169 (идентичность 99,30%) – из морского ежа [7], бактерии вида *Carnobacterium gallinarum* обнаружены в составе микрофлоры кишечника атлантической трески (в объектах данного исследования обнаружен штамм *Carnobacterium gallinarum* DSM 4847 с идентичностью 99,53%) [13]. Некоторые имеют другое происхождение: например, аэробные мезофильные грамотрицательные штаммы *Providencia burhodogranariae* В (идентичность 99,53%) и *Psychrobacter pulmonis* CCUG 46240 (идентичность 100%) выделены из гемолимфы фруктовой дрозофилы и легких ягнят, соответственно, и являются патогенными для животных [9; 16]; штамм *Urmitella timonensis* Marseille-P2918 (идентичность 94,54%) был выделен из микробиоты недоедающих детей [12].

Микрофлора продукта из байкальского омуля, ферментированного с применением бактериального концентрата *Latilactobacillus sakei*, имеет существенные отличия от других ферментированных рыбных продуктов. Так, к преобладающей микрофлоре шведского продукта surströmming, изготовленного из балтийской сельди, относятся виды *Halanaerobium praevalens*, *Alkalibacterium gilvum*, *Carnobacterium spp.*, *Tetragenococcus halophilus*, *Clostridiisalibacter spp.* и *Porphyromonadaceae*.

К второстепенной микрофлоре можно отнести *Psychrobacter celer*, *Ruminococcaceae*, *Marinilactibacillus psychrotolerans*, *Streptococcus infantis*, *Salinivibrio costicola* [4].

Исследование Осимани и др. посвящено изучению состава микрофлоры хакарла, традиционного продукта Гренландии, изготовленного из мяса акулы. В работе отмечается, что основными родами бактерий являются *Tissierella*, *Pseudomonas*, *Oceanobacillus*, *Abyssivirga* и *Lactococcus*, а второстепенными – *Alkalibacterium*, *Staphylococcus*, *Proteiniclasticum*, *Acinetobacter*, *Erysipelothrix*, *Anaerobacillus*, *Ochrobactrum*, *Listeria* и *Photobacterium* [11].

Наиболее близким, разработанному продукту из байкальского омуля, по составу микрофлоры, по всей видимости, является норвежский продукт rakfisk. Так, установлено, что его микрофлора сильно зависит от технологических режимов производства: при содержании соли 4-5% и температуре 5-7°C молочнокислые микроорганизмы, преимущественно *Lactilactobacillus sakei*, доминируют в микрофлоре этого продукта. При более высоких концентрациях соли (6%) и более низкой температуре (3-4°C) молочнокислые бактерии хотя и присутствуют в продукте, но не доминируют в составе микрофлоры. В этом случае к доминирующим относятся другие психротрофные и солеустойчивые виды бактерий, например, *Psychrobacter* [14]. Похожая картина наблюдалась при исследовании тузлука продукта rakfisk. В образцах одного из производителей доминирующими являются *Lactobacillales*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* и *Pediococcus*, а в образцах другого – *Psychrobacter*, *Halomonas* и *Pseudoalteromonas* [5].

### ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований установлено, что по микробиологическим показателям продукты контрольной (без применения молочнокислых бактерий) и опытной (с применением бактериального концентрата молочнокислых бактерий) партий ферментированного продукта из байкальского омуля соответствуют установленным в нормативной документации нормам, а по составу микрофлоры партии существенно отличаются.

### ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

- Безопасность и качество рыбо- и морепродуктов / Г. Аллан Бремнер (ред.). – СПб.: Профессия, 2009. – 512 с.
1. *Safety and Quality Issues in Fish Processing* / G. Allan Bremner (ed.). 2009. Saint Petersburg: Professiya. 512 p. [in Russian].
- Никифорова А.П., Хазагаева С.Н., Хамагаева И.С. Изучение процесса ферментации байкальского омуля с применением молочнокислых бактерий // Вестник Камчатского государственного технического университета. – 2021. – № 55. – С. 17-28.
2. Nikiforova A.P., Khazagaeva S.N., Khamagaeva I.S. Study of fermentation process of Baikal omul with the use of lactic acid bacteria // *Bulletin of Kamchatka State Technical University*. 2021. I. 55. P. 17-28.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* – 1990. – 215. – Pp. 403-410.
- Belleggia L, Aquilanti L, Ferrocino I, Milanović V, Garofalo C, Clementi F, Coccolin L, Mozzon M, Foligni R, Haouet MN, Scuota S, Framboas M, Osimani A. Discovering microbiota and volatile compounds of surströmming, the traditional Swedish sour herring. – *Food Microbiol.* – 2020. – 91. – 103503.
- Bjerke, G.A.; Rudi, K.; Avershina, E.; Moen, B.; Blom, H.; Axelsson, L. Exploring the Brine Microbiota of a Traditional Norwegian Fermented Fish Product (Rakfisk) from Six Different Producers during Two Consecutive Seasonal Productions. // *Foods.* – 2019. – 8. – P. 72.
- Brouckov A, Kabilov M, Filippova S, Baturina O, Rogov V, Galchenko V, Mulyukin A, Fursova O, Pogorelko G. Bacterial community in ancient permafrost alluvium at the Mammoth Mountain (Eastern Siberia). *Gene.* – 2017. – 15(636). – Pp. 48-53.
- Chen YG, Zhang YQ, Huang HY, Klenk HP, Tang SK, Huang K, Chen QH, Cui XL, Li WJ. *Halomonas zhanjiangensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a sea urchin. *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2009. – 59(Pt 11). – Pp. 2888-93.
- Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nat. Methods.* – 2013. – V. 10. – Pp. 996-998.
- Juneja P, Lazzaro BP. *Providencia sneebia* sp. nov. and *Providencia burhodogranariaea* sp. nov., isolated from wild *Drosophila melanogaster*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. – 59(Pt 5). – Pp. 1108-11.
- Jung SY, Lee MH, Oh TK, Park YH, Yoon JH. *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2005. – 55(Pt 2). – Pp. 577-582.
- Osimani A., Ferrocino I., Agnolucci M., Coccolin L., Giovannetti M., Cristani C., Palla M., Milanovic V., Roncolini A., Sabbatini R., Garofalo C., Clementi F., Cardinali F., Petruzzelli A., Gabucci C., Tonucci F., Aquilanti L. Unveiling hákarl: A study of the microbiota of the traditional Icelandic fermented fish. // *Food Microbiology.* – 2019. – V. 82. – Pp. 560-572.
- Pham T.-P.-T., Cadoret F., Tidjani Alou M., Brah S., Ali Diallo B., Diallo A., Sokhna C., Delerce J., Fournier P.-E., Million M., Raoult D. “*Urmitella timonensis*” gen.nov., sp.nov., “*Blautia marasmi*” sp.nov., “*Lachnoclostridium pacaense*” sp.nov., “*Bacillus marasmi*” sp.nov. and “*Anaerotruncus rubiinfantis*” sp.nov., isolated from stool samples of undernourished African children. // *New Microbes and New Infections.* – 2017. – 17. – Pp. 84-88.
- Seppola M., Olsen R.E., Sandaker E., Kanapathippillai P., Holzapfel W., Ringø E. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua*) *Syst Appl Microbiol.* – 2005. – 29. – Pp. 131-137.
- Skåra T., Axelsson L., Stefansson G., Ekstrand B., Hagen H. Fermented and ripened fish products in the northern European countries. // *Journal of Ethnic Foods.* – 2015. – V. 2(1). – Pp. 18-24.
- Speranza B., Racioppo A., Bevilacqua A., Beneduce L., Sinigaglia M., Corbo M.R. Selection of autochthonous strains as starter cultures for fermented fish products. // *Journal of Food Science.* – 2015. – V. 80(1). – Pp. 151-160.
- Vela A.I., Collins M.D., Latre M.V., Mateos A., Moreno M.A., Hutson R., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. *Psychrobacter pulmonis* sp. nov., isolated from the lungs of lambs. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003. – 53(Pt 2). – Pp. 415-419.
- Wang Y.-N., Cai H., Chi C.-Q., Lu A.-H., Lin X.-G., Jiang Z.-F., Wu X.-L. *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 2007. – V. 57. – Pp. 1222-1226.
- Zagorec M., Champomier-Vergès M.C. 2017. *Lactobacillus sakei*: a starter for sausage fermentation, a protective culture for meat products. *Microorganisms*. V. 5(3). P. 56.