

Абдрахманова А.К.,  
Бержанова Р.Ж.,  
Мукашева Т.Д., Сартаева А.А.

**Сүтқышқылды  
микроорганизмдердің жаңа  
дақылдарын бөліп алу  
және қасиеттерін зерттеу**

Осы мақалада сүтқышқылды микроорганизмдерді түрлі табиғи қайнар көздерінен және сүт қышқыл өнімдерінен бөлінетіні арналған. Сүтқышқылды өнімдерден сонымен қатар, жемдік дақылдардың фило және ризосферасынан бөлініп алынған 38 сүтқышқылды микроорганизмдер штамдарына анализ жүргізілді. Шұбат өнімінен алынған организмнің көп бөлігін кокк тәріздес микроорганизмдер құрастырған. Зерттелген қасиеттерінің кешені бойынша (осмотолеранттылық, ферменттеуші қабілеттілігі, протеолитикалық және антибиотикалық белсенділігі бойынша) екі перспективті штамм іріктеліп алынды. Зерттей келе штаммдар тест микроорганизмдердің өсу қарқынын тежейтін заттардың құрамында бактериоциндердің болатынын білдіреді. Екі белсенді штаммдардың физиолого-биохимиялық қасиеттері зерттелді және 16S rRNA генинің нуклеотидтік тізбегінің салыстырмалы анализі жүргізілді. АЮ13 штамы *Lactobacillus paracasei* түріне жатқызылды, ал АЮ19 штамы *Lactobacillus casei* ретінде анықталды.

**Түйін сөздер:** сүтқышқылды бактериялар, шұбат, протеолиттік белсенділік, антагонистік белсенділік, тест организмдер.

Abdrahmanova A.K.,  
Berzhanova R.ZH.,  
Mukasheva T.D., Sartaeva A.A.

**Selection of new cultures of  
lactate microorganisms and study  
of their properties**

This article deals with the isolation of lactic mikroorganizov from different natural sources and milk products. From milk products, as well as from the rhizosphere of plants and filo was isolated and analyzed in 38 strains of lactic microorganisms. Microorganisms isolated from shubat mainly represented coccoid forms. For complex traits studied (osmotolerantnosti fermenting ability, proteolytic and antibiotic activity) selected two active strain. It was found that the strains isolated bakterioitsinopodobnye substances depressing the test microorganism growth. Two active shtammov studied the physiological and biochemical properties and the analysis of the nucleotide sequence of genes 16S rRNA. AYU13 strain is related to mind *Lactobacillus paracasei*, and strain AYU19 defined as *Lactobacillus casei*.

**Key words:** lactic acid bacteria, shubat, proteolytic activity, antagonistic activity, test organisms.

Абдрахманова А.К.,  
Бержанова Р.Ж.,  
Мукашева Т.Д., Сартаева А.А.

**Выделение новых культур  
молочнокислых  
микроорганизмов  
и изучение их свойств**

Данная статья посвящена выделению молочнокислых микроорганизмов из различных природных источников и молочнокислых продуктов. Из молочнокислых продуктов, а также из фило- и ризосферы растений было выделено и проанализировано 38 штаммов молочнокислых микроорганизмов. Микроорганизмы, выделенные из шубата, в основном представлены кокковыми формами. По комплексу изученных признаков (осмотолерантности, ферментирующей способности, протеолитической и антибиотической активности) отобрано два активных штамма. Было обнаружено, что штаммы выделяли бактериоцинподобные вещества, угнетающие рост тест микроорганизмов. У двух активных штаммов изучены физиолого-биохимические свойства и проведен анализ генов нуклеотидной последовательности 16S rRNA. Штамм АЮ13 отнесен к виду *Lactobacillus paracasei*, а штамм АЮ19 определен как *Lactobacillus casei*.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, шубат, протеолитическая активность, антагонистическая активность, тест организмы.

**СҮТҚЫШҚЫЛДЫ  
МИКРООРГАНИЗМ-  
ДЕРДІҢ ЖАҢА  
ДАҚЫЛДАРЫН БӨЛІП  
АЛУ ЖӘНЕ  
ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ**

Сүтқышқылды микроорганизмдер жүз жылдан астам уақыт бойы зерттеушілер назарында. Сүтқышқылды микроорганизмдер түрлі табиғи қайнар көздері мен сүтқышқыл өнімдерінен бөлінетіні белгілі [1, 2]. Көптеген зерттеушілердің сүтқышқылды микрооагимздерге деген қызуғушылығы, оның адам денсаулығына тигізетін әсері мен тағам өнімдерін консервілеу қабілетімен, сонымен қатар, жеке штамдарды немесе сүтқышқылды микроорганизмдер қауымдастығының сүрлеу қарқындылығы және азық сапасын жоғарылату үшін қолданумен байланысты [3, 4]. Микробқа қарсы әсерге ие сүтқышқылды бактериялар және олардың метаболиттерін пайдалану, тағам өнімдерін консервілеуге алып келетін, қарқынды әзірленіп жатқан балама тәсілдердің бірі болып табылады. Сондықтан сүтқышқылды микроорганизмдердің жаңа белсенді штамдарын іздеу, оларды бөліп алу әдісін және ұқсастығын табу қазіргі таңға дейін шешімін таппай келген өзекті мәселе болып отыр.

Жұмыстың мақсаты – тіршілік ететін табиғи ортадан (шұбат) сонымен қатар, өсімдіктердің фило және ризосфераларын сүтқышқылды микроорганизмдердің белсенді штамдарын бөліп алу, олардың түрлік ерекшеліктері мен белсенділігін анықтау.

**Зерттеу материалдары мен әдістері**

Сүтқышқылды микроорганизмдерді бөліп алу үшін Оңтүстік Қазақстан облысы мен Қазақстанның Батыс өңірінен алып келінген шұбаттың түрлі сынамалары пайдаланылды. Сүтқышқылды бактерияларды, сонымен қатар, шабындық жоңышқаның (*Trifolium pratense*) жерасты өсіп-өнетін бөліктерін және екпе жоңышқаны (*Medicago sativa*) агармен байытылған МРС және Сабуро ортада егу арқылы, 37° С стационарлы жағдайда өсірдік [5, 6].

Сүтқышқылды бактериялардың туыстық қатынастарын реттеу жұмыстары жазбаға сүйене отырып физиологиялық-биохимиялық тесттер негізінде жүргізілді [7, 8].

Зерттеліп отырған штамдардың осмостық төзімділігін салыстырмалы бағалау үшін МРС қоректік ортасына NaCl 0,5-тен 2%-ға дейінгі арақашықтықпен қостық.

Сүтқышқылды бактериялардың протеоликалық белсенділігін қоректік сұйықтығында анықтадық (МРС-ға өсуі, өсудің стационарлы фазасында).

Сүтқышқылды бактериялардың антибиотикалық белсенділігін агарға диффузиялау тәсілімен анықтадық, өсіндінің өсу қарқынының тежелген аймақтарын мм белгілеп отырдық. Тест-өсінді ретінде грам оң штаммдар (*Micrococcus*, *Bacillus mycoides*) және грам теріс бактериялар (*Escherichia coli*) және саңырауқұлақтың екі штаммы *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* пайдаланылды.

Сүтқышқылды бактериялардың жаңа штаммдарының идентификациясы *16S rRNA* гені фрагментінің нуклеотидтік тізбегін тікелей анықтау, халықаралық Gene Bank (коллективті қолданудың халықаралық зертханасында орындалды) [9] базасындағы депонирленген нуклеотидтер тізбегінің бірдей болуын анықтау әдістерімен жүргізілді.

Нәтижелердің статистикалық мәліметтерін ExcelXP/2002 бағдарламасының электронды кестесін пайдалана отырып енгіздік.

#### Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

*Сүтқышқылды микроорганизмдердің табиғи штаммдарының сипаттамасы және пайда болуы.* Азықтық өсірудің филогенез және ризосфераларынан сүтқышқылды микроорганизмдердің морфо-физиологиялық құрамдық сипаты бар 13 изолят оқшауланып алынды.

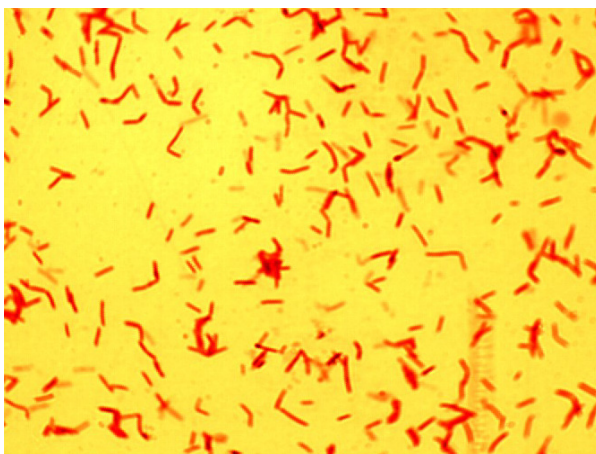
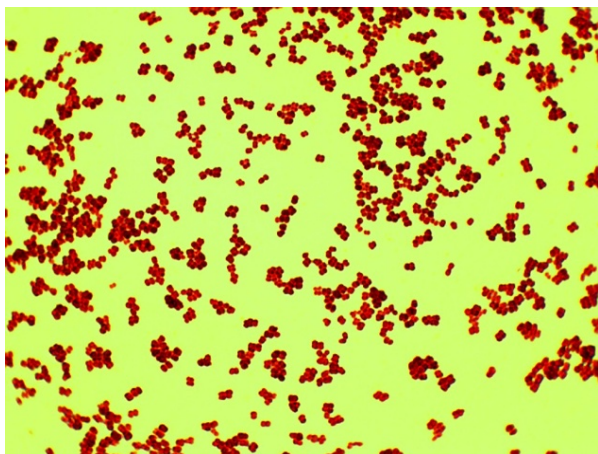
Сүтқышқылды бактериялардың пайда болуының қайнар көзі болып Оңтүстік Қазақстан және Батыс Қазақстан облыстарының шұбат үлгілері табылды. Оңтүстік Қазақстан облысының шұбат үлгілерінің құрамынан 15 изолят және Ба-

тыс Қазақстан облысының шұбат сынағасының сүтқышқылды микроорганизмдердің 10 изоляты алынды.

Зерттеудің алғашқы сатысында пайда болған сүтқышқылды микроорганизмдердің 38 штаммының морфологиясы зерттелді. Алынған зерттеу нәтижелері бойынша шұбат өнімінен алынған организмнің көп бөлігін кокк тәріздес құрайтыны (25 изолят) анықталды. Олардың пішіндері негізінен жұптасқан күйінде және түрлі ұзындықты құрайтын қысқа шынжыр тәрізді болып келеді (1-сурет). Барлық зерттелген бактериялар жылжымайтын, грам оң және аэротөзімді. Өсу сипаттамалары бойынша штаммдар *Lactococcus* туысына жатқызылды.

Өсімдіктердің филогенез және ризосферадан оқшауланған изоляттары, жалғыз таяқша тәрізді, грам оң және спора түзбейтін, қозғалмайтын, аэротөзімді болып келеді, сонымен қатар, каталазаға теріс әсер көрсетті. Жалпыға бірдей алынған тест негізінде изоляттарда туыстық қатынасы бойынша *Lactobacillus* туысына жатқызылды.

*Сүтқышқылды бактериялардың кейбір қасиеттерін бағалау.* Штаммдардың осмоттық төзімділігін салыстырмалы бағалау мақсатында қоректік ортаға ас тұзының әртүрлі концентрациясы қосылды (0,5 %-дан 2%-ға дейін). Барлық штаммдар тұздың төменгі 0,5 % концентрациясына төзімділік танытты. *NaCl* концентрациясының ортада 1 % -ға көбеюі барысында 10 штаммда өсу қарқынды анықталды, олардың 8 штаммы *Lactococcus* және 2 штаммы *Lactobacillus* туысына жатқызылды. Қоректік орта құрамында ас тұзының концентрациясы 1,5 және 2%-ға дейін барған жағдайда барлық зерттеліп отырған сүтқышқылды бактериялар штаммдарының өсуі тоқтады.



1-сурет – Сүтқышқылды микроорганизмдердің микрофологиясы, микроскоп MOTIC BA 300 (үлкейтп 20 x 100)

Сүтқышқылды бактериялардың түрлі көмірсутектерді: лактоза, глюкоза, галактоза, рамноза, раффиноза, манноза, рибоза және ксилозаны ферменттейтін қасиеті анықталған. Ферментативті белсенділігін зерттеу барысында 38 қарастырылған штаммдардан тек лактобацилдің 5 штаммы лактозаны жалғыз көміртегі көзі ретінде пайдаланды. Зерттеліп отырған штаммдардың көбі (23 штамм) глюкоза, сахароза және лактозаны сіңіру қабілетіне ие. Бұл сүтқышқылды штаммдардың метаболиздерінің түрлі биохимиялық көрсеткіштерінің оларды өндірістік биотехнологиялық үрдістерде дамыту объектісі ретінде қарастыруға болатынының көрсеткіші болып табылады.

Сүтқышқылды бактериялардың белсенді штаммдарының протеолитикалық белсенділігіне зерттеу жүргізілді. Ақуыздар олигопептидтері мен аминқышқылдарының гидролизіне және катаболизміне өсімдік және микробты ферменттер қатысады [10]. Сүтқышқылды бактериялар штаммдарының клеткадан тыс ферменттермен казеинді протеолизін стационарлы өсу фазасында зерттелді. Зерттеу нәтижесі бойынша 10 штамм ішінен тек қана 2 штамм (АЮ13 және АЮ19) жоғарғы деңгейде протеолиттік белсенділікті байқатты. Қалған штаммдар протеолитикалық белсенділікке ие болмады.

Белгілі бір дережеде тағам өнімдері мен азық өнімдерінің сапасына, олардың сақтау мерзімін қысқартатын, сонымен қатар осы өнімді пайдаланушыларға уытты әсер ететін, кері әсер ететін патогенді грам оң және грам теріс бактериялар бар. Сынамаға алынған тест – организм ретінде патогенді грам оң және грам теріс бактериялар, сонымен қатар, микроскопиялық саңырауқұлақтар пайдаланылған. Бірнеше рет жасалған зерттеулерден кейін, сүтқышқылды бактериялардың тест-организмдерге қарсы өсуі қарқынды әсер ететіні белгілі болды.

Шұбат және жемдік дақылдардың фило және ризосферасынан бөлініп алынған сүтқышқылды бактериялардың фунгицидті белсенділігін зерттеу, фитопатогенді саңырауқұлақтардың дамуын тежейтін штаммдарды анықтауға мүмкіндік берді. Штаммдардың кейбір қатары саңырауқұлақты патогендерге қарсы кешенді белсенділікпен сипатталды, ал кейбір штаммдар анық байқалған немесе спецификалық фунгицидті эффектке ие болды (1-кесте). Сонымен қатар, зерттеу барысында зерттелетін бактериялардың белсенділігі әртүрлі көрінетіні байқалды. Мысалы, АЮ13 және АЮ19 штамдары агарлы блок айналасында фитопатогендердің дамуын тежейтін метаболиттерді агар қабатына бөліп, «таза» ингибирлеу аймақтарын түзді.

**1-кесте** – Сүтқышқылды бактериялармен фитопатогендердің өсуінің ингибирлеу аймағы

Штаммдардың аты	Тест – объектілері				
	<i>Micrococcus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Таза аймақ ауданы, мм</i>				
ЮА12	45 ± 0,2	-	-	-	-
ЮА2	51 ± 0,5	-	6,3 ± 0,03	-	-
КК1	44 ± 0,03	-	-	-	-
ЮА3	22 ± 0,01	-	-	-	-
АЮ19	15 ± 0,4	64 ± 0,01	25 ± 0,05	21 ± 0,03	38 ± 0,01
М5	21 ± 0,01	-	-	-	-
ФЛ10	23 ± 0,03	-	-	-	-
АЮ13	25 ± 0,04	41 ± 0,1	23 ± 0,04	43 ± 0,2	21 ± 0,03-
М9	14 ± 0,3	-	10 ± 0,3	-	-
Фл3	15 ± 0,3	-	13 ± 0,4	-	-

Бактериалды культуралардың және фитопатогендердің ығысу аймақтарында саңырауқұлақтар клеткаларының белсенді лизисі және жойылуы жүрді, осындай өсуді ингибирлеу аймағы 43±0,2-ден 64 ± 0, 01 мм аралығында

болды. Сүтқышқылды бактериялардың антагонистік белсенділігі антимикробтық қасиеттері бар биологиялық белсенді заттарды түзуімен байланысты болуы мүмкін. *Botrytis cinerea* және *Fusarium oxysporum* фитопатогенді саңы-



рауқұлақтарына қарсы антагонистік потенциал АЮ13 және АЮ19 штамдарында да байқалады, өсу тежелуінің зонасы  $21 \pm 0,03$  және сәйкесінше  $38 \pm 0,01$  мм аймақтарында болды. Бактерия культураларының және фитопатогендердің ығысу аймақтарында лизис аймағы жүрді. Тексерілген 38 бактерияның ішінде 32 штамм белсенді емес болып шықты.

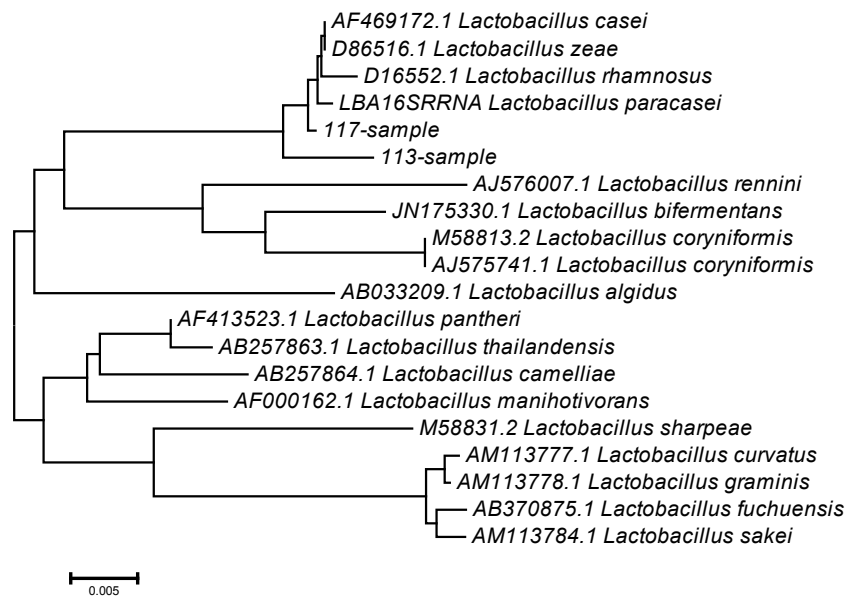
Жұмыс нәтижесінде фунгицидтік қасиеттері айқын байқалатын 2 штамм іріктеліп алынды. Дәл осы штамдар осмотолерантты және протектитикалық белсенділік көрсетті.

Барлық тест организмдерге қатысты жоғары сипатқа ие антимикробтық белсенділік *Lactobacillus* туысына жататын екі штамм АЮ13 және АЮ19 көрсетті. Бұл штаммдардың микробқа қарсы белсенділігі өсу динамикасы бойынша зерттелген. Микроорганизмдерге қарсы белсенділік өсіру барысының 6-шы сағатында байқала бастайды. Өсумен қатар бір бағытта продуценттердің биомассасының жиналуы жо-

ғарылауына алып келеді. Өсу жоғарылауының логарифмдік фазасының соңында микробқа қарсы белсенділіктің максималды белгісі және өсу кедергісінің диаметрі  $28 \pm 0,04$  мм құрады. Бұл басқа микроорганизмдердің өсу қарқынын тежейтін алғашқы микробқа қарсы заттардың құрамында бактериоциндердің болатынын білдіреді.

Сүтқышқылды бактериялардың белсенді штаммдарының зерттеліп отырған түрлік ерекшеліктерін нақты бекіту үшін 16S рРНК генінің бөлшектелген нуклеотидтік бірізділігі анықталған. Екі белсенді зерттеліп отырған штаммның 16S рРНК генінің жоғарғы нуклеотидтік бірізділік талдауы нәтижесі Gene Bank бойынша штамм АЮ13 *Lactobacillus paracasei* және штамм АЮ19 *Lactobacillus casei* түрлеріне жата- тындығы анықталды.

2-суретте филогенетикалық ағаш көрсетілген, онда зерттеліп отырған штаммдар бір сабақ бойында орналасқаны байқалған.



2-сурет – Филогенетикалық ағаш, негізгі 16S rRNA группы *Lactobacillus* гендердің фрагменттік анализінің құрылуы

Осылайша, алынған белсенді штаммдар сүтқышқылды бактериялар топтамасының қатарын көбейтті және оларды бактериялық ашытқылар жасау барысында, сүт өнімдерін дайындауда,

тағам және шикізат өнімдерін консервілеуде, сонымен бірге, азық өнімдерінің сапасын арттыруда тәжірибелік пайдалануда қызығушылық тудыру мүмкіндігін арттырады.

Әдебиеттер

- 1 Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства // Прикладная биохимия и микробиология, 2012, том 48. – № 3. – С. 269 – 275.
- 2 Фрунджян В.Г., Бровко Л.Ю., Бабунова В.С., Карташова В.М., Угарова Н.Н. Биолуминесцентный метод определения общей бактериальной обсемененности сырого молока // Прикладная биохимия и микробиология, 1999, том 35. – № 3. – С. 358 – 365.
- 3 Стоянова Л.Г., Егоров Н.С., Федорова Г.Б., Катруха Г.С., Нетрусов А.И. Сравнение свойств бактериоцинов, образующих штаммами *Lactococcus lactis* разного происхождения // Прикладная биохимия и микробиология, 2007, том 43. – №6. – С. 677 – 684.
- 4 Шурхно Р.А., Гареев Р.Г., Абульханов А.Г., Валидов Ш.З., Боронин А.М., Наумова Р.П. Ферментация высокобелковой растительной массы с интродукцией молочнокислых бактерий // Прикладная биохимия и микробиология, 2005, том 41. – №1. – С. 79-89.
- 5 Практикум по микробиологии: под ред. А.Н. Нетрусова. – М.: Academia. 2005. – С. 448 – 597.
- 6 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: МГУ, 1991. – С. 59 – 75.
- 7 Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge Univer. Press, 2000. – 1139 p.
- 8 Определитель бактерий Берджи : В 2 т / под ред. Дж.Хоулга, Н. Крига, П. Смита, С. Ульямса. – М.: Мир, 1997. – 305 с.
- 9 Matthew D. Collins, Brian A. Phillips, Paolo Zanoni. Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. // International journal of systematic bacteriology, apr. 1989. – P. 105-108. – Vol. 39. – No. 2.
- 10 Саубенова М.Г., Пузыревская О.М., Нурумбетова Б.К. Ассоциация молочнокислых бактерии и дрожжей для сбраживания кобыльего молока // Вестник КазГУ. Серия биологическая. – 2001. – №1 (13). – С. 75-81.
- 11 Шигаева М.Х., Токабасова А., Сагындыкова С.З., Касымбекова С.К. Молочнокислая микрофлора шубата Западной и Северо – Западной зон Казахстана // Изденіс Поиск, №2, 2001. – С. 3 – 45.

References

- 1 Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Netrusov A.I. Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria: diversity and properties // Applied Biochemistry and Microbiology, 2012, vol 48, № 3. S. 269 – 275.
- 2 Frundzhyan V.G., Brow L.Y., Babunova V.S., Kartashov V.M., Ugarov N.N. Bioluminescent method properly to the total bacterial contamination of raw milk // Applied Biochemistry and Microbiology, 1999, vol 35, № 3. S. 358 – 365.
- 3 Stoyanov L.G., Egorov N.S., Fedorov G.B., Katruha G.S., Netrusov A.I. Comparison of bacteriocins produced strains of *Lactococcus lactis* different origin // Applied Biochemistry and Microbiology, 2007, Volume 43, № 6. S. 677 – 684.
- 4 Shurkhno R.A., Gareyev R.G., Abulhanov A.G., Walid S.Z., Boronin A.M., Naumova R.P. Fermentation vysokobelkovoij plant mass with the introduction of lactic acid bacteria // Applied Biochemistry and Microbiology, 2005, Vol 41, № 1. S. 79 – 89.
- 5 Workshop on microbiology / Under. Ed. AN Netrusov. – М.: Academia. 2005, pp 448 – 597.
- 6 Zvyagintsev D.G. Methods of Soil Microbiology and Biochemistry. – М.: MSU, 1991. – S. 59 – 75.
- 7 Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge Univer. Press, 2000. – 1139 p.
- 8 The determinant of bacteria Burgi: 2 v / Ed. Dzh.Houlga, N. Krieg, P. Smith, S. Ulyamsa. – М.: Mir, 1997. – 305 с.
- 9 Matthew D. Collins, Brian A. Phillips, Paolo Zanoni. Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. // International journal of systematic bacteriology, apr. 1989, p. 105-108 Vol. 39, No. 2.
- 10 Saubenova M.G., Puzyrevsky O.M., Nurumbetova B.K. Association of lactic acid bacteria and yeast for fermentation of mare's milk // Vestnik KSU. Series biologicheskaya. – 2001. – №1 (13). – S. 75 – 81.
- 11 Shigaeva M.KH., Tokabasova A. Sagyndykova S.Z., Kasymbekova S.K. Lactic microflora shubat West and North – Western regions of Kazakhstan // Izdenis search, №2, 2001, C. 3 – 45.