



И.К. Тыныбаева*, К.Г. Ли, З.С. Сармурзина

ҚР БҒМ ҒК "Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы" РМК, Астана, Қазақстан
*Байланыс үшін автор: indiara@mail.ru

Орталық Қазақстан қымызының микробтық құрамын анықтау

Аңдатпа. Қымыз – бие сүтінен алынатын сүтқышқылды өнім. Орталық Азияда кеңінен қолданылатын дәстүрлі сусын. Оның құрамында дәрумендер, биологиялық белсенді заттар және түрлі микроорганизмдер бар, сол себепті денсаулыққа өте пайдалы деп саналады. Негізінен, қымызды ашытуға жауапты микроорганизмдер сүт қышқылды бактериялар болып табылады. Кейбір СКБ тек пробиотиктер ретінде ғана қызмет етіп қоймайды, сонымен қатар биологиялық консервант ретінде қолданылады, яғни олардың ұзақ сақтап тұру сияқты пайдалы өндірістік қабілеті бар. Осы зерттеуде микроорганизмдерді қымыз сүт қышқылды өнімінен оқшаулап алдық. Әрі олардың түрлері микроскоп әдісімен бағаланды. ДНҚ үлгілері бөлініп алынып, әрі қарай генетикалық идентификация жүргізілді. Сонымен, қымыз тағам өнімінен 16S рРНҚ гені бойынша *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter tropicalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc fallax*, *Staphylococcus hominis* идентификацияладық.

Түйін сөздер: бактериялар, микроскоп, қоректік орта, микроорганизмдер, сүт қышқылды бактериялар, идентификациялау, лактобактериялар, түрлер, праймер, инкубация, СКБ.

DOI: 10.32523/2616-7034-2022-140-3-6-13

Кіріспе

Қымыз (моңғолша арраг, чиге және айраг) - Орталық Азияда кеңінен қолданылатын дәстүрлі және жоғары құнарлы ашытылған сүт сусыны. Қымыз үйде ашыту технологиясы көмегімен жаңа сауылған бие сүтінен алынды. Оның емдік қасиеттері құрамында жеңіл сіңетін ақуыздар, майлар, көмірсулар, дәрумендер мен биологиялық белсенді заттардың болуына байланысты [1]. Қымыз малшылар мен олардың отбасыларына дәстүрлі көшпелі өмір салты және жайлаудың суық климатында аман қалуға мүмкіндік беретін қоректік заттарға бай, толыққанды рацион болып саналады. Қытайда тұратын моңғолдар да қымызды тағамдық дәрі деп санайды [2].

Ашытылған бие сүтінің сақталуында ферментативті микроорганизмдер шешуші рөл атқарды. Бұл микроорганизмдер қатарына сүт қышқылды бактериялар, сірке қышқылы бактериялары және ашытқы енеді. Сүт қышқылды бактериялар (СКБ) грам-позитивті, теріс каталазалы және көмірсулы ашытудың негізгі өнімі ретінде сүт қышқылын өндіреді [3].

Тағам құрамындағы микроорганизмдер тағамның дәміне, хош иісіне, сақтау тұрақтылығына және тіпті тағамдық сапасына әсер етуі мүмкін [4]. СКБ штамдары лактозаны конверсиялау және ашытылған сүт өнімдерінің сіңімділігін жақсарту қабілетімен сипатталады [5]. Олар антимикробтық қасиеттерге ие, себебі кең спектрлі антибиотиктер өндіреді. СКБ-дың біршамасы қауіпсіз организм ретінде және адам денсаулығына қауіп төндірмейді деп танылады [13]. Жалпы сипаттамасы бойынша СКБ сүт қышқылын негізгі өнімі немесе қант ашыту өнімі ретінде өндіре алатын микроорганизм [14]. Қазіргі уақытта әлем бойынша пробиотиктер ас

қорыту жүйесінде, иммунологиялық және респираторлық қызметінде маңызды рөл атқаруы мүмкін және жұқпалы аурулардың алдын алуға маңызды болуы мүмкін деп насихатталуда [15]. Табиғи және өңделмеген тағамдарға тұтынушылардың сұранысының артуына байланысты химиялық қоспалардың орнын басатын немесе оларды қолдануды азайтатын тағамдық консерванттар ретінде табиғи ингибиторларды қолдануға үлкен қызығушылық тудырды [16].

Қымызды ашытуға жауапты микроорганизмдер сүт қышқылды бактериялар болып табылады. Кейбір СҚБ тек пробиотиктер ретінде ғана қызмет етіп қоймайды, сонымен қатар биологиялық консервант ретінде қолданылады, яғни олардың ұзақ сақтап тұру сияқты пайдалы өндірістік қабілеті бар [6].

Әдетте, СҚБ сүт, ірімшік, ет, сусындар мен көкөністер сияқты қоректік заттарға бай орталарда табылады. Сонымен қатар, СҚБ топырақтан, көлдерден, жануарлар мен адамдардан ішек жолдарынан бөліп алуға болатындығы дәлелденген. Олар ежелден бері тағам және жем ферментациясы үшін қолданылған, және қазіргі кезде оларды азық-түлік және жем өнеркәсібінде басты ашытқы ретінде әлі де қолданады [7].

Қазіргі кезде барлық дүние жүзі бойынша СҚБ-дың шамамен 90-нан астам түрі оқшауланған [8]. Ең алғаш рет сүт қышқылының бактериялары сүттен бөлініп алынған [17, 18]. Заманауи уақытта жаңа пробиотиктерді, әсіресе кейбір дамымаған түрлерді скрининг жүргізу тұрақты тәжірибеге айналды.

Қымыздың микробтық құрамын зерттеу ғылым үшін сөзсіз қызығушылық тудырады. Мақалада қымыз тағамдық өнімі құрамындағы микроорганизмдерді анықтауды мақсат тұттық. Генотиптеуге негізделген идентификация әдісі фенотиптік белгілерге негізделген дәстүрлі әдіске қарағанда дәлірек нәтиже береді.

Жадығаттар мен әдістер

Зерттеуде Орталық Қазақстаннан алынған қымыз үлгілерін қолданды.

Сүт қышқылды бактерияларды бөліп алу. Сүт қышқылды бактериялардың жасушаларын жинақтау үшін MRS сұйық қоректік ортасына ашытылған сүт өнімдерінің үлгілері енгізілді (Manosa-Rogoza-Sharp, HiMediaLaboratoriesPvt.Ltd.).

Сүт қышқылды бактериялардың таза культурасын алу үшін байыту культурасының стерильді тұзды ерітіндідегі он есе сұйылтылуы дайындалады, содан соң осы өсімдіктің сәйкесінше 100 мкл (10^{-5} немесе 10^{-6}) ерітіндісі тығыз MRS agar қоректік ортасына (Manosa-Rogoza-Sharp, HiMediaLaboratoriesPvt. Ltd.) енгізілді. Барлық егілген культуралар термостатта $+37^{\circ}$ C температурада 48 сағат бойы инкубацияланды. Культуралардың басқа микроорганизмдерден дара, таза өсуі микроскоптық Грам әдісімен анықталды.

Өсірілген микроорганизмдердің *Lactobacillus* туысына жататындығын микроскоп негізінде анықтады: жасуша морфологиясы, қозғалғыштығы, споралардың болмауы немесе болуы.

Бактериялық ДНК-ны бөліп алу [19]. 1,5 мл тәулік бойы өскен бактерия культураларын центрифугада 13 мың айн/мин. 2 минуты. Супернатант алынып тастайды. Жасушалар 547 мкл TE 1x ерітіндісіне салынады. 20 мкл лизоцим (10 мг/мл) құямыз. Араластырып, 80 минут при 37° C қоямыз. 30 мкл 10% SDS және 3 мкл протеиназа K (10 мг/мл) қосамыз. Араластырып 2 сағат 37° C градус инкубациялаймыз. 100 мкл 5M NaCl қосып, араластырамыз. 80 мкл СТАВ/NaCl қосамыз. Араластырып, 10 минут 65° C градуста ұстаймыз. 750 мкл хлороформа/изоамилового спирт қосамыз. Араластырамыз, центрифугада 10 минут 13 мың айналым бөлме температурасында айналдырамыз. Таза пробиркаға супернатантты ауыстырамыз. 500 мкл хлороформ/изоамил спирт қосып араластырып, центрифугада 10 минут 13 мың айналымда айналдырамыз. Таза пробиркаға супернатантты ауыстырамыз. 0,6 мөлшер изопропанол (300 мкл) қосып, ақ тұнба болғанша араластырамыз. Центрифугада 10 минут 13 мың айналымда айналдырамыз.

Супернатанантты алып тастап, ДНҚ-ны 500 мкл 70 % этанолмен шаямыз. Пайда болған ДНҚ тұнбасын 100 мкл TE 1x ерітіндіде ерітеміз. 60 градуста 30 минут қыздырамыз.

16S рРНҚ генін қолдана отырып генотиптеу [20]. ПТР қоспасы: 13,8 мкл H₂O (ДНКаза/РНКаза-), 3 мкл буфер 10x Taqpolymerase, 3мкл 25 mM MgCl₂, 3 мкл 2 mM dNTP қоспасы, 1 мкл 8F праймер (10 пмоль/мкл), 1 мкл 806R праймер (10 пмоль/мкл), 0,2 мкл TaqPolymerase 5U/мкл. Келесі шарттар бойынша ПТР жүргізіледі-бастапқы денатурация - +95° С 5 минут, 30 цикл: +95° С – 1 минут, 55° С 1 минут, +72° С 1 минут, ұзартылуы - +72 °С 10 минут. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,5 % агароза гелінде ПТР-амплификация өнімдерін электроферзі жүргізіледі.

ПТР-амплификация (дефосфорилирование). Амплификация жүрген реакциялық қоспадағы 5'-соңды фосфатты топты дефосфорилирлеуді арктикалық асшаяндардың 0,5 бірлікті сілтілік фосфатазасын (ShrimpAlkalinePhosphatase, Fermentas) 37° С температурада 30 мин инкубациялау және әрі қарай инактивациялау 85° С температурада 10 минут қыздыру арқылы жүргізілді.

16S рРНҚ генін секвенирлеу. Тікелей нуклеотидтік тізбектілікті анықтау өндірушінің нұсқаулығына сай BigDyeTerminator v 3.1 CyclesequencingKit (Қолданбалы биожүйелер) қолдана отырып Сэнегер әдісі көмегімен жүргізілді. Алынған нуклеотидтік тізбекті талдауға SeqScan бағдарламалық қамтамасыз ету пакеті қолданылды. Тізбектерді салыстыру NCBI мәліметтер базасында жүргізілді.

Нәтижелер мен талқылаулар

Жүргізілген жұмыстардың нәтижесінде таза культуралардың 42 штаммы алынды. Морфологиялық сипаттамасы бойынша MRS тығыз қоректік ортасында өскен жаусшалар *Lactobacillus spp.* туысының сипаттамасына лайық жасуша оқшауларының түсі қоңыр-сарғыш, жиіктері тегіс, беті жылтыр, консистенциясы жұмсақ. MRS сұйық қоректік ортасында өсіргенде жасушалардың көрінісі келесідей: қоректік ортаның барлық бойы бойынша, түтікшенің қабырғасы бойымен, түбінде тұнба түзеді.

Жасушалардың тазалығын және туыстық сипаттамасын микроскоптық әдіспен анықтадық. Грам әдісі көмегімен грам оң, тізбектеліп немесе бір-бірден жеке дара орналасқан таяқшалы мен кокк тәрізді домалақ пішінді жаусшалар екені анықталды. Яғни, Берджи мәліметшесі бойынша *Lactobacillus spp.* пен *Lactococcus* туысына жататынын анықтадық.

Сүт қышқылды бактериялар таяқша тәрізді немесе домалақ кокк тәрізді, теріс каталазалы, қозғалмайтын, гомоферментативті немесе гетероферментативті және аздап қышқылдық жағдайда өсетін микроорганизмдер [9]. Зерттелген культуралар негізінен ұзындығы, қалыңдығы мен орналасу сипатымен ерекшеленетін таяқшалардан тұрады: 1 топ - таяқшалар жеке және тізбекпен орналасқан, 2 топ - таяқшалар сәл жіңішкеуеу, кластерлерде, қос-қостан орналасқан. Екі топтың бактериялары да спора түзбейді.

Микроскоптық зерттеу әдісі бактериялардың тек түрлік қасиеттерін ғана анықтауға мүмкіндік береді. Жұмыс барысында зерттеліп отырған үлгілерді лактобактерия түрлеріне жатқыздық. Ал түршелерін анықтау үшін қосымша әдіс қолдануды талап етеді. Оқшауланып алынған бактериялар үлгісін әрі қарай генетикалық идентификациялау үшін 16S рРНҚ генін сиквинирлеу әдісін қолдандық.

MRS сұйық ортасына отырғызған культураларды эппендорф 1,5 мкл пробиркаларына құйып, тұнба отырғызу үшін центрифугада 13 мың айн/мин. 2 минут айналдырдық. Алынған бактерия жасушаларының тұнбасынан нұсқаулама қолдану арқылы ДНҚ бөліп алдық. Бөлініп алынған ДНҚ концентрациясын ND-2000 (thermofisher) спектрофотометрінде өлшедік. Яғни, ДНҚ концентрация мөлшері 200-500 нг аралығында болды.

Фенотиптік белгілерге негізделген дәстүрлі әдіске қарағанда 16S рРНҚ генін сиквинирлеу арқылы идентификациялау әдісі дәлірек нәтиже береді [10]. 16S рРНҚ геннің тізбектік талдауы

қазіргі уақытта бактерияларды анықтау мен жіктеудің кең тараған әдісі болып табылады. 1994 жылдан бастап 16S рРНҚ гендік тізбегіне 97%-дан астам ұқсастығы бар штамдар бір түрге жатады деп саналады [11]. Оқшауланып алынған ДНҚ үлгілерімен жүргізілген ПТР амплификация нәтижесінде шамамен 800 қ.н. фрагменттері алынды.

Осы зерттеуде, бөлініп алынған ДНҚ үлгілерінің ПТР амплификациясы 8FAGAGTTTGATCCTGGCTCAG және 806RGGACTACCAGGGTATCTAAT праймерлерді қолдана отырып жүргізілді. Генотиптеу нәтижесінде Орталық Қазақстан өңірінен жиналып алынған қымыз үлгісінен келесі бактериялар бөлініп алынды:

Lactobacillus brevis- 35,7 %;

Acetobacter tropicalis-4,7 %;

Lactobacillus plantarum-11,9 %;

Lactobacillus delbrueckii- 21,4 %;

Lactococcus lactis- 9,5 %;

Enterococcus faecalis-7,1 %;

Leuconostoc fallax- 2,3 %;

Staphylococcus hominis- 7,1 %.

Алынған нуклеотидтік тізбектілікті BLAST мәліметтер базасына енгізіп, зерттеліп отырған үлгілердің түрлік қасиеттерін анықтадық. Зерттеу жұмысының нәтижесінде, қымыз үлгілерінде лактобациллалардың келесі түрлері басым болды: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*. Аз мөлшерде *Acetobacter tropicalis*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc fallax*, *Lactococcus lactis* штамдары кездесті.

Қорытынды

Бие сүтінің микробтық құрамын зерттеу ғылым үшін сөзсіз қызығушылық тудырды. Соңғы жылдары бие сүтінің микробтық құрамын зерттеуге қызығушылық айтарлықтай артты, ағзаның микробтық профилінің композициялық құрамының өзгеруі арасындағы байланыс туралы жаңа ғылыми деректер пайда болды. Ақпараттың жоқтығы бие сүтінің және оның ашытылған туындыларының денсаулыққа пайдалы қасиеттерін анықтауға, сондай-ақ микробтық құраммен байланысын талдауға мүмкіндік беретін кез келген тұжырымға ерекше мән береді. Қазақстанның әртүрлі аймақтарынан алынған бие сүті және оның ашытылған туындылары ғылыми зерттеулер үшін бірегей биоматериал.

Қазақстанда ең алғаш жүргізілген қымыздың метагеномын анықтау жұмысында Ақмола облысынан алынған қымыз құрамында *Lactobacillus* туысына жататын басқа бактериялар және басқа да сүт қышқылы бөлініп алынған. Атап айтқанда бактериялардың келесі түрлері *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. curvatus* тұқымдасының ашытқысы (62,4%) және *Saccharomyces cerevisiae* (37,6%) [12]. Авторлардың пікірінше, қымызда басым түрлердің салыстырмалы түрде аз диапазоны бар, мысалы, *L. helveticus* және *Lc. lactis*. Қымыз қышқыл, сондықтан қышқыл орта оның сақтау мерзімін ұзартуға көмектеседі, себебі көптеген лактобактериялар пробиотиктер болып саналады және биологиялық белсенді заттарды шығара алады. Бұл микробтық құрам қымыздың денсаулықты жақсартатын әсерімен байланысты болуы мүмкін [21]. Мулиеватти жұмысында 16S рДНҚ секвенирлеу нәтижелері бұл топтарды үш туысқа бөлді: *Lactobacillus*, *Staphylococcus* және *Ochrobactrum* [1].

Қымыз тағам өнімінде *Lactobacillus spp.* болуы құрамындағы қоректік заттардың биожетімділігін арттырады және консервант қызметін атқарады. Осы зерттеуден, ашытылған бие сүті, яғни қымыз сүтқышқылды бактерияларға бай деп білеміз.

Зерттеу жұмысының мақсаты қымыздың микробтық құрамын анықтау болды. Сонымен, Орталық Қазақстан өңірінің қымыз үлгісінен бөлініп алынған 42 штамның ішінде *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* түрлерінен басқа аз мөлшерде *Acetobacter*

tropicalis, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc fallax*, *Lactococcus lactis* штамдары кездеседі.

Келешекте СҚБ биотехнологиялық өндірісте қолданыла алады. Бие сүтінің микробтық құрамы мен оның қасиеттерімен байланысы туралы алынған білімді жоғары сапалы функционалды тамақ өнімдерін өндіруде, сонымен қатар жаңа биотехнологияларды дамытуда қолдануға болады. Сонымен, Қазақстанның әр аймағынан алынған бие сүтінің микробтық құрамы жаңа штамдарды табуға мүмкіндік береді.

Қаржыландыру. Мақала OR11465530-OT-21 «Өндірістік микроорганизмдер коллекциясын құру және толықтыру, биотехнология, медицина және ауыл шаруашылығы қажеттіліктері үшін олардың биологиялық әртүрлілігін зерттеу және сақтау» бағдарламалық-мақсатты қаржыландыру жобасы бойынша ғылыми-зерттеу жұмыстары аясында.

Әдебиеттер тізімі

1. Mulyawati A.I., Jatmiko Y.D., Mustafa I., Ardyati T., Suharjo. Diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented mare's milk products based on PCR-RFLP analysis // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., 2019. - P. 012104.
2. Gesudu Q., Zheng Y., Xi X., Qiangchuan H., Xu H., Weiqiang H., et al. Investigating bacterial population structure and dynamics in traditional koumiss from Inner Mongolia using single molecule real-time sequencing // J. Dairy Sci. - 2016. - Vol. 99. - P. 7852-7863.
3. Sujaya N., Ramona Y., Widarini N.P., Suariani N.P., Dwipayanti N.M.U., Nocianitri K.A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Sumbawa mare milk // J. - 2008. - Vol. 9. - № 2. - P. 52-59.
4. Aspen T. Reese, Anne A. Madden, Marie Joossens, Guylaine Lacaze, Robert R. Dunn. Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread // Applied and Environmental Science January. - 2020. - V. 5. - № 1. - P. 19. DOI: doi.org/10.1128/mSphere.
5. Misganaw Wassie, Teketay Wassie. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk // International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. - 2016. - Vol. 3. - № 8. - P. 44-49.
6. Meng Zhang, Na Dang, Dongyan Ren, Feiyan Zhao, Ruirui Lv, Teng Ma, Qiuhua Bao, Bilige Menghe, Wenjun Liu. Comparison of Bacterial Microbiota in Raw Mare's Milk and Koumiss Using PacBio Single Molecule Real-Time Sequencing Technology // Frontiers in Microbiology. - 2020. - Vol. 11. - P. 581610.
7. Vera A., Ly-chatain M.H., Rigobello V., Demarigny Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focusing on the lactobacilli present in the microbiota // Antonie van Leeuwenhoek. - 2012. - Vol. 101. - P. 369-377.
8. Comasio A., Verce M., Van Kerrebroeck S., De Vuyst L. Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins // Front. Microbiol. -2020. - P.11:1212. DOI:10.3389/fmicb.2020.01212.
9. Holzapfel E.H., Haber P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition // American Journal of Clinical Nutrition. - 2001. - Vol. 73. - № 2. - P. 365-373.
10. Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K.J. Application of molecular identification tools for Lactobacillus, with a focus on discrimination between closely related species // LWT- Food Sci. Technol. - 2009. - Vol. 42. - № 2. - P. 448-57.
11. Huang C-H., Li S-W., Huang L., Watanabe K. Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* // Group. Front. Microbiol. - 2018. - P. 9:1974. DOI:doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974.
12. Kozhakhmetov S., Tynybayeva I., Baikhanova D., Saduakhasova S., Shakhbayeva G., Kushugulova A., Nurgozhin T., Zhumadilov Z. Metagenomic Analysis of Koumiss in Kazakhstan

- // Central Asian Journal of Global Health. - 2014. - Vol. 3. - P. 163. DOI: doi.org/10.5195/cajgh.2014.163.
13. Silva C.C.G., Silva S.P.M., Ribeiro S.C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation // *Frontiers Microbiology*. - 2018. - Vol. 9. - P. 1-15.
14. Tannock G. A special fondness for lactobacilli // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2004. - Vol. 70. - № 6. - P. 3189-3194.
15. Pineiro M., Stanton C. Probiotic bacteria: Legislative framework requirements to evidence basis // *Journal of Nutrition*. - 2007. - Vol. 137. - P. 850-853.
16. Zhu W-M., Liu W., Wu D-Q. Isolation and characterisation of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7 // *Journal of Applied Microbiology*. - 2000. - Vol. 88. - P. 877-886.
17. Metchnikoff E. The prolongation of life: Optimistic studies. - London: William Heinemann, 1907. - 161 p.
18. Faehgheh F., Anousheh S., Naser T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored *Apis mellifera* honey // *Journal of Apicultural Research*. - 2020. - Vol. 60. - № 3. - P. 421-426.
19. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria // *Current Protocols in Molecular Biology*. - 2001. - Vol. 56. - № 1. - P. 241-24. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
20. Lee M.Ch., Sieo Ch. Ch., Wong C.M., Abdullah N., Ho Y.W. Sequence analysis of 16S pPHK gene and 16S-23S pPHK gene intergenic spacer region for differentiation of probiotics *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken // *Annals of Microbiology*. - 2008. - Vol. 58. - № 1. - P. 133-140.
21. Zhang Na Dang, Dongyan Ren, Feiyan Zhao, Ruirui Lv, Teng Ma, Qiuhua Bao, Bilige Menghe, Wenjun Liu. Comparison of Bacterial Microbiota in Raw Mare's Milk and Koumiss Using PacBio Single Molecule Real-Time Sequencing Technology // *Front. Microbiol.* - 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581610>.

И.К. Тыныбаева, К.Г. Ли, З.С. Сармурзина

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Астана, Казахстан

Определение микробного состава кумыса Центрального Казахстана

Аннотация. Кумыс - это кисломолочный продукт из кобыльего молока. Представляет собой традиционный напиток, широко используемый в Средней Азии. Он содержит витамины, биологически активные вещества и различные микроорганизмы, поэтому считается полезным для здоровья. Основными микроорганизмами, ответственными за брожение кумыса, являются молочнокислые бактерии. Некоторые МКБ используются не только как пробиотики, но и как биологические консерванты. В своих исследованиях мы выделили бактерии рода лактобацилл из кумыса. Проводили микроскопирование исследуемых штаммов по Грамму, также определяли видовую принадлежность секвенированием. Таким образом, были идентифицированы виды бактерий рода *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter tropicalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc fallax*, *Staphylococcus hominis* с использованием анализа фрагмента гена 16S рPHK.

Ключевые слова: бактерии, микроскоп, питательная среда, микроорганизмы, молочнокислые бактерии, идентификация, лактобациллы, виды, праймер, инкубация, МКБ.

I.K. Tynybayeva, K.G. Lee, Z.S. Sarmurzina
Republican collection of microorganisms, Astana, Kazakhstan

Analysis of the microbial composition of koumiss in Central Kazakhstan

Abstract. Koumiss is a fermented milk product made from mare's milk. The Koumiss traditional drink is widely used in Central Asia. It contains vitamins, biologically active substances, and various microorganisms. Therefore it is considered beneficial for health. The main microorganisms responsible for the fermentation of kumis are lactic acid bacteria. Some LABs are used not only as probiotics but also as biological preservatives. In our studies, we isolated bacteria of the genus lactobacilli from koumiss. The authors carried out a microscopic examination of the studied strains according to Gram, the species was also determined by sequencing. Thus, the species of bacteria of the genus *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter tropicalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc fallax*, *Staphylococcus hominis* were identified using 16S rRNA.

Keywords: bacteria, microscope, nutrient medium, microorganisms, lactic acid bacteria, identification, lactobacilli, species, primer, incubation, ICD.

References

1. Mulyawati A.I., Jatmiko Y.D., Mustafa I., Ardyati T., Suharjono. Diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented mare's milk products based on PCR-RFLP analysis, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., 012104 (2019).
2. Gesudu Q., Zheng Y., Xi X., Qiangchuan H., Xu H., Weiqiang H., et al. Investigating bacterial population structure and dynamics in traditional koumiss from Inner Mongolia using single molecule real-time sequencing, J. Dairy Sci., 99, 7852-7863 (2016).
3. Sujaya N., Ramona Y., Widarini N.P., Suariani N.P., Dwipayanti N.M.U., Nociantri K.A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Sumbawa mare milk, J., 9(2), 52-59 (2008).
4. Aspen T. Reese, Anne A. Madden, Marie Joossens, Guylaine Lacaze, Robert R. Dunn. Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread, Applied and Environmental Science January, 5(1), 19 (2020). DOI: doi.org/10.1128/mSphere.
5. Misganaw Wassie, Teketay Wassie. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk, International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 3(8), 44-49 (2016).
6. Meng Zhang, Na Dang, Dongyan Ren, Feiyan Zhao, Ruirui Lv, Teng Ma, Qiuhua Bao, Bilige Menghe, Wenjun Liu. Comparison of Bacterial Microbiota in Raw Mare's Milk and Koumiss Using PacBio Single Molecule Real-Time Sequencing Technology, Frontiers in Microbiology, 11, 581610 (2020).
7. Vera A., Ly-chatain M.H., Rigobello V., Demarigny Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focusing on the lactobacilli present in the microbiota, Antonie van Leeuwenhoek, 101, 369-377 (2012).
8. Comasio A., Verce M., Van Kerrebroeck S., De Vuyst L. Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins, Front. Microbiol., 11:1212 (2020). DOI:10.3389/fmicb.2020.01212.
9. Holzapfel E.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, American Journal of Clinical Nutrition, 73(2), 365-373 (2001).
10. Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K.J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species, LWT- Food Sci. Technol., 42(2), 448-57 (2009).
11. Huang C-H., Li S-W., Huang L., Watanabe K. Identification and Classification for the *Lactobacillus casei*, Group. Front. Microbiol., 9:1974 (2018). DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974.

12. Kozhakhmetov S., Tynybayeva I., Baikhanova D., Saduakhasova S., Shakhbayeva G., Kushugulova A., Nurgozhin T., Zhumadilov Z. Metagenomic Analysis of Koumiss in Kazakhstan, *Central Asian Journal of Global Health*, 3, 163 (2014). DOI: doi.org/10.5195/cajgh.2014.163.
13. Silva C.C.G., Silva S.P.M., Ribeiro S.C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation, *Frontiers Microbiology*, 9, 1-15 (2018).
14. Tannock G. A special fondness for lactobacilli, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3189-3194 (2004).
15. Pineiro M., Stanton C. Probiotic bacteria: Legislative framework requirements to evidence basis, *Journal of Nutrition*, 137, 850-853 (2007).
16. Zhu W-M., Liu W., Wu D-Q. Isolation and characterisation of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 877-886 (2000).
17. Metchnikoff E. The prolongation of life: Optimistic studies. (London: William Heinemann, 1907, 161 p.).
18. Faehgheh F., Anousheh S., Naser T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored *Apis mellifera* honey, *Journal of Apicultural Research*, 60(3), 421-426 (2020).
19. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria, *Current Protocols in Molecular Biology*, 56, 241-24 (2001). DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
20. Lee M.Ch., Sieo Ch. Ch., Wong C.M., Abdullah N., Ho Y.W. Sequence analysis of 16S pPHK gene and 16S-23S pPHK gene intergenic spacer region for differentiation of probiotics *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken, *Annals of Microbiology*, 58(1), 133-140 (2008).
21. Zhang Na Dang, Dongyan Ren, Feiyan Zhao, Ruirui Lv, Teng Ma, Qiuhua Bao, Bilige Menghe, Wenjun Liu. Comparison of Bacterial Microbiota in Raw Mare's Milk and Koumiss Using PacBio Single Molecule Real-Time Sequencing Technology, *Front. Microbiol.*, (2020) DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581610>.

Авторлар туралы мәлімет:

Тыныбаева И.К. - биология ғылымдарының кандидаты, а/ш ғылымдарының магистрі, микроорганизмдер республикалық коллекциясының жетекші ғылыми қызметкері, Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Ли К.Г. - биология ғылымдарының кандидаты, микроорганизмдер республикалық коллекциясының жетекші ғылыми қызметкері, Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Сармурзина З.С. - биология ғылымдарының кандидаты, микроорганизмдер республикалық коллекциясының Бас директоры, Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Тыныбаева И.К. - Candidate of Biological Sciences, Master of Agricultural Sciences, Leading Researcher of the Republican collection of microorganisms, 13/1 Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Lee K.G. - Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher of the Republican collection of microorganisms, 13/1 Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Sarmurzina Z.S. - Candidate of Biological Sciences, General Director of the Republican collection of microorganisms, 13/1 Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.