

УДК 579.66

<sup>1,2</sup>А.С. Баубекова, <sup>2,3</sup>Г.С. Конуспаева\*, <sup>1,4</sup>Ш.Н. Ахметсадыкова, <sup>1,4</sup>Н.Н. Ахметсадыков<sup>1</sup> ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматы, Казахстан,<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан,<sup>3</sup>FAO Camel project UTF/SAU/044/SAU, Al-Kharj, Saudi Arabia,<sup>4</sup>Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

\*e-mail: konuspayevags@hotmail.fr

### Подготовка промышленного производства заквасок– выделение и идентификация бактерий для кумыса и шубата

Для налаживания промышленного производства заквасок кумыса и шубата проведен первый шаг – выделение и идентификация микроорганизмов кумыса, шубата, верблюжьего и кобыльего молока 4 областей Казахстана. Выделено 92 культуры бактерий, из которых выделялись ДНК для идентификации методом определения полиморфизма фрагмента 16S рибосомальной РНК. Идентификацию прошли 57 культур бактерий, из которых 30 бактерий идентифицированы на 93% и выше гомологичностью, 14 бактерий не были идентифицированы вовсе, в связи с отсутствием в существующей базе данных.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, кумыс, шубат, верблюжье и кобылье молоко.

Современные исследования в области пищевой микробиологии показали, что качество, органолептические свойства продуктов на 70% связаны с микрофлорой [1]. Микрофлора может быть напрямую связана с местом получения сырья или же методикой и практикой переработки сырья. Так при производстве вин, используется термин «терруар», который является емким термином, под которым подразумевают одновременно микрофлору место получения сырья и характерную микрофлору мест производства [2, 3]. Так, одинаковые сорта винограда, выращенные в разных местах дают совершенно разные параметры вин.

Если делать параллель относительно кисломолочных продуктов, то всем известные болгарская палочка и молочный стрептококк дают многообразие йогуртов, производимых по всему миру. Казалось бы известные 2 вида бактерии, а такое широкое разнообразие продуктов. То же самое и в случае с кумысом и шубатом. Вековые традиции производства кумыса и шубата на территории Центральной Азии и Казахстана имеют большое разнообразие между собой по специфическому вкусу, аромату, текстуре продукта. Все они связаны со специфической микрофлорой того или иного места разведения животных, их рациона питания, используемой методикой приготовления напитков. Если в средние века

Марко Поло кумыс назвал «шампанским степей», то с точки зрения пищевой микробиологии он не сильно преувеличил [4].

Исторически очень много было описано все возможных ароматов кумыса и шубата. Однако, все также знают, что каждой весной из года в год у производителей создаются трудности в восстановлении прежних ароматов. Из-за сурового климата Казахстана в зимний период не все животные продолжают давать молоко, а у производителей не всегда есть возможность сохранить заквасочный материал. Поэтому с приходом весны зачастую производители теряют время для проведения спонтанного брожения до получения известного вкуса, аромата и текстуры продукта. Для решения такого рода трудностей необходимо налаживание производства специфических заквасок для кумыса и шубата. Данный процесс очень длительный и трудоемкий. Цель данной статьи описать предварительный этап в налаживании производства – выделение и идентификация микроорганизмов из кумыса и шубата разных областей Казахстана. Данный этап обеспечит специфичность будущих заквасок

#### Материалы и методы

Был сделан забор образцов типичного кумыса, шубата, верблюжьего и кобыльего молока. На данном этапе пробы отбирались на 14 фермах четырех областей Казахстана:

Алматинской, Южно-Казахстанской, Кызылординской и Атырауской областях (Рисунок 1). Все образцы помещались в стерильные пробирки.

Классическими микробиологическими методами выделялись культуры микроорганизмов. Затем эти микроорганизмы

методом определения полиморфизма фрагмента 16S рибосомальной РНК были идентифицированы.

#### Результаты и их обсуждение

Из 19 образцов разных ферм и крестьянских хозяйств было выделено 92 культур бактерий (Таблица 1).

**Таблица 1** – Количественные данные выделенных культур из микрофлоры кисломолочных продуктов верблюжьего и кобыльего молока

№	Микро-организмы	Количество изолятов					
		Атырауская область (2 фермы)		Кызылординская область (4 фермы)	Южноказахстанская область (5 ферм)		Алматинская область (компания Саржайлау))
		Верблюжье молоко	Шубат	Шубат	Верблюжье молоко	Шубат	Кумыс
1	Бактерии	6	4	13	26	29	13
2	Дрожжи	2	2	-	3	2	5

Идентификация проводилась по «сверке» секвенированных клонов бактерий после секвенирования 16S рибосомальной ДНК. Из 92 указанных бактерий результаты по идентификации получено только для 57 бактерий. Среди 57 секвенированных клонов бактерий филогенетическая принадлежность показало только:

- идентифицированы и предложен один вид бактерий – 30 бактерий,
- идентифицированы и предложен два и более вида бактерий – 13 бактерий,
- не идентифицированы – 14 бактерий.

Следует отметить, что большое количество микроорганизмов полученных в виде изолятов при пересевании больше не давали роста. Поэтому многие из них были потеряны для идентификации. Затем на стадии идентификации 100% идентифицировано было только 6 бактерий. Даже если к остальным из 30 бактерий базой данных было предложено одно наименование бактерий. Другими словами по 24 бактериям в базе данных проявили 88% и выше гомологичности. По остальным бактериям следует отметить, что использованная база данных секвенированных бактерий не имеет. В связи с этим, 51 бактерия были идентифицированы частично или вовсе не идентифицированы. Такие результаты дают возможность интерпретировать, что 51 бактерия является скорее «эндемическими» или по крайней мере ранее не были идентифицированы и внесены в известную базу

данных. В будущем следует эти микроорганизмы идентифицировать и охарактеризовать для пополнения базы данных. Пока, полученные результаты можно интерпретировать как широкое биоразнообразие микрофлоры национальных продуктов, которое подтверждает свою древность и устойчивость времени. Не смотря на появление в нашей среде других кисломолочных продуктов, особенно полученных с помощью производственных заквасок, не сместила и не подвергла исчезновению особенных «эндемических» видов микроорганизмов.

Доминирующей микрофлорой были грамположительные бактерии, относящиеся к родам *Enterococcus*, *Lactobacillus*. Хотя бактерии выделялись на средах, специфичных для молочнокислых бактерий, однако, среди выделенных микроорганизмов были идентифицированы и протеобактерии (4 изолята), которые были представлены видами *Ralstonia pickettii*, *Escherichia fergusonii*, *Acetobacter pasteurianus*, относящиеся скорее к посторонней, загрязняющей микрофлоре, как и актинобактерии, представленные в виде, *Corynebacterium variabile* и *Microbacterium hatanonis*.

Из 57 идентифицированных изолятов бактерий 22 относилось к этому роду, что составляет почти 38% всей микрофлоры. Из 22 изолятов, 8 были идентифицированы как *Enterococcus faecium*, 5 изолятов как

*Enterococcus durans* и 4 из них *Enterococcus faecalis*.

До последнего времени в отечественной литературе энтерококки рассматривались (как серологическая группа D стрептококков) в качестве нормальной кишечной микрофлоры человека и животных, а в молочных продуктах ее рассматривали как постороннюю микрофлору [5]. За последнее десятилетие в зарубежной литературе появился ряд статей о том, что различные виды энтерококков могут быть обнаружены в молоке и различных кисломолочных продуктах [6, 7, 8, 9, 10, 11]. При анализе микрофлоры различных национальных продуктов, особенно сыров, в странах с наиболее развитыми традициями сыроварения (во Франции, Италии) наряду с другими бактериями часто обнаруживаются энтерококки [12]. В традиционных кисломолочных продуктах Китая, таких как кумыс, ферментированной ветчине, той-фу и др. [13], в ферментированном кулумбийском кумысе [14] и др. энтерококки являются постоянным компонентом заквасок.

Самыми распространёнными в процентном отношении видами энтерококков, выделенными из молочных продуктов и идентифицированными различными способами, являются виды *E. faecium*, *E. faecalis* и *E. durans* [6,7], что согласуется и с нашими данными. Бактерии этих видов используются в качестве стартовых культур, особенно при приготовлении сыров, поскольку молочнокислые энтерококки обладают

способностью к ароматообразованию [10, 15]. Многие штаммы энтерококков, обнаруженные в молоке, обладают протеолитической активностью и антагонистическими свойствами по отношению к патогенным штаммам *Listeria* и *Clostridium* [8, 9, 16].

На втором месте по встречаемости были представители рода *Lactobacillus* - 11 изолятов, составляющие 19% микрофлоры. Какой-либо закономерности в распределении лактобацилл в молоке верблюдов и шубате не наблюдалось. В некоторых образцах (3 видах шубата и 1 образце верблюжьего молока) они встречались по 2-3 вида, в других же не были обнаружены. Тем не менее, отсутствие бактерий рода *Lactobacillus* в традиционных ферментированных молочных продуктах скорее является исключением, нежели правилом.

В меньшем количестве были обнаружены виды родов *Leuconostoc*, представленные двумя видами *Leuconostoc mesenteroides* (CHL60) и *Leuconostoc pseudomesenteroides* (SH2M3), а также 1 вид *Lactococcus lactis* (CHL62), обнаруженный в шубате. Хотя эти виды молочнокислых бактерий имеют большое значение в качестве заквасок ферментированных продуктов, но видимо не являются доминантным видом при ферментации верблюжьего молока.

Таким образом, представленные результаты в данной статье в дальнейшем использовались для налаживания производства заквасок для национальных кисломолочных продуктов.

### Литература

- 1 Jourjon F. Recherche de facteurs explicatifs du milieu : influence et hiérarchisation sur la qualité et typicité des vins rouges de la Moyenne Vallée de la Loire // Thèse de Doctorat - Institut Œnologie de Bordeaux, 1990. - 186 p.
- 2 Pagès J. Recueil direct de distances sensorielles : application à l'évaluation de dix vins blancs du Val-de-Loire // Sciences des Aliments. – 2003. – V. 23. – P. 679-688.
- 3 Jourjon F. Recherche de l'influence du milieu sur la qualité des vendanges : comparaison de cinétiques de divers constituants de la baie au cours de la maturation. Mémoire de DEA Œnologie-Ampéologie. - Institut Œnologie de Bordeaux, 1984. – 127 p.
- 4 Polo M.. Le Livre de Marco Polo, Citoyen de Venise, Conseiller Privé et Commissaire Impérial de Khoubilāï-Khaân: Rédigé en Français Sous Sa Dictée en 1298 Par Rusticien de Pise. Publié Pour la Première Fois... Par Pauthier M.G. (Ed.). – Adegí Graphics, 1999. – 494 p.
- 5 Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. Учебник для ВУЗов. – Сергиев Посад: ООО "Все для Вас - Подмосковь", 1999. – 415 с.
- 6 Wessels D., Jooste P.J., Mostert J.F. Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolated from milk and dairy products // J. Food Microbiol. – 1990. – V. 10. – P. 349-352.
- 7 Arizcun C., Barcina Y., Torre P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus spp.* Isolated from milk and Roncal Idiazabal cheese // Int. J. Food Microbiol. – 1997. – V. 38. – P. 17-24.

- 8 Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M.E., Andrighetto C., Lanorte M.T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino) // *J. Appl. Microbiol.* – 2000. – V. 89(2). – P. 267-274.
- 9 Andrighetto C., Kniff E., Lombardi A., Torriani S., Vancanneyt M., Kersters K., Swings J., Dellaglio F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses // *J. Dairy Res.* – 2001. – V. 68(2). – P. 303-316.
- 10 Gelsomino R., Vancanneyt M., Cogan T.M., Condon S., Swings J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68(7). – P. 3560-3565.
- 11 Delgado S., Delgado T., Mayo B. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk // *J. Food. Prot.* – 2002. – V. 65(10). – P. 1590-1596.
- 12 Poznanski E., Cavazza A., Cappa F., Cocconcelli P.S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 92(2). P. 141 - 151.
- 13 Shan-na Liu et al. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods // *Food Research International.* – 2011. – V. 44. – P. 643–651.
- 14 Clemencia Chaves-Lopez et al. Microbiological characteristics of kumis, a traditional fermented Colombian milk, with particular emphasis on enterococci population // *Food Microbiology.* – 2011. – V. 28. – P. 1041-1047.
- 15 Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. - V. 67(12). – P. 5482-5487.
- 16 Giraffa G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology // *Food Microbiol.* – 1995. – V. 12. – P. 291-299.