

IRSTI: 34.27.51

L.B. UMIRALIEVA^{1*}, L.G. STOYANOVA², M.A. DIBIRASULAEV³,
D.M. DIBIRASULAEV³, M.H. ISKAKOV¹, I.D. FILATOV¹

¹Kazakh Research Institute of Processing and Food Industry, Almaty, Kazakhstan

²Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow, Russia

³All-Russian Research Institute of the Refrigeration Industry, Moscow, Russia

*e-mail: l.umiraliyeva@rpf.kz

STUDY OF BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF BIOCONSERVANT BASED ON BACTERIOCIN OF HYBRID STRAIN *LACTOCOCCUS LACTIS* SSP. *LACTIS* F-116

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.15

Abstract

Studies have been conducted on the selection of the most active strains of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from the collection of the Department of Microbiology of Moscow State University named after M.V. Lomonosov, according to their antimicrobial activity on test cultures of bacteria and fungi - potential contaminants of poultry meat. An experimental approach to the creation of a bioconservant based on a hybrid strain of *L.lactis* subsp. *lactis* F-116 with probiotic potential is presented. The strain synthesizes a multicomponent antibiotic complex with a wide range of bactericidal and fungicidal effects against pathogens colonizing chilled meat raw materials while enriching it with biologically active metabolites (bacteriocins of a peptide nature, antimycotics, lactate, superoxide dismutase). The prospects of using bioconservants to increase the shelf life of chilled poultry meat and increase safety are shown.

Keywords: lactic acid bacteria, bioconservant, bacteriocin, hybrid strain.

Currently, issues of increasing the safety and effectiveness of food control, as well as microbial decontamination at all stages of production and sale, are increasingly becoming of obvious relevance for the meat processing industry. Providing the population with food free from threats to their health is a multi-vector task. Poultry farming is the largest meat sector in the world, which is expected to account for 41% of all protein from meat sources in 2030, according to the forecast of the Food and Agriculture Organization [1]. However, such an increase in the production and consumption of poultry meat correlates with its large losses due to spoilage during storage. It is known that poultry meat and its products are a favorable breeding ground for the reproduction of many microorganisms. The quality of poultry meat products and their safety for the consumer depend primarily on the raw meat. The priority and main direction for the preservation and improvement of the health of the population of our country are methodological support, constant monitoring of food safety, methods of microbial decontamination. The existing traditional technologies of physical or chemical processing in the production and storage of poultry meat, developed in the middle of the twentieth century, are noticeably outdated and require further improvement to the level of modern achievements of branch science. In recent decades, the livestock industry has undergone several changes, which implies improved control and protection of products in all sectors of the agro-industrial complex, including the meat processing industry. This need is obvious, first of all, for the poultry industry, which is developing at the fastest pace in our country.

Preservatives are food additives that increase the shelf life of products, protecting them from spoilage caused by bacteria, yeast and mold. By adding preservatives to food, it is possible to slow down or completely prevent the development of microorganisms and, accordingly, prolong the safety of products. The effectiveness of the use of preservatives depends on their concentration, nature and acidity of the medium. In any civilized country, the following requirements apply to preservatives used in the food industry:

- be harmless to the human body (in the amount of the applied dose) or easily removed from the product before eating it;

- be effective in small quantities;

- do not reduce the nutritional value of products and do not give them an extraneous, undesirable taste and smell;

- do not react chemically with the materials of which the equipment or packaging are made.

According to European standards, the group of preservative additives is labeled from E200 to E299. A particularly dangerous group of preservatives are nitrates and nitrites (E250 — sodium nitrite, E251 — sodium nitrate, E252 — potassium nitrate). Once in the body, they form new compounds called nitrosamines, which reduce resistance to infections and cause cancer. Synthetic preservatives can cause allergies, up to asthma attacks, headaches and nausea, especially in people predisposed to allergic reactions.

There is a need for non-toxic drugs that do not cause drug resistance and have a pronounced antimicrobial effect, including on antibiotic-resistant strains of microorganisms.

The search for new natural antimicrobial substances synthesized by microorganisms is an urgent problem. Lactic acid bacteria (LAB) can be called the most common in everyday life. The growth and development of LAB in the habitat causes fermentation. Lactic acid fermentation became known to people at the dawn of civilization. Since time immemorial, LAB has been used by people to extend the shelf life of food products, in particular, the preservation of such an important product for humans as milk, which contributed to the emergence of several fermented lactic acid products, for example, cheeses, a wide range of fermented dairy products. The synthesis of bacteriocins is a hereditary feature of organisms, manifested in the fact that each strain is capable of forming one or more specific bacteriocinogenic substances strictly specific to it. Bacteriocinogenic substances produced by lactic acid bacteria have a complex of useful features, which determines the possibility of their use in food production.

The most common and available bacteriocin is nisin. The producer of nisin is lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Currently, nisin is approved as a food preservative in more than 50 countries, the only bacteriocin has the status of "GRAS", which allows it to be widely used in the food industry as a bioconservant. Nisin acquired the E234 cipher as a preservative in the food industry. It is used in the production of cheeses, wine, ethyl alcohol, and low-pH foods. Several works show the harmlessness of the lowland. Nisin is effectively decomposed by α -chymotrypsin present in the gastrointestinal tract [2]. The safety of using nisin is due to the fact that having a polypeptide structure, it is quickly destroyed to amino acids by enzymes of the digestive tract. This eliminates the possibility of accumulation of an antibiotic in the body and the appearance of forms of microorganisms resistant to it. Nisin is the basis of the industrial drug "Nisaplin", which is produced by the English company "Aplin & Barrett, LTD", the company "Christian Hansen" (Denmark) under the trademark "Chrisin". The preparations of both companies have very similar characteristics, they contain 2.5% of the active component. However, nisin exhibits antibacterial activity mainly in an acidic environment; various compounds found in the food raw materials themselves (emulsifiers, phospholipids, fatty acids, etc.) can inactivate nisin; the action of proteases present in food raw materials and food products on the activity of nisin; adsorption of nisin on food particles and on producing cells; a narrow spectrum of action directed mainly at gram-positive bacteria, and pathogenic and opportunistic microbes that colonize food raw materials and cause diseases belong mainly to Gram-negative bacteria and micromycetes [3; 4].

Of particular interest to scientists from many laboratories around the world are the ways and methods of directed synthesis of bacteriocins in order to biologically obtain various modifications of already known bacteriocins, but with more valuable properties, or to obtain new naturally balanced safe bacteriocinogenic complexes for use as probiotics [5; 6].

For the ecosystem of the human gastrointestinal tract (GI tract), the most important types of microorganisms are lactic acid bacteria (LAB), since they are permanent inhabitants of the

gastrointestinal tract, as well as the bacterial basis and/or starter culture of various food products. LAB, which are part of the lactic acid products consumed, can successfully compete with putrefactive bacteria living in the intestine, and thus help prevent premature aging of the body and prolong the life of the consumer. In recent years, the method of fusion of protoplasts has been used in genetic breeding practice as a hybridization method that allows combining complete genomes and cytoplasmas of parent strains in order to transfer hereditary information on a trait of interest that can occur spontaneously in nature.

A method for obtaining active bacteriocin-producing lactococci by fusion of protoplasts has been developed. It has been established that protoplasty, reversion of protoplasts to a cellular form, and fusion of protoplasts can serve as methods for obtaining active forms of active forms. Recombinant strains 10-14 times higher than the activity of the parent strains and synthesizing a broad-spectrum antibiotic complex were obtained by fusion of protoplasts of related strains [7].

Materials and methods of research

The most effective probiotic strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116 was selected from the collection of bacteriocin-producing lactococci of the Department of Microbiology of the Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University. Strain F-116, stored in a freeze-dried state in a household refrigerator at -18 °C, was restored in a reverse (skimmed milk), which is the best medium for the cultivation of lactic acid bacteria. From the reverse, lactococci were transplanted into a culture medium prepared with tap water with yeast extract (20 g/l) and glucose (10 g/l), the pH of the medium was set to 6,8 – 7,0 using a 20% NaOH solution. Then the seed material in an amount of 5% was introduced into a biosynthetic (fermentation) medium, of the following composition (g / l): sucrose – 20,0; KH_2PO_4 – 20,0; NaCl – 2,0; $MgSO_4$ – 0,2; yeast extract – 20,0; pH 6,8 – 7,0.

The level of antibiotic activity of *L. lactis* subsp. *lactis* strains was determined by diffusion into agar with measurement of growth suppression zones of the test culture in mm. To fully extract the antibiotic complex from the cells, acetone-acetic mixture of AVC (acetone - acetic acid - water) was extracted in a ratio of 4:1:5. To determine the spectrum of antimicrobial action, gram-positive, gram-negative bacteria, microscopic fungi and yeast were used as test cultures. Bacteria were grown on MPA, microscopic fungi and yeast were grown on Saburo medium. Activity was calculated using a standard curve, taking into account dilutions of standard antibiotics specific to each group of microbes. Nisin Nisaplin (Aplin & Barrett, Ltd, UK) was used as the standard for gram-positive bacteria, levomycetin (HiMedia Laboratories Limited, Mumbai) was used for gram-negative bacteria, nystatin (Sigma) with an activity of 4670 units/mg was used for micromycetes.

Antioxidant activity was defined as superoxide dismutase. Superoxide dismutase is an enzyme that catalyzes the dismutation reaction of a superoxide radical to O_2 and H_2O_2 [8]. The activity of SOD in cell extracts was determined spectrophotometrically using the xanthine oxidase-cytochrome method.

The protein concentration was determined by the Bradford method with the Coomassie diamond blue G-250 dye on a KFK-3-0.1 "ZOMZ" spectrophotometer ($\lambda = 595$ nm). Bovine serum albumin was used as the standard for constructing the calibration curve.

The *L. lactis* subsp. *lactis* strain was lyophilized on a LABCONCO FreeZone1 vacuum unit (USA) with a condenser temperature of - 52°C [9]

Meat sampling and their preparation for testing were carried out by GOST 31467-2012 - poultry meat, offal and semi-finished products from poultry meat. Sampling methods and their preparation for testing.

Samples in the form of pieces of pulp tissue were cut to the full depth of the muscles with minimal damage to the muscle tissues. The sampling sites were determined by the test objectives and specific control methods. Samples subjected to flushing are suitable for food purposes. Sampling of lumpy, boneless meat for flushing was carried out, observing the rules of asepsis, without burning the sample surface. Flushing samples taken by rinsing the entire surface were

examined for the total microbial number (TMN) and according to indications for the detection of opportunistic and pathogenic microorganisms (for example, bacteria of the *E. coli* group, bacteria of the genus *Proteus*, salmonella, listeria) according to GOST R 50396.0-2013. The resulting flushing liquid served as the starting material for subsequent 10-fold dilutions. The total microbial number was determined in 1 cm³ of the flushing liquid. Detection of pathogenic microorganisms (for example, salmonella, listeria) in flushing samples was carried out in 25 cm³ of the flushing liquid.

Statistical processing of the research results was carried out using Excel 2016 computer programs (Microsoft Inc., Statistica for Windows, v.5.0 StatSoft Inc.), calculating the arithmetic mean, confidence intervals, and standard deviation. The reliability of the differences between the mean values was assessed using the Student's t-test. The values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

Lactic acid bacteria of the *L. lactis* subsp. *lactis* subspecies have the international status of a "completely safe" organism ("GRAS" status). They usually grow in the temperature range of 10 - 40°C, although some species can grow at temperatures up to 7°C for a long incubation period of 10 - 14 days. Most lactococcus species can grow at 4.0% NaCl; in media they grow best at pH 7,0 and stop growing if the pH drops to 4,5. The hybrid strain F-116 (GenBank: EF100777.1) was used in the work, obtained by fusion of protoplasts of two related low-level nisin synthesis strains 729 and its mutant 1605, obtained as a result of combined exposure to UV rays and nitrozoethyl urea [10]. The results of comparing the low-level synthesizing activity of the new recombinant strain with the parent and natural strain *L. lactis* ssp. *lactis* 194 showed a significant increase in activity (10-12 times and 20% respectively). The study of antimicrobial activity in the dynamics of growth in a biosynthetic medium made it possible to determine the period of growth of the producer when the synthesis of bacteriocin reaches its maximum activity -4300 IU/ml (activity is calculated by nisin). Bacteriocin activity reaches its maximum in the stationary growth phase by 10 hour when cultured in a biosynthetic medium (Figure)

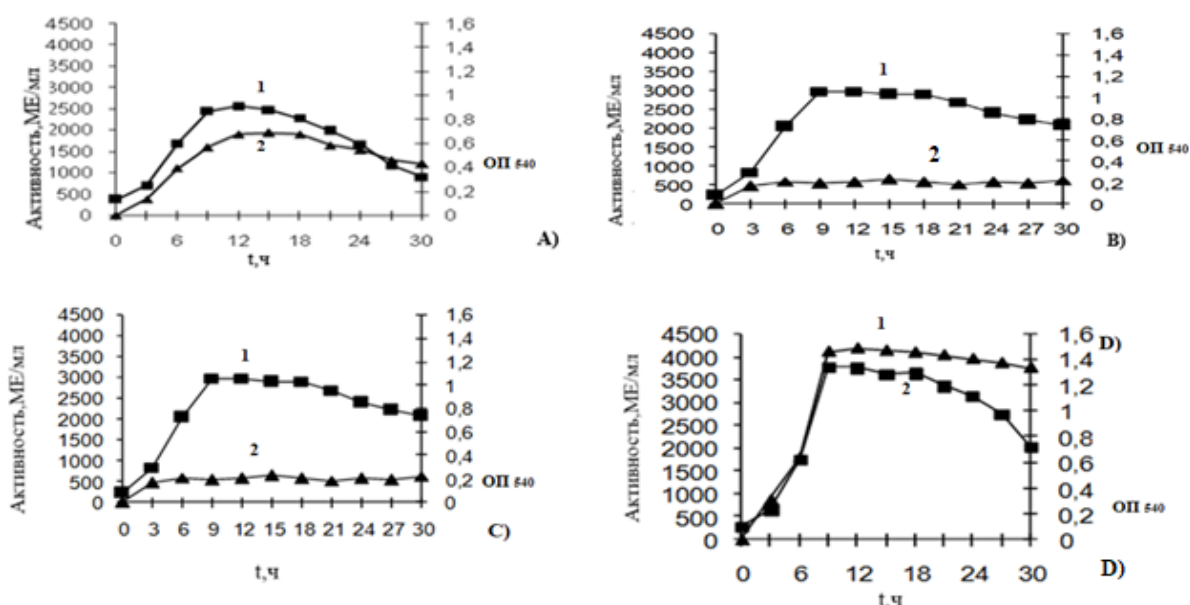


Figure – Growth dynamics (1) and antimicrobial activity (2) of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains ($p \leq 0.05$) ((A) - natural strain 194; B) - 729; C) - 1605; D) - F-116.), test microorganism – *Micrococcus flavus*)

Bacteria of the genus *Lactococcus* are characterized as gram-positive, non-spore-forming, catalase - negative, coccoid-shaped, forming lactic acid (up to 98%) during the fermentation of

sugars. The primary and one of the most important effects caused by LAB is the release and rapid accumulation of lactate, which leads to a sharp acidification of the medium caused by a decrease in pH, while in an acidic environment the activity of synthesized bacteriocins increases. Lactic acid is one of the main end metabolites formed by *L. lactis* ssp. *lactis*, homofermentative LAB, during fermentation, up to 98% of sugar is converted into lactic acid, as a result of which the substrate is acidified to pH= 4,2 [2; 4; 9].

An analysis of the studied properties of bacteriocin-like complexes produced by the hybrid strain F-116 using the BNPD (J. Berdy) computer database suggested that the peptide components have not been described in the literature and are new natural biologically active substances [3].

According to the properties and spectrum of antagonistic activity, these compounds correspond to the currently accepted definition of bacteriocins, which include thermostable peptide-protein compounds. The rapid manifestation of the antimicrobial effect of bacteriocins may indicate the membrane orientation of the action of inhibitory substances, characteristic of most known bacteriocins [11].

The results of our experiments indicated the ability of lactococcal strains to exhibit fungicidal activity on micromycetes - selected tests *Aspergillus niger* INA 00760 and yeast *Candida albicans* INA 00763, which amounted to 3325 units/ml (activity calculated by nystatin). It is worth noting that the increase in activity on yeast and fungi in lactococci corresponded to 15-18 hours of cultivation. The ability of lactococci of the *L. lactis* subsp. *lactis* subspecies to synthesize fungicidal metabolites is a rare and poorly studied property [12]. It is known that fungicides are toxic to humans and animals, accumulate in soil and water, so the need for non-toxic antimycotics in the food industry, medicine and agriculture is growing every year. In this regard, the search for new fungicidal substances among non-pathogenic forms of microorganisms is relevant. It was previously established that F-116 is a producer of three-component antimicrobial complexes, named LGS, two of which are effective against gram-positive bacteria of the nizin type, and the third with a molecular weight of $M = 506$ Da is assigned to the group of alkylaromatic ketones, also containing hydroxyl groups, had fungicidal activity [3; 13].

Among the dangerous contaminants – pathogens of foodborne diseases associated with the consumption of poultry products and creating possible risks to human health are *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacteria of the genus *Proteus*.

The results of our research have shown that the strain of *L. lactis* ssp. *lactis* F-116 is effective against *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marsescens* and other gram-negative microorganisms, as well as gram-positive ones - *Staphylococcus aureus*, *Micrococcua flavus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus coagulans*, *Listeria monocytogenes*, inhibits the growth of micromycetes *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida gualirmondii*, *Rhodotorula aurantica*, which often colonize meat raw materials (Table).

The growth of LAB inhabiting the human macroorganism, as well as coming from outside, depends on the processes taking place in it, including free radical ones. Reactive oxygen species (ROS) trigger programmed cell death – apoptosis. The accumulation of ROS (in particular, hydrogen peroxide) in products causes rancidity of fat and discoloration of meat products due to the destruction of pigments, which leads to loss of quality [8]. An interesting fact is that some LABs can remain viable in the presence of sufficiently high concentrations of H_2O_2 . The fact that LABs are able not only to remain viable, but also to divide under conditions of sufficiently strong oxidative stress indicates that their cells have enzymes of antioxidant protection, for example, superoxide dismutase (SOD). It was found that hybrid F-116 has high SOD-activity (up to 30 units/mg of protein).

A new non—toxic drug, bacteriocin LGS, has been obtained. The product is freeze-dried, has a wide range of bactericidal and fungicidal effects. Activity for lowland 1100 IU / mg, for nystatin 1150 u/mg. It is well soluble in water. When dissolved in water in an amount of 10 mg/ml,

it withstands boiling, autoclaving at 1 atm for 2 hours. It is stable in a wide pH range - from 2,4 to 8,0.

Table - Antimicrobial spectrum of action of the parent strains of *L. lactis* subsp. *lactis* 729, 1605 and their hybrid F-116 in comparison with nisin

Test culture	Strains			Nisin, 3000 IU/ml
	729	1605	F-116	
	Diameter of growth suppression zones, mm			
<i>Micrococcus luteus</i>	10±0,04	12±0,06	30±0,11	19±0,08
<i>Bacillus subtilis</i>	10±0,04	12±0,06	52±0,16	21±0,09
<i>Bacillus coagulans</i>	9±0,04	10±0,03	26±0,09	22±0,09
<i>Listeria monocytogenes</i>	8±0,03	9±0,03	21±0,08	16±0,07
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	12±0,06	21±0,08	18±0,06
<i>Salmonella gallinarum</i>	9±0,03	11±0,04	52±0,16	-
<i>Serratia marcescens</i>	8±0,03	9±0,03	21±0,10	-
<i>Escherichia coli</i>	10±0,04	11±0,04	19±0,08	-
<i>Proteus vulgaris</i>	9±0,03	10±0,04	19±0,08	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	9±0,03	17±0,07	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	8±0,03	14±0,06	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	9±0,03	14±0,06	-
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	-	-	16±0,07	-

Conclusion

The possibility of practical use of bacteriocin-forming lactococci as biological preservatives is shown.

It was revealed that the recombinant strain F-116 has high SOD-activity, which will make it possible to create effective drugs to reduce oxidative spoilage of meat during storage.

The new technology of application of the proposed bioconservant is environmentally safe, energy-saving and can be recommended for processing food raw materials for long-term storage. With an increase in storage time, the microbiological safety of raw materials and the nutritional value of finished products increases. The recombinant strain F-116 can be recommended for the creation of bioconservants with a prebiotic effect.

It should be noted that the presented experimental data are of scientific and practical interest in terms of the use of new strains synthesizing useful biologically active substances of a unique structure, the possible use of these cultures with the status of "GRAS" as bioconservants with biologically active metabolites. In the future, several measures aimed at reducing the use of chemical preservatives and antibiotics, increasing shelf life, will lead to an improvement in the quality of raw materials for the production of new high-quality food products.

Funding

The research was carried out with the support of funding from the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan under the budget program 217 "Development of Science", subprogram 102 "Grant financing of scientific research", specifics 154 "Payment for research services" within the framework of the AP19678940 project

"Development of a new technology for storing chilled poultry meat and poultry products using biological preservation methods in combination with cold" for 2023-2025.

References:

- 1 FAO (The Food and Agriculture Organization). *FAOSTAT*. 2020. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Date of the application 1 February 2024).
- 2 Bernbom N., Licht T.R., Brogren C.H., Jelle B., Johansen A.H., Badiola I., Vogensen F.K. and Norrung B. Effects of *Lactococcus lactis* on Composition of Intestinal Microbiota: Role of Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 239-244. (doi:10.1128/AEM.72.1.239-244.2006)
- 3 Stoyanova L. G., Ustjugova E. A., Netrusov A. I. Antimikrobnnye metabolity molochnokislyh bakterij: raznoobrazie i svojstva (obzor). *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*, 2012, 48(3): 259-275. (In Russian) (doi: 10.1134/S0003683812030143)
- 4 Stoyanova L. G., Gabrijelyan N. I. Perspektivnost' ispol'zovanija probioticheskikh shtammov *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* pri lechenii gospital'nyh infekcij. *Zhurnal infektologii*, 2017, 9(4): 110.
- 5 Duarte F.N.D.; Rodrigues J.B.; Lima M.C.; Lima M.S.; Pacheco M.T.B.; Pintado M.M.E.; Aquino J.S.; Souza E.L. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agroindustrial byproduct on *Lactobacillus* sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97: 3712. (doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>)
- 6 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morrellj L.; Canani R.B.; Flint H.J., Salminen S., et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11: 506-514; (doi: 10.1038/nrgastro.2014.66)
- 7 Stoyanova L. G., Egorov N. S. Poluchenie nizinproducirujushhih bakterij metodom slijanija protoplastov dvuh rodstvennyh shtammov *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, nizkoaktivnyh po sintezu nizina. *Mikrobiologija*, 1998, 67(1): 47-54.
- 8 Vilela C.; Kurek M.; Hayouka Z.; Röcker B.; Yildirim S.; Antunes M.D.C.; Nilsen-Nygaard J.; Pettersen M.K.; Freire C.S.R. A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol*, 2018, 80: 212-222. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>)
- 9 Stoyanova L.G., Sul'timova T.D., Netrusov A.I. Sozdanie banka liofil'nyh bakteriocinproducirujushhih molochnokislyh bakterij. *Citologija*, Vol. 46, №10, 2004: 865-866.
- 10 Stoyanova L.G., Fedorova G.B., Egorov N.S. & others. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* f-119 strain is a producer of the *lgs* antibiotic complex and a method for producing the *lgs* antibiotic complex using it. №2374320, C 12 N 1/20, C 12 P 1/04, C 12 R 1/225, Stoyanova L.G., Fedorova G.B., Egorov N.S. & others (RU). №2007148649/13. *Appl. 28.12.2007. Publ. 27.11.2009. Bul. 33.*
- 11 Stoyanova L.G., Netrusov A.I. Vydelenie i identifikacija bakteriocinproducirujushhih shtammov *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* iz svezhego moloka. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*, 2011, 42: 560-568.
- 12 Kwak M.-K., Liu R., Kim M.-K., Moon D., Hyoung A., Kim J., Song S.-H., Kang S.-O. Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi. *Journal of Microbiology*, 2014, 52: 64-70. (doi: <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3520-7>)
- 13 Stoyanova L.G., Napalkova M.V., Netrusov A.I. The creating a new biopreservative based on fusant strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* f-116 for food quality and its safety. *Journal of Hygienic Engineering and Design, Consulting and Training Center KEY (Skopje)*, 2016, 16: 19-27. (URL: <https://keypublishing.org/jhed/wp-content/uploads/2020/07/02.-Full-paper-Lidia-G.-Stoyanova.pdf>)

Л.Б. УМИРАЛИЕВА^{1*}, Л.Г. СТОЯНОВА², М.А. ДИБИРАСУЛАЕВ³,
Д.М. ДИБИРАСУЛАЕВ³, М.Х. ИСКАКОВ¹, И.Д. ФИЛАТОВ¹

¹Қазақ қайта өңдеу және тамақ өнеркәсіптері ғылыми-зерттеу институты, Алматы,
Қазақстан

²М.В. Ломоносов атындағы Мәскеу Мемлекеттік Университеті, Мәскеу, Ресей

³Тоңазытқыш өнеркәсібінің бүкілресейлік ғылыми-зерттеу институты, Мәскеу, Ресей
*e-mail: l.umiraliyeva@rpf.kz

LACTOCOCCUS LACTIS SSP. LACTIS F-116 ГИБРИДТІ ШТАММЫНЫҢ БАКТЕРИОЦИН НЕГІЗІНДЕГІ БИОКОНСЕРВАНТТЫҢ БИОТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Сүт қышқылы бактерияларының ең белсенді штамдарының микробиология кафедрасының коллекциясынан *Lactococcus lactis* subsp *lactis* олардың микробқа қарсы белсенділігі бойынша бактериялар мен саңырауқұлақтардың сынақ дақылдарына-құс етінің ықтимал ластаушы заттарына іріктеу бойынша зерттеулер жүргізілді. Пробиотикалық потенциалы бар *L.lactis* subsp. *lactis* F-116 гибридті штаммы негізінде биоконсервант жасауға эксперименттік тәсіл ұсынылды. Штамм биологиялық белсенді метаболиттермен (пептидтік сипаттағы бактериоциндермен, антимикотиктермен, лактатпен, супероксид дисмутазамен) байыта отырып, салқындатылған ет шикізатын колонизациялайтын патогендерге қарсы бактерицидтік және фунгицидтік әсердің кең спектрінің көп компонентті антибиотикалық кешенін синтездейді. Салқындатылған құс етінің сақтау мерзімін ұзарту, қауіпсіздікті арттыру үшін биоконсерванттарды пайдалану перспективасы көрсетілген.

Кілтті сөздер: сүт қышқылы бактериялары, биоконсервант, бактериоцин, гибридті штамм.

МРНТИ: 34.27.51

Л.Б. УМИРАЛИЕВА^{1*}, Л.Г. СТОЯНОВА², М.А. ДИБИРАСУЛАЕВ³,
Д.М. ДИБИРАСУЛАЕВ³, М.Х. ИСКАКОВ¹, И.Д. ФИЛАТОВ¹

¹Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой
промышленности, Алматы, Казахстан

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт холодильной промышленности,
Москва, Россия

*e-mail: l.umiraliyeva@rpf.kz

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОКОНСЕРВАНТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОЦИНА ГИБРИДНОГО ШТАММА *LACTOCOCCUS LACTIS* SSP. *LACTIS* F-116

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.15

Аннотация

Проведены исследования по отбору из коллекции кафедры микробиологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова наиболее активных штаммов молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* по их антимикробной активности на тест-культуры бактерий и грибов - потенциальных контаминантов мяса птицы. Представлен экспериментальный подход к созданию биоконсерванта на основе гибридного штамма *L. lactis* ssp. *lactis* F-116 с пробиотическим потенциалом. Штамм синтезирует многокомпонентный антибиотический комплекс широкого спектра бактерицидного и фунгицидного действия против патогенов, колонизирующих охлажденное мясное сырье с одновременным обогащением его биологически активными метаболитами (бактериоцинами пептидной природы, антимикотиками,

лактатом, супероксиддисмутазой). Показана перспективность использования биоконсервантов для увеличения сроков хранения охлажденного мяса птицы, повышения безопасности.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, биоконсервант, бактериоцин, гибридный штамм.

В настоящее время очевидную актуальность для мясоперерабатывающей отрасли все чаще приобретают вопросы повышения безопасности и эффективности контроля пищевых продуктов, а также микробной деконтаминации на всех этапах производства и реализации. Обеспечение населения продовольствием, свободным от угрозы для его здоровья, является многовекторной задачей. Птицеводство - крупнейший мясной сектор в мире, на который, как ожидается, в 2030 г. будет приходиться 41 % всего белка из мясных источников по прогнозу Продовольственной и сельскохозяйственной организации [1]. Однако такое увеличение производства и потребления мяса птицы коррелирует и с большими его потерями из-за порчи при хранении. Известно, что мясо птицы и продукты из него являются благоприятной питательной средой для размножения многих микроорганизмов. Доброкачественность продуктов из мяса птицы и их безопасность для потребителя зависят, прежде всего, от исходного мясного сырья. Приоритетом и главным направлением для сохранения и улучшения здоровья населения являются методическое обеспечение, постоянный контроль безопасности пищевых продуктов, способы микробной деконтаминации. Существующие традиционные технологии физической или химической обработки при получении и хранении мяса птицы, разработанные в середине XX века, заметно устарели и требуют дальнейшего совершенствования до уровня современных достижений отраслевой науки. В последние десятилетия животноводческая отрасль претерпела ряд изменений, что предполагает совершенствование контроля и защиты продукции во всех отраслях агропромышленного комплекса, в том числе и в мясоперерабатывающей промышленности. Такая потребность очевидна, прежде всего, для птицеводческой отрасли, которая развивается в нашей стране наиболее быстрыми темпами.

Консерванты — пищевые добавки, которые повышают срок хранения продуктов, защищая их от порчи, вызываемой бактериями, дрожжами и плесенью. С помощью добавления консервантов в пищу, можно добиться замедления или полного предотвращения процессов развития микроорганизмов и соответственно продлить сохранность продуктов. Эффективность использования консервантов зависит от их концентрации, природы и кислотности среды. В любой цивилизованной стране к консервантам, применяемым в пищевой промышленности, предъявляют следующие требования:

- быть безвредными для организма человека (в объеме вносимой дозы) или легко удаляться из продукта перед его употреблением в пищу;
- быть эффективными в небольших количествах;
- не снижать пищевой ценности продуктов и не придавать им постороннего, нежелательного привкуса и запаха;
- не вступать в химическую реакцию с материалами, из которых изготовлены оборудование или тара.

Согласно европейским стандартам, группа добавок-консервантов имеет маркировку от E200 до E299. Особо опасной группой консервантов являются нитраты и нитриты (E250 — нитрит натрия, E251 — нитрат натрия, E252 — нитрат калия). Попадая в организм, они образуют новые соединения, называемые нитрозаминами, которые снижают сопротивляемость к инфекциям и вызывают онкологические заболевания. Синтетические консерванты способны вызывать аллергию, вплоть до приступов астмы, головные боли и тошноту, особенно у людей, предрасположенных к аллергическим реакциям.

Возникла необходимость в нетоксичных препаратах, не вызывающих лекарственной устойчивости, обладающих выраженным антимикробным действием в том числе и на резистентные к антибиотикам штаммы микроорганизмов.

Поиск новых природных антимикробных веществ, синтезируемых микроорганизмами, является актуальной проблемой. Молочнокислые бактерии (МКБ) можно назвать наиболее распространенными в повседневной жизни. Рост и развитие МКБ в среде обитания вызывает брожение. Молочнокислое брожение стало известно людям на заре развития цивилизации. С незапамятных времен МКБ использовались людьми для продления сроков хранения пищевых продуктов, в частности, консервирование такого важного для человека продукта, каким является молоко, что способствовало появлению ряда ферментированных молочнокислых продуктов, например сыров, широкого перечня кисломолочных продуктов. Синтез бактериоцинов – наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый штамм способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него бактериоциногенных веществ. Бактериоциногенные вещества, продуцируемые молочнокислыми бактериями, обладают комплексом полезных признаков, чем обусловлена возможность их использования в производстве пищевых продуктов.

Самый распространённый и доступный бактериоцин – это низин. Продуцентом низина являются молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

В настоящее время низин одобрен в качестве пищевого консерванта в более чем 50 странах, единственный из бактериоцинов имеет статус «GRAS», что позволяет широко использовать его в пищевой промышленности в качестве биоконсерванта. В качестве консерванта в пищевой промышленности низин приобрел шифр E234. Он применяется в производстве сыров, вина, этилового спирта, пищевых продуктов с низким pH. Рядом работ показана безвредность низина. Низин эффективно разлагается α -химотрипсином, присутствующим в желудочно-кишечном тракте [2]. Безопасность использования низина обусловлена тем, что имея полипептидную структуру, он быстро разрушается до аминокислот ферментами пищеварительного тракта. Благодаря этому исключается возможность накопления антибиотика в организме и появление резистентных к нему форм микроорганизмов. Низин является основой промышленного препарата «Nisaplin», который производится Английской фирмой «Aplin & Barrett, LTD», фирмой «Christian Hansen» (Дания) под торговой маркой «Chrisin». Препараты обеих компаний имеют очень схожие характеристики, содержат 2,5% активного компонента. Однако, низин проявляет антибактериальную активность, главным образом, в кислой среде; различные соединения, находящиеся в самих продуктах пищевого сырья (эмульгаторы, фосфолипиды, жирные кислоты и др.), способны инактивировать низин; действие протеаз, присутствующих в пищевом сырье и продуктах питания, на активность низина; адсорбция низина на частицах пищи и на клетках-продуцентах; узкий спектр действия, направленный, преимущественно, на грамположительные бактерии, а патогенные и условно-патогенные микробы, колонизирующие пищевое сырье и вызывающие заболевания, принадлежат, в основном, к грамотрицательным бактериям и микромицетам [3, 4]

Особый интерес учёных многих лабораторий мира вызывают пути и способы направленного синтеза бактериоцинов с целью получения биологическим путем различных модификаций уже известных бактериоцинов, но с более ценными свойствами, или же получения новых природных сбалансированных безопасных бактериоциногенных комплексов для использования в качестве пробиотиков [5, 6].

Для экосистемы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека наиболее важными видами микроорганизмов являются молочнокислые бактерии (МКБ), так как они являются постоянными обитателями ЖКТ, а также бактериальной основой и/или закваской разнообразных продуктов питания. МКБ, входящие в состав потребляемых молочнокислых продуктов, способны успешно конкурировать с гнилостными бактериями, обитающими в кишечнике, и таким образом способствовать предотвращению преждевременного старения организма и продлению жизни потребителя. В последние годы в генетико-селекционной практике используют метод слияния протопластов, как метод гибридизации, позволяющий соединить полные геномы и цитоплазмы родительских штаммов с целью передачи

наследственной информации по интересующему признаку, который может возникать спонтанно в природе.

Разработан метод получения активных бактериоципродуцирующих лактококков слиянием протопластов. Установлено, что протопластирование, реверсия протопластов к клеточной форме, и слияние протопластов могут служить методами получения активных форм. Методом слияния протопластов родственных штаммов получены рекомбинантные штаммы, в 10 – 14 раз превышающие активность родительских штаммов и синтезирующие антибиотический комплекс широкого спектра действия [7].

Материалы и методы исследования

Из коллекции бактериоципродуцирующих лактококков кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова отобран наиболее эффективный пробиотический штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116. Штамм F-116, хранившийся в лиофильном состоянии в условиях бытового холодильника при -18°C , восстанавливали в обрате (обезжиренном молоке), являющимся лучшей питательной средой для культивирования молочнокислых бактерий. Из обраты лактококки пересевали в посевную среду, приготовленную на водопроводной воде с дрожжевым экстрактом (20 г/л) и глюкозой (10 г/л), pH среды устанавливали 6,8 - 7,0 с помощью 20%-ного раствора NaOH. Затем посевной материал в количестве 5% вносили в биосинтетическую (ферментационную) среду, следующего состава (г/л): сахараза - 20,0; KH_2PO_4 - 20,0; NaCl - 2,0; MgSO_4 - 0,2; дрожжевой экстракт - 20,0; pH 6,8 - 7,0.

Уровень антибиотической активности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* определяли методом диффузии в агар с измерением зон подавления роста тест - культуры в мм. Для полного извлечения антибиотического комплекса из клеток проводили экстракцию ацетон - уксусной смесью АВК (ацетон - уксусная кислота - вода) в соотношении 4:1:5. Для определения спектра антимикробного действия в качестве тест-культур использовали: грамположительные, грамотрицательные бактерии, микроскопические грибы и дрожжи. Бактерии выращивали на МПА, микроскопические грибы и дрожжи выращивали на среде Сабуро. Активность рассчитывали по стандартной кривой с учетом разведений стандартных антибиотиков, специфичных для каждой группы микробов. В качестве стандарта на грамположительные бактерии использовали низин Nisaplin (фирма Aplin & Barrett, Ltd, Великобритания), на грамотрицательные бактерии – левомицетин (HiMedia Laboratories Limited, Mumbai), на микромицеты – нистатин (фирма Sigma) с активностью 4670 ед./мг.

Антиоксидантную активность определяли, как супероксиддисмутазную. Супероксиддисмутаза – это фермент, катализирующий реакцию дисмутации супероксид-радикала до O_2 и H_2O_2 [8]. Активность СОД в экстрактах клеток определяли спектрофотометрически с использованием ксантиоксидазо-цитохромного метода.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда с красителем Кумасси бриллиантовый синий G-250 на спектрофотометре КФК-3-0.1 «ЗОМЗ» ($\lambda = 595$ нм). В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Штамм *L. lactis* subsp. *lactis* лиофилизировали на вакуумной установке LABCONCO FreeZone1 (США) с температурой конденсора - 52°C [9].

Отбор проб мяса и подготовка их к испытаниям проводили по ГОСТ 31467–2012 - мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям.

Пробы в виде кусков мякотных тканей вырезали на всю глубину мышц с минимальным повреждением мышечных тканей. Места отбора точечных проб определяли целями испытаний и конкретными методами контроля. Образцы, подвергнутые смыву, пригодны для пищевых целей. Отбор проб кускового, бескостного мяса для смывов проводили, соблюдая правила асептики, без обжига поверхности пробы. Пробы смывов,

отобранные методом ополаскивания всей поверхности, исследовали на общее микробное число (ОМЧ) и по показаниям на выявление условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (например, бактерий группы кишечной палочки, бактерий рода *Proteus*, сальмонелл, листерий) по ГОСТ Р 50396.0–2013. Полученная смывная жидкость служила исходным материалом для последующих 10-кратных разведений. Определение общего микробного числа проводили в 1 см³ смывной жидкости. Выявление патогенных микроорганизмов (например, сальмонелл, листерий) в пробах смывов проводили в 25 см³ смывной жидкости.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием компьютерных программ Excel 2016 (Microsoft Inc., Statistica for Windows, v.5.0 StatSoft Inc), рассчитывая среднее арифметическое, доверительные интервалы, стандартное отклонение. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Молочнокислые бактерии подвида *L. lactis* subsp. *lactis* имеют международный статус «полностью безопасного» организма («GRAS» status). Они обычно растут в диапазоне температур +10 - +40°C, хотя некоторые виды способны расти при температурах до +7°C в течение длительного инкубационного периода 10–14 дней. Большинство видов лактококков могут расти при 4,0% NaCl; в питательных средах они лучше всего растут при pH 7,0 и перестают расти, если pH падает до 4,5. В работе использовали гибридный штамм F-116 (GenBank: EF100777.1), полученный слиянием протопластов двух родственных низкоактивных по синтезу низина штаммов 729 и его мутанта 1605, полученного в результате комбинированного воздействия УФ-лучей и нитрозозэтилмочевины [10]. Результаты по сравнению низинсинтезирующей активности нового рекомбинантного штамма с родительским и природным штаммом *L. lactis* ssp. *lactis* 194 показало значительное повышение активности (в 10–12 раз и на 20%, соответственно). Исследование антимикробной активности в динамике роста в биосинтетической среде позволило определить период роста продуцента, когда синтез бактериоцина достигает максимума своей активности – 4300 МЕ/мл (активность рассчитана по низину). Бактериоципродуцирующая активность достигает своего максимума в стационарной фазе роста к 10 часам при культивировании в биосинтетической среде (рисунок).

Бактерий рода *Lactococcus* характеризуют как грамположительные, не образующие спор, каталазо – отрицательные, кокковидной формы, образующие молочную кислоту (до 98%) в процессе сбраживания сахаров. Первичный и один из самых главных эффектов, вызываемый МКБ, – выделение и быстрое накопление лактата, что ведет к резкому подкислению среды, вызванному снижением pH, при этом; а в кислой среде усиливается активность синтезируемых бактериоцинов. Молочная кислота – один из основных конечных метаболитов, образуемых *L. lactis* ssp. *lactis*, гомоферментативными МКБ, в процессе брожения до 98% сахара превращается в молочную кислоту, вследствие чего субстрат подкисляется до pH= 4.2 [2, 4, 9].

Анализ изученных свойств бактериоцинподобных комплексов, продуцируемых гибридным штаммом F-116 с помощью компьютерной базы данных BNPD (J. Berdy), позволил предположить, что пептидные компоненты в литературе не описаны и являются новыми природными биологически активными веществами [3].

По свойствам и спектру антагонистической активности эти соединения соответствуют принятому в настоящее время определению бактериоцинов, к которым относят термостабильные пептидно-белковые соединения. Быстрое проявление антимикробного эффекта бактериоцинов может свидетельствовать о мембранной направленности действия ингибирующих веществ, характерной для большинства известных бактериоцинов [11].

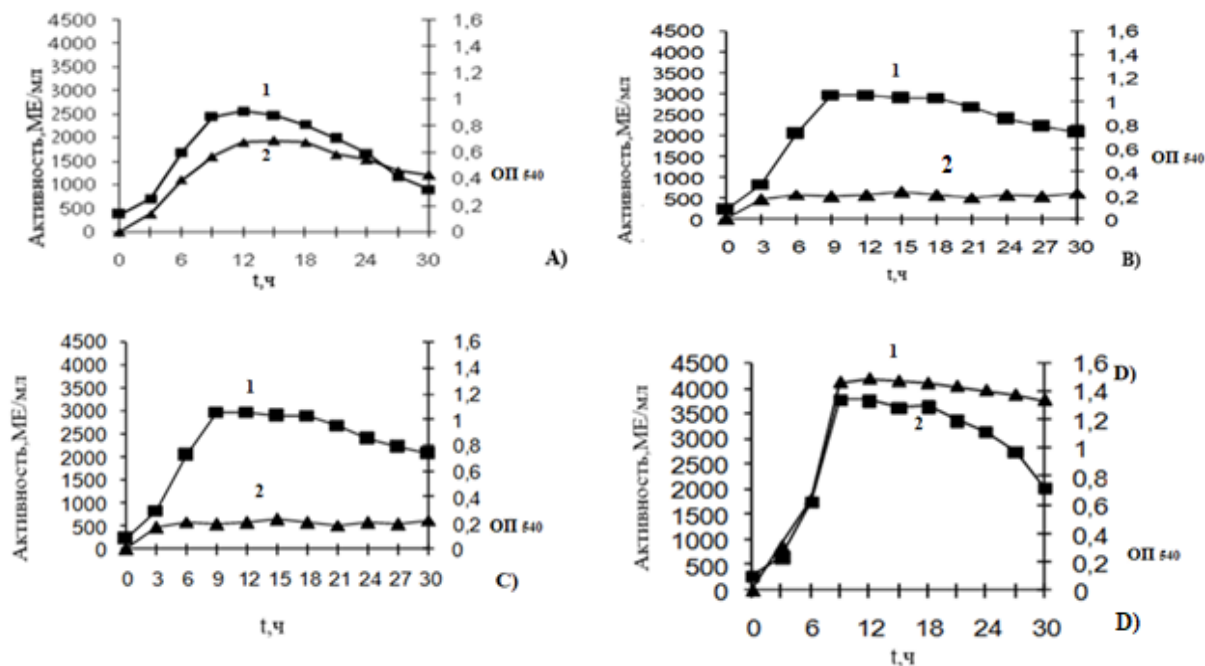


Рисунок - Динамика роста (1) и антимикробная активность (2) штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ($p \leq 0,05$) ((А) природный штамм 194; В) 729; С) 1605; D) F-116, тест-микроорганизм – *Micrococcus flavus*)

Результаты наших экспериментов указали на способность штаммов лактококков проявлять фунгицидную активность на микромицеты - отобранные тесты *Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжи *Candida albicans* INA 00763, которая составила 3325 ед/мл (активность рассчитана по нистатину). Стоит заметить, что увеличение активности на дрожжи и грибы у лактококков соответствовало 15–18 ч культивирования. Способность лактококков подвида *L. lactis* subsp. *lactis* к синтезу фунгицидных метаболитов является редким и малоизученным свойством [12]. Известно, что фунгициды обладают токсичностью для человека и животных, накапливаются в почве и воде, таким образом, потребность пищевой промышленности, медицины и сельского хозяйства в нетоксичных антимикотиках растет с каждым годом. В связи с этим актуален поиск новых фунгицидных веществ среди непатогенных форм микроорганизмов. Ранее было установлено, что F-116 - продуцент трехкомпонентных антимикробных комплексов, названного авторами ЛГС, два из которых эффективны против грамположительных бактерий по типу низина, а третий с молекулярной массой $M=506$ Да отнесен к группе алкилароматических кетонов, содержащих также гидроксильные группы, обладал фунгицидной активностью [3,13].

Среди опасных контаминантов – возбудителей болезней пищевого происхождения, связанных с потреблением продуктов из мяса птицы и создающих возможные риски для здоровья человека, являются *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, бактерии рода *Proteus*.

Результаты наших исследований показали, что штамм *L. lactis* ssp. *lactis* F-116 эффективен против бактерий группы кишечной палочки (БГКП): *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marsecens* и других грамотрицательных микроорганизмов, а также грамположительных: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus coagulans*, *Listeria monocytogenes*, ингибирует рост микромицетов: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula aurantica*, часто колонизирующих мясное сырье (таблица).

Таблица - Антимикробный спектр действия родительских штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* 729, 1605 и их гибрида F-116 в сравнении с низином

Тест-культура	Штаммы			Низин, 3000 МЕ/мл
	729	1605	F-116	
	Диаметр зон подавления роста, мм			
<i>Micrococcus luteus</i>	10±0,04	12±0,06	30±0,11	19±0,08
<i>Bacillus subtilis</i>	10±0,04	12±0,06	52±0,16	21±0,09
<i>Bacillus coagulans</i>	9±0,04	10±0,03	26±0,09	22±0,09
<i>Listeria monocytogenes</i>	8±0,03	9±0,03	21±0,08	16±0,07
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	12±0,06	21±0,08	18±0,06
<i>Salmonella gallinarum</i>	9±0,03	11±0,04	52±0,16	-
<i>Serratia marcescens</i>	8±0,03	9±0,03	21±0,10	-
<i>Escherichia coli</i>	10±0,04	11±0,04	19±0,08	-
<i>Proteus vulgaris</i>	9±0,03	10±0,04	19±0,08	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	9±0,03	17±0,07	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	8±0,03	14±0,06	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	9±0,03	14±0,06	-
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	-	-	16±0,07	-

Рост МКБ, населяющих макроорганизм человека, а также поступающих извне, зависит от происходящих в нем процессов, в том числе свободнорадикальных. Активные формы кислорода (АФК) запускают программируемую клеточную смерть – апоптоз. Накопление АФК (в частности, перекиси водорода) в продуктах вызывает прогорклость жира и обесцвечивание мясных продуктов за счет разрушения пигментов, что ведет к потере качества [8]. Интересен тот факт, что некоторые МКБ могут сохранять жизнеспособность в присутствии достаточно высоких концентраций H_2O_2 . То, что МКБ способны не только сохранять жизнеспособность, но и делиться в условиях достаточно сильных окислительных стрессов свидетельствует о том, что в их клетках есть ферменты антиокислительной защиты, например, супероксиддисмутаза (СОД).

Было выявлено, что гибридный F-116 обладают высокой СОД-активностью (до 30 ед/мг белка).

Получен новый нетоксичный препарат— бактериоцин ЛГС. Препарат лиофильной сушки обладает широким спектром бактерицидного и фунгицидного действия. Активность по низину - 1100 МЕ/мг, по нистатину - 1150 ед/ мг. Хорошо растворим в воде. При растворении в воде в количестве 10мг/мл выдерживает кипячение, автоклавирование при 1 атм в течение 2-х часов. Стабилен в широком диапазоне рН - от 2,4 до 8,0.

Заключение

Показана возможность практического использования бактериоцинообразующих лактококков в качестве биологических консервантов.

Выявлено, что рекомбинантный штамм F-116 обладает высокой СОД-активностью, что позволит создать эффективные препараты для снижения окислительной порчи мяса при хранении.

Новая технология применения предлагаемого биоконсерванта экологически безопасная, энергосберегающая и может быть рекомендована для обработки пищевого сырья в целях длительного хранения. При увеличении времени хранения повышается микробиологическая безопасность сырья и пищевая ценность готовой продукции. Рекомбинантный штамм F-116 можно рекомендовать для создания биоконсервантов с пребиотическим эффектом.

Следует отметить, что представленные экспериментальные данные имеют научный и практический интерес в плане использования новых штаммов, синтезирующих полезные биологически активные вещества уникальной структуры, возможного применения этих культур, имеющих статус "GRAS", в качестве биоконсервантов с биологически активными метаболитами. В перспективе ряд мер, направленных на уменьшение использования консервантов химической природы и антибиотиков, увеличение сроков годности, приведет к улучшению качества исходного сырья для производства новых высококачественных пищевых продуктов.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке финансирования Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований», специфике 154 «Оплата услуг по исследованиям» в рамках выполнения проекта AP19678940 «Разработка новой технологии хранения охлажденного мяса птицы и птицепродуктов с применением биологических методов консервирования в сочетании с холодом» на 2023-2025 гг.

Литература:

- 1 FAO (The Food and Agriculture Organization). FAOSTAT. 2020. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Дата обращения 1 февраля 2024).
- 2 Bernbom N., Licht T.R., Brogren C.H., Jelle B., Johansen A.H., Badiola I., Vogensen F.K. and Norrung B. Effects of *Lactococcus lactis* on Composition of Intestinal Microbiota: Role of Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 239-244. (doi:10.1128/AEM.72.1.239-244.2006)
- 3 Стоянова Л. Г., Устюгова Е. А., Нетрусов А. И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2012, 48(3): 259-275. (doi: 10.1134/S0003683812030143)
- 4 Стоянова Л. Г., Габриэлян Н. И. Перспективность использования пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* при лечении госпитальных инфекций. *Журнал инфектологии*, 2017, 9(4): 110.
- 5 Duarte F.N.D., Rodrigues J.B., Lima M.C., Lima M.S., Pacheco M.T.B., Pintado M.M.E., Aquino J.S., Souza E.L. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agroindustrial byproduct on *Lactobacillus* sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97: 3712 (doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>)
- 6 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morrell J. L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11: 506-514 (DOI:10.1038/nrgastro.2014.66)
- 7 Стоянова Л. Г., Егоров Н. С. Получение низинпродуцирующих бактерий методом слияния протопластов двух родственных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, низкоактивных по синтезу низина. *Микробиология*, 1998, 67(1): 47-54.
- 8 Vilela C., Kurek M., Hayouka Z., Röcker B., Yildirim S., Antunes M.D.C., Nilsen-Nygaard J., Pettersen M.K., Freire C.S.R. A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.*, Vol. 80, 2018: 212-222. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>)
- 9 Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Нетрусов А.И. Создание банка лиофильных бактериоцинопродуцирующих молочнокислых бактерий. *Цитология*, 2004, 46(10): 865-866
- 10 Стоянова Л.Г., Федорова Г.Б., Егоров Н.С. и др. Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* f-119 - продуцент антибиотического комплекса lgs и способ получения антибиотического комплекса lgs

с его использованием, №2374320, С 12 N 1/20, С 12 P 1/04, С 12 R 1/225, Стоянова Л.Г., Федорова Г.Б., Егоров Н.С. и др. (РФ). №2007148649/13,. Заявл. 28.12.2007. Оpubл. 27.11.2009. Бюл. 33.

11 Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Выделение и идентификация бактериоцинопродуцирующих штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* из свежего молока. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2011, 42: 560-568.

12 Kwak M.-K., Liu R., Kim M.-K., Moon D., Hyoung A., Kim J., Song S.-H., Kang S.-O. Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi. *Journal of Microbiology*, 2014, 52: 64-70. (doi: <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3520-7>)

13 Stoyanova L.G., Napalkova M.V., Netrusov A.I. The creating a new biopreservative based on fusant strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* f-116 for food quality and its safety. *Journal of Hygienic Engineering and Design, Consulting and Training Center KEY (Skopje)*, 2016, 16: 19-27. (URL: <https://keypublishing.org/jhed/wp-content/uploads/2020/07/02.-Full-paper-Lidia-G.-Stoyanova.pdf>)