

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2018. - №3 (98). - С.109-116

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЗАКВАСОК ПРЯМОГО ВНЕСЕНИЯ

Э. Назызбекқызы, PhD А.К. Молдагулова,
Д. Ж. Сембаева, Э.Ж. Хасенова, магистр Н.Б. Молдагулова, к.в.н, PhD
ТОО «Экостандарт. kz»

Аннотация

Объектом данного исследования служили 36 молочнокислых бактерий, выделенных из различных кисломолочных продуктов. Целью работы являлось выделение молочнокислых бактерий, перспективных для разработки заквасок прямого внесения и их идентификация. Всего выделено 36 молочнокислых бактерий, в результате оценки жизнеспособности культур микроорганизмов отобрано 19 активных изолятов для дальнейших исследований. Проведена фено- и генетическая идентификация культур МКБ. В результате генотипирования бактерий путем анализа последовательности гена 16S rRNA отобранные изоляты были отнесены к родам *Lactobacillus*, виды *casei*, *paracasei*, *fermentum*, *curieae*, *oryzae*; *Pediococcus*, виды *acidilactici*, *pentosaceus*; *Enterococcus*, виды *faecium*, *lactis*; *Weissella*, вид *confusa*. Проведенная генетическая идентификация на основе фрагмента ITS региона показала, что 2 культуры были идентифицированы как *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces lactis*.

Ключевые слова: молочнокислые бактерий, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Saccharomyces*, закваски прямого внесения, идентификация, 16S rRNA.

Современная биотехнология неразрывно связана с использованием новых подходов к отбору природных микроорганизмов при создании заквасок и бактериальных препаратов для молочной промышленности [1]. Одним из направлений современной биотехнологии является защита и улучшение здоровья человека. Молочнокислые бактерии (МКБ)

относятся к группе микроорганизмов, которые являются основой для создания заквасок и пробиотических препаратов, которые положительно влияют на желудочно-кишечный тракт и в целом здоровье человека. Они используются не только в медицине, но и в пищевой промышленности, в частности молочной, участвуя в процессе производства и поддержке свежести продукта и одновременно снижают потребность в использовании искусственных консервантов [2]. Своеобразное специфическое управление биохимическими процессами во внутренней среде организма осуществляется кисломолочными продуктами, получаемыми с помощью молочнокислых микроорганизмов. При их недостатке происходит заселение кишечника патогенными и условно-патогенными микроорганизмами [3]. Для получения молочнокислых продуктов стерилизованное молоко или сливки сквашивают путем внесения чистых культур. Они носят название «стартовых заквасок». В зависимости от типа

Методы и объекты исследования

Исследования проводились на базе компании ТОО «Экостандарт.kz». Объектами исследований служили культуры

закваски получают разные продукты. Например, такие как сметана, творог и творожные изделия, простокваша, кефир, кумыс, шубат, курт и т.д.

Традиционно к МКБ относят представителей отряда *Lactobacillales*. Наибольшую практическую ценность для использования имеют бактерии, относящиеся к родам *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*. Мезофильные лактобациллы, такие, как *L. casei*, *L. rhamnosus*, чаще всего используются в производстве кисломолочных напитков и йогуртов как дополнительный заквасочный компонент. Считается, что род *Lactococcus*, тесно ассоциированный с производством пищевых продуктов, является одним из самых значимых среди них [4]. Выделение уникальных культур МКБ со значимым пробиотическим эффектом является актуальной задачей современной биотехнологии. В связи с этим, целью данной работы являлось выделение МКБ, перспективных для разработки заквасок прямого внесения.

МКБ, выделенные из различных кисломолочных продуктов домашнего и заводского приготовления.

Исследования включали выделение, изучение жизнеспособности и идентификация на основе физиолого-биохимических характеристик культур МКБ, а также генотипирования по фрагменту гена 16S rRNA (для бактерий) и ITS региона (для дрожжей).

Для культивирования бактерий использовались питательные селективные среды MRS с различной концентрацией агара – жидкие, плотные (2%), и с различной концентрацией водородных ионов (рН 5,0; 7,0). В качестве посевного материала использовали 24-х часовые культуры 3-й генерации. рН определялось потенциометрически с помощью мембранного рН-метра.

Для отбора среди выделенных изолятов жизнеспособных культур, была дана оценка максимального показателя ЖСП. Нами был использован метод серийных разведений Miles&Misra. Посевы инкубировались в течение 48 часов.

Результаты исследований и обсуждение

Выделение молочнокислых кисломолочных продуктов домашнего приготовления, в основном из свежего верблюжьего, кобыльего, коровьего и козьего молока различных регионов Казахстана; из кисломолочных продуктов, представленных на

Количество колоний подсчитывали по двум последним разведениям, в которых наблюдался рост молочнокислых бактерий.

Идентификацию на основе физиолого-биохимических характеристик культур микроорганизмов проводили по общепринятым в бактериологической практике методам с использованием определителей [5-10]. Родовую идентификацию лактобацилл определяли с помощью таксономической классификации Квасникова Е.И. и Нестеренко О.А. [6]. Генотипирование проводили с помощью амплификации фрагмента 16S rRNA гена и ITS региона (для дрожжей).

Молочнокислые микроорганизмы, которые непосредственно использовали в исследованиях, поддерживали и сохраняли в виде пробирочных культур одной генерации. Культуры хранили в герметично закрытом виде в холодильнике при + 4–8С.

микроорганизмов проводили из рынке Казахстана (заводского приготовления отечественного производства); заквасок различных кисломолочных продуктов (домашнего и заводского приготовления).

В работе были использованы пробы преимущественно из домашних хозяйств Южно-Казахстанской, Западно-Казахстанской, Кызылординской, Актюбинской, Акмолинской, Карагандинской, Костанайской и Северо-Казахстанской областей.

Также для выделения микроорганизмов были исследованы жидкие закваски «Желмая» для шубата производства КХ «Абылай», село Саналы, ЮКО, закваска домашнего приготовления для шубата (Кызылординская обл.).

Выделение культур осуществлялось с использованием специальных сред, предназначенных для молочнокислых бактерий с инкубацией при 37°C и 50°C в течение двух суток в микроаэрофильных условиях.

Общее число исследованных образцов составило 45, что позволило выделить 36 культур молочнокислых бактерий.

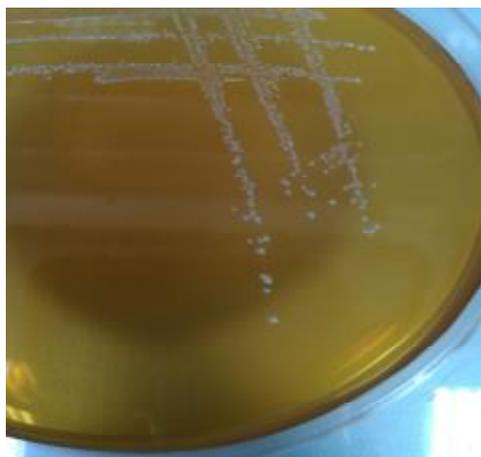
Предварительную идентификацию бактерий проводили традиционным

способом на основе морфологических, физиологических и биохимических свойств.

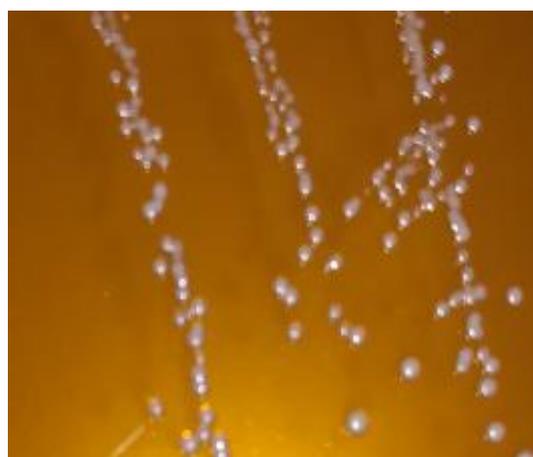
При определении культуральных признаков МКБ отмечается, что одни характеризовались ростом на агаризованной среде МРС в виде поверхностных круглых колоний с четкими краями (S-формы), белого или кремового цвета, диаметры варьировали от мелких до крупных (рисунок 1А, Б). Другие (рисунок 1В, Г) образовывали крупные шероховатые колонии (R-формы), с неровными краями, белого цвета, часто с уплотненным центром.

Рост данных бактерий в бульоне MRS характеризуется тремя разновидностями: равномерное помутнение питательной среды вдоль столбика или с прозрачным кольцом сверху виде пленки, среда остается прозрачной, характерен пристеночный рост. Во всех случаях образуется осадок большей или меньшей интенсивности.

Культуральные характеристики МКБ представлены на рисунке 1.



А



Б



В



Г

Рисунок 1 – Рост колоний выделенных МКБ на среде МРС-4

По микроморфологии чистые культуры были отнесены к бактериям рода *Lactobacillus* по следующим характеристикам: неспорообразующие, разнообразны по форме, коккообразные нитевидные палочки различной длины, расположенные единично или цепочками,

грамположительные. Неподвижные, каталазоотрицательные.

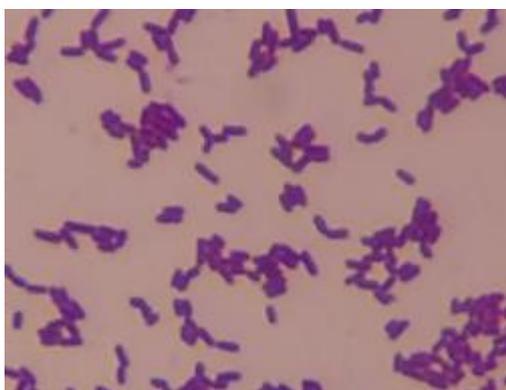
Бактерии рода *Lactococcus* при микроскопии представлены неподвижными кокками, не образующими спор, хорошо окрашиваются анилиновыми красителями и по Граму,

грамположительные, имеют форму стрептококка. Диаметр кокковых форм от 0,6 до 1 мкм, располагаются единично, парами или в виде цепочек различной длины.

По морфологической характеристике:
грамположительные дрожжевые

клетки, круглые, овальные, лимонovidные, крупные, размеры варьируют от мелких до крупных, микроорганизмы были отнесены к дрожжевым грибам.

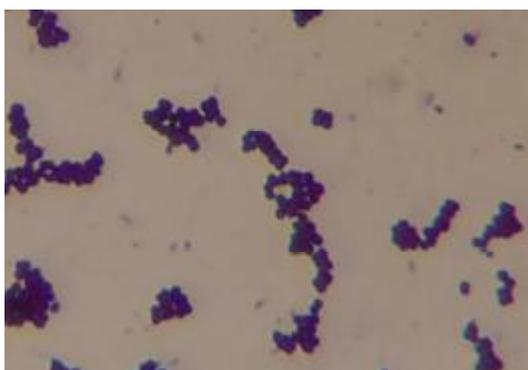
На рисунке 2 представлены варианты микроскопической картины МКБ (лактобацилл, лактококков и дрожжей).



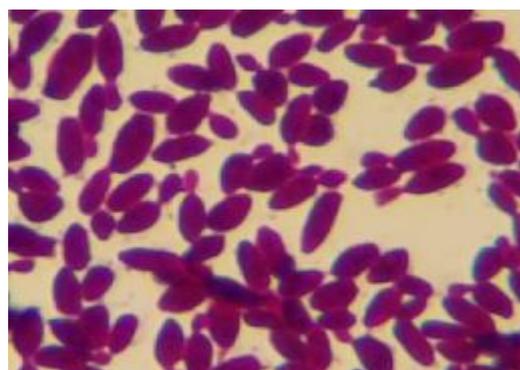
а



б



в



г

а – короткие палочки расположены одиночно, скоплениями и цепочками; б – тонкие палочки расположены одиночно, пачками; в – кокки расположены скоплениями, пачками, местами единичные, г – грамположительные дрожжевые клетки в виде зерна, овальные, крупные

Рисунок 2 – Микроскопическая картина МКБ

Примечание – Окраска по Граму; световая иммерсионная микроскопия; $\times 1000$

Всего из 36 изолятов МКБ, лактобацилл было 19, кокков – 11, а дрожжей – 6.

Согласно изученным фенотипическим характеристикам,

большинство из выделенных нами культур предварительно были идентифицированы как *Lactococcus lactis* – 25%, вторым по численности видом являлся *Saccharomyces cerevisiae* – 16,7%, далее *Lactobacillus fermentum*, *salivarius*, *casei* – 8,3% (рисунок 3).

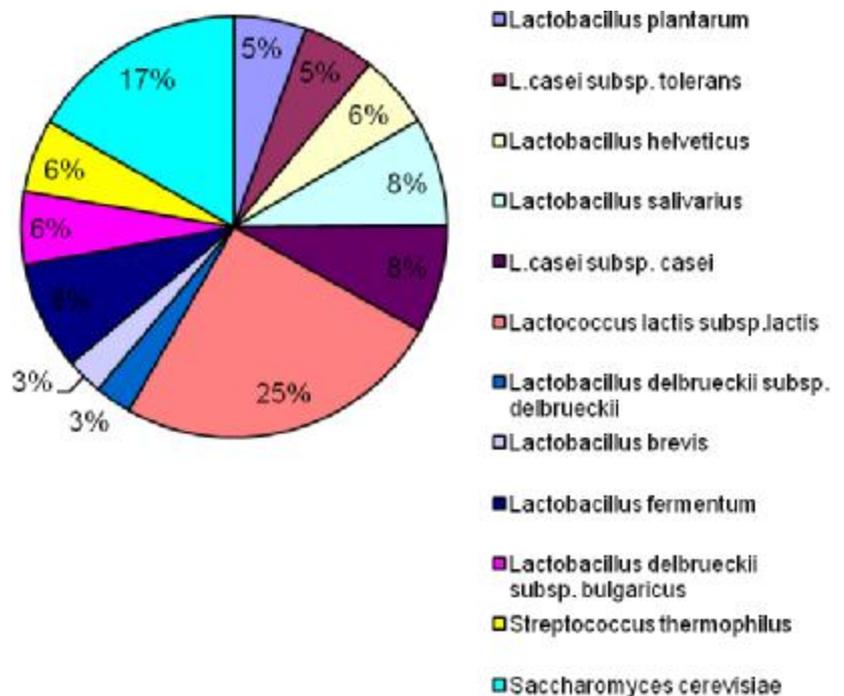


Рисунок 3 – Разнообразие МКБ по фенотипическим признакам

В процессе изучения культур, выделенных из домашних и заводских продуктов, было

выявлено, что МКБ одного и того же вида отличались по способности сбраживания углеводов. Это

указывает на то, что МКБ избирательны к условиям культивирования и составу питательных сред. В зависимости от этого они могут изменять свои культурально-морфологические признаки и терять некоторые биохимические способности, а именно, сбрасывать отдельные виды сахаров.

Создание технологий биойогуртов на основе живых микроорганизмов – одно из самых сложных направлений в биотехнологии, основной задачей которых является получение максимального количества жизнеспособных клеток. Поэтому далее изучали жизнеспособность леток молочнокислых

микроорганизмов. Согласно требованиям, в 1 г продукта на конец срока годности титр клеток должен составлять не менее 10^7 КОЕ/г. Оптимальными цифрами при отборе пробиотических микроорганизмов является максимальный показатель ЖСП 10^7 КОЕ/мл и более. Особый интерес представляют бактерии, выделенные из кисломолочных продуктов домашнего приготовления и верблюжьего молока. В результате изучения жизнеспособности клеток, для дальнейшей работы нами были отобраны 19 культур МКБ, имеющие допустимый показатель ЖСП (таблица 1).

Таблица 1 – Жизнеспособность выделенных культур МКБ

№ п/н	Культура	Титр клеток, \lg КОЕ/см ³	№ п/н	Культура	Титр клеток, \lg КОЕ/см ³
1	Ш 1-1	7,08±0,12	11	Ш 2-11	7,48±0,19
2	Ш 1-2	7,48±0,17	12	Ш 2-12	8,18±0,25
3	Ш 1-3	7,77±0,05	13	Ш 2-16	7,7±0,1
4	Ш 1-4	8,18±0,21	14	Ш 2-17	8,48±0,14
5	Ш 1-5	7,6±0,18	15	Ш 2-18	7,48±0,23
6	Ш 1-6	8,84±0,02	16	Ш 2-20	7,78±0,15
7	Ш 1-7	8,7±0,23	17	Ш 2-21	8,78±0,31
8	Ш 1-8	8,48±0,12	18	Ш 2-23	7,65±0,27

9	Ш 1-9	7,6±0,11	19	Ш 2-24	7,6±0,1
10	Ш 2-10	7,48±0,13			

Далее проводили генетическую идентификацию исследуемых культур микроорганизмов методом изучения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rRNA, а также фрагмента ITS региона. Результаты генотипирования приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты генетической идентификации МКБ

№ п/н	Обозначение изолятов	Полученный результат	№ п/н	Обозначение изолятов	Полученный результат
1	L-001	<i>Enterococcus faecium</i>	11	L-011	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
2	L-002	<i>Pediococcus acidilactici</i>	12	L-012	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
3	L-003	<u><i>Lactobacillus curieae</i></u>	13	L-013	<u><i>Lactobacillus fermentum</i></u>
4	L-004	<i>Lactobacillus casei</i>	14	L-014	<i>Weissella confusa</i>
5	L-005	<i>Enterococcus lactis</i>	15	L-015	<i>Weissella confusa</i>
6	L-006	<u><i>Lactobacillus oryzae</i></u>	16	L-016	<i>Weissella confusa</i>
7	L-007	<i>Lactobacillus paracasei</i>	17	L-017	<i>Saccharomyces lactis</i>
8	L-008	<i>Weissella confusa</i>	18	L-018	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
9	L-009	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	19	L-019	<u><i>Weissella confusa</i></u>
10	L-010	<i>Pediococcus pentosaceus</i>			

В результате генотипирования путем анализа последовательности гена 16S rRNA стало известно, что отобранные изоляты относятся к родам *Lactobacillus*, виды *casei*, *paracasei*, *fermentum*, *curieae*, *oryzae*; *Pediococcus*, виды *acidilactici*, *pentosaceus*; *Enterococcus*, виды *faecium*, *lactis*; *Weissella*, вид *confusa*. Проведенная генетическая идентификация методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента ITS региона (для дрожжей) показала, что 2 культуры были идентифицированы как *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces lactis*.

Таким образом, для проведения дальнейших исследований нами были отобраны 5 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, 5 штаммов рода *Pediococcus* и 2 штамма рода *Saccharomyces*.

Выводы

В результате проведенных работ, нами выделено 36 культур МКБ из различных кисломолочных продуктов домашнего и заводского приготовления, в основном из свежего верблюжьего, кобыльего, коровьего и козьего молока различных регионов Казахстана. На основе идентификации по

физиолого-биохимическим характеристикам и генетической идентификации по гену 16S rRNA и ITS региона, выделенные культуры были отнесены к группам молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* и дрожжам рода *Saccharomyces*.

Список литературы

1. Шурхно Р.А., Вологин С.Г., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш. Скрининг природных штаммов молочнокислых бактерий и их таксономическая идентификация // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - №2-1.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21189> (дата обращения: 25.08.2018).
2. Сливка І.М., Цісарик О.Й., Боцер Т. Ідентифікація молочнокислих бактерій із застосуванням комплексу молекулярно-генетичних методів // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького - 2014. –Т. 16. № 3(60) Частина 2, - С. 280-289.
3. Magnusson J., Ström K., Roos St., Sjögren J., Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria // FEMS Microbiology Letters. – 2003. – Vol. 219. – P. 129–135.
4. Щетко В.А., Фещенко В.Ю. Выделение молочнокислых бактерий, перспективных для пищевой промышленности, с целью последующей их идентификации // Природа. - 2015. - №2. - С. 42-48.

5. ГОСТ 10444.11-88: Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М.: Издательство стандартов, 2002. – 14 с.
6. Квасников Е.И., Нестеренко О.Л. Молочнокислые бактерии и пути их использования. - М.:Наука, 1975. - 389 с.
7. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. - М.:Мир, 1980. – С. 287-294.
8. Ильенко-Петровская Т.П., Бухтарева Э.Ф. Товароведение пищевых жиров, молока и молочных товаров: учебник для торг. вузов. – М.: Экономика, 1980. – 304 с.
9. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
10. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

References

1. Shurhno R.A., Vologin S.G., Gibadullina F.S., Tagirov M.Sh. Skrining prirodnyh shtammov molochnokislyh bakterij i ih taksonomicheskaja identifikacija [Screening of natural strains of lactic acid bacteria and their taxonomic identification], *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija* [Modern problems of science and education], (2/1), (2015). Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21189> [in Russian]. (accessed: 25.08.2018).
2. Slivka I.M., Cisarik O.J., Bocser T. Identifikacija molochnokislyh bakterij iz zastosuvannjam kompleksu molekularno-genetichnih metodiv [Identification of lactic acid bacteria and its complex of molecular genetic methods], *Naukovij visnik LNUVMBT imeni S.Z. Ġzhič'kogo* [Scientific herald of LNUWMBT named after S.Z. Gzhytsky], 16(3/60), 280-289 (2014). [in Russian]
3. Magnusson J., Ström K., Roos St., Sjögren J., Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria // *FEMS Microbiology Letters*. – 2003. – Vol. 219. – P. 129–135.
4. Shhetko V.A., Feshhenko V.Ju. Vydelenie molochnokislyh bakterij, perspektivnyh dlja pishhevoj promyshlennosti, s cel'ju posledujushhej ih identifikacii [Isolation of lactic acid bacteria, promising for the food industry, with a view to their subsequent identification], *Priroda* [Nature]. (2), 42-48 (2015). [in Russian]
5. GOST 10444.11-88: Produkty pishhevye. Metody opredelenija molochnokislyh mikroorganizmov [Food products. Methods for the determination of lactic acid microorganisms], *Izdatel'stvo standartov* [Publishing house of standards], P 14 (2002). [in Russian]

6. Kvasnikov E.I., Nesterenko O.L. Molochnokislye bakterii i puti ih ispol'zovaniya [Lactic acid bacteria and ways of using them], Nauka [Science], P 389 (1975). [in Russian]

7. Kratkij opredelitel' bakterij Bergi [Brief determinant of bacteria Bergi], Pod red. Dzh. Hoult. - Mir [Ed. J. Hoult. -The World], P 287-294 (1980). [in Russian]

8. Ilyenko-Petrovsky T.P., Bukhtareva E.F. Tovarovedeniye pishchevykh zhиров, moloka i molochnykh tovarov: uchebnik dlya torg. vuzov. [Commodity science of food fats, milk and dairy products: a textbook for bargaining universities], Ekonomika [Economy], P 304 (1980). [in Russian]

9. Tepper Ye.Z., Shil'nikova V.K., Pereverzeva G.I. Praktikum po mikrobiologii. [Workshop on microbiology], Drofa [Drofa], P 256 (2004). [in Russian]

10. Praktikum po mikrobiologii / pod red. A.I. Netrusova [Workshop on Microbiology / Ed. A.I. Netrusova], Akademiya [Academy], P. 608 (2005). [in Russian]

ТІКЕЛЕЙ ЕНГІЗІЛЕТІН АШЫТҚЫЛАРДЫ ДАЙЫНДАУҒА АРНАЛҒАН СТАРТЕРЛІК КУЛЬТУРАЛАРДЫ БӨЛІП АЛУ

Э. Нағызбекқызы, PhD А.К. Молдағұлова,
Д. Ж. Сембаева, Э.Ж. Хасенова, магистр Н.Б. Молдағұлова, в.з.к., PhD
¹«Экостандарт. kz»

Түйін Зерттеудің объектісі ретінде әр түрлі ферменттелген сүт өнімдерінен бөлініп алынған 36 сүтқышқылды бактериялар болды. Жұмыстың мақсаты тікелей енгізілетін ашытқыларды дайындауға пайдаланылатын сүтқышқылды бактерияларды бөліп алу және идентификациялау болып табылады. Барлығы 36 сүтқышқылды бактериялар бөлініп алынды, скрининг нәтижесі бойынша 19 белсенді изолят іріктелді. Сүтқышқылды бактерияларға фенотиптік және генетикалық идентификация жүргізілді. 16S рРНК генінің арнайы бөлігін талдау арқылы бактериялық генотиптіліктің нәтижесінде іріктелген изоляттар *Lactobacillus* туыстығына, оның ішінде *casei*, *paracasei*, *fermentum*, *curieae*, *oryzae* түрлеріне; *Pediococcus* туыстығына, оның ішінде *acidilactici*, *pentosaceus* түрлеріне; *Enterococcus* туыстығына, *faecium*, *lactis* түрлеріне, *Weissella* туыстығына, *confusa* түрлеріне жататындығы анықталды. ITS аймағының фрагменті негізінде генетикалық сәйкестендіру 2 культураны *Saccharomyces cerevisiae* және *Saccharomyces lactis* ретінде анықталғанын көрсетті.

Кілттік сөздер: сүтқышқылды бактериялар, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Saccharomyces*, тікелей енгізілетін ашытқылар, сәйкестендіру, 16S rRNA.

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA, PROMISING AS STARTER CULTURES FOR THE DEVELOPMENT OF FERMENTS FOR DIRECT APPLICATION

*E. Nagyzbekkyzy, PhD A.K. Moldagulova, D.Zh. Sembaeva, c
E.Zh. Khasenova, master N.B. Moldagulova, k.v.s., PhD
LLP "Ecostandard.kz"*

Summary The object of this study was 36 lactic acid bacteria isolated from various fermented milk products. The purpose of the work was to isolate lactic acid bacteria that are promising as starter cultures for ferments of direct application and their identification for the development of starter cultures for direct application. A total of 36 lactic acid bacteria were isolated, 19 active isolates were selected for screening as a result of the screening. Phenotypical and genetic identification of LAB cultures was carried out. As a result of bacterial genotyping by analysis of the sequence of the 16S rRNA gene, the selected isolates were related to genera *Lactobacillus*, species *casei*, *paracasei*, *fermentum*, *curieae*, *oryzae*; *Pediococcus acidilactici*, *pentosaceus*; *Enterococcus*, species of *faecium*, *lactis*, *Weissella*, species of *confusa*. Genetic identification based on the ITS region fragment showed that 2 cultures were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces lactis*.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Saccharomyces*, starter cultures, identification, 16S rRNA.