

Л.Ю. Лаженцева

## ВЛИЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ НА КАЧЕСТВО СЫРЬЯ ИЗ МОРСКИХ ОБЪЕКТОВ

Исследованы микроорганизмы морских промысловых объектов, установлена количественная оценка их протеолитической активности. Наибольшей протеолитической активностью и скоростью роста характеризуются бактерии рода *Pseudomonas*, которые при пониженной положительной температуре хранения вызывают гидролитические изменения в сырье из рыбы и беспозвоночных и снижают его качество.

Рыба, беспозвоночные, микроорганизмы, протеолитическая активность, небелковый азот, реологические показатели.

### Введение

В результате микробной порчи ежегодно в мире теряется значительная часть сырья и продуктов из объектов морского промысла. Известно, что основную роль в процессах порчи играют бактериальные экзопроteaseы [1]. Наиболее выраженной протеолитической активностью обладают представители рода *Proteus*, которыми высоко обсеменено животное и растительное наземное сырье. Под действием микробных энзимов происходит распад белков, накопление азотистых низкомолекулярных соединений, в том числе свободных аминокислот и продуктов их превращений при дезаминировании и декарбоксилировании, что сопровождается накоплением низших алифатических и жирных кислот, моноаминов, диаминов, ароматических спиртов, гетероциклических соединений, сернистых и других токсичных для организма человека веществ.

Микробиологические исследования морских объектов из промысловых уловов показали, что они до 80 % контаминированы психрофильными бактериями родов *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, обладающими выраженной протеолитической активностью [2–4]. Численность этих микроорганизмов в свежем выловленном сырье составляет  $1,0 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$  клеток/г. Частота выделения протеев из гидробионтов не превышает  $5 \pm 0,6$  %, а степень обсеменения составляет не более  $1,4 \cdot 10^2 \pm 0,2 \cdot 10^2$  клеток/г. Температурные условия хранения охлажденной рыбы в местах промысла не являются благоприятными для развития протеев, что исключает возможность снижения качества или порчи рыбы за счет бактерий рода *Proteus*.

Целью настоящей работы явилось определение количественной характеристики протеолитической активности микроорганизмов из морских объектов и их влияние на качество сырья.

### Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований были использованы дальневосточные рыбы – горбуша, минтай и нерыбные объекты – креветки, кальмар, а также выделенные из них микробные штаммы – представители доминирующей микрофлоры. Для выделения микроорганизмов из исследованных объектов использован питательный агар.

Отбор проб рыбы и нерыбных объектов проводили непосредственно из промысловых уловов. Из морских объектов выделяли наиболее массовые виды микроорганизмов в соответствии с ГОСТ 10444.15-94 [5]. Первичный отбор протеолитически активных штаммов проводили в соответствии с рекомендациями В.М. Никитина [6]. О присутствии и активности микробных протеаз судили по действию их на желатин (загустевание желатина), казеин (феномен свертывания и пептонизации молока) и яичный белок (феномен просветления белковой среды).

Для определения протеолитической активности ферментного комплекса микроорганизмов и мышечной ткани гидробионтов использовали модифицированный метод Ансона [7–10]. Удельную активность пептидгидролаз выражали по приросту тирозина в мг на 1 г белка в час.

### Результаты и их обсуждение

Основными группами доминирующей микрофлоры в рыбе и беспозвоночных являлись представители бактерий рода *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Achromobacter* и другие потенциально морские виды. Частота выделения бактерий рода *Proteus* из объектов составила  $4,6 \pm 0,3$  %.

Из выловленных рыбы и нерыбных объектов были выделены 346 штаммов бактерий, которые были испытаны на наличие протеолитической активности. Установлено, что не все штаммы после изолирования их из морских объектов обладали протеолитической активностью. Несмотря на то что протеи относятся к группе основных гнилостных микроорганизмов, обеспечивают гниение практически всех органических субстратов в природе и в живых организмах, протеолитическую активность после их выделения показали всего  $57,7 \pm 2,1$  % штаммов. После нескольких пассажей на среде обогащения активность их восстанавливалась. По всей видимости, пребывание протеев в морской среде снижает их протеолитическую активность.

В этой связи было выдвинуто предположение, что непосредственно роль возбудителей порчи сырья и продуктов из морских объектов выполняют те протеолитические микроорганизмы, морская среда для которых является специфической, а условия добычи, хранения, транспортирования и переработки гидробионтов – благоприятными для развития.

Был оценен уровень протеолитической активности микроорганизмов, контаминирующих морские объекты и продукты из них. Штаммы бактерий с выраженной активностью протеаз культивировали на питательном бульоне при температуре 25–37 °С в течение 24 ч, после чего отделяли биомассу, в культуральной жидкости определяли протеолитическую активность. Для оценки участия протеаз мышечной ткани гидробионтов в процессах ее протеолиза также была определена протеолитическая активность мяса промысловых объектов.

В табл. 1 приведены сравнительные данные о протеолитической активности изолированных штаммов бактерий, а также мышечной ткани рыбы и беспозвоночных. Установлено, что активность ферментов мяса рыбы и беспозвоночных значительно ниже таковой выделенных штаммов бактерий, культивируемых в питательном бульоне в течение 18 ч. В одинаковых условиях *in vitro* наибольшей активностью экзопротеаз обладали бактерии родов *Proteus* и *Pseudomonas*.

Таблица 1

Протеолитическая активность микроорганизмов, изолированных из морских объектов

Микроорганизмы	Активность	
	ПЕ в 1 мл	мг тирозина в 1 мл/ч
<i>Achromobacter</i>	1,37±0,11	14,88±1,5
<i>Bacillus</i>	1,59±0,13	17,27±1,6
<i>Pseudomonas</i>	2,36±0,19	25,54±2,1
<i>Proteus</i>	2,29±0,18	24,87±2,1
Креветка	0,05	0,50
Кальмар	0,03	0,32
Горбуша	0,14	1,52
Минтай	0,03	0,32

Протеолитически активными штаммами бактерий (*P. fluorescens* и *P. vulgaris*) была инфицирована мышечная ткань гидробионтов, в которых предварительно определена активность собственных мышечных протеаз. Для сравнительной оценки роста и проявления активности протеаз пробы были заражены одинаковым количеством клеток, предварительно была подготовлена суспензия по стандарту мутности. После заражения в каждой пробе определено исходное количество клеток каждого вида.

Экспериментально инфицированные пробы выдерживали при температуре 2–5 °С в течение 24 ч.

На рис. 1 показано изменение численности бактерий каждого вида, которыми были заражены образцы креветок. В течение первых четырех часов достоверного изменения количества микробов в инфицированных образцах не отмечено, что, по видимому, соответствовало их лаг-фазе роста. В дальнейшем скорость роста псевдомонад была значительно выше, и через 24 ч их численность превышала количество протеев на 3 логарифмических порядка.

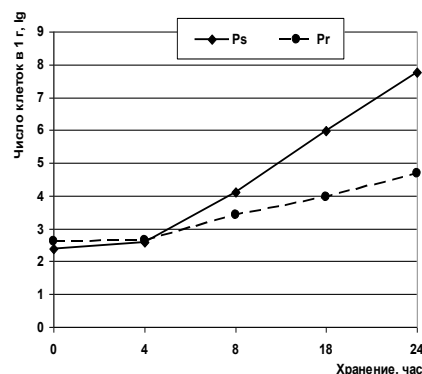


Рис. 1. Изменение численности протеолитически активных бактерий в тканях креветки при температуре 2–5 °С. Обозначения микробных штаммов: Ps – *P. fluorescens*; Pr – *P. vulgaris*

Закономерность роста опытных штаммов бактерий в инфицированных тканях рыбы и кальмара была подобной. Результаты определения протеолитической активности в пробах, инфицированных псевдомонадами и протеями, после хранения в течение 24 ч приведены на рис. 2.

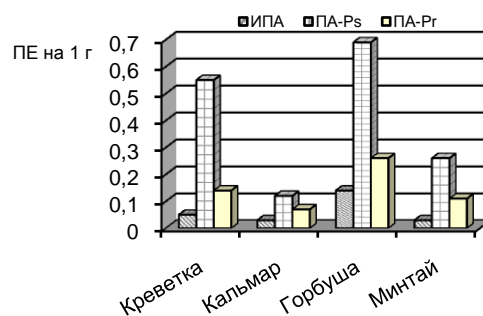


Рис. 2. Протеолитическая активность в экспериментально инфицированных пробах из морских объектов. Обозначения проб: ИПА – исходная до инфицирования; ПА-Ps – инфицированная бактериями *P. fluorescens*; ПА-Pr – инфицированная бактериями *P. vulgaris*

Как видно, активность мышечных протеаз в контрольных пробах из гидробионтов в зависимости от вида различается и при хранении практически не изменяется. В экспериментально инфицированных пробах из гидробионтов через 24 ч увеличилась как численность бактерий, так и протеолитическая активность. Причем число псевдомонад в 1 г проб в зависимости от вида объекта оказалось выше в 16–83 раза, чем количество протеев, и достигало более 16,0 млн клеток в 1 г. Протеолитическая активность инфицированных псевдомонадами проб превышала таковую в пробах, обработанных протеями, в 2 раза и более.

В пробах исходных и после выдержки в холодильнике определяли содержание небелкового азота ( $N_{\text{нб}}$ ) и азота летучих оснований ( $N_{\text{лб}}$ ). В табл. 2 показано, что в образцах рыбы и беспозвоночных в процессе хранения в условиях бытового холодильника происходит накопление небелковых форм азота, что

указывает на гидролитические изменения белков под действием экзопротеаз. Вместе с тем в пробах, зараженных псевдомонадами, скорость нарастания не-

белкового азота была значительно выше, чем в контрольных образцах и зараженных штаммом протея.

Таблица 2

Динамика изменения небелковых форм азота в пробах из гидробионтов

Объекты, зараженные штаммом		Образцы исходные		Образцы после хранения			
				незараженные		зараженные	
		N <sub>нб</sub>	N <sub>лю</sub>	N <sub>нб</sub>	N <sub>лю</sub>	N <sub>нб</sub>	N <sub>лю</sub>
Креветка	Ps	37,3	0,676	41,1	0,865	54,0	1,392
	Pr					45,6	0,986
Кальмар	Ps	34,8	0,828	38,9	1,015	58,1	1,747
	Pr					44,1	1,252
Минтай	Ps	24,8	0,467	27,4	0,514	40,1	0,913
	Pr					31,8	0,635
Горбуша	Ps	33,1	0,499	36,1	0,593	43,1	1,090
	Pr					38,1	0,704

Примечание. Обозначения штаммов: Ps – *Pseudomonas*; Pr – *Proteus*.

Заражение фаршей из гидробионтов штаммом *P. fluorescens* активно влияло на реологические показатели, что не наблюдалось при инфицировании протеолитически активным штаммом *P. vulgaris*. На рис. 3 показана зависимость изменения основных реологических показателей фарша из лососей под действием протеаз опытных микробных штаммов. Динамика изменения модулей сохранения и потерь в зараженных бактериями измельченных тканях минтая, креветки и кальмара была подобной.

### Выводы

Таким образом, установлено, что среди доминирующих видов микроорганизмов на морских объектах наибольшей протеолитической активностью характеризуются бактерии рода *Pseudomonas*.

Благодаря высокой скорости роста и высокой активности экзопротеаз при пониженной положительной температуре в сырье морского происхождения псевдомонады быстро вызывают гидролитические процессы, что снижает качество сырья и продуктов.

### Список литературы

1. Козарева, М. Протеолитическая активность некоторых условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих пищевые отравления / М. Козарева, Р. Еникова, Б. Симова, М. Йорданова // Вопросы питания. – 1982. – № 1. – С. 53–56.
2. Шульгина, Л.В. Микрофлора дальневосточных морей и ее влияние на продукцию из промысловых гидробионтов / Л.В. Шульгина, Г.И. Загородная, Ю.П. Шульгин, Т.М. Бывальцева, Л.М. Галкина // Гигиена и санитария. – 1995. – № 1. – С. 14–16.
3. Шульгина, Л.В. Научное обоснование летальности процессов стерилизации консервов из морских гидробионтов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1995. – 42 с.
4. Лаженцева, Л.Ю. Контаминация микроорганизмами объектов морской среды залива Петра Великого // Материалы III Международной научной конференции «Рыбохозяйственные исследования Мирового Океана». – Ч. 2. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2005. – С. 64–65.

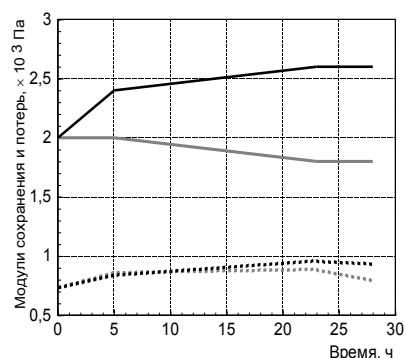


Рис. 3. Зависимость изменения модуля сохранения (сплошные линии) и модуля потерь (пунктирные линии) в образцах фарша из лососей, зараженного *P. fluorescens* (черные линии) и *P. vulgaris* (серые линии)

5. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. – М.: Изд-во стандартов, 1994.
6. Никитин, В.М. Справочник методов биохимической экспресс-индикации микробов. – Кишинев: Картя Молдовеныскэ, 1986. – 296 с.
7. ГОСТ 20264.2-88. Препараты ферментные. Метод определения протеолитической активности. – М.: Изд-во стандартов, 1988.
8. Каверзнева, Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз // Прикладная биохимия и микробиология. – 1971. – Т. 7. – Вып. 2. – С. 225–228.
9. Польшалина, Г.В. Определение активности ферментов: справочник / Г.В. Польшалина, В.С. Чердниченко, Л.В. Римарева. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.
10. Садовая, Т.Н. Изучение активности ферментных систем плесневых грибов / Т.Н. Садовая // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 1(20). – С. 45–50.

ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный  
технический рыбохозяйственный университет»,  
690087, Россия, г. Владивосток, ул. Луговая, д. 52б.  
Тел./факс: (4232) 44-03-06  
e-mail: festfu@mail.ru

## SUMMARY

**L.Yu. Lagenceva**

### **EFFECT OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIA ON THE QUALITY OF MARINE RAW MATERIALS**

The micro-organisms of marine raw materials are studied. The quantitative evaluation of their proteolytic activity is established. The bacteria of the *Pseudomonas* genus are characterized by the highest proteolytic activity and growth rate, and cause hydrolytic changes in raw fish and invertebrates and lower their quality at low temperature of storage.

Fish, invertebrates, microorganisms, proteolytic activity, non-protein nitrogen, rheological properties.

Far Eastern Technical Fisheries University  
52b, Lugovaya, Vladivostok, 690087, Russia  
Phone/Fax: +8 (4232) 44-03-06  
e-mail: festfu@mail.ru

