

СҮТ ӨНІМДЕРІ БИОТЕХНОЛОГИЯСЫНДА
ҚОЛДАНЫЛАТЫН
ЛАКТОБАКТЕРИЯЛАРДЫҢ
ФЕРМЕНТАТИВТІК ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Орындаған: Қоңырбекова А. Б.
Ғылыми жетекші: Мұхтаров Ә. Қ.
х.ғ.к., кафедра доценті

Жұмыстың өзектілігі

Сүт өнімдері биотехнологиясы – тағам өнеркәсібінде 3-орын алатын маңызды салалардың бірі. Биотехнологиялық процестер сүт өнімдерінің сапасын арттыруда негізгі рөл атқарады. Бүгінде экономикадағы күрделі жағдайға және халықаралық жағдайдағы өзгерістерге байланысты агроөнеркәсіптік өндіріс салаларында, оның ішінде сүт саласында сапалы өсуді қамтамасыз ететін жаңа тәсілдер қарастырылуда. Сүтті мал шаруашылығы және сүт өнеркәсібі Қазақстан Республикасының агроөнеркәсіптік кешенінің маңызды жүйелерінің бірі болып табылады. Сүт өнеркәсібі тұтас сүт, қышқыл сүт өнімдерін, сары май мен ерітілген май, табиғи, балқытылған, тұздық ірімшіктер, құрғақ қаймағы алынбаған сүт және т.б. дайындау және кешенді қайта өңдеуді жүзеге асыратын кәсіпорындардың жиынтығын қалыптастыратын өнеркәсіп болып табылады. Осы сала мамандарының бағалауы бойынша қазақстандық нарықтың сыйымдылығы бүгінде жылына 40 мың тоннадан асады. Ірі импорттаушылардың үштігі келесідей: Ресей, Украина, Беларусь. Қазақстанда орташа есеппен жан басына шаққанда ірімшікті тұтыну 2,5 килограмды құрайды.

Сүт өнімдері – халық тарапынан әр уақытта сұранысқа ие болатын, денсаулыққа пайдасы мол тағам. Лактобактериялардың ферментативтік қасиеттерін жете меңгерсек, сүттің сапасын, өнімділігін біршама жоғарылата аламыз.

Магистрлік диссертацияның мақсаты: Сүт өнімдері биотехнологиясында қолданылатын лактобактерияларды зерттеу, ферментативтік қасиеттерін анықтау.

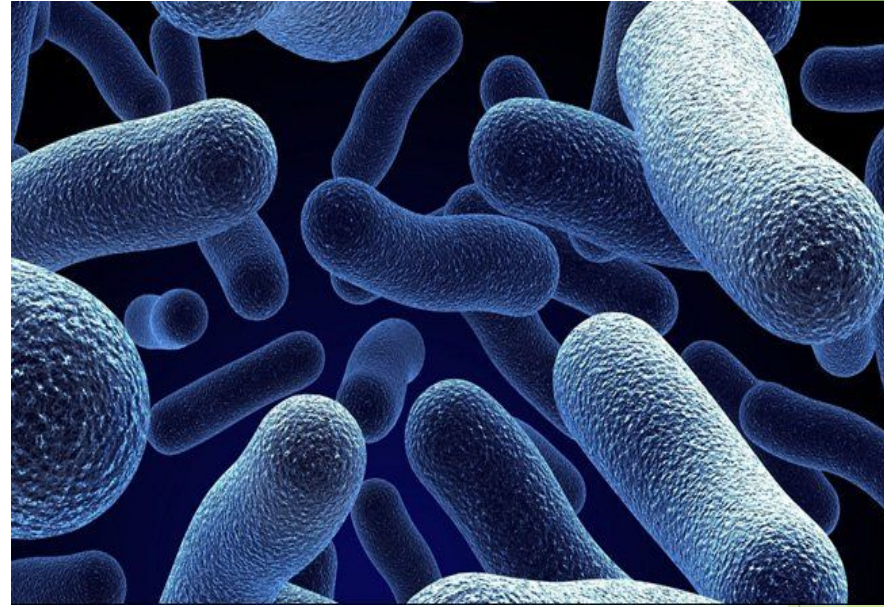
Магистрлік диссертацияның мақсатына жету үшін алға қойылған міндеттер:

- ▶ -лактобактериялар жөнінде материалдар жинақтау;
- ▶ -қолайлы қоректік орта дайындау;
- ▶ -лактобактерия штаммдарын өсіру;
- ▶ -лактобактериялардың морфологиялық ерекшеліктерін зерттеу;
- ▶ -лактобактериялардың биохимиялық ерекшеліктерін анықтау

Lactobacillus тұқымы Firmicutes қатарына, Bacilli классына, Lactobacillales сабына, Lactobacillaceae тұқымдасына жатады.

Сүт қышқылы бактерияларының сипаттамасы:

- грам оң;
- спора түзбейді;
- каталазаға теріс;
- цитохромдары жоқ;
- аэро- және қышқылға толерантты;
- қор көзіне талапшыл;
- соңғы өнім ретінде сүт қышқылын шығарады.



Lactobacillus бактерия тұқымының номенклатурасы мен таксономиясы туралы сұрақтар қазіргі күнге дейін әлі бар. Қазіргі таңда бұл тұқымның 100 түрі бар, ол Lactobacillales сабында ең үлкен топ болып саналады.

Көптеген еңбектерде «лактобацилла» атауының орнына лактобактерия термині қолданылып жүр, бірінші рет Н. А. Красильников «Бактериялар мен актиномицеттер» (1949ж.) еңбегінде қолданған. Бұл топтың бактериялары спора түзбейтін болған соң оларды бацилла емес бактерия деп атау дұрысырақ еді; бірақ Ұлтаралық комитет номенклатура бойынша 1971 жылы Lactobacillus атауын енгізді

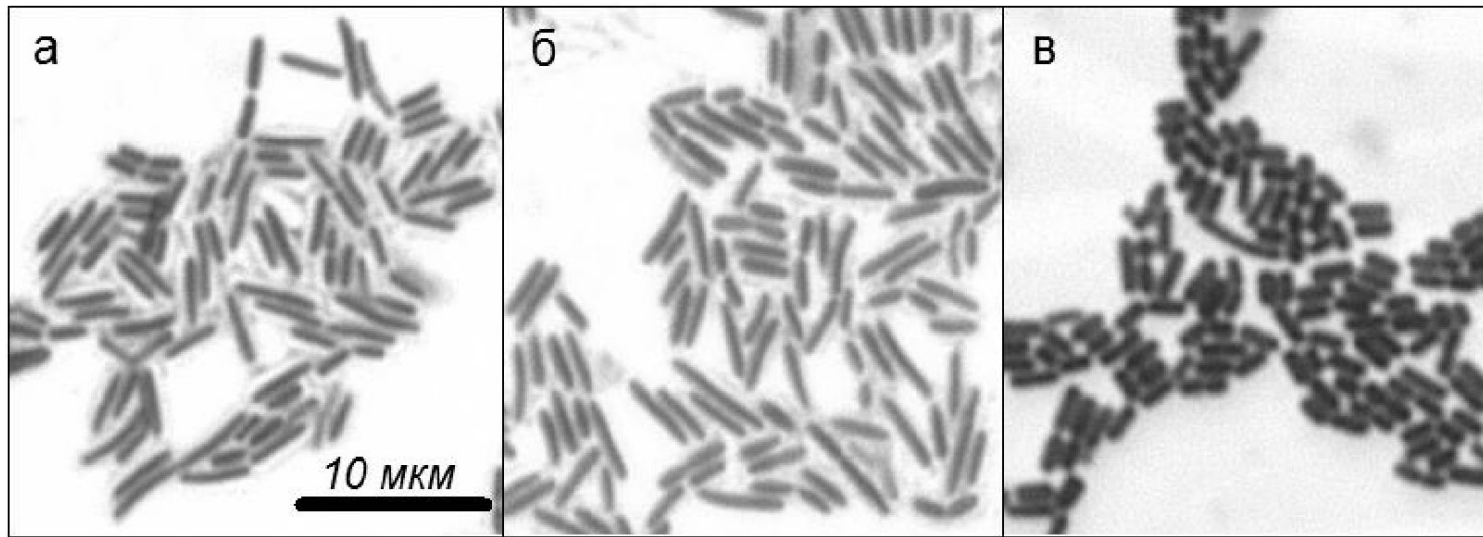
Лактобактериялар таксономиясы

	Тұқым	Тұқым таксономиясы
	Lactobacillus Pediococcus	Домен Bacteria Қатар XIII. Firmicutes Класс I. Bacilli Сап II. Lactobacillales Тұқымдас I. Lactobacillaceae
	Aerococcus	Тұқымдас II. Aerococcaceae
	Carnobacterium	Тұқымдас III. Carnobacteriaceae
	Enterococcus Tetragenococcus Vagococcus	Тұқымдас IV. Enterococcaceae
	Oenococcus Leuconostoc Weissella	Тұқымдас V. Leuconostocaceae
	Lactococcus Streptococcus	Тұқымдас VI. Streptococcaceae

Lactobacillus бактерияларының морфологиясы әр түрлі. Көбінесе ұштары дөңгеленген түзу таяқша түрінде болады. Олар тізбектеліп немесе жалғыз не жұптасып орналасады. Лактобактериялардың қысқа кокка тәріздес немесе қайырылған түрлері де кездеседі, ұзын жіп тәріздес түрлері де болады. Ұзындығы 0,7-1,1-ден 3-8 мкм-ге дейін болады.

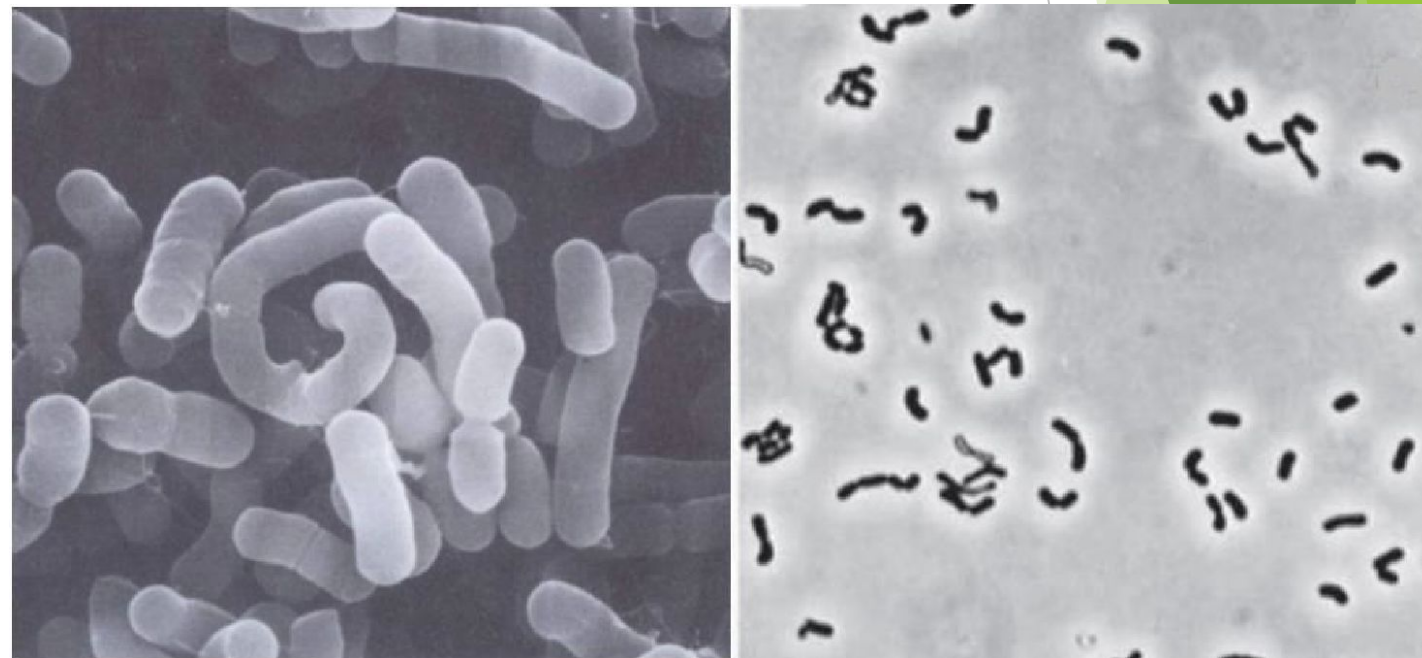
Таяқшалардың ұзындығы мен иілу мөлшері қоректік ортаның құрамына, температура режиміне, аэрацияға, культура жасына байланысты болады. Лактобациллалар эндоспора түзбейді. Грам оң боялады, жасы өскенде және қышқылдылығы көтерілгенде грам теріске айналады. Грам бойынша немесе метиленді көкпен бояғанда кейбір штаммдарда биполярлық денелер, түйірлік немесе цитоплазманың сызылуы көрінеді. Кейбір түрлер құрамында, мысалы, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* және *L. delbrueckii* subsp. *lactis* волютин дәндері (метахроматин, полифосфаттық гранулалар) кездеседі. *L. fermentum*, *L. brevis* түрлерінде морфологиясы әрқашан қысқа және ұзын таяқшалар қосылысы түрінде болады.

L. curvatus, *L. coryniformis* клеткалары қисық груша тәріздес таяқша түрінде болады.



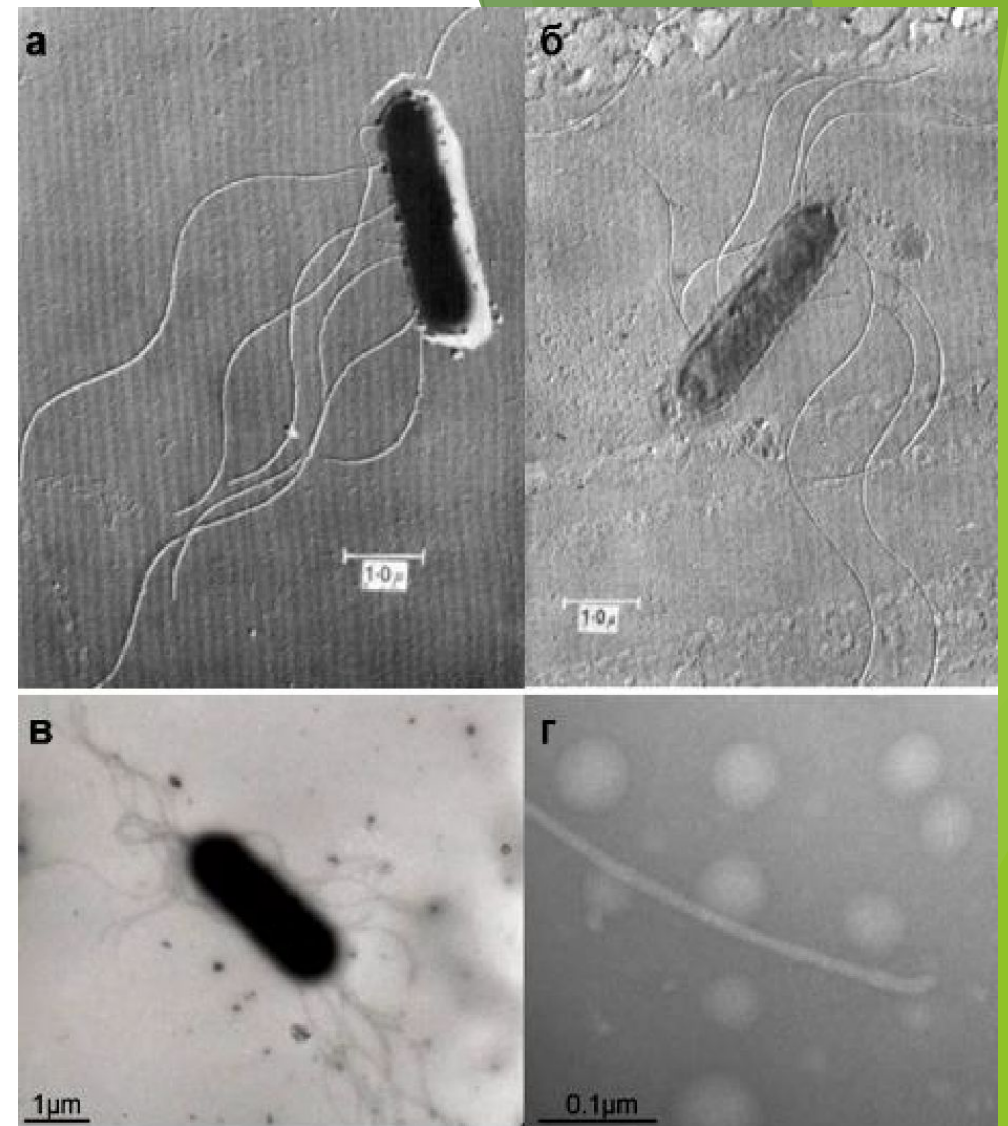
L. acidophilus (а), *L. bulgaricus* 51 (б) және *Lactobacillus* sp. (в),. Грам бойынша боялуы

L. curvatus клеткаларының электрондық (сол жақта) және жарық (оң жақта) микроскопиясы



Көюінесе лактобактериялар қозғалмайды. Қозғалғыштық тек кейбір өкілдеріне тән:

L. agilis, *L. aquaticus*, *L. capillatus*, *L. ghanensis*, *L. mali*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. ruminis*, *L. satsumensis*, *L. sucicola*, *L. uvarum*, *L. vini*



Лактобактериялардың экзополисахаридтері

	Жасушадан тыс гомополисахаридтер	Жасушадан тыс гетерополисахаридтер
Құрылысы	Көбінесе декстран, глюкан, леван	Молекулалық массасы: $4 \cdot 10^4 - 6 \cdot 10^6$
Биосинтез ерекшеліктері	Синтез ортаға сахароза енгізу арқылы индуцирленеді.	Аз мөлшерде нуклеотид-активтеуші ізашарлардан синтезделеді (0,1-1,5 г/л)
Өкілдері	Гетероферментативті: L. pontis, L. frumenti, L. sanfranciscensis, L. reuteri	Гомоферментативті және факультативті-гетероферментативті: L. kefiranofaciens, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. paracasei, L. rhamnosus, L. helveticus, L. sakei
Өмір сүретін жері	Дәнді дақылдар	Сүт өнімдері, ет

Кейде EPS лактобациллалар капсула түрінде болады. Диаметрі 1.5-3 мкм капсула йогурттан бөлініп алынған *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* және айран дәнінен бөлініп алынған *L. kefiranofaciens* бактерияларынан табылған. EPS өндіру қабілеті бар болғандықтан, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* йогурт өндіруде қолданылады, олар йогурт өніміне қажетті текстураны береді.

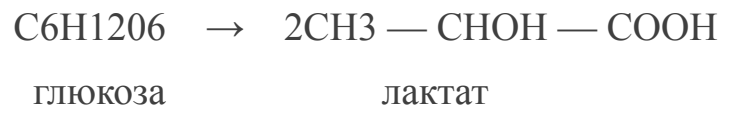
Сүт қышқылды ашу процесі. Сүт қышқыл бактериялары энергияны гексоза, дисахарид және полисахаридтердің ашуы нәтижесінде жинақтайды.

Сүтті ашыту кезінде негізгі өнім ретінде сүт, пропион, лимон, сірке және май қышқылдары түзіледі. Сүт құрамындағы лактоза микроорганизмдер арқылы гидролизденіп глюкоза және галактоза түзіледі. Олар кейін L-, D- немесе LD - қышқылына айналады. Сүт қышқылының концентрациясы жоғарылағанда және рН 4-5 дейін төмендегенде сүзбелік масса түзіліп, сарысу бөлінеді. Сүттің ұюы, сүт қышқылының әсерінен, казеиннен, кальций ионының бөлінуінен болады, ақуыз параказеинге айналып, тұнбаға түседі.

Ашу процесінің сипатына қарай сүт қышқылы бактерияларын мынадай екі топқа бөледі:

- 1) Гомоферментативті;
- 2) Гетероферментативті.

Гомоферментативті сүт қышқылды ашу процесі барысында қант тек қана сүт қышқылына дейін ғана ыдырайды:



Гомоферментативті сүт қышқылды ашуға қатысатын бактериялар: *L. delbrueckii*, *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. plantarium*, *L. casei* /25/.

Гомоферментативті сүт қышқылды ашу Эмбден - Мейергоф - Парнас жолымен жүрсе, гетероферментативті ашу пентозафосфатты жолмен жүретіндігі дәлелденген.

Сүт қышқылды ашу процесінің нәтижесінде екі молекула АҰФ және екі молекула сүт қышқылы пайда болады. Кейбір гомоферментативті сүт қышқыл бактериялар цитраттан хош иісті заттар диацетил, ацетоин түзеді. Бұл процестің басты ферменті – цитратлиаза .

Гетероферментативті сүт қышқылды ашу процесі:



Гетероферментативті сүт қышқылды ашуға қатысатын лактобактериялар: *L. brevis*, *L. fermentum*, *Str. diacetylactis*, *Leuc. cremoris*. Гетероферментативті сүт қышқылды ашу процесінің нәтижесінде сүт қышқылының бір молекуласы, бір молекула АҰФ, бір молекула этанол және бір молекула CO2 түзіледі .

- ▶ Зерттеу объектілері: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-3141, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* B-6543, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-3964, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* B-6515, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-6516 штамдары
- ▶ *Lactobacillus* тұқымдасындағы бактериялардың дақылдарын өсіру үшін модификацияланған МРС қоректік ортасын пайдаланған: құрамында 0,15% агар бар (МРС-2) жартылай сұйық және 2% агар (МРС-4) бар тығыз. МРС қоректік ортаның құрамы, г/л: пептон – 10,0; ашытқы сығындысы – 20,0; глюкоза -20,0; твин-80 – 1,0; дикалия гидрофосфаты – 2,0; натрий ацетаты – 5,0; триаммоний цитраты – 2,0; магний сульфаты – 0,2; марганец сульфаты ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) – 0,05; ет суы – 1 л дейін; рН 6,2-6,4.
- ▶ *Lactobacillus* тұқымдасына бөлінген бактериялардың тиістілігін анықтау 10444.11-89 «Азық-түлік өнімдері. Сүт қышқылды микроорганизмдерді анықтау әдістері» МС (ГОСТ) бойынша жүргізілді. *Lactobacillus* тұқымдасындағы бактерияларға микроаэрофильді, грам оң, таяқша тәрізді, қозғалмайтын, спора құрмайтын, каталазасы жоқ микроорганизмдер жатқызылды.

- ▶ Көмірсулардың ферментациясын анықтау көмірсулар бар дискілерді бромкрезолды күлгін сорпаны пайдалана отырып жүргізілді. Бромкрезолды күлгін сорпа 5 мл-ден балқытпасы бар пробиркаларға құйылып, 1,1 атм кезінде автоклавтаумен 10 минут ішінде стерильдеді.
- ▶ Лиофильді кептірілген штаммдар 1 мл стерильді физиологиялық ерітіндіде ерітілген және 0,1-0,15 мл МРС-2 сұйық ортасына егілген. Инкубацияны 37 °С кезінде екі тәулік өткізді. Содан кейін 10-1-ден 10-8-ге дейін стерильді физиологиялық ерітіндіде ерітіп, МРС-4 тығыз ортасында ыдыстарға егеді, анаэробты жағдайларда 37 °С кезінде 2-3 тәулік бойы инкубацияланды. Лактобацилл үшін типтік оқшауланған колониялар МРС-2 жартылай сұйық ортасына көшіріліп егілді. Екі тәулік инкубациядан кейін барлық пробиркалардан бақылау жағындысын орындалды, содан кейін дақылдарды таңбалы қатарға қою үшін пайдаланды.
- ▶ Таңбалы қатар құрамына 14 субстраттар кірді (сахаров және көпәтомды спирттердің): арабиноза, целлобиоза, галактоза, лактоза, мальтоза, маннит, манноза, мелибиоза, раффиноза, салицин, сахароза, трегалоза, ксилоза, сорбит.
- ▶ Бромкрезолды күлгін сорпа МРС-2 ортасынан 48 сағаттық дақылдың екі тамшысымен жақсылап араластыруға арналған түтікті шайқау арқылы себілді.
- ▶ Сыналатын микроорганизмдерді себуден кейін әрбір түтікке асептикалық түрде көмірсумен бір дискіден орналастырады. Дақылдар 35-37°С температурасында 18-48 сағат ішінде инкубацияланды. Нәтижелер 18 және 48 сағаттан кейін ескерілді. Бромкрезолды күлгін сорпада өсірілген кезде пайда болатын қышқыл ортаны сары түске бояуға ықпал етеді, ал газ балқытуда жиналады.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* штамдарының культуралды-морфологиялық белгілерін зерттеу жүргізілді. 1 мл-де алдын ала ерітілген лиофильді кептірілген штамдарды стерильді физиологиялық ерітіндіде өсіру түрлендірілген МРС қоректік ортасында жүргізілді: құрамында 0,15% агар (МРС-2) бар жартылай сұйық және құрамында 2% агар (МРС-4) бар тығыз. Бактерияларды идентификациялау 10444.11-89 МС (ГОСТ) сәйкес жүргізілді.

Лактобацилл штамдарының культуралды-морфологиялық белгілері

Әр түрлі текті сүт қышқылды термофильді бактериялар штамдарының жасушалық препараттарын кейіннен оларды микроскопиялай отырып дайындау әр түрлі көздерден бөлінген барлық штамдар грам оң таяқшалар, жеке немесе тізбектеп орналасқан болып табылатындығын көрсетеді.

Штам атауы	Штамдардың культуралды-морфологиялық белгілері
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B-3141	MRS агарда ұзын таяқшалар диаметрі 1-2 мм дұрыс емес пішіндегі кремді жартылай мөлдір күңгірт колония құрады
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B-6545	Грамм оң таяқшалар, жеке және тізбектерде орналасқан. MRS агарда тегіс колониялар құрады
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B-3964	Грамм оң қозғалмайтын таяқшалар, бір-бірден және тізбектеп орналасады. Диаметрі 2-3 мм болатын күңгірт колониялар құрады
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B-6515	Грамм оң таяқшалар. Диаметрі 1-2 мм дұрыс емес нысанды тегіс колониялар құрады
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B-6516	Грамм оң таяқшалар. Тегіс колония құрады

Лактобактерия штаммдардың ферментативтік қасиеттері

Түрі	Штамм номеры	Галактоза	Маннит	Целлоза	Лактоза	Мелибиоза	Салицин	Раффиноза	Манноза	Мальтоза	Сукроза	Сорбит	Трегалоза	Ксилоза	Арабиноза	Эскерулин
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	B-3141	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	B-6545	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	B-3964	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	B-6515	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	B-6516	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Лактобациллдердің раффинозды пайдаға асыру қабілеті зерттелді. Бұл көміртегі фосфоолигосахаридтер (ФОС) тобына жатады, пробиотикалық препараттардың құрамында пребиотикалық компонент ретінде қолданылады. Бұл олигосахариді кәдеге жарату қабілеті ерекше гликозилгидролаздың болуына немесе болмауына байланысты. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* түріндегі бактериялар штаммдарында раффинозды кәдеге жарату байқалмады. Кестеден лактобактерияның зерттелетін штаммдарының барлығы лактозаны жақсы ашытатынын көруге болады. *Lactobacillus bulgaricus* бір штамм сахарозаны ферменттейді, екі штамм мальтозаны ферменттейді, қалған екі штамм – маннозаны ферменттейді. Осылайша, өзінің қасиеттері бойынша зерттелетін штаммдар біркелкі емес. Әдеби деректерден сүт қышқылды бактериялар үшін ең маңызды энергия көзі моно және дисахаридтер: глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза болып табылатыны белгілі. Глюкозаның ыдырауының негізгі соңғы өнімі D (-) – сүт қышқылы (2%-ға дейін).

5 кестеден *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* түріндегі гомоферментативті лактобациллалар пентоздарды ашыта алмайтыны көрінеді, өйткені ферментация гликолитикалық жолмен жүреді.

Болгар таяқшасының штаммдарын ферментациялау бойынша алынған нәтижелерді талдай отырып, қоректік ортаның таңдалған құрамы белсенді қышқылдықтың өзгеруі есебінен өсіру процесінде осы дақылдардың сахаролитикалық қасиеттерінің өзгеруін туындатады деген қорытынды жасауға болады. Алайда, өсіру кезінде белсенді қышқылдықтың өзгеруі жылдамырақ жүреді, яғни орта көп жағдайда зерттелетін дақылдардың дамуын қамтамасыз етеді. Сондай-ақ, рН белгілі бір мәніне жеткен кезде жекелеген штаммдардың ферменттеу жылдамдығы айтарлықтай азаяды, бұл ортада нутриенттердің жеткіліксіздігінен, сондай-ақ метаболизм өнімдерімен, атап айтқанда сүт қышқылының артық болуынан туындауы мүмкін дақылдардың дамуының тежелуін куәландырады.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* штаммдарының морфологиялық және сахаролитикалық қасиеттері зерттелді. Фазалық-контрасты микроскоп арқылы бөлінген штаммдардың морфологиясын зерттеу дақыл жұпқа жиналған немесе бір-бірден орналасқан және грамоң таяқшалармен ұсынылатынын көрсетті. Болгар таяқшасы штаммдарының сахаролитикалық қасиеттерін зерттеуде бактериялар толық мөлшерде лактозаны ферменттейді, ал штаммдардың кейбірі сахарозаны, мальтозаны, маннозды сіңіре алады. Қорыта айтқанда, көмірсулар мен спирттерді ашыту сүт қышқылды таяқшалардың маңызды диагностикалық белгісі болып табылады.

ҚОРЫТЫНДЫ

1. Лактобактериялардың таксономиясы, түрлері туралы материалдар жан-жақты зерттеліп жинақталды.
2. *Lactobacillus bulgaricus* штаммдары өсірілді, сүт қышқылды бактерияларды өсіру үшін селективті қоректік ортаның оңтайлы сапалық және сандық құрамы іріктелді.
3. *Lactobacillus bulgaricus* тұқымдасындағы бактериялар штаммдарының морфологиялық қасиеттері зерттелді. Бактерияларды идентификациялау 10444.11-89 МС (ГОСТ) сәйкес жүргізілді.
4. *Lactobacillus bulgaricus* штаммдарының сахаролитикалық қасиеттері зерттелді, бактериялар толық мөлшерде лактозаны ферменттейді, ал штаммдардың кейбірі сахарозаны, мальтозаны, маннозды сіңіре алады.
5. Жұмыс нәтижесінде кәдеге жаратылатын субстраттардың спектрі зерттелді: көмірсулар, оның ішінде раффиноз олигосахаридтер, оның метаболизмі жаңадан бөлінген штаммдармен бұрын зерттелмеген, көпатомды спирттер (сорбит, маннит) және глюкозидтер (салицин, эскулин).