

ӘОЖ 577.21
МРНТИ 34.15.25

DOI: <https://doi.org/10.37788/2021-3/106-113>

А.Е. Үсенова^{1*}, А.К. Оспанова¹, Г.Г. Джаксыбаева²

¹Инновациялық Еуразия Университеті, Қазақстан

²Торайғыров университеті, Қазақстан

*(e-mail: arailim777@mail.ru)

Lactobacillus тектес бактериялардың биохимиялық қасиеттерін зерделеу және оларды сәйкестендіру

Аңдатпа

Негізгі мәселе: Бұл мақалада *Lactobacillus* тектес бактериялардың биохимиялық қасиеттері және оларды өнеркәсіпте, атап айтқанда сүт өндірісінде және биотехнологияда пайдалану жөніндегі өзекті деректер қарастырылған. *Lactobacillus* тектес микроорганизмдер патогенді микроорганизмдерге қатысты антагонистік белсенділікке ие және иммунитетті күшейтуші функцияны орындайды. Лактобациллдер адам денсаулығына оң ықпалын тигізетіндіктен, олар пробиотиктерде белсенді пайдаланылады. Ішек пен пробиотиктердің қалыпты микрофлорасының позитивті әсерлері негізінен бифидо- және лактобактериялармен түсіндіріледі. Пробиотикотерапияда *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei* секілді *Lactobacillus* тектес бактериялардың әралуан түрлері пайдаланылады. Соңғы жылдары пробиотиктердің – адам мен жануарлардың асқазан-ішек жолындағы микроэкологиялық бұзылыстарды түзету және олардың алдын-алу үшін пайдаланылатын препараттардың биотехнологиясы қарқынды дамып келеді. Лактобациллдер биологиялық қасиеттері туралы жаңа деректер алу, олардың негізінде өсірудің модификацияланған тәсілдемелерінің көмегімен жаңа пробиотикалық препараттар жасау өзекті мәселе болып табылады. Сахаролитикалық белсенділік негізінде сәйкестендірудің классикалық биохимиялық әдісімен алынған, түрді сәйкестендіру жұмысын жүргізуді қиындататын *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* түрлерін анықтау нәтижелері молекулалық-генетикалық әдіспен салыстыруға келеді. *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* жағдайында полимеразалық тізбекті реакцияға негізделген сәйкестендірудің заманауи әдістерін жүргізу қажет, себебі олардың биохимиялық қасиеттері ұқсас келеді, бұл жайт түрді сәйкестендіруді күрделендіреді. Молекулалық-генетикалық әдіс классикалық биохимиялық әдістің өзгергіштігін ескере отырып, лактобациллдерді тұқымаралық және түрлік сәйкестендіру үшін құнды толықтыру болып табылады.

Мақсаты: *Lactobacillus* тектес бактериялардың биохимиялық қасиеттерін зерделеу және оларды сәйкестендіру.

Әдістер: *Lactobacillus* тектес микроорганизмдерді биохимиялық сәйкестендіру RapID стандартты биохимиялық тест-стриптерді пайдалану арқылы жүргізілді. Нәтижелерді интерпретациялау ERIC бағдарламалық қамтылымымен жүргізілді.

Нәтижелер және олардың маңыздылығы: *Lactobacillus* тектес бактериялардың таксономиялық және биохимиялық қасиеттері қарастырылып, зерделенді. Зерттелетін микроорганизмдерді биохимиялық сәйкестендіру жүргізілді. *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* түрлерінің биохимиялық қасиеттері ұқсас келеді, бұл жайт түрлік сәйкестендіруді жүргізуді қиындатады. *B. bifidum*, *L. acidophilus* түрлік дифференциациясы байқалады. Түрлік тиістілікті дәлірек анықтау үшін полимеразалық тізбекті реакцияға және ДНҚ-гендерінің реттілігін секвенирлеуге негізделген заманауи әдістер талап етіледі.

Түйін сөздер: *Lactobacillus*, биохимиялық сәйкестендіру, пробиотиктер, бактериялар.

Кіріспе

XIX ғасырдың соңынан қазіргі уақытқа дейін *Lactobacillus* тектес бактериялар ғылыми зерттеулердің объектісі болып табылады, себебі олар ежелгі дәуірден бері ашытылған сүт өнімдерін өндіру үшін стартерлік дақылдар ретінде пайдаланылған.

Лактобациллдер биотехнология мен тамақ өнеркәсібінің әртүрлі салаларында кеңінен қолданылады. Олар пайдаланылатын негізгі сала – ашытылған сүт өнімдерін өндіру, әр түрлі тағам өнімдерін байыту, сондай-ақ дәрілік препараттар мен тағамға қосылатын ББҚ түріндегі пробиотиктерді жасап шығару. Бүгінгі таңда отандық нарықта *Lactobacillus* тектес бактерияларды құрайтын өнімдер мен препараттардың кең ассортименти бар [1].

Ашытылған сүт өнімдері саласындағы жетекші мамандардың заманауи әзірлемелері мен ғылыми еңбектеріне жүргізілген талдау функционалды тамақ өнімдерін әзірлеу оларды адам рационына енгізу аспектілері адам ағзасының микроэкологиялық мәртебесін қолдаудағы перспективалы бағыт екенін көрсетті.

Функционалды өнімдер тобында ашытылған сүттен дайындалған пробиотикалық өнімдер ерекше орын алады, бұл жайт олардың түрлік құрамымен, сондай-ақ адам ағзасына жағымды мақсатты әсерінің кең спектрімен түсіндіріледі.

Ашытылған сүт өнімдерінің құрамында пробиотикалық дақылдарды пайдалану функционалды тамақтанудың маңызды элементі болып табылады, осы себепті бірегей пайдалы қасиеттері бар сүт қышқылды және пропион-қышқылды бактериялардың ассоциаттарын қамтитын жаңа пробиотикалық өнімдерді әзірлеу сүт өнеркәсібіндегі заманауи биотехнологиялардың стратегиялық бағыты ретінде қарастырылады.

Микроорганизмдер консорциумдарын – әр түрлі таксономиялық топтардың пробиотиктерін әзірлеу өзекті және перспективалы бағыт болып табылады, бұл жайт биохимиялық белсенділіктің жалпы жоғарылауын, бастапқы ассоциаттармен салыстырғанда консорциумның қолайсыз және агрессивті факторларға тұрақтылығын түсіндіреді.

Бағытталған әрекеттің күрделі компоненттерінің синергизмін біріктіретін синбиотикалық пробиотикалық өнімдерді – пробиотиктер мен пребиотиктерді жасау сүт өнеркәсібінде биотехнологияларды қолданудың тиімді әдісі болып табылады. Алайда қазіргі заманғы ғылыми-техникалық әдебиетке жүргізілген талдау Қазақстан Республикасының аумағында синбиотикалық бағыттағы пробиотикалық өнімдердің технологияларын теориялық әзірлеу және практикалық қолдану мәселесі толық көлемде іске асырылмағанын және одан әрі зерттеуді талап ететінін көрсетті.

Бактериоцин өндіруші микроорганизмдерді қолдану тәжірибесі одан әрі зерттеу қажеттілігін көрсетеді, бірақ дегенмен бактериоциндер тиісті мәселелерді шешу үшін пайдаланылуы мүмкін.

Осылайша, ашытылған сүт өнімдері өндірісінде пробиотикалық дақылдарды пайдалану патогенді және шартты патогенді микроорганизмдерге белсенді бөлініп алынған сүт қышқылды дақылдардың ассоциацияларын енгізудің орынды екенін көрсетеді. Сүт қышқылды бактерияларды іріктеу кезінде протеолитикалық, антибиотикалық белсенділік, қышқыл түзуші қабілет, қышқылға және өтке төзімділік, бактериоциндерді өндіру қабілетілігі негізге алынады. Сүт қышқылды бактериялар патогендік микрофлораның дамуын тежеп, антибиотиктерді синтездеу қабілетіне ие, дәрумендер мен аминқышқылдарының синтезіне қатысады, ішектің адсорбциялық қабілетіне оң әсерін тигізеді. Ашытылған сүт өнімдері өндірісінде *Lactobacillus* тектес бактерияларды құрайтын өнімдерді қолдану өзекті әрі перспективалы болып табылады.

Соңғы жылдары пробиотиктердің – адам мен жануарлардың асқазан-ішек жолындағы микроэкологиялық бұзылыстарды түзету және олардың алдын-алу үшін пайдаланылатын препараттардың биотехнологиясы қарқынды дамып келеді. Пробиотикалық препараттардың тиімділігі препараттың құрамына кіретін штаммдардың биологиялық қасиеттерінің жиынтығымен анықталады. Өндірістік бактериялар олардың патогенді және шартты патогенді микроорганизмдермен бәсекелесуіне мүмкіндік беретін бірқатар сипаттамаларға ие болуы тиіс. Мұндай сипаттамаларға төмендегілер жатады: апатогенділік, антагонистік белсенділік, адгезияға және ішектің шырышты қабығын колонизациялауға қабілеттілік, қышқыл түзу белсенділігі, тұз қышқылы мен өтке резистенттіліктің белгілі деңгейі.

Осылайша, қолданбалы биотехнологияның қарқынды дамуы ашытылған сүт өнімдерінің жаңа буынын өндіру үшін кең перспективаларды ашуда. Бұл өнімдер пробиотиктерді қолдану арқылы өндірілетін өнімдер болып келеді – микроорганизмдердің моно- немесе аралас дақылын құрайды, адам пайдаланған кезде олар табиғи микрофлораның қасиеттеріне пайдалы әсерін тигізеді. Мұндай ұйытқылар ерекше диеталық және терапевтік қасиеттері бар: олар микробқа қарсы заттарды өндіреді, қажетсіз ішек микрофлорасын басуға қатысады, шырышты қабатта дамиды және ас қорыту жолында өміршең келеді.

Атап өтетін жайт, заманауи биотехнологияда өнімнің биологиялық құндылығын арттыруға, органолептикалық және реологиялық көрсеткіштерді жақсартуға мүмкіндік беретін симбиотикалық ұйытқылар, микроорганизмдердің ассоциаттары мен консорциумдары кеңінен қолданылады.

Lactobacillus тектес микроорганизмдер иммунтүрлендіруші функцияны орындайды және патогендік микроорганизмдерге қатысты антагонистік белсенділікке ие. Лактобациллдер адам денсаулығына оң ықпалын тигізетіндіктен, олар пробиотиктерде белсенді пайдаланылады. Ішек пен пробиотиктердің қалыпты микрофлорасының позитивті әсерлері негізінен бифидо- және лактобактериялармен түсіндіріледі.

Қажетсіз микробтардың өсуіне қысым көрсету айқын антагонистік белсенділікке ие субстанцияларды қамтитын пробиотиктары өнімдерінің: лизоцимнің, бактериоциндердің, органикалық қышқылдардың (сүт, сірке, янтарь, құмырсқа), сутек асқыноттығының, антибиотиктік белсенділікке ие заттардың арқасында жүреді. Лактобациллдердің сүт қышқылын түзуі ішекішілік заттың рН көрсеткішінің рН 4,0–5,8 дейін төмендеуіне және өсімнің тежелуіне және шіріктік микроорганизмдердің көбеюіне әкеп соғады. Пробиотиктер ішектің эпителий жасушаларына қатысты адгезивті белсенділікке ие және ішек қабырғасындағы адгезия сайттары үшін патогендік және шартты патогенді микробтармен бәсекелеседі, бұл жайт та нәтижесінде қажетсіз микрофлораның өсуіне қысым көрсетеді [1].

Материалдар және әдістер

Жұмыста коммерциялық лиофильді кептірілген Линекс, Бифидобактерин бифидум препараттары, Нарине ашытылған сүт өнімі пайдаланылды, сондай-ақ «ФудМастер» ЖШС компаниясының өндірістік ұйытқылар пайдаланылды. *Lactobacillus rhamnosus*. YO-MIX 207 LYO 250

DCU/ YO-MIX 208 LYO 250 DCU құрайтын «Био-С Имун плюс» биоюгуртны өндіруге арналған CHOOZIT BIO-C IMUN+ LYO 200 DCU сүтті дақылды бұл құрамында *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* секілді штамдарды қамтитын ішетін йогурттарды өндіруге арналған іріктелген штамдардың қоспасы болып табылады.

Лактобациллдерді ндикациялау және сәйкестендіру үшін қолданылатын әдістердің ішінде мәдени әдістерді, яғни микроорганизмнің таза дақылды ажыратып алудың міндетті кезеңін талап ететін әдістерді және осы кезеңді айналып өтіп, зерттеу жүргізуге мүмкіндік беретін мәдени тәуелсіз әдістерді атап өту қажет.

Lactobacillus тектес бактериялардың дақылдары MRS-4 ортасында өсірілді, инкубациялау – 37 °C температура жағдайында 12 сағат.

Классикалық микробиология көмегімен *Lactobacillus* тектес бактерияларды өсіру үшін қоректік заттар мен өсу факторларына бай MRS (de Man, Rogossa and Sharpe) ортасы пайдаланылды. Орта құрамы: ашытқы автолизаты – 5 г, ет экстрактісі – 10 г, глюкоза – 20 г, аммоний цитраты – 2 г, натрий ацетаты – 5 г, протеозопептон – 10 г, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 200 мг, $MnSO_4 \times 4H_2O$ – 500 мг, K_2HPO_4 – 2 г, твин 80 – 1 г, агар-агар – 20 г, су – 1000 г, pH 6,2-6,6. MRS ортасы пробиотикалық лактобациллдермен жұмыс істеу үшін, сондай-ақ осы микроорганизмдерді тамақ өнімдері мен табиғи биотоптардан ажырату үшін қолданылуы мүмкін [2].

Ажырату және жетілдіре өсіруден кейін лактобациллдерді түрге дейін сәйкестендіру кезеңі жүреді. *Lactobacillus* тектес бактерияларды биохимиялық сәйкестендіру (көмірсулар ферменттелуін анықтау процесінде) RapID стандартты биохимиялық тест-стриптерді пайдалану арқылы жүргізілді. Нәтижелерді интерпретациялау ERIC бағдарламалық қамтылымымен жүргізіледі.

RapID микроорганизмдерді сәйкестендірудің қолмен басқарылатын тест-жүйесі биохимиялық тесттерге негізделген, аталмыш тестілер 4 сағат ішінде нәтиже алуға мүмкіндік беретін микроорганизмдерді сәйкестендірудің жеделдетілген әдісіне жатады. RapID тест-жүйесі шұңқыршалары бар мөлдір пластиктен жасалған панельдер болып келеді, микроорганизмнің белгілі бір ферментативті белсенділігін, сондай-ақ оның көмірсуларды кәдеге жарату қабілетін анықтау үшін аталмыш шұңқыршаларға лиофилизирленген субстраттар енгізілген. Шұңқыршаларға микроорганизмнің таза дақылдың суспензиясы енгізіледі, мұнда субстраттардың еруі жүреді. Бұдан әрі тесті тиісті жағдайларда инкубацияланады және 4 сағаттан соң нәтиже есепке алынады. Нәтижені есепке алу шұңқыршадағы суспензия түсінің өзгеруі бойынша жүреді. Оң және теріс бағалаулардың алынған үлгісі тест нәтижелерін деректер базасына сәйкес келетін реактивтілік үлгілерімен салыстыру арқылы тестіленетін изолятты сәйкестендіру үшін негіз ретінде пайдаланылады. Тест нәтижелері бойынша бактерияларды сәйкестендіру кесте бойынша қолмен немесе ERIC бағдарламасы көмегімен жүзеге асырылады.

Микроорганизмді RapID көмегімен сәйкестендіру бірнеше кезеңді қамтиды:

- дақылды дайындау;
- инокуляция, тестті өсіру және нәтижені есепке алу;
- алынған нәтижені арнайы деректер базасын пайдалана отырып интерпретациялау.

RapID стандартты биохимиялық тест-стриптер жиынтығының ала қатарына қанттар мен көпәтомды спирттердің субстраттары кіреді: арабиноза, целлобиоза, галактоза, лактоза, мальтоза, маннит, манноза, мелибиоза, раффиноза, салицин, сахароза, трегалоза, ксилоза, сорбит, эскулин, мелецитоза.

Микроскопия көмегімен дақыл тазалығын тексергеннен кейін, агар пластинасының бетінен ілгектердің өскен колониялары алынады және лайлылық стандарты бойынша 1 мл-де бактериялардың 1 миллиард жасушасын құрайтын жүзгінді алу үшін натрий хлоридінің стерильді ерітіндісінде ресуспендирленеді. 0,01 мл мөлшеріндегі алынған бактериялар жүзгіні негіздің 1 мл-іне енгізіледі (орта негізіндегі жасушалар жүзгінінің концентрациясы – 10⁷ м. к.).

Лиофильді кептірілген штамдар стерильді физиологиялық ерітіндінің 1 мл-іне және 0,1–0,15 мл сұйылтылады және MRS-2 сұйық ортасында себіледі. Инкубация – 2 тәулік, t – 37 °C. Сұйылту – 10–1–10–6 стерильді физиологиялық ерітіндіде. MRS-4 ортасына қайта себу. Инкубация – 2 тәулік, t – 37 °C. 2 тәуліктен соң дақылдар биохимиялық тест-стриптерде ала қатарды қою үшін пайдаланылады. Инкубация – 4 сағат (аэробты түрде), t – 37 °C. Нәтижелер шұңқыршаларда орта бояуының өзгеруі бойынша есепке алынады.

Нәтижелер

Lactobacillus тектес бактериялардың биологиялық және биохимиялық қасиеттері зерделенді. *Lactobacillus* тектес микроорганизмдердің биологиялық қасиеттері. *Lactobacillus* тектес бактериялар Caryotes Империясына, Procarayotes Патшалық үстіне, Bacteria патшалығына, Firmicutes Бөліміне, Bacilli Класына, Lactobacillales Қатарына, Lactobacillaceae Тұқымдасына, *Lactobacillus* тегіне жатады.

Лактобациллдер өлшемі 0,5–1,2×1,0–10,0 мкм, дұрыс пішінді грамоң спора түзбейтін таяқшалар болып келеді. Әдетте, таяқшалар ұзын, бәрақ кейде кокк түріне ие, әдетте қысқа тізбектерде, сирек жағдайларда перитрихальді талшықтар есебінен қозғалғыш келеді. Микроорганизмдердің

морфологиясы өсу жағдайларына, қоректік ортаның құрамына, температуралық режимге және дақылдың жасына байланысты.

Факультативті анаэробтар, микроаэрофилдер ауада нашар өседі, оттегі құрамы аз болған кезде жақсы өседі, кейбір түрлер тек анаэробты жағдайларда өседі. Өсім әдетте 5 % CO₂ қосу арқылы ынталандырылады. Агарлендірілген орталардағы колониялар, әдетте, 2–5 мм диаметрге ие, дөңес келеді, қырлары тұтас болады, мөлдір емес, пигменттелмеген болады, орта қатқабатында мақта кесікшелері түріне ие, ақ және саршыл-қоңыр түсті. Хемоорганотрофтар бай күрделі орталарды қажет етеді. Метаболизм ашыту типінде, сахарокластикалық; кем дегенде ашудың соңғы өнімдері көміртегінің жартысы лактатқа тиесілі. Нитраттарды қалпына келтірмейді, желатинаны сұйылтпайды, каталазотеріс, цитохромдарды құрамайды. Өсу үшін оңтайлы температура 30–40°C [4].

Адгезивті және антагонистік белсенділік, ортаның жоғары қышқылдығына төзімділік *Lactobacillus* тектес бактерияларға адам мен жануарлар ағзасының әртүрлі биотоптарын колонизациялауға және микробтық биоценоздың басқа өкілдерімен сәтті бәсекелесуге мүмкіндік беретін аталмыш бактериялардың негізгі биологиялық қасиеттері болып табылады. Адгезия – колонизациялаудың тиімділігін анықтайтын негізгі қасиет. Адгезия құбылысы айрықша органеллалармен – бактериялық жасушалардың бетінде орналасатын кірпікшелермен қамтамасыз етіледі, бұл органеллалардың ультрақұрылымы – ақуыздар мен полисахаридтердің конгломераты. Гастроинтестинальді лактобациллдер адгезиясының механизмдері жеткілікті дәрежеде жақсы зерделенген. М.Н. Сосоньег мен қызметкерлердің деректеріне сәйкес *L. acidophilus* адгезиясы жасуша қабырғасының экзополисахаридтерінің көмегімен жүзеге асырылады және promoting-фактормен – экзометаболит болып табылатын ақуыз табиғатына ие затпен бастамаланады [3]. Сүтқышқылды бактериялардың 9 түрінде mucus-binding domain (MUD) – муцинге адгезияны шарттайтын ақуыздық субстанциялар ажыратылып алынып, зерделенді. Неғұрлым толық домендер тек интестинальді сүтқышқылды бактерияларда анықталды. Осы пептидтерді кодтайтын тізбектіліктер әртүрлі жасушадан тыс компоненттерді кодтайтын гендер кластерінде болды [4].

Пробиотикалық флораның антагонистік белсенділігі макроорганизмнің колонизациялық резистенттілігін қамтамасыз ету механизмдерінің бірі болып табылады. Сүтқышқылды бактериялар мен ашытқылардың қожайынның патогенді және шартты-патогенді микрофлорасына қатысты антагонизмі төмендегілермен іске асырылады: органикалық қышқылдардың, сутегі асқынототығының, лизоцимнің, антибиотиктердің, бактериоциндердің синтезімен, қоректік заттар үшін бәсекемен, жасушалар популяциясы, адгезиялардың жоғары жылдамдықты көбеюімен және т.с.с. Осылайша, осы бактериялардың патогенді және шартты-патогенді макроорганизмдердің өсуі мен көбеюіне қысым көрсету қабілеті штаммдардың негізінде препарат-пробиотиктерді жасау үшін перспективті штаммдарды іріктеудегі маңызды критерийлердің бірі болып табылады [5, 6].

Сүтқышқылды бактериялардың тобы филогенетикалық тұрғыдан жақын тектес макроорганизмдері қамтиды: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Alloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Melissicoccus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactosphaera*, *Aerococcus* [7].

Барлық сүтқышқылды бактериялар энергия көзі ретінде көміртектерді пайдаланады және оларды сүт қышқылын түзе отырып ыдыратады. *Enterobacteriaceae* тұқымдас бактериялармен салыстырғанда сүтқышқылды бактериялар тек ашуға қабілетті, цитохром және каталаза секілді гемопротеиндерді құрамайды.

Гомоферментативті сүтқышқылды бактериялар глюкоза ашыған кезде іс жүзінде бір сүт қышқылын (барлық ашу өнімдерінің 90 %) түзеді. Глюкоза катаболизмі фруктозалық-1,6-бифосфаттық жолмен жүрдеі (гликолиз немесе Эмбден-Мейерхоф-Парнас жолы). Бұл бактериялар барлық қажетті ферменттерге, соның ішінде алдолазаға ие. Лактатдегидрогеназаның стереоспецификалығынан және лактатрацемазаның бар-жоқтығынан қандай өнім - D(-), L(+) немесе D/L-сүт қышқылы түзілетіні тәуелді болады. Гомоферментативті сүтқышқылды бактериялар пентозаларды ашытуға қабілетсіз. Облигатты гетероферментативті сүтқышқылды бактерияларда фруктозобифосфаттық жолды басты ферменттері – альдолаза мен триозофосфатизомераза жоқ. Олар пентозофосфаттық жолмен сүт және сірке қышқылын және CO₂ түзе отырып глюкозаны және сүт және сірке қышқылын түзе отырып пентозаны ашыту қабілетіне ие [2].

Lactobacillus тектес пробиотикалық сүтқышқылды бактерияларды сәйкестендіру олардың морфологиялық-дақылдық және биохимиялық белгілеріне негізделген. Сондай-ақ лактобациллдерді стандартты микробиологиялық тестілерді пайдалана отырып сәйкестендіру кезінде қиындықтар туындайы мүмкін. Мысалы, туыс-тек жағынан бір-біріне жақын *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* физиологиялық-биохимиялық қасиеттер негізінде сәйкестендіру олардың қасиеттерінің ортақтығы салдарынан қиынға соғады. Мұндай міндет олардың сахаролитикалық қасиеттерінің ұқсас боуымен, фенотиптік белгілердің өзгергіштігімен күрделене түседі [8].

Микроскопиялық зерттеу әдісі артықшылықтар мен кемшіліктерге ие. Артықшылықтары – қарапайымдылық; микроорганизмдерді тікелей айқындау; микроорганизмдерді морфологиялық белгілері

бойынша ажырату мүмкіндігі. Кемшіліктері – еңбек сыйымдылығы, ұзақтығы; төмен сезімталдық; ұқсас микроорганизмдерді ажыратудың мүмкін болмауы; жоғары біліктіліктің қажеттілігі.

Зерттеудің жаңа тәсілдемесі стерильді планшеттерге енгізілген дегидратацияланған реагенттердің үлкен жиынтығынан тұратын коммерциялық тест-жүйелерін қолдану есебінен сүтқышқылды бактерияларға классикалық фенотиптік талдау жүргізуді жеңілдетеді. Бактериялық дақылдардың суспензиясын қосу реакцияның болуын (өсімін, ферментативтік реакцияны және т.с.с.) жылдам анықтауға мүмкіндік береді. Сонымен бірге, сүтқышқылды өнімдерге арналған ұйытқылардың құрамына кіретін микроорганизмдерді дәлірек сәйкестендіруге фенотиптік талдаулармен қатар геномдық сипаттамаларды зерделеуді қамтитын кешенді зерттеулер нәтижесінде қол жеткізуге болады [8].

Бактерияларды сәйкестендіруге арналған тест-жүйелер екі түрге бөлінеді. Олардың бірі бір дақылды сәйкестендіруге бағытталған, екіншісі бірнеше дақылды сәйкестендіруге арналған шұңқыршаларды қамтитын көп қатарлы планшет болып келеді. Тестжүйелердің бірінші типі өз кезегінде кең қолданысқа ие, себебі олар қолжетімді әрі кішігірім зертханалар үшін ыңғайлы. Таңдалған дақылдарды сәйкестендіру үшін суспензияны дайындау қажет, содан кейін шұңқыршалар бұрын дайындалған суспензияның белгілі бір көлемімен инокулирленеді, тиісті жағдайларда инкубацияланады, инкубация аяқталғаннан кейін алынған нәтижелер оқып алынып, интерпретацияланады. Нәтижелерді оқып алу визуалды түрде, сондай-ақ арнайы ридерлердің көмегімен жүргізілуі мүмкін. Алынған мәліметтер кодталады, оларға сәйкесінше оң немесе теріс белгі беріледі. Бұл кезеңде арнайы компьютерлік бағдарламалық қамтылымдарды пайдаланған тезірек әрі ыңғайлы болады. Микроорганизмдерді биохимиялық сәйкестендіруге арналған тест-жүйелер шығаратын фирмалар өздерінің тест-жүйелері үшін талдау нәтижелерін өңдеуге арналған арнайы компьютерлік бағдарламаларды әзірлейді.

Лактобацилларды түрлік сәйкестендірудің негізі – лактобациллардың көмірсуларды ферменттеу қабілеті бойынша биохимиялық қасиеттері. Сәйкестендірудің классикалық микробиологиялық схемасы қанттардың метаболизміне негізделген. Субстраттар гетероферментативті және гомоферментативті лактобациллармен гликолитикалық және тотықтырғыш пентозофосфаттық жолмен кәдеге жаратылады.

Жұмыста *Lactobacillus* – *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* и *B. bifidum* тектес бактериялар түрлерінің биохимиялық қасиеттерінің деректері келтірілген (1-кесте). Бұл түрлерді сәйкестендірудің классикалық микробиологиялық схемасы қанттар метаболизмін зерделеуге негізделген және «ала қатар» болып келеді, бұл ретте ол 16 субстраттан (қанттар мен көпәтомды спирттерден) тұрады: арабиноза, целлобиоза, галактоза, лактоза, мальтоза, маннит, манноза, мелибиоза, раффиноза, салицин, сахароза, трегалоза, ксилоза, сорбит, эскулин, мелецитоза. Жұмыс нәтижесінде біздің тарапымыздан кәдеге жаратылатын субстраттардың: көмірсулардың спектрі зерделенді, оның ішінде олигосахарид раффиноза зерттелді, соңғысының қайта бөлінген штаммдармен метаболизмі бұрын зерделенген емес, көпәтомды спирттердің (сорбит, маннит) және глюкозидтердің (салицин, эскулин). *Lactobacillus* тектес бактериялар штаммдарының биохимиялық қасиеттері Rapid тест-жүйелерін қолдана отырып анықталды. *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* түрлерінің биохимиялық қасиеттері ұқсас келеді, бұл жайт түрлік сәйкестендіруді жүргізуді қиындатады. Арабинозаның, целлобиозаның, галактозаның, лактозаның, мальтозаның, манниттің, маннозаның, мелибиозаның, раффинозаның, салицинді, сахарозаның, трегалозаның, ксилозаның, сорбиттің және т.с.с. аталынған лактобациллармен ассимиляциялану реакциясы бірдей екені байқалды. Дереккөздердің мәліметтері бойынша, *L. rhamnosus* – бұл бастапқыда *L. casei* түршесі болып саналған бактерия, алайда генетикалық зерттеулер ол жеке түр екенін көрсетті. *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* түрлік дифференциациясы байқалады.

1-кесте – *Lactobacillus* тектес бактериялардың биохимиялық қасиеттері

Түрлері	Целлобиоза	Галактоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Манноза	Мелибиоза	Раффиноза	Салицин	Сахароза	Трегалоза	Арабиноза	Сорбит	Ксилоза	Эскулин	Мелецитоза
<i>B. bifidum</i>	±	+	+	+	±	+	+	+	-	+	±	-	-	-	+	-
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>L. rhamnosus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>L. paracasei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+

Ескертпе: «+» оң; «-» теріс; «±» – баяу оң

Мультипробиотиктерді жасау кезінде лактобациллдерді бірге өсіру кезінде олардың штаммаралық өзара әрекеттесуін зерделеу қажет.

Индикаторлық штаммдар ретінде Chr.Hansen өндірген «Lactobacillus acidophilus LA-5», Danone/Dannon өндірген Lactobacillus casei DN-114 001(Actimel, DanActive), Valio өндірген Lactobacillus rhamnosus ATCC 53013 (LGG) пробиотиктерінің препараттары пайдаланылды. Lactobacillus acidophilus LA-5 лактобактериясының құрамына Lactobacillus acidophilus LA-5 кіреді, мөлшері кемінде $2 \times 10^9 - 4 \times 10^9$ м. к. Actimel құрамы Valio өндірген Lactobacillus casei DN-114 001, Lactobacillus rhamnosus ATCC 53013 (LGG) ұсынылған, бір дозадағы мөлшері кемінде 10^7 м. к.

Антагонистік белсенділікті зерделеу үшін тура антагонизм (аралас дақыл) әдісі пайдаланылды. 1,0 мл зерделенетін штамм-продуценті (сұйық 10^7) MPC-4 жартылай сұйық ортасының 10,0 мл-іне енгізілді. Индикаторлық дақылдар 10^7 шамасынан 0,1 мл мөлшерінде енгізілді. Сұйық қоректік ортада өсірілген күнделікті дақыл тығыз қоректік ортаның бетіне орналастырылды. Lactobacillus анықтау және оны сандық есепке алу үшін (0,1 мл суспензия) 12 сағ, 24 сағ сайын MPC тығыз қоректік ортасына себілді [8].

Аралас дақылдан алынған үлгілерді себу кезінде 12 сағаттан кейін барлық лактобактериялардың $10^8 - 10^9$ КОЕ/мл шамасындағы жақсы өсімі байқалды. Тәулік ішінде барлық сынамаларда L. rhamnosus штаммдары тәжірибелік сынауықтарда өсуді жалғастырды, L. acidophilus және L. casei жағдайында мұндай әрекет байқалмады. Қоспалардың 24 сағаттық инкубациясынан кейін L. acidophilus және L. casei кемінде 10^6 КОЕ/мл концентрацияда байқалды.

Lactobacillus тектес бактерияларының пробиотикалық штаммдарының өзара қатынасы L. acidophilus L. casei штаммдары биоүйлесімді болып табылатынын көрсетті. L. rhamnosus штаммы күшті антагонистік белсенділікті көрсетті, басым бөлігінде L. acidophilus L. casei штаммдарына әрекет етеді.

Талқылау

Зерделенген микроорганизмдер екі әртүрлі биохимиялық топқа жатады: L. delbrueckii, L. acidophilus түрлері гомоферментативті лактобациллдер тобына жатады, ал L. casei, L. paracasei, L. rhamnosus түрлері – факультативті-гетероферментативті лактобациллдер тобына жатады. Осы топтардың өкілдерінде қанттардың метаболизмі принциптік тұрғыда өзгешеленеді: бірінші жағдайда генетикалық тұрғыда гликолитикалық жол детерминирленген, екінші жағдайда – пентозофосфаттық жол. Гомоферментативті лактобациллдер, әдетте, пентозаларды ашытуға қабілетті емес, бұл жайт біздің зерттеулермен расталды.

Біздің деректерден көрініп тұрғандай, субстраттардың ең жоғары мөлшерін L. casei, L. paracasei, L. rhamnosus лактобациллдері кәдеге жаратады, олар факультативті-гетероферментативті лактобациллдерге жатады. Бұл жайт гомоферментативті лактобациллдер пентозаларды ашытуға қабілетсіз болуымен, ал гетероферментативті микроорганизмдер қанттар метаболизмінің екі жолына ие болуымен түсіндіріледі, бұл ретте гексозалардың ашуы гликолитикалық жолмен, ал пентозалардікі – тотықтырғыш пентозофосфаттық жолмен жүреді. Гексозалардың саны жеткілікті болған кезде оларды ашуы гликолитикалық жолмен жүреді, ал гексозалардың саны азайған кезде қоректік ортада пентозалардың болуы фосфокетозалардың синтезін индуктілейді.

Лактобациллдердің раффинозаны кәдеге жаратуға деген қабілетін зерделеу практикалық және ғылыми қызығушылықты құрайды. Бұл көміртек фосфолигосахаридтер (ФОС) тобына жатады, пробиотикалық препараттардың құрамына пребиотикалық компонент ретінде пайдаланылады. Бұл олигосахаридтің кәдеге жаратуға деген қабілеті спецификалық гликозилгидролаздың болуына не болмауына байланысты. Раффинозаны L. acidophilus түріне жататын штаммдар кәдеге жаратты, L. casei, L. paracasei, L. delbrueckii түрлерінде бұл олигосахаридтің кәдеге жаратылуы байқалмады.

Зерделенген қасиеттер спектрі бойынша түрлік сәйкестендіруді жүргізу кезінде L. casei, L. paracasei и L. rhamnosus түрлерін сәйкестендіру кезінде қиындықтар туындады, себебі олардың биохимиялық қасиеттері ұқсас келеді. Биохимиялық әдісті пайдалану кезіндегі осындай қиындықтар молекулалық-генетикалық сипаттамалар негізінде сәйкестендірудің баламалы әдістерін әзірлеудің өзектілігін түсіндіреді. Бұған қоса, микроорганизмдердің аралас популяциясымен жұмыс істеу кезінде сәйкестендірудің бұл әдісін пайдалану сұйық дақылдың сынамасын тығыз қоректік ортаға сепкеннен кейін, екі түрлі бактериялардың арақатынасын анықтау үшін таза дақылды бөліп алып, ортаның бетінде өскен барлық колонияларды зерттеу керектігімен шектеледі, мұндай әрекет экономикалық және еңбек шығындарын елеулі дәрежеде арттыра түседі. Осы себепті қойылған міндетті шешу үшін тиімдірек әдісті іздеу өзекті мәселе болып табылады.

Қорытынды

Сүтқышқылды бактерияларды классикалық биохимиялық әдістермен индикациялау және сәйкестендіру қиынға соғуда, себебі стандартталған тестжүйелердің қолжетімділігі төмен және қымбатқа түседі. Бұдан басқа, атап өтетін жайт, биохимиялық қасиеттер бойынша сәйкестендірудің классикалық әдісі таза дақылды бөліп шығаруды көздейді және, сәйкесінше, жеткілікті дәрежеде ұзақ уақытты алады (8 тәулікке дейін), осының салдарынан практикалық зертханалар үшін аса ыңғайлы емес, сонымен қатар тамақ өнімдерін ағымдағы жедел бақылау талаптарын қанағаттандырмайды.

Лактобациллдердің таксономиясы мен биохимиялық қасиеттерін зерделеу өзекті мәселе болып табылады. Осы микроорганизмдердің жіктелімдері жасап шығарылған, олар биохимиялық белгілер негізінде оларды сәйкестендіруге арналған әртүрлі белгілер мен әдістерге негізделген. Биотехнология мен өнеркәсіптік микробиологияның дамуы лактобациллдерді сәйкестендірудің ыңғайлы әрі жылдам әдістемесін әзірлеуді талап етеді. Әр түрлі субстраттардағы *Lactobacillus* тектес бактерияларды индикациялау мәселелерін шешу үшін қазіргі заманғы молекулалық-генетикалық әдістерді пайдалану орынды шара болып көрінеді. Осы әдістерді қолдану бактерияларды айқындау үшін қажетті уақытты едәуір қысқартуға, талдаудың дәлдігін арттыруға мүмкіндік береді.

Сүтқышқылды бактериялардың дақылдарын бөліп шығарумен, зерделеумен және жалпы және функционалды мақсаттағы ашытылған сүт өнімдерін өндіруде неғұрлым перспективалы өнімдерді іріктеумен айналысатын мамандандырылған зертханаларда штаммдардың нақты түрлік тиістілігін анықтауға, сонымен қатар өндірістік дақылдарды типтеуге және төлқұжаттауға мүмкіндік беретін әртүрлі молекулалық-генетикалық әдістер пайдаланылады.

ПАЙДАЛАНҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Аналитический обзор. Анализ российского рынка пробиотиков и продуктов на их основе.[Электронныйресурс]. – Режимдоступа: <http://centripap.ru/report/food/functional/Probiotic>.
- 2 Coconnier M.H., T.R. Klaenhammer, S. Kernéis et al. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol.* 1992. – Vol. 58. – № 6. – 2034-2039 pp.
- 3 Kanatani K., Tahara T., Oshimura M. et al. Identification of the replication region of *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA102T. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. Vol. 133, Is. 2. 127-130 pp.
- 4 *Lactobacillus*. Molecular biology From Genomics to Probiotics. Edited by A. Ljungh, T. Wadstrom. Caister Academic Press, UK. 2009. 205 с.
- 5 Boekhorst J., Helmer Q., Kleerebezem M. et al. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiol.* – 2006. – Vol.152. – 273-280 pp.
- 6 ТюринМ.В., ШендеровБ.А., РахимоваН.Г. идр. К механизму антагонистической активности лактобацилл. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1989. – № 2. – С. 3-8.
- 7 Бондаренко В. М. Классификация бактерий рода *Lactobacillus* / В. М. Бондаренко // Матер.VIII съезда Всеросс. Обществаэпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 2002. – Т. I. – С. 140.
- 8 Ботина, СГ. Генетическое разнообразие природных штаммовбактерий вида *Streptococcus thermophilus* / СГ. Ботина, О.В. Пиксазова, Ю.Д.Цыганков // *Генетика*, 2007. – Т. 43. – № 5. – С. 601-608.

REFERENCE

- 1 Analyticheskiioobzor. Analizrossiiskogorynkaprobiotikov i produktovnaihosnove [Analytical review. Analysis of the Russian market for probiotics and products based on them]. [centripap.ru](http://centripap.ru/report/food/functional/Probiotic). Retrieved from <http://centripap.ru/report/food/functional/Probiotic>[inRussian].
- 2 Coconnier, M.H. Klaenhammer, T.R. Kerneis, S. et al (1992). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 58, 6, 2034-2039.
- 3 Kanatani, K. Tahara, T. Oshimura, M. et al (1995). Identification of the replication region of *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA102T. *FEMS Microbiol.* Vol. 133, 2, 127-130.
- 4 Ljungh, A. Wadstrom, T. (2009). *Lactobacillus*. Molecular biology From Genomics to Probiotics. UK: Caister Academic Press.
- 5 Boekhorst, J. Helmer, Q. Kleerebezem, M. et al (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiol.* Vol. 152, 273-280.
- 6 Turin, M.V. Shenderov, B.A. Rahimova, N.G. etc. (1989). К mechanism antagonistskoyaktivnistilactobacill [To the mechanism of antagonistic activity of lactobacilli]. *Zhurnalmikrobiologii, epidemiologiiimmunobiologii* – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2, 3-8 [in Russian].
- 7 Bondarenko, V.M. (2002). Klassifikatsiyabakteriyroda *Lactobacillus* [Classification of bacteria of the genus *Lactobacillus*]. Material VIII syezdaVserossiyskogoObshchestvaepidemiologii, mikrobiologii i parazitologii – Proceedings of the 8th Congress of the All-Russian Society of Epidemiology, Microbiology and Parasitology, Vol. 1, 140 [in Russian].
- 8 Botina, S.G. Piksasova, O. V. Tsygankov, Yu.D. (2007). Geneticheskoye raznoobraziye prirodnykh shtammov bakteriy vida *Streptococcus thermophilus* [Genetic diversity of natural strains of bacteria of the species *Streptococcus thermophilus*] *Genetica - Genetics*. Vol. 43, 5, 601-608 [in Russian].

А.Е. Усенова^{1*}, А.К. Оспанова¹, Г.Г. Джаксыбаева²

¹Инновационный Евразийский университет, Казахстан

²Торайгыров университет, Казахстан

Изучение биохимических свойств бактерий рода *Lactobacillus* и их идентификация

В данной статье рассмотрены актуальные данные о биохимических свойствах бактерий рода *Lactobacillus* и их использования в промышленности, в частности, молочного производства и биотехнологии. Микроорганизмы рода *Lactobacillus* обладают антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов и выполняют иммуномодулирующую функцию. Положительное влияние лактобацилл на здоровье человека объясняет их активное использование в пробиотиках. Позитивные эффекты нормальной микрофлоры кишечника и пробиотиков обусловлены в основном бифидо- и лактобактериями. В пробиотикотерапии используют различные виды бактерий рода *Lactobacillus*, такие как: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*. В последние годы интенсивно развивается биотехнология пробиотиков – препаратов, используемых для коррекции и профилактики микробиологических нарушений в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Актуальным вопросом является получение новых данных о биологических свойствах лактобацилл, создание новых пробиотических препаратов на их основе с помощью модифицированных подходов к культивированию. Результаты определения видов *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, полученные классическим биохимическим методом идентификации на основе сахаролитической активности, затрудняющие проведение видовой идентификации, сопоставимы с молекулярно-генетическим методом. В случае с *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* необходимо проведение современных методов идентификации, основанных на полимеразной цепной реакции, так как их биохимические свойства сходны, что затрудняет проведение видовой идентификации. Учитывая вариабельность классического биохимического метода, авторы считают молекулярно-генетический метод ценным дополнением к межродовой и видовой идентификации лактобацилл.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, биохимическая идентификация, пробиотики, бактерии.

А.Е. Usenova^{1*}, А.К. Ospanova¹, G.G. Jaksybayeva²

¹Innovative University of Eurasia, Kazakhstan

²Toraigyrov University, Kazakhstan

Study of the biochemical properties of bacteria of the genus *Lactobacillus* and their identification

This article discusses the current data on the biochemical properties of bacteria of the genus *Lactobacillus* and their use in industry, particularly in dairy production and biotechnology. Microorganisms of the genus *Lactobacillus* have antagonistic activity against pathogenic microorganisms and perform an immunomodulatory function. The positive effect of lactobacilli on human health explains their active use in probiotics. The positive effects of normal intestinal microflora and probiotics are mainly due to bifidobacteria and lactobacilli. In probiotic therapy, various types of bacteria of the genus *Lactobacillus* are used, such as: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*. In recent years, the biotechnology of probiotics has been intensively developing - drugs used for the correction and prevention of microecological disorders in the gastrointestinal tract of humans and animals. An urgent issue is obtaining new data on the biological properties of lactobacilli, creating new probiotic preparations based on them using modified approaches to cultivation. The results of determining the species *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, obtained by the classical biochemical identification method based on saccharolytic activity, complicating species identification, are comparable to the molecular genetic method. In the case of *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, it is necessary to carry out modern identification methods based on the polymerase chain reaction, since their biochemical properties are similar, which makes it difficult to carry out species identification. The molecular genetic method is a valuable addition to the intergeneric and species identification of lactobacilli, given the variability of the classical biochemical method.

Key words: *Lactobacillus*, biochemical identification, probiotics, bacteria.

Қолжазбаның редакцияға келіп түскен күні: 13.08.2021 ж.