



ISSN 2304-585X
ИНДЕКС 76057

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY AND VIROLOGY



Tom/
Volume

№

Year

41 | 2 | 2023

**«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы»
Жауапкершілігі шектеулі серіктестігі**

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

Товарищество с ограниченной ответственностью
«Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

№ 2(41)

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТЫ
2023

Научно-практический журнал

Журнал зарегистрирован в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан. Свидетельство о регистрации №12821-Ж от 12.06.2012 г.

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ

© ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

Редакционная коллегия

Саданов А.К. – доктор биологических наук, профессор, академик (главный редактор)

Баймаханова Б.Б. – кандидат биологических наук

Айткельдиева С.А. – доктор биологических наук

Балгимбаева А.С. – кандидат биологических наук (ответственный редактор)

Dr. Azliati Azizan (USA) – PhD

Березин В.Э. – доктор биологических наук, профессор, член - корреспондент НАН РК

Богоявленский А.П. – доктор биологических наук, профессор

Гаврилова Н.Н. – доктор биологических наук, профессор

Головлева Л.А. (Россия) – доктор биологических наук, профессор

Кыдырманов А.И. – доктор ветеринарных наук

Магай Е.Б. (Узбекистан) – кандидат биологических наук

Мурадов П.З. (Азербайджан) – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана

Науанова А.П. – доктор биологических наук, профессор

Ратникова И.А. – доктор биологических наук, доцент

Савицкая И.С. – доктор биологических наук, профессор

Dr. Sasan Fereidouni (Germany) – DVM, PhD

Кузметов А.Р. (Узбекистан) – доктор биологических наук, профессор

Саубенова М.Г. – доктор биологических наук, профессор

Смирнова И.Э. – доктор биологических наук

АДРЕС РЕДАКЦИИ 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105, тел.+7(727) 291-84-97, 291-97-36

Сайт: <http://imv-journal.kz>

Подписной индекс - 76057

ПЕЧАТЬ

ТОО «Print Market.kz»

Адрес: г. Алматы, ул. Казыбек би, 125

Тел.: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68

Территория распространения – Республика Казахстан

Периодичность – 4 номера в год

Тираж 500 экземпляров

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

А.Ж. Алыбаева, А.А. Айтжанова, А.Ж. Жаксылык, Э.Т. Хамедова, Ш.Ы. Кененбай
 Микробиологические способы повышения сохранности и безопасности мяса и мясных продуктов.....6

Г.К. Бейсембекова, Ш. Канаят, М.Х. Нармуратова
 Жирнокислотный состав и свойства масла верблюжьего молока.....33

А.Н. Манакбаева, П.Г. Алексюк
 Бактериофаги: век спустя, снова в центре внимания.....40

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А.У. Исабек, А.К. Бопи, Р.А. Ахмет, К.Т. Султанкулова, А.К. Наханов, О.В. Червякова
 Метод повышения эффективности получения рекомбинантных вирусов нодулярного дерматита для разработки векторных вакцин.....65

Д.Д. Бокенов, Е.А. Олейникова, Ж.Н. Еремекбай, Д.Е. Абдильманов, М.Г. Саубенова
 Выделение и отбор целлюлолитических бактерий и антагонистов микромицетов-засорителей из целлюлозосодержащих субстратов.....81

М.А. Абдулжанова, А.С. Кистаубаева, Л.В. Игнатова, С.Д. Жантлессова, А.А. Кабыкенова, Собхи-эль-Сохайми
 Получение йогурта на основе сухого кобыльего молока, обогащенного пробиотическими микрокапсулами.....96

И.Э. Смирнова, А.К. Саданов, Ш.А. Бабаева, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова
 Штамм клубеньковых бактерий для создания биоудобрения для культуры сои (*Glycine max* (L.) Merr.).....117

А.В. Чижасва, М.Б. Алимжанова, К. Ашимулы, А.К. Саданов, А.Ж. Алыбаева, Ж.Н. Еремекбай, А.А. Амангелді, М.Е. Елубаева
 Спектр летучих соединений пробиотического консорциума для рыб в аквакультуре.....132

Х.Ж. Абдреш, Э.К. Асембаева, А.Е. Рябова, К.А. Мырзабек, З.Ж. Сейдахметова
 Исследование показателей качества продуктов смешанного брожения.....152

А.Н. Жұмабай, А.Д. Серикбаева, К.А. Мырзабек, М.М. Мусульманова
 Микробиологический анализ сырого верблюжьего молока, сухого верблюжьего молока и шубата фермерского хозяйства Алматинской области.....161

| | |
|---|-----|
| Г.Т. Джакибаева, А.К. Саданов, Э.Т. Исмаилова, Б.Б. Баймаханова, А.Е. Молжигитова, Г.Б. Баймаханова, О.Н. Шемшура, М.Б. Алимжанова, Д.А. Тлеубекова, А.Е. Елубаева Оценка ингибирующей активности коллекционных культур дрожжей против возбудителя бактериального ожога <i>Erwinia amylovora</i> | 173 |
| З.А. Латыпова, Б.Ж. Исакулова, З.К. Буйенбаева, А.Б. Есеналиева, Р.А. Керимбаева, Ж.С. Турсынова, О.Н. Нурлыбаев Диагностика пастереллеза крупного рогатого скота серологическим методом..... | 183 |
| Л.Б. Умиралиева, А.Б. Абуова, Р.Х. Кандроков, М.С. Исабекова, М. Халмухамедова Технология производства хлебобулочных изделий из муки тритикале с использованием закваски на основе молочнокислых бактерий..... | 192 |
| А.С. Латиф, А.А. Сапарбекова, З.Р. Ахмедова, Г. Калдыбекова, Г.О. Кантуреева Исследование микробной адгезии к растворителям и устойчивости аборигенных штаммов <i>Saccharomyces cerevisiae</i> к разным значениям рН..... | 208 |
| Ж.З. Умиралиева, А.А. Джаймурзина Чувствительность возбудителя бактериального ожога бактерий <i>Erwinia amylovora</i> к антибиотикам..... | 220 |

МАЗМҰНЫ

CONTENTS

ШОЛЫМА МАҚАЛАЛАР

А.Ж. Алыбаева, А.А. Айтжанова, А.Ж. Жақсылық,
Э.Т. Хамедова, Ш.Ы. Кененбай
Ет және ет өнімдерінің қауіпсіздігі мен сақтау мерзімін
ұзартудың микробиологиялық әдістері.....16

Г.Қ. Бейсембекова, Ш. Қанаят, М.Х. Нармуратова
Түйе сүті майының май қышқылдық құрамы мен
қасиеттері.....26

А.Н. Манакбаева, П.Г. Алексюк
Бактериофагтар: бір ғасырдан кейін олар қайтадан
назарда.....52

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

А.У. Исабек, А.Қ. Бопи, Р.А. Ахмет, К.Т. Султанкулова,
А.К. Наханов, О.В. Червякова
Векторлық вакциналарды әзірлеу үшін рекомбинантты
нодулярлы дерматит вирустарын алудың тиімділігін
арттыру әдісі.....73

Д.Д. Бокенов, Е.А. Олейникова, Ж.Н. Ермекбай,
Д.Е. Абдильманов, М.Г. Саубенова
Құрамында целлюлоза бар субстраттардан ластаушы
микробиоттерге қарсы целлюлолитикалық
бактериялар мен антагонистерді окшаулау және
таңдау.....88

М.А. Абдулжанова, А.С. Кистаубаева, Л.В. Игнатова,
С.Д. Жантлесова, А.А. Кабыкенова,
Собхи-эль-Сохайми
Пробиотикалық микрокапсулалармен байытылған
құрғақ бие сүті негізіндегі йогурт алу.....106

И.Э. Смирнова, А.К. Саданов, Ш.А. Бабаева,
Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова
Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) дақылдары үшін
биотыңайтқыш құруға арналған түйнек бактериялар
штаммы.....124

А.В. Чижаева, М.Б. Алимжанова, Қ. Ашимұлы,
А.К. Саданов, А.Ж. Алыбаева, Ж.Н. Ермекбай,
А.А. Амангелді, М.Е. Елубаева
Аквакультурадағы балықтарға арналған
пробиотикалық консорциумның ұшқыш
косылыстарының спектрі.....138

Х.Ж. Абдреш, Э.К. Асембаева, А.Е. Рябова,
К.А. Мырзабек, З.Ж. Сейдахметова
Аралас ашыту өнімдерінің сапа көрсеткіштерін
зерттеу.....144

А.Н. Жұмабай, А.Д. Серикбаева, К.А. Мырзабек,
М.М. Мусульманова
Алматы облысындағы шаруашылықтың шикі түйе сүті,
құрғақ түйе сүті және шұбат үшін микробиологиялық
талдау.....167

REVIEW RESEARCH PAPERS

A.Zh. Alybayeva, A.A. Aitzhanova, A.Zh. Zhaksylyk,
E.T. Khamedova, Sh. Y. Kenenbay
Microbiological methods of improving the safety and security of
meat and meat products.....17

G.K. Beisembekova, Sh. Kanayat, M.Kh. Narmuratova
Fatty acid composition and properties of camel milk
oil.....33

A.N. Manakbayeva, P.G. Alexyuk
Bacteriophages: a century later, back in the spotlight.....53

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

A.U. Issabek, A.K. Bopi, R.A. Akhmet, K.T. Sultankulova,
A.K. Nakhanov, O.V. Chervyakova
Method of increasing the efficiency of obtaining recombinant
nodular dermatitis viruses for the development of vector
vaccines.....73

D.D. Bokenov, Ye.A. Oleinikova, Zh.N. Yermekbay,
D.E. Abdilmanov, M.G. Saubanova
Isolation and selection of cellulolytic bacteria and antagonists of
spoiling micromycetes from cellulose-containing
substrates.....89

M.A. Abdulzhanova, A.S. Kistaubayeva, L.V. Ignatova,
S.D. Zhantlesova, A.A. Kabykenova, Sobhy el-Sohaimy
Obtaining yogurt based on mare's milk powder enriched with
probiotic microcapsules.....107

I.E. Smirnova, A.K. Sadanov, Sh.A. Babaeva, E.R. Fayzulina,
L.G. Tatarkina, G.A. Spankulov
Rhizobia strain for creating biofertilizer for soybean (*Glycine
max* (L.) Merr.).....125

A.V. Chizhaeva, M.B. Alimzhanova, K. Ashimuly,
A.K. Sadanov, A.Zh. Alybayeva, Zh.N. Ermekbay,
A.A. Amangeldi, M.Y. Yelubayeva
Spectrum of volatile compounds of the probiotic consortium for
fish in aquaculture.....138

Kh. Zh. Abdresh, E.K. Assembayeva, A.E. Ryabova
K.A. Myrzabek, Z.Zh. Seidakhmetova
Investigation of quality indicators of mixed fermentation
products.....152

A.N. Zhumabay, A.D. Serikbayeva, K.A. Myrzabek,
M.M. Musulmanova
Microbiological analysis of raw camel milk, dry camel milk and
shubat from a farm in Almaty region.....167

| | |
|--|---|
| Г.Т. Жәкібаева, А.К. Саданов, Э.Т. Исмаилова, Б.Б. Баймаханова, А.Е. Молжігітова, Г.Б. Баймаханова, О.Н. Шемшура, М.Б. Алимжанова, Д.А. Тілеубекова, А.Е. Елубаева <i>Erwinia amylovora</i> бактериялық күйік қоздырғышына қарсы ашытқы коллекциялық дақылдарының ингибиторлық белсенділігін бағалау.....178 | G.T. Dzhakibayeva, A.K. Sadanov, E.T. Ismailova, B.B. Baymakhanova, A.E. Molzhigitova, G.B. Baymakhanova, O.N. Shemshura, M.B. Alimzhanova, D.A. Tleubekova, A.E. Yelubaeva Evaluation of the inhibitory activity of collection yeast cultures against the causative agent of bacterial burn <i>Erwinia</i> <i>amylovora</i>178 |
| З.А. Латыпова, Б.Ж. Исакулова, З.К. Буйенбаева, А.Б. Есеналиева, Р.А. Керимбаева, Ж.С. турсынова, О.Н. Нурлыбаев Ірі қара малдың пастереллезін серологиялық әдіс бойынша балау.....187 | Z.A. Latypova, B.Zh. Issakulova, Z.K. Buienbayeva, A.B. Yessenaliyeva, R.A. Kerimbayeva, J.S. Tursynova, H.E. Nurlybaev Diagnosis of pateurellosis in cattle by serological method.....187 |
| Л.Б. Умиралиева, А.Б. Абуова, Р.Х. Кандроков, М.С. Исабекова, М. Халмухамедова Сүт қышқылды бактерияларына негізделген ашытқыны қолдана отырып тритикале ұнынан жасалған нан өнімдерін өндірутехнологиясы.....200 | L.B. Umiraliyeva, A.B. Abuova, R.H. Kandrovokov, M.S. Isabekova, M. Halmuhamedova Technology of production of bakery products made of triticale flour using a starter culture based on lactic acid bacteria.....200 |
| А.С. Латиф, А.А. Сапарбекова, З.Р. Ахмедова, Г. Калдыбекова, Г.О. Кантуреева <i>Saccharomyces cerevisiae</i> аборигенді штамдардың әртүрлі рН мәндеріне төзімділігін және еріткіштерге деген микробты адгезиясын зерттеу.....214 | A.S. Latif, A.A. Saparbekova, Z.R. Akhmedova, G. Kaldybekova, G.O. Kantureeva Study of microbial adhesion to solvents and resistance of aboriginal strains <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to different pH values.....214 |
| Ж.З. Умиралиева, А.А. Джаймурзина Бактериялық күйік ауруының қоздырғышы <i>Erwinia</i> <i>amylovora</i> бактерияларының антибиотиктерге сезімталдығы224 | Zh.Z. Umiraliyeva, A.A. Jaimurzina Sensitivity of the fire blight pathogen <i>Erwinia amylovora</i> to antibiotics.....225 |

=====

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

=====

МРНТИ: 65.09.05

А.Ж. АЛЫБАЕВА^{1*}, А.А. АЙТЖАНОВА¹, А.Ж. ЖАКСЫЛЫК¹, Э.Т. ХАМЕДОВА¹,
Ш.Ы. КЕНЕНБАЙ²

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Алматинский технологический университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ СОХРАННОСТИ И
БЕЗОПАСНОСТИ МЯСА И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ****doi:10.53729/MV-AS.2023.02.01****Аннотация**

Потребительская тенденция к полезным мясным изделиям с минимальной обработкой оказала огромное давление на переработчиков, требуя сертификации безопасности мяса и мясных продуктов без ущерба для качества продукта и удовлетворения потребительского спроса. Это вызвало трудности при создании и внедрении новых технологических достижений, поскольку использование более современных инноваций может повлиять на решения потребителей и их оценку качества мяса и мясопродуктов. Новые технологии приготовления в мясной промышленности требуют микробиологического одобрения, прежде чем быть названными промышленно подходящими альтернативами и санкционировать инфраструктурные изменения. Порча продуктов питания патогенными микроорганизмами вызывает различные болезни пищевого происхождения, которые могут даже приводить к смерти, что влечет за собой экономические потери. В данной статье приведены данные литературы о воздействии микроорганизмов на свойства мяса, а также способы микробиологического контроля качества и биобезопасности мяса и мясных продуктов.

Ключевые слова: микробиологическая порча, мясо и мясные продукты, молочнокислые бактерии, патогенные микроорганизмы.

Безопасность продуктов питания – это мировая проблема, приоритетное направление, как научных исследований, так и практической деятельности в пищевой промышленности. Системы безопасности продуктов питания значительно лучше действуют в развитых странах и хуже – в развивающихся. Этим объясняется большое число кризисных ситуаций с продуктами питания в этих регионах, особенно в азиатских странах.

Мясо продолжает играть важную роль в рационе человека, являясь хорошим источником высококачественного белка, а также полезных жирных кислот и множества микроэлементов для оптимального поддержания здоровья [1]. Мясо содержит белок высокой биологической ценности со всеми незаменимыми аминокислотами, необходимыми взрослым и детям. В мясе содержится в среднем 20-24 г белка на 100 г (в сыром виде) что делает его одним из основных источников белка [2]. Также мясо содержит широкий спектр биодоступных микроэлементов, например железо, которые необходимы для общего состояния здоровья и хорошего самочувствия [3,4].

Порча пищевых продуктов возникает в результате микробиологических, химических или физических изменений, которые делают пищевой продукт неприемлемым для потребителя. Микробиологическая порча пищевых продуктов вызвана ростом микроорганизмов, которые вырабатывают ферменты, приводящие к образованию нежелательных побочных продуктов в пище. Мясо является одним из наиболее

скоропортящихся пищевых продуктов, который широко ассоциируется с болезнями пищевого происхождения, поскольку обширные вспышки связаны с потреблением зараженного мяса [5].

Продукты животного происхождения должны контролироваться, чтобы гарантировать, что люди могут получать мясо, пригодное для потребления. Мясо может представлять биологическую, физическую и химическую опасность, которая может возникнуть на любом этапе процесса поставки – от забоя до подачи на стол. Патогенные микроорганизмы обычно обнаруживаются в пищеварительном тракте здорового крупного рогатого скота. Эти микроорганизмы также могут быть обнаружены на шкурах живых животных, загрязненных фекалиями, которые затем могут быть перенесены на поверхность ранее стерильного мяса во время забоя, особенно когда он проводится на полу при отсутствии системы подвешивания туш при небрежном потрошении, при котором содержимое кишечника распределяется по поверхности мяса. Туши крупного рогатого скота могут быть загрязнены в процессе убоя при контакте с кожей и волосами животного, конечностями, кровью, содержимым желудка, кишечника, желчью и другими выделениями, помещениями, оборудованием, а также руками и одеждой работника [6]. По этим причинам необходимо уделять особое внимание соблюдению гигиены и санитарии в процессе забоя скота [7].

Обеспечение качественным продуктом и увеличение сроков хранения продуктов питания является одним из важных и основных направлений пищевой промышленности. Использование различных синтетических красителей, ароматизаторов, консервантов для продления сроков хранения мяса и мясных продуктов приводит к угрозе здоровью потребителей. Даже с применением современных методов консервации порча остается нерешенной проблемой [8].

Пища, которая по своей природе является сырой, остается защищенной от нападения микроорганизмов благодаря специфическим структурам, таким как кожица, скорлупа, отруби и т. д., которые не поддаются разложению. Мясные и рыбные продукты более подвержены порче в сыром виде из-за подходящих условий для микробной порчи. Загрязнение поверхности обычно происходит на более ранней стадии переработки сырого мяса и рыбы. Когда защитный слой или упаковка удаляются, пищевые продукты, как правило, становятся более уязвимыми к порче, что также ускоряет распространение микроорганизмов, как только начинается этап обработки [9].

Порча сырого мяса в основном связана с нежелательным развитием микробов в мясе во время хранения. Тип бактерий и их количество зависят от исходного загрязнения мяса и от конкретных условий хранения, которые могут влиять на развитие различных микробных популяций, связанных с порчей, таким образом воздействуя на тип и скорость процесса порчи [10].

При нарушении режимов и сроков холодильного хранения мяса в результате размножения микроорганизмов может изменяться его качество, что приводит к порче продукта. Различают несколько видов порчи охлажденного, мороженого и размороженного мяса: ослизнение, гниение, кислое (кислотное) брожение, пигментация (появление пигментных пятен), свечение и плесневение.

Основные возбудители ослизнения — аэробные психрофильные грамотрицательные бактерии, чаще всего из рода *Pseudomonas*, а также аэробные дрожжи. В случае хранения мяса при температуре -5°C размножаются микрококки, стрептококки, актиномицеты, некоторые гнилостные бактерии и другие мезофильные микроорганизмы, имеющие наиболее низкую минимальную температуру роста. Гниение мяса вызывают различные аэробные и факультативно-анаэробные неспорообразующие бактерии, а также спорообразующие аэробные и анаэробные бактерии, чаще всего рода *Pseudomonas*. При повышенных температурах хранения гниение мяса вызывают мезофильные гнилостные микроорганизмы: неспорообразующие бактерии *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*; другие аэробные бациллы;

анаэробные клостридии *Clostridium sporogenes*, *Clostridium putrificus* и *Clostridium perfringens*. Возбудителями кислого брожения мяса являются психрофильные лактобациллы, микобактерии и дрожжи, которые способны развиваться в глубине мышечной ткани, где создается низкая концентрация кислорода. Возбудители пигментации — *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* и другие аэробные бактерии, различные сарцины, пигментные дрожжи, чаще всего рода *Torula*. Возбудителями плесневения мороженого мяса чаще всего являются плесени родов *Thamnidium*, *Rhizopus* и *Cladosporium*, которые имеют наиболее низкую минимальную температуру роста [11]. Микроорганизмы порчи мяса растут при определенных условиях (таблица 1).

Таблица 1 – Значения температуры, определяющие возможность роста типичных для мясопродуктов микроорганизмов и последствия, вызываемые их развитием

| Микроорганизмы | Температура, °С | Последствия | Характеристика |
|------------------------|-----------------|--------------------|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>Cl.Perfringens</i> | ≥15 | Порча и отравление | Крупные (0,8-1,5 × 4-8 мкм) полиморфные, палочковидные грамположительные. Споры овальные, неподвижные, в организме человека образуют капсулу |
| <i>Bacillus cereus</i> | ≥12 | Порча и отравление | Факультативный анаэроб, способен к нитратредукции, образует плоские, мелкобугристые, слегка вогнутые, матовые колонии. Край волнистый. Клетки крупные 1 × 3-4 мкм, эндоспоры расположены центрально, не превышают размер клетки. Жгутики расположены перитрихально. Грамположительные, спорообразующие |
| <i>Staph.aureus</i> | ≥7 | Порча и отравление | Шаровидные, грамположительные, крупные 1 × 3-4 мкм |
| <i>Escherichia</i> | ≥ 7 | Порча и отравление | Грамотрицательные палочки размером 0,4–0,6х2-6 мкм, подвижные за счет перитрихально расположенных жгутиков, образуют колонии в R- и S-формах. |
| <i>Salmonella</i> | ≥5 | Порча и отравление | Подвижные (благодаря жгутикам – перитрихи), аспорогенные грамотрицательные прямые палочки (0,5-1х1-3 мкм) с закругленными концами |
| <i>Lactobacillus</i> | ≥0 | Порча | Грамположительные анаэробы неспорообразующие, имеют правильную форму длинной «палочки», иногда кокковидные, располагаются в коротких цепочках или по одиночке. |
| <i>Pseudomonas</i> | ≥ -5 | Порча | Грамотрицательные бактерии. Размеры клеток 0,5-1х1,5-4 мкм |
| Дрожжи | ≤ -5 | Порча | Размеры от 2,5 до 10 микрометров в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Форма клеток удлиненная, овальная, эллипсоидная, лимонообразная или шаровидная |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|-----------|--------------------|--|
| Плесневые грибы | ≤ -5 | Порча и отравление | Образуют бархатистые, порошкообразные, войлочные, паутинообразные, моховидные налеты зеленого, белого, черного, желтого и других цветов различных оттенков. Гифы могут быть короткими или длинными. Толщина их колеблется от 1 до 15 мкм, длина — от 2065 до 50 мкм и более. |

Потери, связанные с микробиологической порчей мяса, представляют серьезную экономическую проблему в мировом масштабе. На сегодняшний день в мясной промышленности микробная порча мяса при хранении наносит отрасли значительные финансовые потери. По оценкам Продовольственной и сельскохозяйственной организации (FAO) ежегодно в мире пропадает треть всех произведенных продуктов питания — около 1,3 млрд тонн. Общие объемы утраченной продукции для развитых и развивающихся стран сопоставимы, однако в развитых государствах преобладают потери мясной продукции, достигающие 67 % мировых потерь мясоперерабатывающих производств [12-14].

Мясо и мясные продукты обеспечивают превосходную среду для роста разнообразной микрофлоры (бактерий, дрожжей и плесени), некоторые из которых являются патогенными [15]. Доминирующими микроорганизмами порчи являются грамотрицательные аэробные палочки (*Escherichia coli*, род *Pseudomonas*), кокковые бактерии (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*), факультативные анаэробы (*Aeromonas hydrophila*), *Salmonella spp.* [16]. Качественный состав микроорганизмов и их начальная концентрация не являются величинами постоянными, а зависят от самых разных факторов, в том числе, от вида и начальной концентрации микроорганизмов, характера взаимодействия популяций, температурного и временного факторов хранения сырья, наличия условий, способствующих микробной контаминации [17].

Рост патогенов пищевого происхождения, таких как *Salmonella* и токсин-продуцирующих штаммов *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* и *Staphylococcus aureus* вызывают наибольшее беспокойство при производстве продуктов из мяса и птицы [18-20]. Эти бактерии являются наиболее распространенной причиной болезни пищевого происхождения. *L. monocytogenes* является возбудителем листериоза у человека и животных. В настоящее время данное заболевание считается одним из наиболее значимых пищевых инфекций в мире. Основными факторами передачи листериоза являются молоко и молочные продукты, мясо животных и птиц, овощи и морепродукты [21]. [Наиболее значимым грамположительным микроорганизмом, который привлек внимание из-за связанных с ним внутрибольничных и внебольничных инфекций, является *S. aureus* [22-24]. Помимо мяса птицы, *S. aureus*, а также устойчивый к метициллину *S. aureus*, обнаруживается в мясе свиней [25] и крупного рогатого скота [26]. Эта бактерия быстро размножается при комнатной температуре с образованием токсинов, вызывающих пищевое отравление [27].

В области общественного здравоохранения и экономики, как в развитых, так и в развивающихся странах *Salmonella spp.* продолжают вызывать серьезные проблемы. *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium* являются наиболее часто регистрируемыми серотипами, вызывающими сальмонеллез человека как в ЕС, так и в США [28-32]. Это подчеркивает необходимость улучшения профилактики и контроля *Salmonella spp.* в пищевых продуктах. Сальмонеллы — грамотрицательные организмы семейства *Enterobacteriaceae*, которые могут быть неотличимы от *E. coli* под микроскопом или при культивировании на обычных неселективных питательных средах [33]. Несмотря на значительные изменения, которые были внесены с течением времени в систематику и

номенклатуру рода *Salmonella*, в настоящее время хорошо установлено, что род состоит только из двух геномных видов, т.е. *Salmonella enterica* и *Salmonella bongori*. Штаммы *S. enterica* ответственны за 99% сальмонеллезных инфекций у людей и теплокровных животных и обычно передаются при употреблении зараженной пищи или воды; с другой стороны, штаммы других пяти подвидов, а также вида *S. bongori* обычно выделяются из патогенов пищевого происхождения, относящихся к безопасности мяса. *S. enterica* из-за его высокой ассоциации с пищевыми животными, такими как домашняя птица, крупный рогатый скот и свиньи, патоген обычно связывают с сырым мясом этих и других сельскохозяйственных животных [34].

Стафилококковое заражение представляет собой наиболее экономически значимое заболевание пищевого происхождения [35]. Оно вызывает желудочно-кишечные заболевания из-за широкого спектра токсинов [36], включая стафилококковые энтеротоксины, вызывающие рвоту и диарею в течение 2–6 часов после употребления зараженной пищи [37-39].

Психротрофные виды *Pseudomonas* являются ключевыми микроорганизмами, вызывающими порчу охлажденного мяса при аэробном хранении. Псевдомонады очень устойчивы и способны выдерживать стрессовые условия окружающей среды, которые в противном случае препятствовали бы росту других организмов, вызывающих порчу [40].

Escherichia coli — бактериальный вид семейства *Enterobacteriaceae*, включающий как патогенные, так и непатогенные штаммы, причем последние составляют большую часть факультативной микрофлоры, локализованной в желудочно-кишечном тракте большинства позвоночных [41]. Что касается патогенной *E. coli*, существует шесть патотипов, связанных с болезнями пищевого происхождения ответственных за желудочно-кишечные инфекции, признаны этиологическим агентом серьезных заболеваний и смертности во время вспышек болезней пищевого происхождения во всем мире [42]. В 1982 г. *E. coli* впервые была связана с эпидемией болезней пищевого происхождения, связанных с употреблением неправильно приготовленных гамбургеров в Соединенных Штатах, и был определен новый зооноз пищевого происхождения [43].

Большинство клостридий (*Clostridium*) являются сапрофитами, четыре вида были идентифицированы как патогены человека, а именно *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* и *Clostridium tetani*. Среди этих видов *Cl. perfringens* и *Cl. botulinum* являются хорошо зарекомендовавшими себя патогенами пищевого происхождения. Пищевое отравление обычно возникает в результате приема внутрь высокой концентрации ($>10^6$) жизнеспособных вегетативных клеток *Cl. perfringens*, которые обычно встречаются в продуктах, подвергшихся температурному воздействию. Симптомы болезней пищевого происхождения, вызываемых *Cl. perfringens*, включают острую боль в животе и диарею, в то время как предполагается, что энтеротоксин патогена также играет роль в этиологии синдрома внезапной детской смерти. Что касается мяса, то организм может либо изначально присутствовать в мышечной ткани, либо быть занесен через фекальное загрязнение в туши при убойе или в мясные продукты во время последующей обработки [44].

Род *Yersinia* состоит по меньшей мере из 12 видов, среди которых три вида считаются патогенами для человека: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* [45]. Заболевание пищевого происхождения, вызываемое *Yersinia spp.*, называемое иерсиниозом, вызывается *Y. enterocolitica* или *Y. pseudotuberculosis*. *Yersinia spp.* являются грамотрицательными, неспорообразующими палочками или коккобациллами, которые являются факультативными анаэробами и способны расти при температурах охлаждения. Хотя оптимальная температура роста *Y. enterocolitica* составляет приблизительно 30°C, она может поддерживать рост при температурах до 0°C. Животные традиционно рассматривались как основной резервуар патогенной *Yersinia spp.*, при этом забитые свиньи являются единственным наиболее важным источником *Y. enterocolitica*. Более конкретно, серотип *Y. enterocolitica* по-видимому, распространен по всему миру и является наиболее

часто выделяемым серотипом патогена, относящегося к патогенам пищевого происхождения [46].

Гетероферментативные молочнокислые бактерии, такие как *Lactobacillus spp.*, в основном *Lactobacillus curvatus* и *Lactobacillus sayi*, лейконостоки *Leuconostoc spp.*, *Carnobacterium spp.* [47] наиболее часто являются причиной порчи мяса. В результате своего метаболизма гетероферментативные молочнокислые бактерии производят значительное количество нежелательных катаболитов, таких как CO₂, этанол, уксусная кислота, бутановая кислота и ацетоин с последующими неприятными запахами и визуальными эффектами, такими как образование тягучей слизи и обесцвечивание мяса [48].

Скоропортящийся характер мяса требует постоянной разработки и применения новых и инновационных технологий для уничтожения и/или предотвращения роста патогенных микроорганизмов и микроорганизмов, вызывающих порчу. Многочисленные исследования свидетельствуют о непрекращающемся изменении и повышении устойчивости патогенных микроорганизмов к противомикробным препаратам и обычным методам защиты пищевых продуктов, таким как: низкий pH, тепловая обработка, сушка, понижение температуры и/или минимизация активности воды, использование химических вещества, консервантов.

Пищевая промышленности использует множество методов консервирования мяса для предотвращения и контроля пищевых патогенов и микроорганизмов, вызывающих порчу в свежих мясных продуктах, такие как вакуумная упаковка и упаковка в модифицированной газовой среде [49], упаковочные пленки, иммобилизованные противомикробными веществами [50-54], противомикробные препараты в саше и впитывающие прокладки [55], съедобные покрытия с противомикробными свойствами [56].

Ферментация пищевых продуктов с помощью молочнокислых бактерий является методом консервирования пищевых продуктов, получившим известность в последние десятилетия благодаря возможности молочнокислых бактерий производить бактериоцины, которые способны заменять химические консерванты в пищевой промышленности [57,58]. На сегодняшний день были охарактеризованы различные штаммы молочнокислых бактерий, продуцирующие бактериоцин, с многообещающими результатами в качестве биоконсерванта в различных подходах к промышленному применению [59-61].

Штаммы *Lactobacillus casei* показали потенциальную активность в отношении энтеропатогенных кишечных палочек и видов сальмонеллы [62]. Проведен скрининг молочнокислых бактерий из молочных, мясных продуктов и отходов агропромышленного комплекса и выделен штамм молочнокислых бактерий, содержащий антимикробное соединение широкого спектра действия и ингибирующий десять индикаторных грамположительных и грамотрицательных штаммов. Пробиотические бактерии, выделенные из различных марок традиционных йогуртов в Египте, проявляли антимикробную активность в концентрации 10⁹ КОЕ/г *in vitro* в отношении тестируемых индикаторных патогенов [63]. Штаммы *Lactobacterium sakei*, *Leuconostoc carnosum*, продуцирующие бактериоцины (соответственно, сакацины и лейкоцины), ингибируют деятельность патогенных бактерий, в частности, бактерий рода *Salmonella* и *L. monocytogenes*, в мясе и мясных продуктах [64].

Выделенные из жидкого теста (ферментированных индийских лепешек из мягкого риса) молочнокислые бактерии *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus paraplantarum* продемонстрировали антагонистическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенов пищевого происхождения, таких как *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica subsp.* [65]. Кроме того, устойчивые к желудочному соку и желчи молочнокислые бактерии и бифидобактерии *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum* и *Bifodobacterium longum* и *Bifodobacterium bifidum.*, которые были выделены из стула здорового ребенка, проявляли высокую антагонистическую активность в отношении различных патогенов пищевого происхождения.

Бактерии рода *Propionibacterium* нашли широкое применение в сыроварении в качестве сырной микрофлоры (вместе с молочнокислыми бактериями), что благоприятствует среде для штаммов *Propionibacterium*, используемой при производстве твердого сычужного сыра. Роль этих бактерий в производстве сыра основана на сбраживании лактатов до пропионовой и уксусной кислот, придающих конечному продукту специфический аромат; они также служат естественными консервантами [66]. Заквасочные культуры, состоящие из пропионовокислых и молочнокислых бактерий (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Penicillium jensenii* и *Penicillium acidipropionici*), используются в производстве ферментированных продуктов. Их сочетание увеличивает скорость процесса брожения и защищает конечный продукт от плесени и гнили, кроме того, соленья, полученные таким способом, обогащены витамином В₁₂, обладают лучшими вкусовыми и диетическими свойствами. Были опубликованы исследования, касающиеся использования *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* в качестве оздоровительной добавки в сыр типа Фета в 2017 г. [67].

Результаты многочисленных исследований позволяют предположить, что изоляты молочнокислых и пропионовокислых бактерий являются возможными кандидатами для приготовления промышленных заквасок, полезных для производства безопасных и биобезопасных продуктов, которые, в свою очередь, могут быть подходящими поставщиками пробиотических культур.

Заключение

Безопасность мяса является одной из наиболее важных текущих и будущих проблем общества. Для снижения бремени болезней пищевого происхождения пищевой промышленности и органам общественного здравоохранения необходимо разработать и внедрить комплексные подходы, охватывающие всю цепочку поставок продовольствия, от забоя до реализации готовой продукции. Поскольку бактериальные патогены, включая появляющиеся или эволюционирующие патогенные организмы, представляют собой наиболее серьезные проблемы безопасности мяса, необходимо получение более полной и достоверной информации о составе микробных сообществ и динамических процессах их метаболизма. Выявив специфические взаимодействия между различными фенотипами порчи при микробиологическом загрязнении, возможно добиться контролируемого качества продукции при производстве, транспортировке, реализации и хранении мяса.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (Грант № AP14869028).

Литература:

- 1 Larsson SC & Orsini N (2014) *Red meat and processed meat consumption and all-cause mortality: a meta-analysis*. *Am J Epidemiol* 179, 282–289. (doi: 10.1093/aje/kwt261)
2. Higgs J (2000) *The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality*. *Trends Food Sci Technol* 11, 85–95. (doi: 10.1016/S0924-2244(00)00055-8)
- 3 N. Gerber, R. Brogioli, B. Hattendorf, M. R. L. Scheeder, C. Wenk and D. Günther *Variability of selected trace elements of different meat cuts determined by ICP-MS and DRC-ICPMS (variability-of-selected-trace-elements-of-different-meat-cuts-determined-by-icpms-and-drcicpms/564C81C56BBB4E47505F47EF0D279432)*. (doi: 10.1017/S1751731108003212)
- 4 Ginevra Lombardi-Boccia, Altero Aguzzi, Sabina Lanzi *Aspects of meat quality: Trace elements and B vitamins in raw and cooked meats* (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157503001613>)
- 5 CDC. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2017, *Annual Report; Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2017*. (<https://www.cdc.gov/fdoss/annual-reports/index.html>)

- 6 Sofos J. N. *Challenges to meat safety in the 21st century. Meat Science.* 2008;78(1-2):3–13. (doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.027.)
- 7 Tawaf R. *Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan ke 5 Fapet Unpad.* 2013. *Physical and technical feasibility procedure slaughter at the Government Abattoir in West Java.* (doi: 10.1155/2019/2707064)
- 8 N.N. Wickramasinghe , J.a Ravensdale , R.Coorey , S.P. Chandry, G.A Dykes *The Predominance of Psychrotrophic Pseudomonads on Aerobically Stored Chilled Red Meat. Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019 Sep;18(5):1622-1635. (doi: 10.1111/1541-4337.12483)
- 9 Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. М. : «Колос», 2004.296с.(https://www.studmed.ru/biryukovvosnovypromyshlennoybiotekhnologii_9fd3ce4d66d.html)
- 10 Мария Ф. Юльетто, Паола Сечи, Елена Боргогни и Бениамино Т. Ченчи-Гога. *Порча мяса: критический обзор забытого изменения из-за бактерий, продуцирующих слизь, Итальянский журнал зоотехники, том 14, 2015 г.,* (<https://doi.org/10.4081/111>.) «Особенности санитарно-микробиологического контроля сырья и продуктов питания животного происхождения»: учебное пособие/сост. Н.И.Хамнаева – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ. 2006 г.
- 12 Ивашкин Ю.А. *Агентные технологии и мультиагентное моделирование систем: учебное пособие.* –М.: МФТИ, 2013, с. 268 (<http://simulation.su/uploads/files/default/2016-uch-posob-ivashkin-1.pdf>)
- 13 ФОМУШКИН ВЛАДИМИР ИГОРЕВИЧ, *Автоматизированная система контроля рисков микробиологической порчи мясного сырья, 2017, стр.41* (<http://mgupp.ru/upload/iblock/6ff/6ffb1472d29c6d86dfaba66eb5167f71.pdf>)
- 14 Бородин А.В., Осипова П.Ю., Костенко Ю.Г., Краснова М.А. *Компьютерное прогнозирование изменения микробиологического статуса модельных систем с целью обеспечения и качества мясных продуктов. Сборник материалов 15-ой международной научной конференции «Мясная промышленность, приоритеты развития и функционирования».* М., 2012. Том 1 С. 75-84 (<http://iblock/6ff/6ffb1472d29c6d86dfaba66eb5167f71.pdf>)
- 15 Казаков В.И. Практические решения для идеального мясокомбината. *Журнал "Мясные Технологии»* № 6 (138), март 2014г. (<https://www.meatbranch.com/magazine/archive/viewnumber/2014/6.html>)
- 16 Висвалингам, Дж.; Чжан, П. ; Эллс, ТС; Ян, Х. *Динамика образования биопленки бактериями Salmonella Typhimurium и завода по переработке говядины в моно- и двухвидовых культурах.* микроб. Экол. 2019, 78, 375–387. (<https://www.actabiomedica.ru/jour/article/download/3812/2415>)
- 17 Фомушкин В.И. *Автоматизированная система контроля рисков микробиологической порчи мясного сырья, диссертация, Москва – 2017 ijas.2015.4011*(doi.org/10.3390/app11188309)
- 18 Широне М.; Вишано, П. ; Тофало, Р. ; Суззи, Г. От редакции: *Патогены пищевого происхождения: гигиена и безопасность. Передний. микробиол.* 2019 (<https://articles/10.3389/fmicb.2019.01974/full>)
- 19 Сосновский М.; Осек, Дж. *Микробиологическая безопасность пищевых продуктов животного происхождения с органических ферм.* Дж. Вет. Рез. 2021, 65, 87–92. (doi: 10.2478/jvetres-2021-0015)
- 20 Шарлермрой Р.; Макорнваттана, М.; Фуэнгвас, С.; Мирак, Дж.; Пичпол, Д.; Karoonutaisiri, N. *Технология массива шариков на основе ДНК для одновременной идентификации одиннадцати патогенов пищевого происхождения в курином мясе. Пищевой контроль* 2019, 101, 81–88. (doi: 10.1016/j.foodcont.2019.02.014)
- 21 З.А. Латыпова, *Характеристика listeria monocytogenes, выделенных из мяса разных видов животных* (<https://imv-journal.kz/index.php/mav/article/view/36>)
- 22 Wu, D.; Chen, Y.; Sun, L.; Qu, T.; Wang, H.; Yu, Y. *Prevalence of Fosfomycin Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolated from Patients in a University Hospital in China from 2013 to 2015. JPN J. Infect. Dis.* 2018, 71, P.312–314. (<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.013>)
- 23 Mendes, R.E.; Sader, H.S.; Castanheira, M.; Flamm, R.K. *Distribution of Main Gram-Positive Pathogens Causing Bloodstream Infections in United States and European Hospitals during the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010–2016): Concomitant Analysis of Oritavancin in Vitro Activity.* J. Chemother. 2018, 30,P. 280–289. (doi: 10.1080/1120009X.2018.1516272)
- 24 Bush, K.; Bradford, P.A. *Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. Clin. Microbiol. Rev.* 2020, 33. (doi: 10.1128/CMR.00047-19)

25 M. N. Mulders, A. P. J. Haenen, P. L. Geenen, P. C. Vesseur, E. S. Poldervaart, T. Bosch, X. W. Huijsdens, P. D. Hengeveld, W. D. C. Dam-Deisz, E. A. M. Graat. *Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands. Epidemiology & Infection*, 2010, p. 743 - 755 (doi: 10.1017/S0950268810000075)

26 Nemati, M., et al. *Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52: 3817–3819 (doi: 10.1128/AAC.00613-08)

27 Jh.Kadariya, T.C Smith, D.Thapaliya. *Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int* 2014; (doi: 10.1155/2014/827965.)

28 Odeyemi, O.A.; Alegbeleye, O.O.; Strateva, M.; Stratev, D. *Understanding Spoilage Microbial Community and Spoilage Mechanisms in Foods of Animal Origin. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020, 19, 311–331. (doi: 10.1111/1541-4337.12526)

29 Ríos-Castillo, A.G.; Ripolles-Avila, C.; Rodríguez-Jerez, J.J. *Evaluation of Bacterial Population Using Multiple Sampling Methods and the Identification of Bacteria Detected on Supermarket Food Contact Surfaces. Food Control* 2021, 119, 107471. (<https://publications/evaluation-of-bacterial-population-using-multiple-sampling-method>)

30 Schirone, M.; Visciano, P.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Editorial: *Foodborne Pathogens: Hygiene and Safety. Front. Microbiol.* 2019, 10, 1974. (doi: 10.3389/fmicb.2019.01974)

31 Sosnowski, M.; Osek, J. *Microbiological Safety of Food of Animal Origin from Organic Farms. J. Vet. Res.* 2021, 65, 87–92. (doi: 10.2478/jvetres-2021-0015)

32 Charlermroj, R.; Makornwattana, M.; Phuengwas, S.; Meerak, J.; Pichpol, D.; Karoonuthaisiri, N. *DNA-Based Bead Array Technology for Simultaneous Identification of Eleven Foodborne Pathogens in Chicken Meat. Food Control* 2019, 101, 81–88 (5.-DNA-based-Bead-Array-Technology-for-Simultaneous-Identification-of-Eleven-Foodborne-Pathogens-in-Chicken-Meat-2019.pdf?x86971)

33 Freedman SB, Xie J, Neufeld MS, Hamilton WL, Hartling L, Tarr PI, Alberta Provincial Pediatric Enteric Infection Team (APPETITE). Nettel-Aguirre A, Chuck A, Lee B, Johnson D, Currie G, Talbot J, Jiang J, Dickinson J, Kellner J, MacDonald J, Svenson L, Chui L, Louie M, Lavoie M, Eltorki M, Vanderkooi O, Tellier R, Ali S, Drews S, Graham T, Pang XL. *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infection, Antibiotics, and Risk of Developing Hemolytic Uremic Syndrome: A Meta-analysis. Clin Infect Dis.* 2016 May 15;62(10):1251-1258. (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/)

34 EFSA-ECDC, 2015; Rhoades et al., 2009 (doi:10.2903/j.efsa.2016.4634)

35 Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. *Foodborne disease outbreaks caused by Bacillus cereus, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus—United States, 1998–2008. Clinical Infectious Diseases.* 2013;57:425–433. (doi: 10.1371/journal.pone.0004258)

36 Hasman, H.; Moodley, A.; Guardabassi, L.; Stegger, M.; Skov, R.L.; Aarestrup, F.M. *Spa Type Distribution in Staphylococcus Aureus Originating from Pigs, Cattle and Poultry. Vet. Microbiol.* 2010, 141, 326–331. (doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.025)

37 Hennekinne, J.-A. Chapter 7—Staphylococcus aureus as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks Worldwide. In *Staphylococcus Aureus; Fetsch, A., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 129–146, ISBN 978-0-12-809671-0* (doi:10.1016/B978-0-12-809671-0.00007-3)

38 Jh.Kadariya, T.C Smith, D.Thapaliya. *Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int* 2014; (doi: 10.1155/2014/827965)

39 Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. *Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerging Infectious Diseases.* 2011;17(1) p:7–15 (doi: 10.3201/eid0505.990502)

40 N.N Wickramasinghe, J. Ravensdale, R. Coorey, S. P Chandry, G.A Dykes. *The Predominance of Psychrotrophic Pseudomonads on Aerobically Stored Chilled Red Meat. Compr Rev Food Sci Food Safety*, 2019 p:1622-1635. (doi: 10.1111/1541-4337.12483). Epub 2019 Aug 13.

41 П.Г. Алексюк, А.П. Богоявленский, М.С. Алексюк, *Выделение и характеристика бактериофагов, лизирующих клинические штаммы E.Coli* (<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.09>)

42 Viazis, S., & Diez-Gonzalez, F. (2011). *Enterohemorrhagic Escherichia coli. The Twentieth Century's Emerging Foodborne Pathogen: A Review. Advances in Agronomy, 111, 1-50.* (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387689-8.00006-0>)

43 Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Heigerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Harrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. *Hemorrhagic colitis*

- associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl. J. Med.* 308:681-685. (doi: 10.1056/NEJM198303243081203)
- 44 Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. *Foodborne disease outbreaks caused by Bacillus cereus, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus—United States, 1998–2008. Clinical Infectious Diseases.* 2013;57:425–433.(doi: 10.1093/cid/cit244)
- 45 *Yersinia aleksiciae* Sprague & Neubauer, 2005 , *The Integrated Taxonomic Information System.* (https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=967815)
- 46 EFSA-ECDC, 2015; Fredriksson-Ahomaa et al., 2010, глава j 17 537 (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2016.4634>)
- 47 Ray, B., Bhunia, A., 2013. *Fundamental food microbiology, 5th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.* (<https://www.routledge.com/Fundamental-Food-Microbiology/Ray-Bhunias/p/book/9781466564435>)
- 48 Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин, *Бактерии рода lactobacillus:общая характеристика и методы работы с ними стр.38* , 2014, (https://kpfu.ru/portal/ias_utils.file_download?p_table_id=4&p_file=F1699665265/Methodichka_Yarullina.pdf)
- 49 Евстафьева Е.А.,Куприянов М.А., *Технология упаковки: вакуумирование или модифицированные газовые среды,* (<https://tehnologiya-upakovki-vakuumirovanie-ili-modifitsirovannye-gazovye-sredy>)
- 50 Krockel L., 2013. *The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products, lactic acid bacteria. In: Kongo M. (ed.), Lactic acid bacteria - R & D for food, health and livestock purposes. InTech Publ., pp 129-152.*(doi: 10.5772/51117)
- 51 Bidawid S, Farber JM, Sattar SA. 2001. *Survival of hepatitis A virus on modified atmosphere packaged (MAP) lettuce. Food Microbiol* 18(1):95-102. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002000903800>)
- 52 Eng, S.-K.; Pusparajah, P.; Ab Mutalib, N.-S.; Ser, H.-L.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H. *Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Front. Life Sci.* 2015, 8, 284–293. (www.mdpi.com/2304-8158/10/5/907)
- 53 Han JH. 2000. *Antimicrobial food packaging. Food Technol* 54(3) p:56-65 (doi:10.1533/9781855737020.1.50)
- 54 Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., and Hernández-Muñoz, P. (2012). *Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. Int. J. Food Microbiol.* 157, 239–244. (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.009)
- 55 Han, C., J. Wang, Y. Li, F. Lu, and Y. Cui. 2014. *Antimicrobial-coated polypropylene films with polyvinyl alcohol in packaging of fresh beef. Meat Sci.* 96:901–907. (<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.003>.)
- 56 Woraprayote, W., L. Pumpuang, A. Tosukhowong, T. Zendo, K. Sonomoto, S. Benjakul, and W. Visessanguan. 2018. *Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. Lebensm.-Wiss. Technol.* 89:427– (<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.026>.)
- 57 Quintavalla, S., and L. Vicini. 2002. *Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat Sci.* 62:373–380. ([https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00121-3).)
- 58 Otoni, C. G., P. J. Espitia, R. J. Avena-Bustillos, and T. H. McHugh. 2016. *Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. Food Res. Int.* 83:60–73. (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.018>.)
- 59 Arkoun, M., F. Daigle, R. A. Holley, M. C. Heuzey, and A. Ajji. 2018. *Chitosan-based nanofibers as bioactive meat packaging materials. Packag. Technol. Sci.* 31:185–195. (<https://doi.org/10.1002/pts.2366>.)
- 60 Шуматова Т.А., Зернова Е.С., Григорян Л.А., Шишацкая С.Н., *Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3.* (<https://science-education.ru/ru/article/view?id=18140>)
- 61 Djadouni, F. and M. Kihal, 2012. *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. Braz. Arch. Biol. Technol.,* 55: 435-443. (<https://www.scielo.br/j/babt/a/gZkS6nvPs5QPk6W5Dvm4fWB/?lang=en>)
- 62 Bessadat, N., B. Hamon, N. Bataillé-Simoneau, C. Chateau, K. Mabrouk and P. Simoneau, 2020. *Occurrence of leaf spot disease caused by Alternaria crassa (sacc.) rands on jimson weed and potential additional host plants in Algeria. Plant Pathol. J.,* 36: 179-184. (doi: 10.1590/s1517-83822013000400025)

63 Djadouni, F. and M. Kihal, 2012. *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55: 435-443. (<https://veterinary.arriah.ru/jour/article/download/300/301>)

64 Ганина В. И., Гриневич А. И., Волкова Р. А. *Микробиологическая безопасность молочных и молочно-растительных консервов // Молочная промышленность. –2012. – № 8. – С. 58–59.* (<https://veterinary.arriah.ru/jour/article/download/300/301>)

65 Dutra V., Silva A.C., Cabrita P., Peres C., Malcata X., Brito L. *Lactobacillus plantarum LB95 impairs the virulence potential of Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogens in HT-29 and vero cell cultures*. *J. Med. Microbiol.* 2016;65:28–35. (doi: 10.1099/jmm.0.000196).

66 Мохова И.Д, *Анализ микрофлоры сыра на примере пропионовокислых бактерий, 2017 г, 25 стр.* (<https://nauchkor.ru/pubs/analiz-mikroflory-syra-na-primere-propionovokislyh-bakteriy-5b8881ad7966e1073081b6c1>)

67 Angelopoulou, A.; Alexandraki, V.; Georgalaki, M.; Anastasiou, R.; Manolopoulou, E.; Tsakalidou, E.; Papadimitriou, K. *Production of probiotic Feta cheese using Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermanii as adjunct*. *Int. Dairy J.* 2017, 66, 135–139. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095869461630348X>)

А.Ж. АЛЫБАЕВА^{1*}, А.А. АЙТЖАНОВА¹, А.Ж. ЖАҚСЫЛЫҚ¹, Э.Т. ХАМЕДОВА¹,
Ш.Ы. КЕНЕНБАЙ²

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Алматы технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

ЕТ ЖӘНЕ ЕТ ӨНІМДЕРІНІҢ ҚАУІПСІЗДІГІ МЕН САҚТАУ МЕРЗІМІН ҰЗАРТУДЫҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРІ

Түйін

Аз өңделген пайдалы ет өнімдеріне деген тұтынушылық тенденция өндірушілерге үлкен қысым көрсетіп, өнімнің сапасына нұқсан келтірместен және тұтынушылардың сұранысын қанағаттандыру үшін, ет пен ет өнімдерінің қауіпсіздігін сертификаттауды талап етеді. Бұл жаңа технологиялық жетістіктерді құру мен енгізуде қиындықтар туғызды, өйткені қазіргі заманғы инновацияларды қолдану тұтынушылардың шешімдеріне және олардың ет пен ет өнімдерін бағалауына әсер етуі мүмкін. Ет өнеркәсібіндегі жаңа технологиялар өнеркәсіптік қолайлы баламаларға және инфрақұрылымдық өзгерістерге рұқсат бермес бұрын микробиологиялық мақұлдауды қажет етеді. Патогендік микроорганизмдердің тағамға зиян келтіруі әртүрлі тағамдық ауруларға, тіпті өлімге әкелуі мүмкін, бұл экономикалық шығындарға әкеліп соғады. Бұл мақалада микроорганизмдердің ет пен ет өнімдерінің сапасына әсері, микробиологиялық бақылау әдістері туралы әдеби мәліметтер келтірілген.

Кілтті сөздер: микробиологиялық бүліну, ет және ет өнімдері, сүтқышкылды бактериялар, патогенді микроорганизмдер.

IRSTI: 65.09.05

A.Zh. ALYBAYEVA^{1*}, A.A. AITZHANOVA¹, A.Zh. ZHAKSYLYK¹,
E.T. KHAMEDOVA¹, Sh.Y. KENENBAY²

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

MICROBIOLOGICAL METHODS OF IMPROVING THE SAFETY AND SECURITY OF MEAT AND MEAT PRODUCTS

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.01

Abstract

The consumer trend towards wholesome, minimally processed meat products has put enormous pressure on processors to certify the safety of meat and meat products without sacrificing product quality and meeting consumer demand. This has caused difficulties in the creation and implementation of new technological advances, since the use of more modern innovations can influence consumer decisions and their assessment of the quality of meat and meat products. New cooking technologies in the meat industry require microbiological approval before being named industrially viable alternatives and authorizing infrastructural changes. Food spoilage by pathogens causes a variety of foodborne illnesses that can even lead to death, resulting in economic losses. This article presents literature data on the impact of microorganisms on the quality of meat and meat products, methods of microbiological control.

Keywords: Microbiological spoilage, meat and meat products, lactic acid bacteria, pathogenic microorganisms.

Food safety is a global problem, a priority for both research and practical activities in the food industry. Food safety systems are much better in developed countries and worse in developing ones. This explains the large number of food crises in these countries, especially in Asian countries.

Meat continues to play an important role in the human diet as a good source of high quality protein as well as healthy fatty acids and a variety of micronutrients for optimal health. [1]. Meat contains a protein of high biological value with all the essential amino acids needed by adults and children. Meat contains an average of 20-24 g of protein per 100 g (raw), making it one of the main sources of protein[2]. Meat also contains a wide range of bioavailable micronutrients, such as iron, which are essential for overall health and well-being[3-4].

Food spoilage occurs as a result of microbiological, chemical, or physical changes that render a food product unacceptable to the consumer. Microbiological spoilage of food is caused by the growth of microorganisms that produce enzymes that produce unwanted by-products in food. Meat is one of the most perishable foodstuffs and is widely associated with foodborne illness, as extensive outbreaks have been associated with the consumption of contaminated meat [5].

Animal products must be controlled to ensure that people can obtain meat suitable for consumption. Meat can pose biological, physical and chemical hazards that can occur at any stage of the supply chain, from slaughter to serving. Pathogenic microorganisms are commonly found in the digestive tract of healthy cattle. These microorganisms can also be found on the skins of live animals contaminated with faeces, which can then be transferred to the surface of previously sterile meat during slaughter, especially when it is carried out on the floor in the absence of a carcass suspension system in sloppy evisceration, in which intestinal contents are distributed over the surface. meat. Carcasses of cattle can be contaminated during the slaughter process by contact with the skin and hair of the animal, limbs, blood, stomach contents, intestines, bile and other secretions, premises, equipment, as well as the hands and clothing of the worker [6]. For these reasons, it is necessary to pay special attention to hygiene and sanitation in the process of slaughtering livestock [7].

Providing a quality product and increasing the shelf life of food is one of the important and main directions of the food industry. The use of various synthetic dyes, flavors, preservatives to extend the shelf life of meat and meat products, leads to a threat to the health of consumers. Even with the use of modern conservation methods, spoilage remains an unresolved problem[8].

Food, which by its nature is raw, remains protected from attack by microorganisms due to specific structures such as skins, shells, bran, etc., which are not degradable. Meat and fish products are more susceptible to spoilage when raw due to the favorable conditions for microbial spoilage. Surface contamination usually occurs at an earlier stage in the processing of raw meat and fish. When the protective layer or packaging is removed, food products tend to be more vulnerable to spoilage, which also accelerates the spread of microorganisms once the processing step begins[9].

The spoilage of raw meat is mainly due to the undesirable development of microbes in the meat during storage. The type of bacteria and their number depend on the initial contamination of the meat and on the specific storage conditions, which can influence the development of various microbial populations associated with spoilage, thus affecting the type and speed of the spoilage process [10].

If the regimes and terms of refrigeration storage of meat are violated, as a result of the multiplication of microorganisms, its quality may change, which leads to product spoilage. There are several types of spoilage of chilled, frozen and thawed meat: mucus, rotting, sour (acidic) fermentation, pigmentation (appearance of age spots), glow and mold.

The main causative agents of mucus are aerobic psychrophilic gram-negative bacteria, most often of the genus *Pseudomonas*, as well as aerobic yeasts. When meat is stored at -5°C, micrococci, streptococci, actinomycetes, some putrefactive bacteria and other mesophilic microorganisms multiply, having the lowest minimum growth temperature. Rotten meat is caused by various aerobic and facultative anaerobic non-spore-forming bacteria, as well as spore-forming aerobic and anaerobic bacteria, most often of the genus *Pseudomonas*. At elevated storage temperatures, meat rotting is caused by mesophilic putrefactive microorganisms: non-spore-forming bacteria *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*; other aerobic bacilli; anaerobic *Clostridium sporogenes*, *Clostridium putrificus* and *Clostridium perfringens*. The causative agents of acid fermentation of meat are psychrophilic lactobacilli, micobacteria and yeast, which are able to develop in the depths of muscle tissue, where a low oxygen concentration is created. The causative agents of pigmentation are *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and other aerobic bacteria, various sarcins, pigment yeasts, most often of the genus *Torula*. Frozen meat molds are most often caused by molds of the genera *Thamnidium*, *Rhizopus*, and *Cladosporium*, which have the lowest minimum growth temperature [11]. Meat spoilage microorganisms grow under certain conditions (Table 1).

Table 1 - Temperature values that determine the possibility of growth of microorganisms typical for meat products and the consequences caused by their development

| Microorganisms | Temperature, °C | Effects | Characteristic |
|------------------------|-----------------|------------------------|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>Cl.Perfringens</i> | ≥15 | Spoilage and poisoning | Large (0.8-1.5 × 4-8 microns) polymorphic, rod-shaped gram-positive. The spores are oval, immobile, and form a capsule in the human body |
| <i>Bacillus cereus</i> | ≥12 | Spoilage and poisoning | Facultative anaerobe, capable of nitrate reduction, forms flat, capable of nitrate reduction, |

Table 1 continued

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------|------|------------------------|--|
| | | | slightly concave, matte colonies. The edge is wavy. The cells are large 1 × 3-4 microns, the endospores are centrally |
| | | | located, do not exceed the cell size. The flagella are arranged peritrichially. gram-positive, spore-forming |
| <i>Staph.aureus</i> | ≥7 | Spoilage and poisoning | Spherical, gram-positive, large 1 × 3-4 microns |
| <i>Escherichia</i> | ≥7 | Spoilage and poisoning | Gram-negative rods measuring 0.4-0.6-2.6 microns, mobile due to peritrichially arranged flagella, form colonies in R- and S-forms. |
| <i>Salmonella</i> | ≥5 | Spoilage and poisoning | Movable (thanks to flagella – peritrichs), asporogenic gram-negative straight rods (0.5–1x1-3 microns) with rounded ends |
| <i>Lactobacillus</i> | ≥0 | Spoilage | gram-positive anaerobes are non-spore-forming, have the correct shape of a long "stick", sometimes coccoid, are arranged in short chains or singly. |
| <i>Pseudomonas</i> | ≥-5 | Spoilage | грамотрицательные бактерии. Размеры клеток 0,5-1x1,5-4 мкм |
| Yeasts | ≤ -5 | Spoilage | sizes from 2.5 to 10 micrometers across and from 4 to 20 microns in length. The shape of the cells is elongated, oval, ellipsoid, lemon-shaped or spherical |
| Mold fungi | ≤-5 | Spoilage and poisoning | they form velvety, powdery, felt, spider-like, mossy deposits of green, white, black, yellow and other colors of various shades. Gifs can be short or long. Their thickness ranges from 1 to 15 microns, length — from 2065 to 50 microns or more. |

Losses associated with microbiological spoilage of meat represent a serious economic problem on a global scale. Today, in the meat industry, microbial spoilage of meat during storage causes significant financial losses to the industry. According to the Food and Agriculture Organization (FAO), a third of all food produced in the world is wasted every year - about 1.3 billion tons. The total volume of lost products for developed and developing countries is comparable, however, in developed countries, losses of meat products predominate, reaching 67% of the global losses of meat processing industries [12-14].

Meat and meat products provide an excellent environment for the growth of a variety of microflora (bacteria, yeasts and molds), some of which are pathogenic [15]. The dominant spoilage microorganisms are gram-negative aerobic bacilli (*Escherichia coli*, genus *Pseudomonas*), coccid bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*), facultative anaerobes (*Aeromonas hydrophila*), *Salmonella spp.* [16]. The qualitative composition of microorganisms and their initial concentration are not constant values, but depend on a variety of factors, including the type and initial concentration of microorganisms, the nature of the interaction of populations, temperature and time factors of storage of raw materials, the presence of conditions conducive to microbial contamination [17].

The growth of foodborne pathogens such as *Salmonella* and toxin-producing strains of *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, and *S. aureus* are of greatest concern in the production of meat and poultry products [18–20]. These bacteria are the most common cause of

foodborne illness. *Listeria monocytogenes* is the causative agent of listeriosis in humans and animals. Currently, this disease is considered one of the most significant foodborne infections in the world. The main transmission factors for listeriosis are milk and dairy products, animal and poultry meat, vegetables and seafood [21].

The most significant Gram-positive microorganism that has received attention due to associated nosocomial and community-acquired infections is *S. aureus* [22-24]. In addition to poultry meat, *S. aureus*, as well as methicillin-resistant *S. aureus*, is found in the meat of pigs [25] and cattle [26]. This bacterium multiplies rapidly at room temperature, producing toxins that cause food poisoning [27].

In public health and economics, in both developed and developing countries, *Salmonella* spp. continue to cause serious problems. *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* are the most frequently reported serotypes causing human salmonellosis in both the EU and the USA [28-32]. This highlights the need to improve the prevention and control of *Salmonella* spp. in food products. *Salmonella* are Gram-negative organisms of the *Enterobacteriaceae* family, which may be indistinguishable from *E. coli* under a microscope or when cultured on conventional non-selective nutrient [33]. Despite significant changes that have been made over time to the taxonomy and nomenclature of the genus *Salmonella*, it is now well established that the genus consists of only two genomic species, i.e. *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* strains are responsible for 99% of *Salmonella* infections in humans and warm-blooded animals and are usually transmitted through ingestion of contaminated food or water; on the other hand, strains of the other five subspecies, as well as *S. bongori*, are commonly isolated from foodborne pathogens related to meat safety. *S. enterica*, due to its high association with food animals such as poultry, cattle and pigs, the pathogen is commonly associated with the raw meat of these and other farm animals [34].

Staphylococcal infection is the most economically important foodborne disease [35]. It causes gastrointestinal illness due to a wide range of toxins [36], including staphylococcal enterotoxins that cause vomiting and diarrhea within 2–6 hours of ingestion of contaminated food [37–39].

Psychrotrophic *Pseudomonas* species are the key microorganisms causing spoilage of chilled meat during aerobic storage. *Pseudomonas* are highly resilient and able to withstand stressful environmental conditions that would otherwise inhibit the growth of other spoilage organisms [40].

E. coli is a bacterial species of the *Enterobacteriaceae* family that includes both pathogenic and non-pathogenic strains, the latter being the majority of the facultative microflora found in the gastrointestinal tract of most vertebrates [41]. With respect to pathogenic *E. coli*, there are six foodborne disease-associated pathotypes responsible for gastrointestinal infections recognized as the causative agent of serious illness and death during foodborne disease outbreaks worldwide [42]. In 1982, *E. coli* was first associated with an epidemic of foodborne illness associated with the consumption of improperly cooked hamburgers in the United States, and a new foodborne zoonosis was identified [43].

Most *Clostridium* are saprophytes, four species have been identified as human pathogens, namely *Cl. perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* and *Clostridium tetani*. Among these species, *Cl. perfringens* and *Cl. botulinum* are well-established foodborne pathogens. Food poisoning usually results from ingestion of high concentrations ($>10^6$) of viable *Cl. vegetative* cells. *perfringens*, which are commonly found in processed foods. Symptoms of foodborne illness caused by *Cl. perfringens* include acute abdominal pain and diarrhea, while the pathogen's enterotoxin is also thought to play a role in the etiology of SIDS. For meat, the organism may either be initially present in muscle tissue or be introduced via faecal contamination into carcasses at slaughter or into meat products during subsequent processing [44].

The genus *Yersinia* consists of at least 12 species, among which three species are considered pathogens for humans: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* [45]. A foodborne illness caused by *Yersinia* spp. called yersiniosis is caused by *Y. enterocolitica*

or *Y. pseudotuberculosis* *Yersinia spp.* are gram-negative, non-spore-forming rods or coccobacilli that are facultative anaerobes and are able to grow at refrigeration temperatures. Although the optimum growth temperature for *Y. enterocolitica* is approximately 30°C, it can support growth at temperatures as low as 0°C. Animals have traditionally been considered the main reservoir of pathogenic *Yersinia spp.*, with slaughtered pigs being the single most important source of *Y. enterocolitica*. More specifically, the *Y. enterocolitica* serotype appears to be distributed worldwide and is the most commonly isolated foodborne pathogen serotype. [46].

Heterofermentative lactic acid bacteria like *Lactobacillus spp.*, mainly *L. curvatus* and *L. sayi*, *Leuconostoc spp.*, *Carnobacterium spp.* [47] most involved in meat spoilage. As a result of their metabolism, heterofermentative lactic acid bacteria produce significant amounts of undesirable catabolites such as CO₂, ethanol, acetic acid, butanoic acid, and acetoin, with subsequent unpleasant odors and visual effects, such as the formation of stringy mucus and discoloration of meat [48].

The perishable nature of meat requires the constant development and application of new and innovative technologies to kill and/or prevent the growth of pathogens and spoilage microorganisms. Numerous studies show the ongoing change and increase in resistance of pathogenic microorganisms to antimicrobials and conventional food protection methods such as: low pH, heat treatment, drying, temperature reduction and/or minimization of water activity, use of chemicals, preservatives.

The food industry uses many meat preservation methods to prevent and control foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh meat products, such as vacuum packaging and modified atmosphere packaging [49], packaging films immobilized with antimicrobial agents [50-54], antimicrobial sachets and absorbent pads [55], edible coatings with inherent antimicrobial properties [56].

Fermentation of foods with lactic acid bacteria is a food preservation method that has gained prominence in recent decades due to the ability of lactic acid bacteria to produce bacteriocins that can replace chemical preservatives in the food industry. [57,58] To date, various strains of lactic acid bacteria producing bacteriocin have been characterized with promising results as a biopreservative in various industrial applications [59-61].

Strains of *Lactobacillus casei* showed potential activity against enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* species [62] screened lactic acid from dairy, meat products and agro-industrial waste and isolated a strain of lactic acid bacteria containing a broad-spectrum antimicrobial compound and inhibiting ten indicator gram-positive and gram-negative strains. Probiotic bacteria isolated from various brands of traditional yoghurts in Egypt exhibited antimicrobial activity at a concentration of 10⁹ CFU/g in vitro against test indicator pathogens [63]. Strains of *Lactobacterium sakei*, *Leuconostoc carnosum*, producing bacteriocins (sacacins and leukocins, respectively), inhibit the activity of pathogenic bacteria, in particular bacteria of the genus *Salmonella* and *L. monocytogenes*, in meat and meat products.[64]

The lactic acid bacteria *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* isolated from batter (fermented Indian soft rice cakes) have demonstrated antagonistic activity against gram-positive and gram-negative foodborne pathogens such as *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica subsp.* [65]. Typhi, In addition, gastro- and bile-resistant lactic acid bacteria and bifidobacteria *Lactobacillus rhamnosus*, *L. caasei*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium longum* and *B. bifidum*, which have been isolated from stool healthy child showed high antagonistic activity against various foodborne pathogens.

Bacteria of the genus *Propionibacterium* have found wide use in cheese making as a cheese microflora (together with lactic acid bacteria, which favors the environment for *Propionibacterium* strains) used in the production of hard rennet cheese. The role of these bacteria in the production of cheese is based on the fermentation of lactates to propionic and acetic acids, which give the final product a specific flavor; they also serve as natural preservatives [66]. Starter cultures consisting of propionic acid bacteria and lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Penicillium jensenii* and *Penicillium acidipropionici*) are used in the

production of fermented products. Their combination increases the speed of the fermentation process and protects the final product from mold and rot, in addition to the fact that pickles obtained in this way are enriched with vitamin B12 and have better taste and dietary properties. Studies have been published regarding the use of *P. freudenreichii subsp. shermani* as a health supplement in feta type cheese in 2017[67].

The results of numerous studies suggest that isolates of lactic acid and propionic acid bacteria are possible candidates for the preparation of industrial starters useful for the production of safe and bioprotective products, which, in turn, can be suitable suppliers of probiotic cultures.

Conclusion

Meat safety is one of the most important current and future societal issues, and in order to reduce the burden of foodborne disease, the food industry and public health authorities need to successfully address various challenges. To achieve this goal, it is essential to develop and implement integrated approaches that cover the entire food supply chain, from slaughter to finished products. Since bacterial pathogens, including emerging or evolving pathogens, represent the most serious meat safety problems, more complete and reliable information about the composition of microbial communities and the dynamic processes of their metabolism is needed. By identifying specific interactions between different spoilage phenotypes in microbiological contamination, we could achieve controlled product quality in the production, transportation, marketing and storage of meat.

Funding

This research is funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP14869028).

References:

- 1 Larsson SC & Orsini N (2014) *Red meat and processed meat consumption and all-cause mortality: a meta-analysis. Am J Epidemiol* 179, 282–289. (doi: 10.1093/aje/kwt261)
- 2 Higgs J (2000) *The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. Trends Food Sci Technol* 11, 85–95. (doi:10.1016/S0924-2244(00)00055-8)
- 3 N. Gerber, R. Brogioli, B. Hattendorf, M. R. L. Scheeder, C. Wenk and D. Günther *Variability of selected trace elements of different meat cuts determined by ICP-MS and DRC-ICPMS.* (doi: 10.1017/S1751731108003212)
- 4 Ginevra Lombardi-Boccia, Altero Aguzzi, Sabina Lanzi *Aspects of meat quality: Trace elements and B vitamins in raw and cooked meats* (<https://science/article/abs/pii/S0889157503001613>)
- 5 CDC. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2017, Annual Report; *Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2017.* (<https://fdoss/annual-reports/index.html>)
- 6 Sofos J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science.* 2008;78(1-2):3–13. (doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.027.)
- 7 Tawaf R. *Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan ke 5 Fapet Unpad. 2013. Physical and technical feasibility procedure slaughter at the Government Abattoir in West Java.* (<https://pmc/articles/PMC6885763>)
- 8 N.N. Wickramasinghe, J.a Ravensdale, R.Coorey, S.P. Chandry, G.A Dykes *The Predominance of Psychrotrophic Pseudomonads on Aerobically Stored Chilled Red Meat. Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019 Sep;18(5):1622-1635. (doi: 10.1111/1541-4337.12483)
- 9 Biryukov V. V. *Osnovy promyshlennoj biotekhnologii / V. V. Biryukov. M. : «Kolos», 2004. 296s.* (https://www.studmed.ru/biryukovvosnovypromyshlennoybiotekhnologii_9fd3ce4d66d.html)
- 10 Mariya F. YU'etto, Paola Sechi, Elena Borgogni i Beniamino T. CHenchi-Goga. *Porcha myasa: kriticheskij obzor zabytogo izmeneniya iz-za bakterij, produciryuyushchih sliz', Ital'yanskij zhurnal zootekhniki, tom 14, 2015 g.,* (<https://doi.org/10.4081/111>). *«Osobennosti sanitarno-mikrobiologicheskogo kontrolya syr'ya i produktov pitaniya zhivotnogo proiskhozhdeniya»: uchebnoe posobie/sost. N.I.Hammaeva – Ulan-Ude: Izd-vo VSGTU. 2006 g.*

- 12 Ivashkin YU.A. *Agentnye tekhnologii i mul'tiagentnoe modelirovanie sistem: uchebnoe posobie.* –M.: MFTI, 2013, s. 268 (<https://uploads/files/default/2016-uch-posob-ivashkin>)
- 13 FOMUSHKIN VLADIMIR IGOREVICH, *Avtomatizirovannaya sistema kontrolya riskov mikrobiologicheskoy porchi myasnogo syr'ya, 2017, str.41* (<https://mgupp.ru/upload/iblock/6ff/6ffb1472d29c6d86dfaba66eb5167f71.pdf>)
- 14 Borodin A.V., Osipova P.YU., Kostenko YU.G., Krasnova M.A. *Komp'yuternoe prognozirovanie izmeneniya mikrobiologicheskogo statusa model'nyh sistem s cel'yu obespecheniya i kachestva myasnyh produktov. Sbornik materialov 15-oy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii « Myasnaya promyshlennost', priority razvitiya i funkcionirovaniya».* M., 2012. Tom 1 S. 75-84 (<https://iblock/6ff/6ffb1472d29c6d86dfaba66eb5167f71.pdf>)
- 15 Kazakov V.I. *Prakticheskie resheniya dlya ideal'nogo myasokombinata. ZHurnal "Myasnye Tekhnologii»* № 6 (138), mart 2014g. (<https://www.meatbranch.com/magazine/archive/viewnumber/2014/6.html>)
- 16 Visvalingam, Dzh.; CHzhan, P.; Ells, TC; YAn, X. *Dinamika obrazovaniya bioplenki bakteriyami Salmonella Typhimurium i zavoda po pererabotke govyadiny v mono- i dvuhvidovyh kul'turakh. mikrob. Ekol. 2019, 78, 375–387.* (<https://www.actabiomedica.ru/jour/article/download/3812/2415>)
- 17 Fomushkin V.I. *Avtomatizirovannaya sistema kontrolya riskov mikrobiologicheskoy porchi myasnogo syr'ya, dissertatsiya, Moskva – 2017 ijas.2015.4011*(doi.org/10.3390/app11188309)
- 18 SHirone M.; Vishano, P.; Tofalo, R.; Suzzi, G. *Ot redakcii: Patogeny pishchevogo proiskhozhdeniya: gigiena i bezopasnost'. Perednij. mikrobiol. 2019* (<https://articles/10.3389/fmicb.2019.01974/full>)
- 19 Sosnovskij M.; Osek, Dzh. *Mikrobiologicheskaya bezopasnost' pishchevyh produktov zhivotnogo proiskhozhdeniya s organicheskikh ferm. Dzh. Vet. Rez. 2021, 65, 87–92.* (doi: 10.2478/jvetres-2021-0015)
- 20 SHarlermroj R.; Makornvattana, M.; Fuengvas, S.; Mirak, Dzh.; Pichpol, D.; Karoonutaisiri, N. *Tekhnologiya massiva sharikov na osnove DNK dlya odnovremennoj identifikacii odinnadcati patogenov pishchevogo proiskhozhdeniya v kurinom myase. Pishchevoj kontrol' 2019, 101, 81–88.* (doi : 10.1016/j.foodcont.2019.02.014)
- 21 Z.A. Latypova, *Harakteristika listeria monocytogenes, vydelennyh iz myasa raznyh vidov zhivotnyh* (<https://imv-journal.kz/index.php/mav/article/view/3622>)
- 22 Wu, D.; Chen, Yu.; Sun, L.; Qu, T.; Wang, H.; Yu, Yu. *The prevalence of resistance to fosfomycin in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from University Hospital patients in China from 2013 to 2015. J.P.J. Infects. Dis. 2018, 71, pp.312-314.* (doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.013)
- 23 Mendes R.E.; Sader H.S.; Castanheira M.; Flamm R.K. *Distribution of the main gram-positive pathogens causing bloodstream infections in hospitals in the USA and Europe during the SENTRY antimicrobial surveillance program (2010-2016): concomitant analysis of Oritavancin activity in Vitro. J. Chemother. 2018, 30, pp. 280-289.* (doi: 10.1080/1120009X.2018.1516272)
- 24 Bush K.; Bradford P.A. *Epidemiology of pathogens producing β -lactamase. Wedge. Microbiol. Rev. 2020, 33.* (doi: 10.1128/CMR.00047-19)
- 25 M. N. Mulders, A. P. J. Henen, P. L. Gehenen, P. K. Wesser, E. S. Poldervaart, T. Bosch, H. V. Heysdens, P. D. Hengeveld, V. D. K. Dam-Deish, E. A. M. Graat. *Prevalence of MRSA associated with livestock in broiler herds and risk factors for slaughterhouse personnel in the Netherlands. Epidemiology and Infection, 2010, pp. 743 - 755* (doi:10.1017/S0950268810000075)
- 26 Nemati M. et al. *Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: the first detection of the methicillin-resistant strain ST398 associated with livestock. Antimicrobials and chemotherapy 2008; 52:3817-3819* (doi: 10.1128/AAC.00613-08)
- 27 J. H.Kadaria, T.K. Smith, D.Tapalia. *Staphylococcus aureus and staphylococcal diseases of food origin: an ongoing public health problem. Biomed Res Int 2014; (doi: 10.1155/2014/827965 .)*
- 28 Odeemi, O.A.; Alegbeleye, O.O.; Strateva, M.; Stratev, D. *Understanding the microbial community of spoilage and the mechanisms of spoilage of food products of animal origin. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2020, 19, 311-331.* (doi: 10.1111/1541-4337.12526)
- 29 Rios-Castillo, A.G.; Ripoles-Avila, K.; Rodriguez-Jerez, J.J. *Assessment of the bacterial population using several sampling methods and identification of bacteria found on surfaces in contact with food in supermarkets. Food control 2021, 119, 107471.* ([https://publications/assessment of the bacterial population using the method of multiple samples](https://publications/assessment%20of%20the%20bacterial%20population%20using%20the%20method%20of%20multiple%20samples))
- 30 Shirone, M.; Visciano, P.; Tofalo, R.; Suzzi, G. *Editorial: Pathogens of food origin: hygiene and safety. Before. Microbiol. 2019, 10,1974.* (doi: 10.3389/fmicb.2019.01974)

- 31 Sosnovsky M.; Osek J. *Microbiological safety of food products of animal origin from organic farms*. *J. Vet. Res.* 2021, 65, 87-92.(doi: 10.2478/jvetres-2021-0015)
- 32 Charlermroy, R.; Makornvattana, M.; Fuengvas, S.; Meerak, J.; Pichpol, D.; Karuonutaisiri, N. *Technology based on DNA matrices for simultaneous identification of eleven foodborne pathogens in chicken meat*. *Food Control* 2019, 101, 81-88 (<https://5.-DNA-based-Bead-Array-Technology-for-Simultaneous-Identification-of-Eleven-Foodborne-Pathogens-in-Chicken-Meat-2019.pdf?x86971>)
- 33 Freedman SB, Xie J, Neufeld MS, Hamilton WL, Hartling L, Tarr PI, Alberta Provincial Pediatric Enteric Infection Team (APPETITE). Nettel-Aguirre A, Chuck A, Lee B, Johnson D, Currie G, Talbot J, Jiang J, Dickinson J, Kellner J, MacDonald J, Svenson L, Chui L, Louie M, Lavoie M, Eltorki M, Vanderkooi O, Tellier R, Ali S, Drews S, Graham T, Pang XL. *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infection, Antibiotics, and Risk of Developing Hemolytic Uremic Syndrome: A Meta-analysis*. *Clin Infect Dis.* 2016 May 15;62(10):1251-1258.(www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/)
- 34 EFSA-ECDC, 2015; Rhoades et al., 2009 (doi:10.2903/j.efsa.2016.4634)
- 35 Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. *Foodborne disease outbreaks caused by Bacillus cereus, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus—United States, 1998–2008*. *Clinical Infectious Diseases.* 2013;57:425–433. (doi: 10.1371/journal.pone.0004258)
- 36 Hasman, H.; Moodley, A.; Guardabassi, L.; Stegger, M.; Skov, R.L.; Aarestrup, F.M. *Spa Type Distribution in Staphylococcus Aureus Originating from Pigs, Cattle and Poultry*. *Vet. Microbiol.* 2010, 141, 326–331. (doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.025)
- 37 Hennekinne, J.-A. Chapter 7—*Staphylococcus aureus as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks Worldwide*. In *Staphylococcus Aureus; Fetsch, A., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 129–146, ISBN 978-0-12-809671-0* (doi:10.1016/B978-0-12-809671-0.00007-3)
- 38 Jh.Kadariya, T.C Smith , D.Thapaliya. *Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health*. *Biomed Res Int* 2014; (doi: 10.1155/2014/827965)
- 39 Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. *Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens*. *Emerging Infectious Diseases.* 2011;17(1) p:7–15 (doi: 10.3201/eid0505.990502)
- 40 N.N Wickramasinghe , J. Ravensdale , R. Coorey, S. P Chandry, G.A Dykes. *The Predominance of Psychrotrophic Pseudomonads on Aerobically Stored Chilled Red Meat*. *Compr Rev Food Sci Food Safety*, 2019 p:1622-1635. (doi: 10.1111/1541-4337.12483). Epub 2019 Aug 13.
- 41 P.G. Aleksyuk, A.P. Bogoyavlensky, M.S. Aleksyuk, *Vydelenie i harakteristika bakteriofagov, liziruyushchih klinicheskie shtammy E.Coli* (<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.09>)
- 42 Viazis, S., & Diez-Gonzalez, F. (2011). *Enterohemorrhagic Escherichia coli*. *The Twentieth Century's Emerging Foodborne Pathogen: A Review*. *Advances in Agronomy*, 111, 1-50. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387689-8.00006-0>)
- 43 Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Heigerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Harrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype*. *New Engl. J. Med.* 308:681-685. (doi: 10.1056/NEJM198303243081203)
- 44 Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. *Foodborne disease outbreaks caused by Bacillus cereus, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus—United States, 1998–2008*. *Clinical Infectious Diseases.* 2013;57:425–433. (doi: 10.1093/cid/cit244)
- 45 *Yersinia aleksiciae* Sprague & Neubauer, 2005 , *The Integrated Taxonomic Information System*. (https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=967815)
- 46 EFSA-ECDC, 2015; Fredriksson-Ahomaa et al., 2010, chapter j 17 537 (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2016.4634>)
- 47 Ray, B., Bhunia, A., 2013. *Fundamental food microbiology, 5th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA*.(<https://Fundamental-Food-Microbiology/Ray-Bhunia/p/book/9781466564435>)
48. D.R. YArullina, R.F. Fahrullin, *Bakterii roda lactobacillus:obshchaya harakteristika i metody raboty s nimi str.38,2014*, (https://kpfu.ru/portal/ias_utils.file_download?p_table_id=4&p_file=F1699665265/Methodichka_Yarullina.pdf)
- 49 Evstaf'eva E.A.,Kupriyanov M.A., *Tekhnologiya upakovki: vakuumirovanie ili modifitsirovannye gazovye sredy*, (<https://tehnologiya-upakovki-vakuumirovanie-ili-modifitsirovannye-gazovye-sredy>)
- 50 Krokkel L., 2013. *The role of lactic acid bacteria in ensuring the safety and flavor of meat and meat products, lactic acid bacteria*. In: Kongo M. (ed.), *Lactic acid bacteria - research and development*

in the field of food, healthcare and animal husbandry. *Intech Publishing House*, pp. 129-152. (doi: 10.5772/51117)

51 Bidavid S., Farber J.M., Sattar S.A. 2001. *Survival of hepatitis A virus in salad packed in modified atmosphere (MAP). Food Microbiol* 18(1):95-102. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002000903800>)

52 Eng, S.-K.; Pushparaja, P.; Ab Mutalib, N.-S.; Ser, H.-L.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H. *Salmonella: a review of pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Before. The science of life*. 2015, 8, 284-293. (www.mdpi.com/2304-8158/10/5/907)

53 Khan J. H., 2000. *Antimicrobial packaging for food products. Food Technology* 54(3) pp.56-65 (doi:10.1533/9781855737020.1.50)

54 Muriel-Gale, V., Lopez-Carballo, G., Gavara, R. and Hernandez-Munoz, P. (2012). *Antimicrobial film for food packaging based on LAE produced by EVOH. Int. J. Food Microbiol.* 157, 239-244. (doi: 10.1016/J.ijfoodmicro.2012.05.009)

55 Han, K., J. Wang, Yu. Li, F. Lu and Yu. Cui. 2014. *Polypropylene films with antimicrobial coating and polyvinyl alcohol for packaging fresh beef. Meat science.* 96: 901-907. (<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.003>)

56 Voraprayot, U., L. Pumpuang, A. Tosuhovong, T. Zendo, K. Sonomoto, S. Benjakul and U. Visessanguan. 2018. *Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with bacteriocin 7293 to combat pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. Lebensm.- Viss. Technology.* (89:427–433) (<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.026>.)

57 Quintavalla, S. and L. Vicini. 2002. *Antimicrobial packaging for food products in the meat industry. The science of meat.* 62: 373-380. ([https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00121-3).)

58 Otoni, K. G., P. J. Espitia, R. J. Avena-Bustillos and T. H. McHugh. 2016. *Trends in food packaging systems with antimicrobial properties: disposable bags and absorbent pads. Food Industry*, vol. 83:60-73. (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.018> .)

59 Arkoun M., F. Daigle, R. A. Holley, M. K. Hughesy and A. Aji. 2018. *Chitosan-based nanofibers as biologically active packaging materials for meat. Package. Technology. The science.* 31:185-195. (<https://doi.org/10.1002/pts.2366> .)

60 Shumatova T.A., Zernova E.S., Grigoryan L.A., Shishatskaya S.N., *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* – 2015. – No. 3. ;(<https://science-education.ru/ru/article/view?id=18140>)

61 Jaduni, F. and M. Kihal, 2012. *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against microbes that cause food spoilage. Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55:435-443. (<https://www.scielo.br/j/babt/a/gZkS6nvPs5QPk6W5Dvm4fWB/?lang=en>)

62 Bessadat, N., B. Hamon, N. Bataille-Simoneau, K. Chateau, K. Mabrouk and P. Simoneau, 2020. *The appearance of leaf spotting caused by Alternaria crassa (sacc.) affects the Jimson weed and potential additional host plants in Algeria. Phytopathology. J.*, 36:179-184. (doi: 10.1590/s1517-83822013000400025)

63 Jaduni, F. and M. Kihal, 2012. *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against microbes that cause food spoilage. Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55: 435-443 (<https://veterinary.arriah.ru/jour/article/download/300/301>)

64. Ganina V. I., Grinevich A. I., Volkova R. A. *Mikrobiologicheskaya bezopasnost' molochnyh i molochno-rastitel'nyh konservov // Molochnaya promyshlennost'.* –2012. – № 8. – S. 58–59. (<https://veterinary.arriah.ru/jour/article/download/300/301>)

65 Dutra V., Silva A.S., Kabrita P., Perez S., Malkata H., Brito L. *Lactobacillus plantarum LB95 reduces the virulence potential of gram-positive and gram-negative pathogens of food origin in HT-29 and vero. J. Med. Microbiol cell cultures.* 2016;65:28-35. (doi: 10.1099/jmm.0.000196).

66 Mohova I.D, *Analiz mikroflory syra na primere propionovokislyh bakterij*, 2017 g, 25 str. (<https://nauchkor.ru/pubs/analiz-mikroflory-syra-na-primere-propionovokislyh-bakteriy-5b8881ad7966e1073081b6c1>)

67 Angelopoulou, A.; Alexandraki, V.; Georgalaki, M.; Anastasiou, R.; Manolopoulou, E.; Tsakalidou, E.; Papadimitriou, K. *Production of probiotic feta cheese using Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermania as a supplement. Int. Dairy J.* 2017, 66, 135-139. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095869461630348X>).

MPHTI: 65.63.03

Г.Қ. БЕЙСЕМБЕКОВА^{1*}, Ш. ҚАНАЯТ², М.Х. НАРМУРАТОВА²¹Микробиология және вирусология ғылыми – зерттеу орталығы, Алматы, Қазақстан²Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: beisembekova.gaukhar@mail.ru

ТҮЙЕ СҮТІ МАЙЫНЫҢ МАЙ ҚЫШҚЫЛДЫҚ ҚҰРАМЫ МЕН ҚАСИЕТТЕРІ

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.02

Түйін

Мақалада түйе сүті табиғи функционалды өнім ретінде сипатталады, оның химиялық құрамы, физикалық қасиеті басқа жануарлар сүтінен ерекшелейді. Сүт құрамында адам ағзасында синтезделмейтін маңызды полиқаньқпаған май қышқылдарының, триацилглицеридтердің, диацилглицеридтердің, көптеген фосфолипидтердің биологиялық құндылығы және антиканцерогенді, антимикробтық, қабынуға қарсы және иммуносупрессивті қасиеттері расталды. Бүгінгі таңда инфекциялық аурулардың өршуі және антибиотиктерге қарсы микроорганизмдердің төзімділігінің артуына байланысты, май қышқылдарының антимикробтық белсенділігін ауруларды емдеуде және профилактикада қолдануда таптырмас өнім ретінде ұсынылады. Бұл жұмысты зерттеудің мақсаты – түйе сүтін емдік мақсатта қолдану мүмкіндіктері және май қышқылдық құрамының ерекшеліктері туралы әдебиет деректерін талдау.

Кілтгі сөздер: сүт майы, сүт май қышқылдары, антимикробтық белсенділік, түйе сүті.

Бүгінгі таңда сүт майының құрамдас бөліктері, дұрыс тамақтану және денсаулық арасындағы байланысты түсіну және өмір салтын жақсарту, аурудың алдын алу және әл-ауқатты жақсартудың негізгі тұжырымдамаларының бірі екені белгілі. Сіыр сүтінен басқа барлық сүт және сүт өнімдерін тұтынуы соңғы 50 жылда барлық елдерде 17% өскен [1]. Сүт адамдар мен жануарлар үшін ең маңызды тағамдардың бірі болып саналады және көмірсулар, белоктар, майлар, витаминдер және минералды заттар сияқты маңызды компоненттеріне байланысты толыққанды тамақтану ретінде әрекет етеді. Сүт құрамы көптеген факторларға тәуелді, мысалы, жануардың денсаулығы, әсіресе сүт безінің жағдайы, фотопериодтың жыл мезгілдеріне әсері, жануардың тамақтануы, генетикалық факторлар және сүт сақтау температурасы.

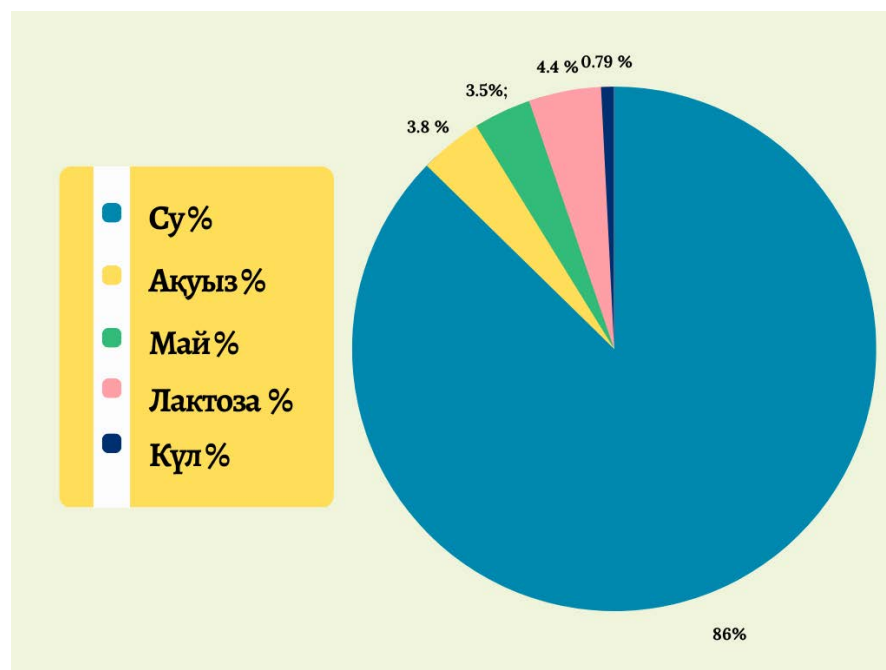
Сүт майының құрамында адам ағзасында синтезделмейтін маңызды полиқаньқпаған май қышқылдары, қысқа тізбекті май қышқылдары, көптеген фосфолипидтер және майда еритін витаминдер бар. Мұның бәрі сүт майының бірегей биологиялық құндылығын анықтайды.

Сүтте табылған спецификалық емес секреторлық қорғаныс факторлары тек омыртқалы жануарларда кездесетін антиденелер сияқты адаптивті иммундық жүйеден филогенетикалық түрде бұрын пайда болған туа біткен қорғаныс жүйесінің бөлігі болып табылады. Бұл спецификалық емес қорғаныс факторларына липидтер, лактоферрин, лактопероксидаза, лизоцим және рецепторлық олигосахаридтер жатады. Мұндай спецификалық емес факторлар вирустардың, бактериялардың, қарапайымдылардың және басқа микроорганизмдердің жұқпалылығын инактивациялау немесе төмендетуі көрсетілген.

Түйе сүтінің май құрамы және сіыр сүті майы құрамынан ерекшелігі

Соңғы кездері түйе сүті емдік және тағамдық қасиеттеріне байланысты денсаулықты нығайтуда ерекше орын алып отыр. Түйе сүтінің майының адгезияға және бактерияға қарсы қасиеттері анықталған. Түйе сүті майы түйіршіктері ұсақ болғандықтан сіңімділігі жоғары. Құрамында холестерин мен қаныққан май қышқылдары мөлшері төмен, маңызды май қышқылдарының деңгейі сіыр сүтіне қарағанда жоғары.

Май - түйе сүтінің маңызды құрамдас бөлігі, оның ішінде табиғи майлардың күрделі қоспасы, яғни құрамында триглицеридтер, фосфолипидтер, холестерин және басқа элементтерден тұрады [2, 3]. Түйе сүтіндегі тағы бір тән липидті қасиеті полиқанықпағанның май қышқылдары, яғни альфа-линолен қышқылы, эйкозапентаен қышқылы және арахидон қышқылы [4, 5], сүтқоректілердің басқа түрлерінің сүтімен салыстырғанда, липидтермен байланысты жүрек-қан тамырлары аурулары қаупі бар адамдар үшін майдың ең жақсы көзі ретінде байқалған [6].



Сурет 1 – Түйе сүтінің химиялық құрамы [41]

Соңғы жылдары құрамында биологиялық белсенді компоненттері жоғары қаныққан аз және жоғары қанықпаған сүт өнімдерін дамытуға көп көңіл бөлінуде. Сонымен қатар, сүт майында кездесетін компоненттердің кең ауқымын анықтауда айтарлықтай прогреске қол жеткізілді. Осылайша, түйе сүтінің майы және оның адам денсаулығына әсері туралы көптеген зерттеулер жүргізілді. Түйе сүті мен адам денсаулығының арасында оң байланыс табылды, бұл түйе сүтінің майлы компоненттерін танудың және оған пайдалы тағам ретінде көзқарастың күрт өзгеруіне әкелді. Түйе сүтінің майы басқа сүтқоректілер сүтінің майларынан ерекшелігі, бұл оның адам ағзасында оңай қорытылуында.

Қаныққан май қышқылдары, түйе сүтінде сиыр сүтімен салыстырғанда моноқанықпаған май қышқылдары мен полиқанықпаған май қышқылдарының деңгейі жоғары. Ұзын тізбекті май қышқылдары және қаныққан май қышқылдары түйе сүтінде жиі кездеседі, бұл оларға липидтермен байланысты жүрек-қан тамырлары ауруларының жиілігін 35-50% төмендетуге ерекше мүмкіндік береді [7]. Түйе сүтіндегі май қышқылдары ана сүтімен салыстырғанда конъюгацияланған линол қышқылына бай. Линол қышқылы қандағы глюкозаны төмендетудегі артықшылықтары үшін танылды және остеопороздың алдын алады, май алмасуын жақсартады және иммундық жүйені белсендіреді [8, 9]. Сонымен қатар, бұл асқазан, тоқ ішек, сүт безі және тері қатерлі ісігінің пайда болуына және өршуіне жол бермейді. Сонымен қатар, линол қышқылының изомерлері семіздіктің алдын алуда маңызды рөл атқаратыны белгілі. Түйе сүтінің майы әдетте көптеген емдік қасиеттерге ие, себебі оның қант диабетіне, бактерияға, вирусқа, қабынуға, гипертензияға қарсы және гипоаллергенді қасиеттері анықталған.

Кесте 1- Әр түрлі сүттің салыстырмалы түрде химиялық құрамы [42]

| Түрі | Су % | Ақуыз % | Май % | Күл % | Лактоза % |
|---------|-------|---------|----------|---------|-----------|
| Түйе | 86-88 | 3.0-3.9 | 2.9-5.4 | 0.6-0.9 | 3.3 |
| Сыыр | 85-87 | 3.2-3.8 | 3.7-4.4 | 0.7-0.8 | 4.8-4.9 |
| Буфалло | 82-84 | 3.3-3.6 | 7.0-11.5 | 0.8-0.9 | 4.5-5.0 |
| Қой | 79-82 | 5.6-6.7 | 6.9-8.6 | 0.9-0.1 | 4.3-4.2 |
| Ешкі | 87-88 | 2.9-3.7 | 4.0-4.5 | 0.8-0.9 | 3.6-4.2 |
| Адам | 88-89 | 1.1-1.3 | 3.3-4.7 | 0.2-0.3 | 6.8-7.0 |

Түйе сүті майының май қышқылдық құрамы

Түйе сүтінің майы 1,2–5,4%, жалпы түйе сүтінің 3,29% құрайды [10] және негізінен триацилглицериндерден, сондай-ақ холестерин мен фосфолипидтерден тұрады.

Сүт майының май қышқылдық құрамы күрделі және қанықтылық деңгейіне байланысты үш топқа жіктеледі.

Қаныққан май қышқылдары ең көп таралған май қышқылдары болып табылады және түйе сүтінде сыыр сүтімен салыстырғанда (46-66%) төмен пайызбен жалпы май қышқылдарының 78,33% құрайды [11]. Ең басым қаныққан май қышқылдары С16:0, одан кейін С18:0 және С14:0. Диеталық тұрғыдан алғанда, С18 қаныққан май қышқылдарының денсаулыққа бейтарап әсер ететіні анықталды, ал С14 және С16 қаныққан май қышқылдары зиянды деп саналады, өйткені олар адамдардағы сарысудағы төмен тығыздықтағы липопротеин холестеринінің жоғары концентрациясымен байланысты [12]. Қаныққан май қышқылдарын көп қабылдау денсаулыққа теріс әсер етеді, өйткені ол n-6 май қышқылдарының метаболизмін тежейді және полиқанықпаған майлардың тапшылығын тудырады [13]. Сонымен қатар, қаныққан май қышқылдарының көп тұтынылуы жүректің ишемиялық ауруы қаупінің жоғарылауымен байланысты [14]. Анықталған (С10-С14) қаныққан май қышқылдарының ішінде орташа тізбекті май қышқылдарының айтарлықтай концентрациясы бар. Бұл пайдалы аспект, өйткені орташа тізбекті май қышқылдары ұзақ тізбекті май қышқылдарына қарағанда оңай қорытылады және метаболизденеді [15]. Түйе - целлюлоза ашыту арқылы (С4-С8) май қышқылдарын түзе алатын күйіс қайыратын жануар. Алайда түйе сүтіндегі (С4-С8) қаныққан май қышқылдарының концентрациясы қой мен ешкі сияқты күйіс қайыратын жануарлардың басқа түрлерімен салыстырғанда төмен. Бұл төмен концентрацияның ықтимал түсіндірмесі не сүтке шығарылғанға дейін түйе тіндеріндегі жылдам метаболизммен байланысты болуы мүмкін [16], немесе түйелердің басқа қоректену әдеттері. Бұл түйе сүтіне кейбір ерекше тағамдық қасиеттер береді, өйткені (С4-С8) қаныққан май қышқылдарының мөлшері ана сүтіне жоғары дәрежеде ұксас.

Моноқанықпаған май қышқылдары түйе сүтінің майында кездесетін май қышқылдарының екінші түрі болып табылады, негізінен олеин қышқылымен (18:1 n-9) ұсынылған, ол май қышқылдарының жалпы құрамының 5,15-32,88% құрайды, одан кейін пальмитол қышқылы (16 :1). Түйе сүтінің майындағы бір қанықпаған май қышқылдарының мөлшері басқа сүтқоректілердің сүт майларына қарағанда біршама жоғары [17]. Түйе сүтіндегі моноқанықпаған май қышқылдарының жоғары деңгейі артқы ішекте ферментацияның баяулауымен немесе түйе сүтіндегі моноқанықпаған май қышқылдары мен полиқанықпаған май қышқылдарының биосинтезіне жауапты май қышқылдарының десатураза белсенділігінің жоғарылауымен түсіндіріледі [18].

Полиқанықпаған май қышқылдары түйе сүтіндегі жалпы май қышқылдарының 2,7–8,46% құрайды, бұл сыыр сүтінен жоғары (1,89%) [19], бірақ ана сүтінен (10–20%) әлі де аз. Күйіс қайыратын жануарларда бактериялық биогидрогенизацияға байланысты әдетте полиқанықпаған май қышқылдары аз болады. Айта кету керек, полиқанықпаған май қышқылдары жаңа туған нәрестелердің миының өсуіне, сондай-ақ тор қабығы мен танымдық функцияларына маңызды рөл атқарады. Полиқанықпаған май қышқылдарының ішінде линол қышқылы (С18:2 n-6) және α -линолен қышқылы сәйкесінше негізгі n-6

полиқанықпаған май қышқылдары және $n-3$ полиқанықпаған май қышқылдары болып табылады. Линолен қышқылы 0,17-3,31% аралығында, ал α -линолен қышқылы жалпы май қышқылдарының 0,05-2,16% аралығында болады. Түйе сүтіндегі май қышқылдарының пайызы ана сүтіне қарағанда 4-16 есе төмен [20], дегенмен түйе сүтіндегі линол қышқылының пайызы сиыр сүтіне қарағанда жоғары 1,12% [21].

Кесте 2- Түйе сүті майының май қышқылдық құрамы [43]

| Май қышқылының түрлері | Мөлшері % |
|--|----------------|
| Линол | 3,1558±0,4472 |
| Линолен | 0,9187±0,2139 |
| Арахидон | 0,0299±0,0127 |
| Қанықпаған май қышқылдарының суммасы | 61,7018±2,5735 |
| Моноқанықпаған май қышқылдарының суммасы | 32,9150±2,6181 |
| Полиқанықпаған май қышқылдарының суммасы | 5,1262±0,2700 |
| Омега-3 | 0,6067±0,0072 |
| Омега-6 | 4,5195±0,2637 |

α -линолен қышқылы сүттегі негізгі омега-3 май қышқылы болып табылады. Түйе сүтіндегі α -линолен қышқылының үлесі ана сүтіне қарағанда 1 есе және сиыр сүтіне қарағанда 10-13 есе жоғары екені анықталды [22, 23], бұл оның антиаритмиялық әсерімен, неврологиялық белсенділікке оң әсерімен (орталық жүйке жүйесінің зақымдануын азайту арқылы) және жүректің ишемиялық ауруынан қорғайтын әсерлерімен байланысты. Түйе сүтінің майында күйіс қайыратын жануарлардың биогидрленуі кезінде түзілетін бірнеше түрлі изомерлері бар конъюгацияланған линол қышқылы да бар [24]. Румен қышқылы және C12 түйе сүтінде кездесетін екі негізгі румен қышқылының изомерлері болып табылады, сәйкесінше жалпы май қышқылдарының $0,80 \pm 0,15$ және $0,06 \pm 0,02$ құрайды [25]. Ана сүтімен салыстырғанда түйе сүтіндегі майлар конъюгацияланған линол қышқылының құрамында жоғары болды. Конъюгацияланған линол қышқылының ісік жасушаларына цитотоксикалық әсері бар екені хабарланды [26], бұл оның адам денсаулығына пайдалы екенін көрсетеді.

Эйкозапентаен қышқылы, докозагексаен қышқылы және арахидон қышқылы шамалы мөлшерде байқалған полиқанықпаған май қышқылдарының қатарына жатады. Түйе сүтіндегі эйкозапентаен қышқылының, докозагексаен қышқылының және арахидон қышқылының пайызы ана сүтіне қарағанда (1%) төмен екендігі хабарланды. Керісінше, бір зерттеу түйе сүтінде емшек сүтінен (тиісінше 0,03 және 0,67 г/100 г) эйкозапентаен қышқылы және арахидон қышқылы (тиісінше 0,14 және 1,35 г/100 г) бар екені анықталды [27]. Дегенмен, бұл нәтижелерді түйе мен ана сүтіне қосымша зерттеулер жүргізу арқылы одан әрі растау қажет.

Сүттегі май қышқылдарының антибактериялық қасиеттері

Сүттегі май қышқылдарының антимиқробтық қасиеті жақсы белгілі және бұл қосылыстар бірнеше жасушалық мақсаттарға, соның ішінде жасуша мембранасы мен оның компоненттеріне әсер ету арқылы бактериялардың, саңырауқұлақтардың және басқа микробтардың өсуін болдырмайды немесе тікелей тіршілігін жоюға әсер етеді. Май қышқылдарының микробқа қарсы қасиеттері ондаған жылдар бойы зерттеліп келеді, және бұл қосылыстар адам мен жануарлардың туа біткен иммунитетінде, әсіресе шырышты қабаттар мен теріде микробтық қауымдастықтан қорғау үшін қызмет етеді [28-34]. Дегенмен, микроорганизмдерге қарсы жаңа қосылыстарды іздестіру және дамытудың тұрақты қажеттілігі қазіргі кезде микробтардың заманауи агенттерге, әсіресе адамның дәріге төзімді инфекцияларын емдеуге арналған эволюциясына байланысты кеңінен танылды.

Май қышқылдарының сүттің құрамында болуы микроорганизмге қарсы қасиеттеріне байланысты көптеген артықшылықтарға ие. Грам-оң және грам-теріс бактерияларға,

микобактерияларға, архейлерге, саңырауқұлақтарға және ашытқыларға, қабықшалы вирустарға, қарапайымдыларға және эукариоттық балдырларға қарсы антагонистік әсер етеді [35, 36]. Нәтижесінде май қышқылдары әртүрлі биотехнологиялық салаларда микроорганизмге қарсы агенттер болып табылады. Атап айтқанда, қаныққан май қышқылдары каприн қышқылы (C10:0) және лаурин қышқылы (C12:0) микробқа қарсы белсенділіктің ең кең спектрін көрсетеді [37]. Көптеген жағдайларда бос май қышқылдары микро- және миллимолярлық концентрацияларда микробқа қарсы белсенділігін көрсетеді [38].

Май қышқылдарының микробқа қарсы әсер ету механизмі ингибиторлық немесе цидтік болуы мүмкін және бұл көптеген факторларға, соның ішінде зерттелетін май қышқылына және оның концентрациясына, мақсатты микроорганизмге және оның физиологиялық күйіне және өзара әрекеттесуге байланысты әсер етеді [39].

Май қышқылдары антибиофильдік қасиеттерден басқа вирусқа қарсы биологиялық белсенділікті де көрсетеді. Солардың ішінде май қышқылдарының қабынуға қарсы қасиеттерін тері инфекциялары емдеу үшін қолданады. Бірнеше зерттеушілер май қышқылдарын жыныстық жолмен берілетін ауруларды емдеу және алдын алу үшін агенттер ретінде [40], сондай-ақ қызыл иектің ауруларының, тіс кариесінің және асқазан-ішек инфекцияларының алдын алу үшін қолданылған.

Қорытынды

Қорытындылай келе, сүт майының құрамында 500-ге жуық май қышқылдары бар деп есептелді және бүгінгі күнге дейін 150-ге жуығы анықталған. Сүт майының триацилглицериндері 400-ден астам түрлі май қышқылдарынан синтезделеді, бұл сүт майын барлық табиғи майлардың ішіндегі ең күрделісі етеді. Сүт май қышқылдары тек қоректік заттар ретінде ғана емес, сонымен қатар шырышты қабаттарда пайда болатын микробтық инфекциялардан қорғау жүйесін құрайтын микробқа қарсы агенттер ретінде де қызмет етеді. Сүттің липидті фракциясы сүт триглицеридтерін микробқа қарсы май қышқылдары мен моноглицеридтерге айналдыратын липолитикалық белсенділік нәтижесінде жаңа туған нәрестелердің асқазан-ішек жолында микробқа қарсы белсенділікті көрсетеді.

Соңғы жылдары құрамында биологиялық белсенді компоненттері жоғары қаныққан аз және жоғары қанықпаған сүт өнімдерін дамытуға көп көңіл бөлінуде. Сонымен қатар, сүт майында кездесетін компоненттердің кең ауқымын анықтауда айтарлықтай прогреске қол жеткізілді. Осылайша, түйе сүтінің майы және оның адам денсаулығына әсері туралы көптеген зерттеулер жүргізілді. Түйе сүті мен адам денсаулығының арасында оң байланыс табылды, бұл түйе сүтінің майлы компоненттерін танудың және оған пайдалы тағам ретінде көзқарастың күрт өзгеруіне әкелді. Түйе сүтінің майы басқа сүтқоректілер сүтінің майларынан ерекшелігі, оның адам ағзасында оңай қорытылуында болып табылады.

Әдебиеттер:

- 1 Khaledi M., Salami M., Moslehi M., Winterburn J., Moosavi-Movahedi A.A. *Biomolecular content of camel milk: A traditional superfood towards future healthcare industry. Trends Food Sci. Technol.* 2017; 62:49–58. (doi: 10.1016/j.tifs.2017.02.004)
- 2 Smiddy M.A., Huppertz T., van Ruth S.M. Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species. *Int. Dairy J.* 2012; 24:64–69. (doi: 10.1016/j.idairyj.2011.07.001)
- 3 Haddad I., Mozzon M., Strabbioli R., Frega N.G. Stereospecific analysis of triacylglycerols in camel (*Camelus dromedarius*) milk fat. *Int. Dairy J.* 2010; 20:863–867. (doi: 10.1016/j.idairyj.2010.06.006)
- 4 Maqsood S., Al-Dowaila A., Mudgil P., Kamal H., Jobe B., Hassan H.M. Comparative characterization of protein and lipid fractions from camel and cow milk, their functionality, antioxidant and antihypertensive properties upon simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chem.* 2018; 279:328–338. (doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.011)
- 5 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Lipid Composition

- Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61:7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452)
- 6 Nikkhah A. Science of Camel and Yak Milks: Human Nutrition and Health Perspectives. *Food Nutr. Sci.* 2011;2:667–673. (doi: 10.4236/fns.2011.26092)
- 7 Nikkhah A. Science of Camel and Yak Milks: Human Nutrition and Health Perspectives. *Food Nutr. Sci.* 2011;2:667–673. (doi: 10.4236/fns.2011.26092)
- 8 Dreiucker J., Vetter W. Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction. *Food Chem.* 2011;126:762–771. (doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.061)
- 9 Teng F., Wang P., Yang L., Ma Y., Day L. Quantification of Fatty Acids in Human, Cow, Buffalo, Goat, Yak, and Camel Milk Using an Improved One-Step GC-FID Method. *Food Anal. Methods.* 2017;10:2881–2891. (doi: 10.1007/s12161-017-0852-z)
- 10 Singh R., Mal G., Kumar D., Patil N.V., Pathak K.M.L. Camel Milk: An Important Natural Adjuvant. *Agric. Res.* 2017;6:327–340. (doi: 10.1007/s40003-017-0284-4)
- 11 Walter L., Shrestha P., Fry R., Leury B., Logan A. Lipid metabolic differences in cows producing small or large milk fat globules: Fatty acid origin and degree of saturation. *J. Dairy Sci.* 2020; 103:1920–1930. (doi: 10.3168/jds.2019-16775)
- 12 Singh R., Mal G., Kumar D., Patil N.V., Pathak K.M.L. Camel Milk: An Important Natural Adjuvant. *Agric. Res.* 2017;6:327–340. (doi: 10.1007/s40003-017-0284-4)
- 13 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Анализ липидного состава молочных жиров разных видов млекопитающих: потенциал для использования в качестве заменителей жира грудного молока. *Дж. Агр. Пищевая хим.* 2013; 61 :7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452y.)
- 14 Ohlsson L. Dairy products and plasma cholesterol levels. *Food Nutr. Res.* 2010;54 (doi: 10.3402/fnr.v54i0.5124)
- 15 Saini R.K., Keum Y.-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life Sci.* 2018;203:255–267. (doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049)
- 16 Virtanen J.K., Mursu J., Tuomainen T.-P., Voutilainen S. Dietary fatty acids and risk of coronary heart disease in men: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014;34:2679–2687. (doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304082)
- 17 Konuspayeva G., Lemarie É., Faye B., Loiseau G., Montet D. Fatty acid and cholesterol composition of camel's (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* and hybrids) milk in Kazakhstan. *Dairy Sci. Techn.* 2008;88:327–340. (doi: 10.1051/dst:2008005)
- 18 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Lipid Composition Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452y)
- 19 Yang J., Zheng N., Wang J., Yang Y. Comparative milk fatty acid analysis of different dairy species. *Int. J. Dairy Technol.* 2017;71:544–550. (doi: 10.1111/1471-0307.12443)
- 20 Chamekh L., Calvo M., Khorchani T., Castro-Gómez P., Hammadi M., Fontecha J., Yahyaoui M.H., Latifa C., Marivi C., Touhami K., et al. Impact of management system and lactation stage on fatty acid composition of camel milk. *J. Food Compos. Anal.* 2020;87:103418. (doi: 10.1016/j.jfca.2020.103418)
- 21 Walter L., Shrestha P., Fry R., Leury B., Logan A. Lipid metabolic differences in cows producing small or large milk fat globules: Fatty acid origin and degree of saturation. *J. Dairy Sci.* 2020;103:1920–1930. (doi: 10.3168/jds.2019-16775)
- 22 Wei W., Jin Q., Wang X. Human milk fat substitutes: Past achievements and current trends. *Prog. Lipid Res.* 2019;74:69–86. (doi: 10.1016/j.plipres.2019.02.001)
- 23 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Lipid Composition Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452y)
- 24 Teng F., Wang P., Yang L., Ma Y., Day L. Quantification of Fatty Acids in Human, Cow, Buffalo, Goat, Yak, and Camel Milk Using an Improved One-Step GC-FID Method. *Food Anal. Methods.* 2017;10:2881–2891. (doi: 10.1007/s12161-017-0852-z)
- 25 Saadaoui B., Henry C., Khorchani T., Mars M., Martin P., Cebo C. Proteomics of the milk fat globule membrane from *Camelus dromedarius*. *Proteomics.* 2013;13:1180–1184. (doi: 10.1002/pmic.201200113)

- 26 Haddad I., Mozzon M., Strabbioli R., Frega N.G. Stereospecific analysis of triacylglycerols in camel (*Camelus dromedarius*) milk fat. *Int. Dairy J.* 2010;20:863–867. (doi: 10.1016/j.idairyj.2010.06.006)
- 27 Dreiucker J., Vetter W. Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction. *Food Chem.* 2011;126:762–771. (doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.061)
- 28 Teng F., Wang P., Yang L., Ma Y., Day L. Quantification of Fatty Acids in Human, Cow, Buffalo, Goat, Yak, and Camel Milk Using an Improved One-Step GC-FID Method. *Food Anal. Methods.* 2017;10:2881–2891. (doi: 10.1007/s12161-017-0852-z)
- 29 Thormar H. Antibacterial effects of lipids: historical review (1881 to 1960). In: Thormar H, Ed. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Philadelphia: John Wiley & Sons, Ltd 2011: 25-45.
- 30 Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 85: 1629-42. (doi:10.3390/ijms19041114)
- 31 Lee JT, Jansen M, Yilma AN, Nguyen A, Desharnais R, Porter E. Antimicrobial lipids: Novel innate defense molecules are elevated in sinus secretions of patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhino Allergy* 2010; 24: 99-104. (doi: 10.20431/2349-0365.0404002)
- 32 Nakatsuji T, Kao MC, Zhang L, Zouboulis CC, Gallo RL, Huang C-M. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating -defensin-2 expression. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 985-94. (doi:10.1016/j.jplipres.2019.02.001)
- 33 Chen C-H, Wang Y, Nakatsuji T, Liu Y-T, Zouboulis CC, Gallo RL, et al. An innate bactericidal oleic acid affective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A therapy concordant with evolutionary medicine. *J Microbiol Biotechnol* 2011; 21: 391-9. (doi:10.3168/jds.2019-16775)
- 34 Zasloff M. Observations on the remarkable (and mysterious) wound-healing process of the bottlenose dolphin. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 2503-5. (doi: 10.1016/j.jfca.2020.103418)
- 35 Hamad B. The antibiotics market. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 675-6. (doi: 10.1111/1471-0307.12443)
- 36 Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS. Antifungal free fatty acids: a review. In: Méndez-Vilas A, Ed. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, Badajoz: Formatex 2011; 1: 61-71. (doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049)
- 37 El Fakharany E., El-Baky N.A., Linjawi M.H., AlJaddawi A.A., Saleem T.H., Nassar A.Y., Osman A., Redwan E.M. Influence of camel milk on the hepatitis C virus burden of infected patients. *Exp. Ther. Med.* 2017;13:1313–1320. (doi: 10.3892/etm.2017.4159)
- 38 Khatoon H., Ikram R., Anser H., Naeem S., Kha(n S.S., Fatima S., Sultana N., Sarfaraz S. Investigation of anti-inflammatory and analgesic activities of camel milk in animal models. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2019;32:1879–1883. . (doi: 10.1108/nfs-07-2015-0085)
- 39 Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS. Antifungal free fatty acids: a review. In: Méndez-Vilas A, Ed. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, Badajoz: Formatex 2011; 1: 61-71.(doi: 10.1139/cjps-2020-0113)
- 40 Zouari A., Schuck P., Gaucheron F., Triki M., Delaplace G., Gauzelin-Gaiani C., Lopez C., Attia H., Ayadi M.A. Microstructure and chemical composition of camel and cow milk powders' surface. *LWT.* 2019;117:108693. (doi: 10.1016/j.lwt.2019.108693)
- 41 Said Zibae., Syed Musa al-reza Hosseini., Mahdi Yousefi., Ali Taghipour., Mohammad Ali Kiani., and Mohammad Reza Noras. Nutritional and Therapeutic Characteristics of Camel Milk in Children: A Systematic Review. *Electronic Physician.* 2015;7. doi:10.19082/1523
- 42 Jilo Kula, Dechasa Tegegne, Jimma university school of veterinary medicine: chemical composition and medicinal values of camel milk. *International Journal of Research Studies in Biosciences.* (doi.org/10.20431/2349-0365.0404002)
- 43 A.S. Shuvarikov., E.A. Yurova., O.N. Pastukh. Quality indicators of cow, goat and camel milk with account of allergenicity. (doi: 10.26897/0021-342X-2017-5-115-123)

Г.К. БЕЙСЕМБЕКОВА^{1*}, Ш. КАНАЯТ², М.Х. НАРМУРАТОВА²

¹Научно – производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: beisebekova.gaukhar@mail.ru

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И СВОЙСТВА МАСЛА ВЕРБЛЮЖЬЕГО МОЛОКА

Аннотация

В статье верблюжье молоко описано как натуральный функциональный продукт, его химический состав и физические свойства отличаются от молока других животных. В молоке подтверждена биологическая ценность незаменимых полиненасыщенных жирных кислот, триацилглицеридов, диацилглицеридов, многих фосфолипидов и антиканцерогенные, противомикробные, противовоспалительные и иммунодепрессивные свойства, которые не могут быть синтезированы в организме человека. Сегодня в связи с развитием инфекционных заболеваний и повышением резистентности микроорганизмов к антибиотикам антимикробная активность жирных кислот рекомендуется как незаменимый продукт при лечении и профилактике заболеваний. Целью настоящего исследования является анализ литературных данных о возможностях использования верблюжьего молока в лечебных целях и особенностях его жирнокислотного состава.

Ключевые слова: молочный жир, молочные жирные кислоты, антимикробная активность, верблюжье молоко.

IRSTI: 65.63.03

G.K. BEISEMBEKOVA^{1*}, Sh. KANAYAT², M.Kh. NARMURATOVA²

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: beisebekova.gaukhar@mail.ru

FATTY ACID COMPOSITION AND PROPERTIES OF CAMEL MILK OIL

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.02

Abstract

The article describes camel milk as a natural functional product, its chemical composition and physical properties differ from the milk of other animals. Milk has confirmed the biological value of essential polyunsaturated fatty acids, triacylglycerides, diacylglycerides, many phospholipids and anti-carcinogenic, antimicrobial, anti-inflammatory and immunosuppressive properties that cannot be synthesized in the human body. Today, due to the development of infectious diseases and increased resistance of microorganisms to antibiotics, antimicrobial activity of fatty acids is recommended as an indispensable product in the treatment and prevention of diseases. The purpose of this study is to analyze the literature data on the possibilities of using camel milk for medicinal purposes and the features of its fatty acid composition.

Keywords: milk fat, milk fatty acids, antimicrobial activity, camel milk.

Today it is known that understanding the relationship between the components of milk fat, proper nutrition and health, lifestyle improvement is one of the main concepts of disease prevention and well-being. Milk consumption by all mammals except cows has increased by 17% in all countries over the past 50 years [1]. Milk is considered one of the most important foods for humans and animals and acts as a complete food thanks to important components such as carbohydrates, proteins, fats, vitamins and minerals. The composition of the milk depends on many

factors, for example, the health of the animal, especially the condition of the mammary gland, the influence of the photoperiod on the seasons, the nutrition of the animal, genetic factors and the storage temperature of the milk.

Milk fat contains essential polyunsaturated fatty acids, short chain fatty acids, many phospholipids, and fat-soluble vitamins that cannot be synthesized by the human body. All this determines the unique biological value of milk fat.

Nonspecific secretory defense factors found in milk are part of an innate defense system that phylogenetically predates the adaptive immune system, such as antibodies found only in vertebrates. Such nonspecific protective factors include lipids, lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme, and receptor oligosaccharides. Such non-specific factors have been shown to inactivate or reduce the infectivity of viruses, bacteria, protozoa and other microorganisms.

Fat content of camel milk and its difference from fat content of cow's milk

Recently, camel milk has taken a special place in health promotion due to its medicinal and nutritional properties. The adhesive and antibacterial properties of camel milk oil have been determined. Camel milk oil is well absorbed because of its tiny granules. Low in cholesterol and saturated fatty acids, the level of essential fatty acids is higher than in cow's milk.

Fat is an important component of camel milk, including a complex mixture of natural fats, that is, it contains triglycerides, phospholipids, cholesterol and other elements [2, 3]. Another characteristic lipid property of camel milk are polyunsaturated fatty acids, that is, alpha-linolenic acid, eicosapentaenoic acid and arachidonic acid [4, 5], which in comparison with the milk of other mammalian species are considered the best sources of fat for people at risk of cardiovascular diseases associated with lipids [6].

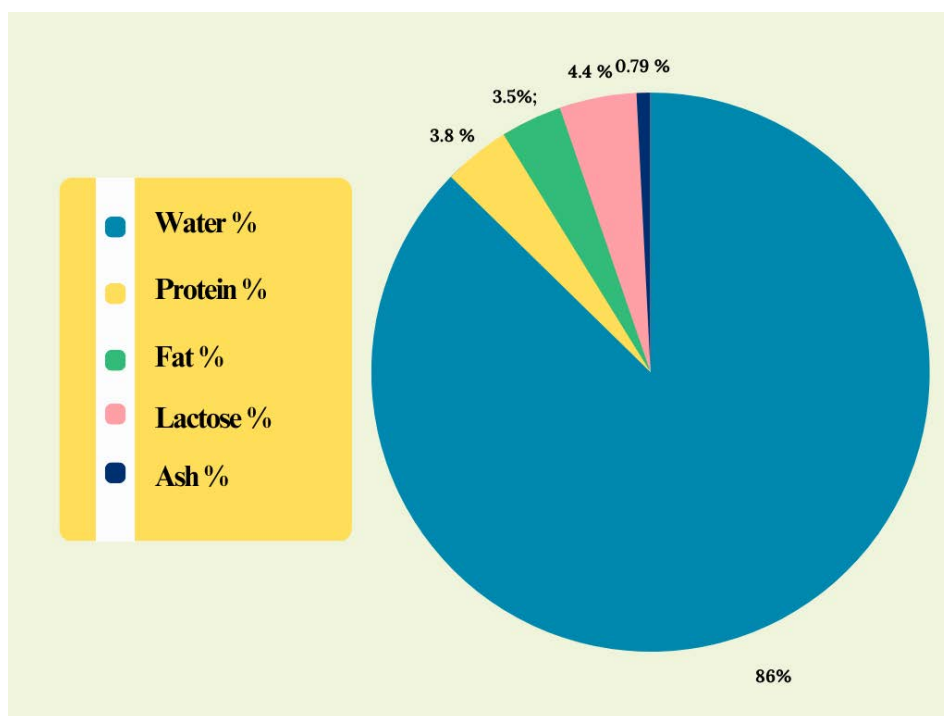


Figure 1 – Chemical composition of camel milk [41]

In recent years, much attention has been paid to the development of low-saturated and high-saturated dairy products with a high content of biologically active components. In addition, significant progress has been made in identifying a wide range of components contained in dairy oil. Thus, many studies have been conducted on camel milk oil and its effect on human health. A positive relationship was found between camel milk and human health, which led to a dramatic change in the recognition of the fatty components of camel milk and the attitude towards it as a healthy food. Camel milk oil differs from the fats of other dairy mammals in that it is easily

digested in the human body.

Saturated fatty acids, camel milk has a higher level of monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids compared to cow's milk. Long-chain fatty acids and saturated fatty acids are often found in camel milk, which gives them a unique opportunity to reduce the incidence of lipid-related cardiovascular diseases by 35-50% [7]. The fatty acids in camel milk are rich in conjugated linoleic acid compared to breast milk. Linoleic acid is recognized for its benefits in lowering blood glucose levels and preventing osteoporosis, improving fat metabolism and activating the immune system [8, 9]. In addition, it prevents the occurrence and progression of cancer of the stomach, colon, breast and skin. In addition, linoleic acid isomers are known to play an important role in the prevention of obesity. Camel milk oil usually has many medicinal properties, as it has been found to have antidiabetic, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, hypotensive and hypoallergenic properties.

Table 1- Chemical composition of milk of different species [42]

| Proximate | Water % | Protein % | Fat % | Ash % | Lactose % |
|-----------|---------|-----------|----------|---------|-----------|
| Camel | 86-88 | 3.0-3.9 | 2.9-5.4 | 0.6-0.9 | 3.3 |
| Cow | 85-87 | 3.2-3.8 | 3.7-4.4 | 0.7-0.8 | 4.8-4.9 |
| Bufallo | 82-84 | 3.3-3.6 | 7.0-11.5 | 0.8-0.9 | 4.5-5.0 |
| Sheep | 79-82 | 5.6-6.7 | 6.9-8.6 | 0.9-0.1 | 4.3-4.2 |
| Goat | 87-88 | 2.9-3.7 | 4.0-4.5 | 0.8-0.9 | 3.6-4.2 |
| Human | 88-89 | 1.1-1.3 | 3.3-4.7 | 0.2-0.3 | 6.8-7.0 |

Fatty acid composition of camel milk oil

Camel milk oil is 1.2-5.4%, and the total amount of camel milk is 3.29% [10] and consists mainly of triacylglycerols, as well as cholesterol and phospholipids.

The fatty acid composition of milk fat is complex and, depending on the saturation level, is divided into three groups.

Saturated fatty acids are the most common fatty acids and account for 78.33% of the total amount of fatty acids in camel milk with a lower percentage compared to cow's milk (46-66%) [11]. The most dominant saturated fatty acids are C16:0, followed by C18:0 and C14:0. From a dietary point of view, it has been found that saturated fatty acids C18 have a neutral effect on health, while saturated fatty acids C14 and C16 are considered harmful because they are associated with higher concentrations of low-density lipoprotein cholesterol in human serum [12]. High consumption of saturated fatty acids has a negative effect on health, since it suppresses the metabolism of n-6 fatty acids and causes a deficiency of polyunsaturated fats [13]. In addition, high intake of saturated fatty acids is associated with an increased risk of coronary heart disease [14]. Among the detected (C10-C14) saturated fatty acids, there is a significant concentration of fatty acids with an average chain length. This is a useful aspect, since fatty acids with an average chain length are easier to digest and metabolize than fatty acids with a long chain [15]. Camel is a ruminant animal that can produce fatty acids by fermentation of cellulose (C4-C8). However, the concentration of saturated fatty acids in camel milk (C4-C8) is lower compared to other types of ruminants, such as sheep and goats. A possible explanation for this low concentration may be due either to rapid metabolism in camel tissues before they are excreted into milk [16], or to other feeding habits of camels. This gives camel milk some special nutritional properties, since (C4-C8) the content of saturated fatty acids is largely similar to mother's milk.

Monounsaturated fatty acids are the second type of fatty acids contained in camel milk fat, mainly represented by oleic acid (18:1 n-9), which is 5.15-32.88% of the total fatty acid content, followed by palmitic acid (16:1). The content of monounsaturated fatty acids in camel milk fats is slightly higher than in milk fats of other mammals [17]. The high level of monounsaturated fatty acids in camel milk is explained either by the slowing down of fermentation in the posterior intestine, or by the increased activity of desaturase of fatty acids responsible for the biosynthesis of monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids in camel milk [18].

Polyunsaturated fatty acids constitute 2.7–8.46% of total fatty acids in camel milk, which is higher than cow's milk (1.89%) [19] but still less than human milk (10–20%). Ruminants are generally low in polyunsaturated fatty acids due to bacterial biohydrogenation. It should be noted that polyunsaturated fatty acids play an important role in the growth of the brain of newborns, as well as in the retina and cognitive functions. Among polyunsaturated fatty acids, linoleic acid (C18:2 n-6) and α -linolenic acid are the major n-6 polyunsaturated fatty acids and n-3 polyunsaturated fatty acids, respectively. Linolenic acid ranges from 0.17 to 3.31%, and α -linolenic acid ranges from 0.05 to 2.16% of total fatty acids. The percentage of fatty acids in camel milk is 4-16 [20] times lower than that of human milk, although the percentage of linoleic acid in camel milk is 1.12% higher than that of cow's milk [21].

Table 2 – Fatty acid composition of camel milk oil [43]

| Types of fatty acids | Amount % |
|---|----------------|
| Linoleic | 3,1558±0,4472 |
| Linolenic | 0,9187±0,2139 |
| Arachidonic | 0,0299±0,0127 |
| Amount of unsaturated fatty acids | 61,7018±2,5735 |
| Amount of monounsaturated fatty acids | 32,9150±2,6181 |
| The amount of polyunsaturated fatty acids | 5,1262±0,2700 |
| Omega-3 | 0,6067±0,0072 |
| Omega-6 | 4,5195±0,2637 |

α -linolenic acid is the main omega-3 fatty acid in milk. It was found that the proportion of α -linolenic acid in camel milk is 1 times higher than in breast milk and 10-13 times higher than in cow's milk [22, 23], which is due to its antiarrhythmic effect, positive effect on neurological activity (by reducing damage to the central nervous system) and protective the effect of coronary heart disease. Camel milk oil also contains conjugated linoleic acid with several different isomers formed during the biohydrogenation of ruminants [24]. Rumic acid and C12 are the two main isomers of rumic acid found in camel milk, which is 0.80 ± 0.15 and 0.06 ± 0.02 total fatty acids, respectively [25]. Compared with breast milk, the fats in camel milk contained a higher content of conjugated linoleic acid. Conjugated linoleic acid has been reported to have a cytotoxic effect on tumor cells [26], indicating that it is beneficial to human health.

Eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and arachidonic acid are among the polyunsaturated fatty acids observed in small amounts. It is reported that the percentage of eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and arachidonic acid in camel milk is lower than in breast milk (1%). On the contrary, one study showed that camel milk contains eicosapentaenoic acid and arachidonic acid (0.14 and 1.35 g/100 g, respectively) from breast milk (0.03 and 0.67 g/100 g, respectively) [27]. However, these results need to be further confirmed by conducting additional studies of camel and breast milk.

Antibacterial properties of fatty acids in milk

The antimicrobial properties of fatty acids in milk are well known, and these compounds prevent the growth of bacteria, fungi and other microbes by acting on several cellular targets, including the cell membrane and its components, or act directly on the destruction of life. Antimicrobial properties of fatty acids have been studied for decades, and these compounds serve to protect against microbial community in the innate immunity of humans and animals, especially mucous membranes and skin [28-34]. However, the constant need to search for and develop new compounds against microorganisms is now widely recognized due to the evolution of microbes into modern agents, especially for the treatment of drug-resistant human infections.

The presence of fatty acids in milk has many advantages due to its antimicrobial properties. It has an antagonistic effect against gram-positive and Gram-negative bacteria, mycobacteria, archaea, fungi and yeast, shell viruses, protozoa and eukaryotic algae [35, 36]. As a result, fatty acids are antifungal agents in various biotechnological industries. In particular, saturated fatty

acids capric acid (C10:0) and lauric acid (C12:0) exhibit the widest spectrum of antimicrobial activity [37]. In many cases, free fatty acids exhibit antimicrobial activity in micro- and millimolar concentrations [38].

The mechanism of antimicrobial action of fatty acids can be inhibitory or acidic, and it depends on many factors, including the fatty acid under study and its concentration, the target microorganism and its physiological state, as well as interactions [39].

In addition to antibacterial properties, fatty acids also exhibit biological antiviral activity. Among them, the anti-inflammatory properties of fatty acids are used to treat skin infections. Several researchers have used fatty acids as agents for the treatment and prevention of sexually transmitted diseases [40], as well as for the prevention of gum disease, caries and gastrointestinal infections.

Conclusion

Thus, it has been estimated that milk fat contains about 500 fatty acids, and about 150 have been identified to date. Milk fat triacylglycerols are synthesized from more than 400 different fatty acids, which makes milk fat the most complex of all natural oils. Lactic fatty acids serve not only as nutrients, but also as antimicrobial agents that form a system of protection against microbial infections that occur on the mucous membranes. The lipid fraction of milk exhibits antimicrobial activity in the gastrointestinal tract of newborns as a result of lipolytic activity, which converts milk triglycerides into antimicrobial fatty acids and monoglycerides.

In recent years, much attention has been paid to the development of low-saturated and high-saturated dairy products with a high content of biologically active components. In addition, significant progress has been made in identifying a wide range of components contained in dairy oil. Thus, many studies have been conducted on camel milk oil and its effect on human health. A positive relationship was found between camel milk and human health, which led to a dramatic change in the recognition of the fatty components of camel milk and the attitude towards it as a healthy food. Camel milk oil differs from the fats of other dairy mammals in that it is easily digested in the human body.

References:

- 1 Khalesi M., Salami M., Moslehishad M., Winterburn J., Moosavi-Movahedi A.A. *Biomolecular content of camel milk: A traditional superfood towards future healthcare industry. Trends Food Sci. Technol.* 2017; 62:49–58. (doi: 10.1016/j.tifs.2017.02.004)
- 2 Smiddy M.A., Huppertz T., van Ruth S.M. Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species. *Int. Dairy J.* 2012; 24:64–69. (doi: 10.1016/j.idairyj.2011.07.001)
- 3 Haddad I., Mozzon M., Strabbioli R., Frega N.G. Stereospecific analysis of triacylglycerols in camel (*Camelus dromedarius*) milk fat. *Int. Dairy J.* 2010; 20:863–867. (doi: 10.1016/j.idairyj.2010.06.006)
- 4 Maqsood S., Al-Dowaila A., Mudgil P., Kamal H., Jobe B., Hassan H.M. Comparative characterization of protein and lipid fractions from camel and cow milk, their functionality, antioxidant and antihypertensive properties upon simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chem.* 2018; 279:328–338. (doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.011)
- 5 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Lipid Composition Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61:7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452y)
- 6 Nikkhah A. Science of Camel and Yak Milks: Human Nutrition and Health Perspectives. *Food Nutr. Sci.* 2011;2:667–673. (doi: 10.4236/fns.2011.26092)
- 7 Nikkhah A. Science of Camel and Yak Milks: Human Nutrition and Health Perspectives. *Food Nutr. Sci.* 2011;2:667–673. (doi: 10.4236/fns.2011.26092)
- 8 Dreiuicker J., Vetter W. Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction. *Food Chem.* 2011;126:762–771. (doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.061)
- 9 Teng F., Wang P., Yang L., Ma Y., Day L. Quantification of Fatty Acids in Human, Cow, Buffalo, Goat, Yak, and Camel Milk Using an Improved One-Step GC-FID Method. *Food Anal.*

Methods. 2017;10:2881–2891. (doi: 10.1007/s12161-017-0852-z)

10 Singh R., Mal G., Kumar D., Patil N.V., Pathak K.M.L. Camel Milk: An Important Natural Adjuvant. *Agric. Res.* 2017;6:327–340. (doi: 10.1007/s40003-017-0284-4)

11 Walter L., Shrestha P., Fry R., Leury B., Logan A. Lipid metabolic differences in cows producing small or large milk fat globules: Fatty acid origin and degree of saturation. *J. Dairy Sci.* 2020; 103:1920–1930. (doi: 10.3168/jds.2019-16775)

12 Singh R., Mal G., Kumar D., Patil N.V., Pathak K.M.L. Camel Milk: An Important Natural Adjuvant. *Agric. Res.* 2017;6:327–340. (doi: 10.1007/s40003-017-0284-4)

13 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Анализ липидного состава молочных жиров разных видов млекопитающих: потенциал для использования в качестве заменителей жира грудного молока. *Дж. Агр. Пищевая хим.* 2013; 61 :7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452y)

14 Ohlsson L. Dairy products and plasma cholesterol levels. *Food Nutr. Res.* 2010;54. (doi: 10.3402/fnr.v54i0.5124)

15 Saini R.K., Keum Y.-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life Sci.* 2018;203:255–267. (doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049)

16 Virtanen J.K., Mursu J., Tuomainen T.-P., Voutilainen S. Dietary fatty acids and risk of coronary heart disease in men: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014;34:2679–2687. (doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304082)

17 Konuspayeva G., Lemarie É., Faye B., Loiseau G., Montet D. Fatty acid and cholesterol composition of camel's (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* and hybrids) milk in Kazakhstan. *Dairy Sci. Techn.* 2008;88:327–340. (doi: 10.1051/dst:2008005)

18 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Lipid Composition Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452y)

19 Yang J., Zheng N., Wang J., Yang Y. Comparative milk fatty acid analysis of different dairy species. *Int. J. Dairy Technol.* 2017;71:544–550. (doi: 10.1111/1471-0307.12443)

20 Chamekh L., Calvo M., Khorchani T., Castro-Gómez P., Hammadi M., Fontecha J., Yahyaoui M.H., Latifa C., Marivi C., Touhami K., et al. Impact of management system and lactation stage on fatty acid composition of camel milk. *J. Food Compos. Anal.* 2020;87:103418. (doi: 10.1016/j.jfca.2020.103418)

21 Walter L., Shrestha P., Fry R., Leury B., Logan A. Lipid metabolic differences in cows producing small or large milk fat globules: Fatty acid origin and degree of saturation. *J. Dairy Sci.* 2020;103:1920–1930. (doi: 10.3168/jds.2019-16775)

22 Wei W., Jin Q., Wang X. Human milk fat substitutes: Past achievements and current trends. *Prog. Lipid Res.* 2019;74:69–86. (doi: 10.1016/j.plipres.2019.02.001)

23 Zou X., Huang J., Jin Q., Guo Z., Liu Y., Cheong L.-Z., Xu X., Wang X. Lipid Composition Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:7070–7080. (doi: 10.1021/jf401452y)

24 Teng F., Wang P., Yang L., Ma Y., Day L. Quantification of Fatty Acids in Human, Cow, Buffalo, Goat, Yak, and Camel Milk Using an Improved One-Step GC-FID Method. *Food Anal. Methods.* 2017;10:2881–2891. (doi: 10.1007/s12161-017-0852-z)

25 Saadaoui B., Henry C., Khorchani T., Mars M., Martin P., Cebo C. Proteomics of the milk fat globule membrane from *Camelus dromedarius*. *Proteomics.* 2013;13:1180–1184. (doi: 10.1002/pmic.201200113)

26 Haddad I., Mozzon M., Strabbioli R., Frega N.G. Stereospecific analysis of triacylglycerols in camel (*Camelus dromedarius*) milk fat. *Int. Dairy J.* 2010;20:863–867. (doi: 10.1016/j.idairyj.2010.06.006)

27 Dreiucker J., Vetter W. Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction. *Food Chem.* 2011;126:762–771. (doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.061)

28 Teng F., Wang P., Yang L., Ma Y., Day L. Quantification of Fatty Acids in Human, Cow, Buffalo, Goat, Yak, and Camel Milk Using an Improved One-Step GC-FID Method. *Food Anal. Methods.* 2017;10:2881–2891. (doi: 10.1007/s12161-017-0852-z)

29 Thormar H. Antibacterial effects of lipids: historical review (1881 to 1960). In: Thormar H, Ed. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Philadelphia: John Wiley & Sons, Ltd 2011: 25-45.

- 30 Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 85: 1629-42. (doi: 10.3390/ijms19041114)
- 31 Lee JT, Jansen M, Yilma AN, Nguyen A, Desharnais R, Porter E. Antimicrobial lipids: Novel innate defense molecules are elevated in sinus secretions of patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhino Allergy* 2010; 24: 99-104. (doi: 10.20431/2349-0365.0404002)
- 32 Nakatsuji T, Kao MC, Zhang L, Zouboulis CC, Gallo RL, Huang C-M. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating -defensin-2 expression. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 985-94. (doi: 10.1016/j.plipres.2019.02.001)
- 33 Chen C-H, Wang Y, Nakatsuji T, Liu Y-T, Zouboulis CC, Gallo RL, et al. An innate bactericidal oleic acid affective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A therapy concordant with evolutionary medicine. *J Microbiol Biotechnol* 2011; 21: 391-9. (doi: 10.3168/jds.2019-16775)
- 34 Zasloff M. Observations on the remarkable (and mysterious) wound-healing process of the bottlenose dolphin. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 2503-5. (doi: 10.1016/j.jfca.2020.103418)
- 35 Hamad B. The antibiotics market. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 675-6(doi: 10.1111/1471-0307.12443)
- 36 Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS. Antifungal free fatty acids: a review. In: Méndez-Vilas A, Ed. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, Badajoz: Formatex 2011; 1: 61-71. (doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049)
- 37 El Fakharany E., El-Baky N.A., Linjawi M.H., AlJaddawi A.A., Saleem T.H., Nassar A.Y., Osman A., Redwan E.M. Influence of camel milk on the hepatitis C virus burden of infected patients. *Exp. Ther. Med.* 2017;13:1313–1320. (doi: 10.3892/etm.2017.4159)
- 38 Khatoun H., Ikram R., Anser H., Naeem S., Khan S.S., Fatima S., Sultana N., Sarfaraz S. Investigation of anti-inflammatory and analgesic activities of camel milk in animal models. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2019;32:1879–1883. (doi: 10.1108/nfs-07-2015-0085)
- 39 Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS. Antifungal free fatty acids: a review. In: Méndez-Vilas A, Ed. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, Badajoz: Formatex 2011; 1: 61-71. (doi: 10.1139/cjps-2020-0113)
- 40 Zouari A., Schuck P., Gaucheron F., Triki M., Delaplace G., Gauzelin-Gaiani C., Lopez C., Attia H., Ayadi M.A. Microstructure and chemical composition of camel and cow milk powders' surface. *LWT.* 2019;117:108693. (doi: 10.1016/j.lwt.2019.108693)
- 41 Said Zibae., Syed Musa al-reza Hosseini., Mahdi Yousefi., Ali Taghipour., Mohammad Ali Kiani., and Mohammad Reza Noras. Nutritional and Therapeutic Characteristics of Camel Milk in Children: A Systematic Review. *Electronic Physician.* 2015;7. (doi:10.19082/1523)
- 42 Jilo Kula, Dechasa Tegegne, Jimma university school of veterinary medicine: chemical composition and medicinal values of camel milk. *International Journal of Research Studies in Biosciences.* (doi.org/10.20431/2349-0365.0404002)
- 43 A.S. Shuvarikov,. E.A. Yurova,. O.N. Pastukh. Quality indicators of cow, goat and camel milk with account of allergenicity. (doi 10.26897/0021-342x-2017-5-115-123)

МРНТИ: 34.25.01; 34.25.29

А.Н. МАНАКБАЕВА*, П.Г. АЛЕКСЮК

Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

*e-mail: adolat.manakbayeva@mail.ru

БАКТЕРИОФАГИ: ВЕК СПУСТЯ, СНОВА В ЦЕНТРЕ ВНИМАНИЯ**doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.03****Аннотация**

Одной из основных проблем современного здравоохранения является повсеместное распространение множественной лекарственной устойчивости у патогенных микроорганизмов. По оценкам ВОЗ к 2050 году смертность от инфекционных заболеваний достигнет 10 миллионов человек в год, что сопоставимо с показателями начала XX века, до внедрения антибиотиков в медицинскую практику. В создавшейся ситуации поиск, разработка и внедрение альтернативных способов борьбы с бактериальными инфекциями имеют первостепенное значение для сохранения жизни и здоровья человека.

Особый интерес представляет собой фаготерапия – использование вирусов как естественных врагов бактерий для борьбы с ними. Бактериофаги могут быть эффективной альтернативой антибиотикам или их дополнением при лечении устойчивых бактериальных инфекций.

В данной статье авторами представлен краткий исторический очерк, показывающий стадии развития фаготерапии, описаны исследования раннего применения бактериофагов в борьбе с бактериальными инфекциями, ещё до открытия и внедрения антибиотиков. Также приведены примеры исследований бактериофагов и успешного их клинического применения уже в современный период – эпоху глобального распространения антибиотикостойчивости.

Представленный обзор позволяет составить целостную картину становления методов фаготерапии, показывает её эффективность и актуальность в борьбе с антибиотикостойчивыми бактериальными инфекциями и подчёркивает важность дальнейших исследований, направленных как на поиск более эффективных литических штаммов бактериофагов, так и на разработку современных методов фаготерапии и их широкомасштабного внедрения в медицинскую практику.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, бактериофаги, фаговая терапия, лизис, бактериальные инфекции.

С каждым годом антибиотикорезистентность бактерий возрастает до угрожающе высоких уровней. Сейчас уровень смертности из-за снижения эффективности антибиотиков составляет 700 тысяч человек в год. ВОЗ предсказывает, что к 2050 году эта цифра увеличится до 10 миллионов [1]. Человечество вступает в пост-антибиотическую эру, когда инфекционные заболевания могут опять стать основной причиной смертности человека, а незначительные травмы приводить к летальным исходам. Хотя в настоящее время ведется разработка некоторых антибиотиков, ни один из них, как ожидается, не будет эффективен против наиболее опасных форм бактерий с устойчивостью к антибиотикам. В связи с этим, особенно актуальна разработка препаратов, представленных нетрадиционными агентами. Примерами их могут быть бактериофаги – вирусы бактерий. Бактериофаги открывают новые возможности для борьбы с инфекциями, вызванными резистентными бактериями, их можно использовать как дополнение к антибиотикотерапии или в качестве альтернативы антибиотикам.

Антибиотики были открыты Александром Флемингом в 1928 году, в то время как первые предпосылки открытия бактериофагов появились ещё в 1896 году. Первым явлением массовой гибели бактерий заметил английский бактериолог Э.Х. Хэнкин, проводивший эксперимент по подсчету холерного вибриона в реке Ганг. При подсчете Хэнкин обнаружил, что образцы воды, взятые при входе в город Агра, содержат в 1111 раз больше инфекционного агента, чем образцы, взятые при выходе из города. Озадаченный полученными результатами, Хэнкин решил изучить свойства воды и выяснил, что вода

сохраняла свои лизирующие свойства даже после прохождения через бактериальный фильтр, но теряла их после кипячения. Тогда Хэнкин не смог объяснить данное явление самоочищения, и оно получило название «парадокса Хэнкина» [2]. В 1898 году русским микробиологом Николаем Гамалея была опубликована статья, посвященная борьбе с бациллой сибирской язвы. В своем эксперименте Гамалея использовал раствор дистиллированной воды с неизвестным агентом, который приводил к лизису бацилл и полностью уничтожал свежие культуры возбудителя [3]. Следующий значимый вклад в открытие бактериофагов внес английский микробиолог Фредерик Туорт. В своей статье, опубликованной в 1915 году, он описал разрушение гнойного стафилококка перевиваемым фильтрующим агентом. Однако, он не смог объяснить причину данного явления [4]. Объяснить и доказать его в 1917 году смог франко-канадский ученый Феликс д'Эрелль, который сталкивался с похожим явлением и раньше. В 1910 году, находясь в Мексике и Тунисе во время нашествия саранчи, он инокулировал фекалии больных и мертвых насекомых, чтобы найти коккобациллы, микроорганизмы, вызывающие смертельную инфекцию саранчи. Осмотрев чашки Петри с семенами, он обнаружил аномалии роста микробной культуры — округлые прозрачные участки диаметром 2-3 мм на поверхности питательного агара. Он соскребал эти прозрачные бляшки с поверхности агара и готовил мазки. Однако, он ничего не видел под микроскопом. На основании этого и других экспериментов он пришел к выводу, что агент, вызывающий образование прозрачных участков на микробной культуре, должен быть настолько мелким, чтобы свободно проходить через задерживающие бактерии фильтры. После публикации Туорта он решил снова обратить свое внимание на эти агенты. Открытие или повторное открытие бактериофагов Феликсом д'Эреллем после Фредерика Туорта часто связывают со вспышкой тяжелой геморрагической дизентерии среди французских войск, расквартированных на окраине Парижа в 1915 году. В ходе исследования заболевания он сделал свободные от бактерий фильтраты образцов фекалий пациентов, смешал и инкубировал их со штаммами *Shigella sp.*, выделенными от пациентов. Часть смеси была привита экспериментальным животным (в рамках исследований д'Эрелле по разработке вакцины против бактериальной дизентерии), а часть была помещена на агаровую среду для наблюдения за ростом бактерий. На этих агаровых культурах д'Эрелль снова наблюдал появление небольших прозрачных участков, которые он сначала назвал пятнами, затем белыми пятнами, а позже – бляшками [5,6]. Результаты исследований д'Эрелля были представлены на сентябрьском заседании Академии наук в 1917 году и впоследствии опубликованы в сборнике материалов заседания [7]. В отличие от Хэнкина и Туорта, д'Эрелль почти не сомневался в природе явления и предположил, что оно вызвано вирусом, способным паразитировать на бактериях. Название "бактериофаг" (от "бактерия" и греческого *φαγω* - «пожираю») также было предложено д'Эрелле [8]. Таким образом, первая статья, опубликованная д'Эреллем, произвела большой фурор в научном сообществе, вызвав волну исследований все большего числа ученых, доказывающих его правоту. Но самым важным достижением Феликса д'Эрелле является то, что он выдвинул идею использования бактериофагов для лечения бактериальных заболеваний человека и животных. За эту идею он заслужил Нобелевскую премию, хотя он так и не был удостоен ее [9].

Основоположителем фаготерапии в Советском союзе был грузинский микробиолог Георгий Элиава. Элиава занимался изучением колоний различных бактерий и методами борьбы с ними. Так, в ходе своих работ Элиава обнаружил бактерицидное действие воды в реке Куре. Это было в том же году, когда д'Эрелль обнародовал свое открытие, и стало ясно, что это явление можно объяснить действием холерного бактериофага. В 1919 году, работая в Институте Пастера в Париже, Элиава познакомился с Феликсом д'Эреллем. Во время своей работы Г.Элиава был очарован идеями д'Эрелля об использовании бактериофагов для терапии. И в 1923 году Г.Элиава инициировал создание Института бактериологии

(нынешний Институт бактериофагов, микробиологии и вирусологии имени Г.Элиавы в Тбилиси, Грузия) [10].

Первые попытки терапевтического использования бактериофагов

Вскоре после своего открытия, д'Эрелль начал прокладывать путь к терапевтическому использованию фагов. Первые исследования проводились в 1919 году во время лечения дизентерии 12-летнего мальчика. Лечение проводилось под клиническим наблюдением профессора Виктора-Анри Хугинеля, заведующего педиатрией больницы [8]. Для уверенности в безопасности препарата, сначала его принял сам д'Эрелль, профессор и несколько интернов больницы. После однократного введения антидизентерийных фагов симптомы у пациента прекратились, и мальчик полностью выздоровел в течение нескольких дней. Эффективность фагового препарата была "подтверждена" когда еще три пациента с бактериальной дизентерией, получившие одну дозу препарата, начали выздоравливать в течение первых 24 часов. Однако результаты этих исследований были опубликованы не сразу, и поэтому первое сообщение о применении фагов для лечения инфекционных заболеваний человека появилось позже. В 1921 году бактериолог Ричард Брюнох и врач-исследователь Джозеф Майсин опубликовали работу, в которой рассказывалось об использовании бактериофагов для лечения стафилококкового заболевания кожи. Бактериофаги вводились в хирургически открытые раны и вокруг них, и авторы сообщили о регрессе инфекции в течение 24–48 часов [10-12].

Путь к коммерческому производству бактериофагов

Воодушевленные этими первыми результатами, д'Эрелль и другие продолжали исследования терапевтического использования фагов. В 1931 году д'Эреллем и Элиава были предприняты первые попытки терапевтического использования холерного бактериофага. Эти исследования проложили путь к первому коммерческому производству бактериофагов. Так, Институтом вакцин и сывороток в Тбилиси был произведен первый коммерческий препарат антихолерного фага, который нашел массовое применение для борьбы с эпидемиями, угрожавшими юго-восточным территориям СССР [13]. Согласно опубликованным в то время оценкам, благодаря применению бактериофагов удалось снизить смертность от холеры в Индии до 10% [13]. Этот факт описан самим д'Эрелле в книге "Бактериофаг и феномен оздоровления", изданной на русском языке в 1935 году в Тбилиси, Грузия. Но были и неудачи, так, при эпидемии холеры 1927 года в штате Пенджаб, Индия из 14 450 человек, фагами были вылечены только 73 человека. Сам д'Эрелль объяснял данный случай нежеланием и противодействием местных жителей приёму фаговых препаратов [14].

В своей книге д'Эрелль упоминает о создании двух промышленных центров по производству бактериофагов против холеры в 1931 году в Индии [13,14]. Коммерческая лаборатория д'Эрелле в Париже произвела по меньшей мере пять фаговых препаратов против различных бактериальных инфекций [13,14]. В 1924 году институт Освальдо Круза в Рио-де-Жанейро начал производство антидизентерийных бактериофагов с целью борьбы против дизентерии в странах Латинской Америки [14, 15]. В течение года институт произвел 10 000 флаконов фагов, которые были отправлены в больницы Бразилии [9]. Терапевтические фаги производились и в Соединенных Штатах. В 1940-х годах компания Eli Lilly выпустила семь фаговых препаратов, направленных против стафилококков, стрептококков, кишечной палочки и других бактериальных патогенов [5]. В состав препаратов входили фаголизированные, бактериологически стерильные бульонные культуры целевых бактерий, также эти же препараты выпускались в водорастворимой желеобразной основе. Они использовались для лечения различных инфекций, включая абсцессы, гнойные раны, вагиниты, острые и хронические инфекции верхних дыхательных путей, а также инфекции сосцевидного отростка. Однако эффективность фаговых препаратов была спорной [16, 17]. Это могло быть вызвано отсутствием жизнеспособных фагов, низким титром фагов или их узким спектром хозяев, как, например, было обнаружено в случае некоторых коммерческих антистафилококковых фаговых препаратов

[18]. Кроме того, после открытия и коммерциализации антибиотиков, производство терапевтических фагов в большинстве западных стран потеряло свою актуальность. Однако на территории бывшего Советского союза на протяжении всего XX столетия продолжалось активное изучение, разработка и внедрения новых методов фаготерапии.

В настоящее время, когда инфекции, вызванные полирезистентными бактериями, стали всемирной угрозой [19], пациенты со всего мира проходят лечение методами фаготерапии в Институте бактериофагов, микробиологии и вирусологии имени Элиавы в Грузии [20]; а также в отделении терапии бактериофагами Института иммунологии и экспериментальной терапии имени Людвика Хиршфельда в Польше [21].

Некоторые компании в Соединенных Штатах, такие как OmniLytics Inc. и Intralytix Inc., разработали различные продукты бактериофагов для применения в качестве дезинфицирующих средств в пищевой промышленности, которые можно использовать против *Salmonella*, *E.coli* и *Listeria monocytogenes*. В Европе голландская компания Microcos BV также продавала бактериофаги против *Salmonella*, *E.coli*, а немецкая компания Fink Tec – против *E.coli* [22]. Ожидается более широкое применение бактериофагов в пищевой цепочке, включая сельское хозяйство и аквакультуру, где широкий спектр разнообразных патогенов растений и рыб наносит значительный экономический ущерб [23, 24].

Было предпринято несколько попыток создать надежные методы производства бактериофагов. Некоторые исследователи использовали теоретический подход с помощью имитационных моделей, в то время как другие применяли практический подход с помощью экспериментов. И хотя некоторые продукты бактериофагов уже поступили в продажу, эффективный, постоянный и контролируемый процесс производства бактериофагов еще не создан. Производство фагов в лабораториях можно считать рутинным процессом, и протоколы четко определены; однако эти процессы нелегко масштабировать. Промышленные предприятия в первую очередь заинтересованы в получении надежных методов производства фагов, позволяющих стандартизировать и масштабировать процесс. Однако решение данной задачи трудновыполнимо из-за биологической природы фагов, что ведёт к неконтролируемым изменениям при новых генерациях и мало предсказуемым взаимодействиям, происходящим между фагами и бактериями.

Массовое применение фагов при обработке ран

Как ранее было сказано, на территории бывшего Советского союза проводились активные исследования в области фаготерапии, всплеск которых приходится на годы Великой отечественной войны. Так, большинство испытаний фаговой терапии пришлось на 1930-1940 годы.

Первым фаговую терапию в хирургии начал использовать профессор медицины А. П. Цулукидзе. Экспериментальная серия фаговых препаратов, содержащих компоненты против бактерий, относящихся к видам *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* и *Proteus*, была испытана в конце 1930-х годов в хирургических и гинекологических клиниках Москвы [25]. Он подробно описывал симптомы, состояние раны, показатели больного и алгоритм лечения. Большинство пациентов, прибывших с передовой с ранениями, были прикованы к постели и находились в тяжелом состоянии: 38,3% имели повреждения мягких тканей и 61,7% - костей. В большинстве случаев фаги вводились в течение первых 6 дней после первичного заражения. Первоначально фаговая терапия применялась только в самых тяжелых случаях, когда ожидался летальный исход. Позже в исследование была вовлечена более широкая группа пациентов. В большинстве случаев бактериологический анализ указывал на наличие смешанных бактериальных инфекций [26]. Лишь в редких случаях у пациентов, прибывших непосредственно с поля боя, наблюдалась моноинфекция. Подкожные инъекции фагов проводились три-четыре раза каждый второй день, чтобы избежать развития антифаговых антител. Кроме того, фаги распылялись на верхнюю часть раны при каждой смене повязок. Согласно прямым отчетам того времени, лечение фагами

приводило к более быстрому снятию боли, улучшению общего состояния пациентов и явным симптомам заживления раны через 2–3 дня.

Война и необходимость в лечебных препаратах вдохновили советских врачей на проведение новых опытов с фагами и разработку новых методов введения фагов. Этот период был одним из самых плодотворных в развитии фаговой терапии в бывшем Советском Союзе [25, 27, 28]. Особенно интересна для военных хирургов книга А. П. Цулукидзе "Опыт применения бактериофагов в условиях военной травмы" [29], в которой обобщены результаты, полученные после Финской кампании. Цулукидзе [29] описал 20 госпитальных случаев, когда бактериофаги против анаэробных бактерий использовались в сочетании со стрепто- и стафило-бактериофагами. 17 из 20 раненых солдат получили смесь фагов непосредственно на поле боя, а трое лечились фагами по прибытии в госпиталь. Все 20 пациентов были в тяжелом состоянии, когда они прибыли в госпиталь, и бактериологические исследования показали, что все они были инфицированы *Clostridium perfringens*. В каждом случае раны были серьезными, включая 19 случаев ранений нижних конечностей. По данным А. П. Цулукидзе [29], существовали значительные различия в развитии инфекции между солдатами, получившими фаги вскоре после ранения, и теми, кто получил фаги позже. У солдат, получивших лечение раньше, раны быстрее очищались от инфекции, быстро появлялись грануляции, температура нормализовалась в более короткие сроки, а неприятный запах не появлялся или был незначительным. А. П. Цулукидзе [29] сообщил, что у солдат, получивших фаги на поле боя, не развилось никаких осложнений. Однако у двух пациентов, которые не получали фаги до прибытия в госпиталь, развился генерализованный сепсис, и они умерли. Основываясь на вышеупомянутых наблюдениях, А. П. Цулукидзе и др. [29] предположили, что инфекция *C. perfringens* обычно сопровождается стрептококковой и стафилококковой инфекциями, поскольку последние создают условия, благоприятные для роста видов *Clostridia*. Поэтому использование смеси фагов, направленной против всех трех бактерий, считалось полезным. А. П. Цулукидзе [29] предложил стратегию лечения анаэробных инфекций, основанную на комбинированном использовании фаговой терапии и антигангренозной сыворотки. Он предположил, что фаги будут лизировать бактерии, вызывающие инфекцию, а сыворотка нейтрализует токсины.

На конференциях, состоявшихся в марте, июне и декабре 1940 года были доложены методы и инструкции по внутримышечному и внутривенному применению фагов, разработанные Кокиным и его коллегами. Эти разработки были особенно важны в случаях генерализованных инфекций. Они были разработаны в результате наблюдения за случаями, связанными с дорожно-транспортными происшествиями и септическими инфекциями, проведенные в Остроумовской больнице в Москве [25]. Эти методы и инструкции были утверждены Военно-санитарным управлением Верховного Совета Красной Армии и применялись для лечения солдат Красной Армии во время Второй мировой войны и продолжались после нее.

В 1941 и 1946 годах Г.А. Кокиным были опубликованы обзоры по первому массовому применению фаговой терапии для хирургического и раневого лечения. Оно было связано с Финской кампанией 1939–1940 годов [27, 28]. В своих работах Г.А. Кокин описал применение смеси бактериофагов, инфицирующих анаэробов, стафилококков и стрептококков, произведенных в Институте бактериофагов, микробиологии и вирусологии имени Г.Элиавы в Грузии, для лечения газовой гангрены. Смесь была применена к 767 инфицированным солдатам. В 1947 году была опубликована работа, авторы которой использовали ту же смесь фагов [25]. Помимо терапевтического применения, этот фаговый препарат использовался мобильными санитарными бригадами в качестве экстренного лечения ран, профилактики газовой гангрены [25].

Лечение кишечных инфекций *Salmonella* и *Shigella*

В 1920-х и 1940-х годах кишечные инфекции, вызванные бактериями рода *Salmonella* и *Shigella* были огромной проблемой во всем мире [16, 25, 30–34]. Они послужили толчком

для множества исследований в области фаговой терапии. Так, в исследовании против инфекций *Salmonella typhi* и *S. paratyphi*, описанном в 1938 году, результаты оказались безуспешными. Фаги вводились перорально 60 пациентам один раз в день в дозе 10 мл в течение 10 дней. Было отмечено, что фаговая терапия не снизила уровень смертности, который остался на уровне 12% в 1936 году и был сопоставим с уровнем смертности в случае применения других видов лечения [34].

Несмотря на это, исследования по разработке терапевтических фагов в бывшем Советском Союзе продолжались. Так, например, интересное исследование было проведено Д.Г.Маноловым и его коллегами [35], которые сообщили о внутривенном применении бактериофагов для лечения брюшного тифа. Авторы вводили внутривенно 20–25 мл соответствующей суспензии бактериофагов, безопасность которых была доказана в экспериментах на кроликах и мышах. Через 15–20 мин после внутривенного введения фагов пациентам, больные отмечали озноб. Через 2–3 часа отмечалось повышение температуры, которое в некоторых случаях сопровождалось тошнотой и рвотой. Через 12–14 часов после введения фага температура нормализовалась, однако через 24 часа она снова поднималась до прежнего уровня. Это заставило авторов применять несколько инъекций фага каждый день или через день. К сожалению, в этом исследовании не было определено количество пациентов. Однако сравнение результатов вышеупомянутых исследований показало, что лизаты содержали живые бактериофаги, твердые клеточные остатки и растворимые клеточные компоненты, включая бактериальные антигены. Последние могут оказывать влияние на конечный результат терапии независимо от бактериофагов за счет стимуляции иммунной системы организма, как это наблюдается в случае вакцинации. В основном это белки и полисахариды, то есть вещества, которые могут вызывать аллергические реакции. Результаты исследований по использованию бактериофагов для лечения тифа привели авторов к следующим выводам: 1. Низкие дозы (2–10 мл) тифозных бактериофагов, вводимых перорально, неэффективны. Кроме того, пероральное введение бактериофагов нецелесообразно из-за специфичности патогенеза брюшного тифа. 2. Внутривенное введение 20–25 мл тифозного бактериофага, приготовленного в физиологическом растворе, ежедневно в течение 3 дней не сопровождалось какими-либо серьезными побочными эффектами. Однако это лечение привело к снижению температуры и сокращению лихорадочного периода, улучшению общего состояния больного и полному излечению [35]. Как часто наблюдались случаи полного излечения, неизвестно.

Самое широкое клиническое исследование терапевтического эффекта дизентерийных фагов было проведено и описано в 1939 году Сапиром [36]. Автор описал в общей сложности 1064 случая дизентерии, в которых использовали фаготерапию в двух различных клиниках Москвы. Группа пациентов включала 767 мужчин и 297 женщин в возрасте от новорожденных до 79 лет. Стандартная фаговая терапия с использованием препарата дизентерийного бактериофага, разработанного в Институте имени И.И.Мечникова в Москве, применялась в каждой возрастной группе, как описано ниже. Точное содержание этого препарата не указано. Суточная доза фага для взрослого составляла 20 мл, а для ребенка - 10 мл. Доза делилась на две порции и вводилась пациентам в полночь в день поступления и в 4:00 утра, чтобы минимизировать инактивацию фага остатками пищи. Сопоставимое время введения фага всем пациентам облегчало оценку результатов фаговой терапии. Пациенты получали магниево-содовый раствор сначала за 6 часов до фаговой терапии, а затем каждые 2 часа шесть раз в течение 12 часов. Взрослые получали 100 мл раствора при каждом введении, а дети - 10–50 мл в зависимости от возраста. Раствор вводился с целью создания оптимальных условий для размножения фага, а также для очищения кишечника. В течение первых 48 часов пациенты придерживались строгой диеты. Автор пришел к выводу, что применение этой дозы фага, разделенной на две порции и введенной в течение одного дня, было достаточным и не требовало повторения. Некоторые из пациентов подвергались либо серотерапии, либо неспецифической терапии. Иногда применялась даже комбинация фаговой и серотерапии.

В случаях тяжелой интоксикации применялось внутривенное переливание физиологического раствора с адреналином или глюкозой. В 15 наиболее тяжелых случаях в дополнение к фаговому препарату применялась антидизентерийная сыворотка, однако летального исхода избежать не удалось. Автор сделал вывод, что в тех случаях, когда серотерапия была безуспешной, фаговая терапия также оказалась неэффективной [36]. Средняя продолжительность заболевания составила 43,3 больничных дня. По мнению автора, применение фаговой терапии значительно сократило продолжительность пребывания в стационаре по сравнению с другими методами, основанными только на симптоматическом лечении или даже специфическом (серологическом) лечении. Автор подчеркнул ключевую роль раннего начала фаговой терапии для сокращения времени госпитализации. Кроме того, он сообщил, что обычно после 1–2 дней фаговой терапии наблюдается резкое улучшение состояния пациента, о чем свидетельствует менее частый и менее водянистый стул, не содержащий крови и/или слизи. По словам автора, наиболее заметный эффект наблюдался в случаях, когда патологические изменения не развивались глубже, чем катар и воспаление. Автор подчеркнул, что иногда фаги из препарата оказывались неспособными лизировать конкретный штамм, или токсический синдром был слишком сильным, или развивались вторичные инфекции, и, возможно, отсюда очевидная недостаточная эффективность фаговой терапии в этих случаях [36]. Автор также сообщил, что после 1 дня лечения фагами число пациентов с кровавым стулом уменьшилось со 100 до 74; на 5-й день лечения этот симптом остался только у 4 пациентов. После 1 недели фаговой терапии у 95% пациентов не наблюдалось патологических симптомов, и они могли быть выписаны из больницы. Летальный исход был зарегистрирован в 47 случаях (4,4%). Однако автор подчеркнул, что эти пациенты страдали от дизентерийного панколита и тяжелых дегенеративных изменений паренхимы различных органов, язв толстой кишки и т. д., характерных для длительной и тяжелой интоксикации, что подтверждено посмертными патоанатомическими исследованиями. Автор пришел к выводу, что: 1. Фаги следует давать каждому пациенту, у которого проявляются симптомы дизентерии, независимо от того, поступает ли пациент в больницу, приезжает на скорой помощи или обращается за медицинской помощью на дому. Эта мера будет иметь как лечебный, так и профилактический эффект. 2. Комбинированную фаго- и серотерапию следует применять в особых случаях, например, при гипертоксиозе у взрослых и для лечения токсического и субтоксического синдрома у маленьких детей. Во всех вышеперечисленных случаях автор также рекомендовал применение соответствующих доз сыворотки и ее введение не менее чем за 6 часов до начала фаговой терапии [36]. Что именно послужило основанием для последней рекомендации, остается неясным.

Текущее состояние исследований в области фаговой терапии

История фаготерапии увлекательна и в ней можно увидеть огромный потенциал в лечении бактериальных инфекций. Но в настоящее время фаготерапия относительно широко используется лишь на территории Восточной Европы и все еще не была одобрена Европейским Союзом или FDA США. Основные трудности с приемом связаны с:

- различиями в биологических, физических и фармакологических свойствах фагов по сравнению с обычными противомикробными препаратами;
- невозможностью стандартизировать фаговые препараты, так как бактериофаги – это биологические, самовоспроизводящиеся объекты и при каждой генерации происходят естественные изменения дочерних копий от материнских;
- необходимостью использования нескольких фаговых изолятов (коктейлей) из-за высокой специфичности фагов, что необходимо для более эффективного предполагаемого лечения, т. е. лечения, которое начинается до точного диагноза микробной этиологии;
- установленными правилами утверждения противомикробных препаратов, основанных на препаратах химического происхождения и, следовательно, менее подходящих для фагов [37].

В связи с упомянутыми выше проблемами, в современной медицине известны случаи лишь сострадательного лечения. Сострадательная медицина применима лишь в случаях, когда исчерпаны все одобренные терапевтические возможности. В таких случаях для лечения пациента разрабатываются индивидуальные лекарства вне клинических испытаний [38]. Предпосылка использования из соображений сострадания изложена в статье 37 «Хельсинкской декларации этических принципов медицинских исследований с участием людей», международного руководства по исследованиям на людях [39]. Официальный надзор за программами сострадательного использования варьируется от страны к стране, но осуществляется регулирующими органами, такими как FDA в США или ЕМА в Европейском Союзе [40-43].

Некоторые страны приняли законодательство для фаговой терапии без разрешения на продажу фаговых продуктов, например, Институт бактериофагов, микробиологии и вирусологии имени Г.Элиавы в Грузии [44], основанный в 1923 году. Институт разработаны такие препараты как: Стафилококковый бактериофаг, Бактериофаг Ферсиси, СЭС-бактериофаг, Интести-бактериофаг, Энко-бактериофаг и Пио-бактериофаг. В большинстве случаев, они рекомендуются для местного применения у пациентов с пиогенными инфекциями, такими как инфекции кожи и мягких тканей, дыхательных путей, глаз, мочевыводящих путей и носовой полости. Интести-бактериофаг и Энко-бактериофаг в основном направлены на лечение желудочно-кишечных инфекций [45-50].

В Чешской и Словацкой республике официально зарегистрирован и показан для местного применения антистафилококковый препарат – Stafal [51].

Институт иммунологии и экспериментальной терапии Людвика Хиршфельда во Вроцлаве [52], который экспериментально лечит пациентов фагами в амбулаторных условиях с 1970-х годов. В 2005 г. в Польше было открыто отделение фаготерапии, которое занимается лечением фагами в соответствии с национальной схемой регулирования, и с 2000 г. исследователи опубликовали сводки и отчеты о почти 1500 пациентах [53-57].

В России существует несколько предприятий по разработке препаратов фагов. Так, НПЦ «МикроМир» [58] разработан лечебно-профилактические препараты «Фагодент», «Отофаг», «Фагонин», «Фагодерм» и «Искрафаг» для профилактики и лечения гингивита и пародонтита, гнойно-воспалительных заболеваний бактериальной этиологии уха, горла и носа, кожных покровов. Препараты содержат фаги против наиболее часто встречающихся патогенов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Wolinella* sp., *Actinobacillus actinomycetemcomitans* и др. В начале 2013 года ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора получено свидетельство о государственной регистрации специализированного пищевого продукта для профилактического питания «Фудфаг». В гигиенической характеристике указано, что БАД обладает специфической литической активностью в отношении *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *typhimurium* и *infantis*, *Escherichia coli* O157:H7 и O104:H4, *Listeria monocytogenes* и показана для профилактического применения декретированному контингенту, занятому на пищевых производствах и предприятиях общественного питания [59]. АО «Микроген» занимается разработкой фаговых коктейлей, таких как «Стрептофаг», «Стафилофаг», «Секстафаг», «Пиофаг», «Клебсифаг» и другие [60]. Данные препараты обладают способностью специфически лизировать бактерии стафилококков, стрептококков, энтерококков, протей, синегнойной и кишечной палочек, клебсиелл пневмонии и окситока. Производство лекарственных средств осуществляется под контролем государственных органов, что гарантирует качество, безопасность и эффективность препаратов бактериофагов. Кроме того, коллекция производственных штаммов бактерий ежегодно обновляется, т.е. препараты бактериофагов регулярно адаптируются к актуальным циркулирующим бактериальным возбудителям.

В Казахстане изучением бактериофагов занимаются НИИ проблем биологической безопасности НИИПББ) и ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии». В НИИПББ на основе фагового коктейля был разработан препарат, предназначенный для дезинфекции

различных поверхностей и приборов, которым противопоказана стерилизации с применением агрессивных химических агентов или высоких температур [61]. В ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии» на протяжении последних 5 лет непрерывно введутся исследования по выделению и описанию свойств новых штаммов бактериофагов направленных на борьбу с антибиотикоустойчивыми возбудителями бактериальных инфекций как человека так и животных. В настоящий момент, в ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии» собрана коллекция с полным описанием из 32 штаммов бактериофагов, которые активны против клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *E.coli* [62-65].

Единственный современный центр инновационных применений фагов и терапии (IPATH) [66] в Северной Америке открылся в 2018 году в Медицинской школе Калифорнийского университета в Сан-Диего. Опыт нескольких видов сострадательной фаговой терапии в Бельгии привел к недавно организованному разрешению на использование фагов в качестве активных ингредиентов экстемпоральных препаратов [67]. Однако фаги по-прежнему считаются «неразрешенными» компонентами препарата, а доступность препаратов экстемпоральных фагов по-прежнему ограничена даже в Бельгии. Хотя эта модель отличается от использования из соображений сострадания, она показывает, как использование из сострадания может привести к разработке альтернативных путей утверждения с четко определенными рекомендациями, даже если они вряд ли будут воспроизведены в таких странах, как США, где составные компоненты требуют разрешений. Помимо таких центров компетентности в области фагов, врачи, не связанные с ними, иногда независимо вводили фаги из академических, биотехнологических и коммерческих источников для лечения инфекций, устойчивых к антибиотикам [38, 68-72]. Однако, в связи с тем, что сострадательная медицина направлена на успешное лечение пациентов, а не на получение доказательств терапевтической эффективности бактериофагов, часто в методы лечения помимо фагов включались антибиотики.

Тем не менее, основываясь на большом количестве данных, полученных некоторыми центрами фаговой терапии, можно судить о том, что пришло время рассмотреть преимущества фаготерапии во всей их полноте, в том числе нацеленное на группы пациентов, для которых в настоящее время нет альтернативного лечения. Эффекты фаготерапии, воздействующей на инфекционные агенты, также способны оказывать влияние на иммунную систему пациентов, что напоминает действие антибиотиков, которые помимо антибактериальной активности могут проявлять и другие регуляторные свойства на организм человека. Таким образом, влияние фагов за пределами предполагаемой антибактериальной активности следует тщательно оценивать в связи с более стандартными методами разработки фаготерапии. Статистика показывает, что инфекционные заболевания значительно поражают развивающиеся страны, фаготерапия, учитывая ее относительную техническую простоту, а также легкость выделения, характеристики и производства фагов, может быть особенно полезной в этих условиях.

Заключение

Оценка исторического опыта применения фаготерапии показывает, что в случаях научно обоснованного методического подхода, бактериофаги являются безопасным и эффективным средством борьбы с бактериальными инфекциями. Только открытие антибиотиков помешало разработке систематических, стандартизованных методов фаготерапии и их повсеместному внедрению в медицинскую практику.

Однако в эпоху глобального распространения бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью и критическим снижением эффективности антибиотиков бактериофаги и фаготерапия вновь выходят на первый план. Обзор проведенных выше исследований показал, что современные разработки в области фаготерапии обладают высокой эффективностью в борьбе с антибиотикоустойчивыми бактериальными инфекциями. На данный момент, уже существует обширная практика

терапевтического применения фаговых препаратов, в Грузии и Польше созданы медицинские центры, в которых как амбулаторно, так и стационарно проходят лечение пациенты, которым антибиотики уже не способны помочь. Начались первые изменения в законодательных актах, позволяющие более широко внедрять фаготерапию в клиническую практику. Но всё-таки, для предотвращения возврата в эпоху «до антибиотиков» с массовой смертностью от бактериальных инфекций, необходимо продолжать исследования как природы бактериофагов, так и способов их применения в терапии, непрерывно пополнять коллекции новыми, наиболее эффективными литическими штаммами фагов. Также необходимо прилагать все усилия для формирования как методической, так и законодательной баз с целью повсеместного внедрения фаготерапии в медицинскую практику по всему миру.

Финансирование

Работа выполнена по теме проекта AP14870277 "Исследование биологических свойств бактериофагов, выделенных на территории Республики Казахстан, эффективных в отношении антибиотикоустойчивых форм *Staphylococcus aureus*" выполняемому в рамках Договора от 18 октября 2022 года №261/30-22-24 на грантовое финансирование по научным и (или) научно-техническим проектам на 2022-2024 годы (МНВО РК).

Литература:

- 1 Всемирная организация здравоохранения. [(Дата обращения 11.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://www.who.int/ru>
- 2 Adhya S., Merril C. The road to phage therapy. *Nature*, 2006, 443:754–755 (doi: 10.1038/443754a)
- 3 Гамалея Н.Ф. Бактериолизины – ферменты, разрушающие бактерии. *Русский архив патологии*, 1898, 6:607-613
- 4 Chanishvili N. Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res.*, 2012, 83:3-40 (doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3)
- 5 Sulakvelidze A., Alavidze Z. and Morris J. G. Jr. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45:649–659
- 6 Summers W. C. Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, 55:437–451
- 7 d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1917, 165:373–375
- 8 Summers W. C. *Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale University Press, New Haven, CT, 1999
- 9 Hausler T. “*Viruses vs. Superbugs*”. MacMillan, New York, 2008
- 10 Rice T. B. Use of bacteriophage filtrates in treatment of suppurative conditions: Report of 300 cases. *Am. J. Med. Sci.*, 1930, 179:345–360
- 11 Schless R. A. Staphylococcus aureus meningitis: Treatment with specific bacteriophage. *Am. J. Dis. Child.*, 1932, 44:813–822
- 12 Stout B. F. Bacteriophage therapy. *Texas State J. Med.*, 1933, 29:205–209
- 13 Кажал Н., Ифтимович Р. *Из истории борьбы против микробов и вирусов*. Научное издательство, Бухарест, 1968:404
- 14 Д'Эрелль Ф. *Бактериофаг и феномен выздоровления*. Тифлисский государственный университет, Тифлис, 1935:404
- 15 Dublanchet A., and Bourne S. The epic of phage therapy. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 2007, 18:15–18
- 16 Eaton M. D. and Bayne-Jones S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *JAMA*, 1934, 23:1769–1939
- 17 Krueger A. P. and Scribner E. J. Bacteriophage therapy. II. The bacteriophage: Its nature and its therapeutic use. *JAMA*, 1941, 19:2160–2277
- 18 Rakieten M. L. Studies with *Staphylococcus bacteriophage*. I. The preparation of polyvalent *Staphylococcus bacteriophage*. *Yale J. Biol. Med.*, 1932, 4:807–818
- 19 García R., Latz S., Romero J., Higuera G., García K., Bastías R. Bacteriophage Production Models: An Overview. *Front Microbiol.*, 2019, 10:1187 (doi: 10.3389/fmicb.2019.01187)

- 20 Kutateladze M. and Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 2010, 28:591–595
- 21 Międzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K., et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv. Virus Res.*, 2012, 83:73–121 (doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7)
- 22 Moye Z. D., Woolston J., Sulakvelidze A. Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 2018, 10:E205 (doi: 10.3390/v10040205)
- 23 Buttimer C., McAuliffe O., Ross R. P., Hill C., O'Mahony J., Coffey A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Front. Microbiol.*, 2017, 8:34 (doi:10.3389/fmicb.2017.00034)
- 24 Doss J., Culbertson K., Hahn D., Camacho J., Berekzi N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 2017, 9:50 (doi: 10.3390/v9030050)
- 25 Крестникова В.А. Лечение и профилактика фагами и их апробация в работах советских исследователей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*, 1947, 3:56–65
- 26 Цулукидзе А.П. Лечение фагами в хирургии. *Хирургия*, 1940, 12:132–133
- 27 Кокин Г.А. Применение бактериофагов в хирургии. *Советская медицина*, 1941, 9:15-18
- 28 Кокин Г.А. Фаготерапия и фагопрофилактика газовой гангрены. В сб.: *Опыт советской военной медицины в годы Великой Отечественной войны 1941-1945*. Медгиз, Москва, 1946, 3:56-63
- 29 Цулукидзе А.П. *Опыт применения бактериофага в условиях военного травматизма*, Грузмедгиз, Тбилиси, 1941
- 30 Alessandrini, A., and Doria, R. (1924). Il batteriofago nella terapia del tifo addominale. *Policlinico, sez prat.*, 1924, 31:109
- 31 Chanishvili, N., Chanishvili, T., Tediashvili, M., and Barrow, P. A. Phages and their application against drug-resistant bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2001, 76:689–699
- 32 Compton, A. Antidysentery bacteriophage in treatment of dysentery: A record of 66 cases treated, with inferences. *Lancet*, 1929, 2:273
- 33 Costa Cruz, J. Le traitement des dysenteries bacillaires par le bacteriophage. *C.R. Soc Biol.*, 1924, 91:845
- 34 Карамов С. Опыт применения фаготерапии для лечения брюшного тифа. В сб.: *Избранные статьи Азербайджанского института эпидемиологии и микробиологии*, 1938, 6:101-105
- 35 Манолов Д.Г., Секунова В.Н., Сомова Е.Е. Опыт терапии брюшного тифа путем внутривенного введения фага. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 4:33
- 36 Сапир И.Б. Наблюдения и замечания по поводу лечения дизентерии бактериофагом. Труды Московского областного института инфекционных болезней. – М.: *Московский областной институт инфекционных болезней*, 1939: 135-151
- 37 Skurnik M. Can Bacteriophages Replace Antibiotics? *Antibiotics (Basel)*, 2022, 26, 11(5):575 (doi: 10.3390/antibiotics11050575)
- 38 Fadlallah A., Chelala E., Legeais J.-M.M. Corneal Infection Therapy with Topical Bacteriophage Administration. *Open Ophthalmol. J.*, 2015, 9:167–168 (doi:10.2174/1874364101509010167)
- 39 World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013, 310:2191–2194 (doi: 10.1001/jama.2013.281053)
- 40 Balasubramanian G., Morampudi S., Chhabra P., Gowda A., Zomorodi B. An overview of Compassionate Use Programs in the European Union member states. *Intractable Rare Dis. Res.*, 2016, 5:244–254 (doi: 10.5582/irdr.2016.01054)
- 41 Jarow J.P., Lurie P., Ikenberry S.C., Lemery S. Overview of FDA's Expanded Access Program for Investigational Drugs. *Ther. Innov. Regul. Sci.*, 2017, 51:177–179 (doi: 10.1177/2168479017694850)
- 42 Donovan P. Access to unregistered drugs in Australia. *Aust. Prescr.*, 2017, 40:194–196 (doi: 10.18773/austprescr.2017.062)
- 43 Leszczyński P., Weber-Dąbrowska B., Kohutnicka K.M., Łuzcak M., Górecki A., Górski A. Successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) intestinal carrier status in a healthcare worker—Case report. *Folia Microbiol.* 2006, 51:336–338 (doi: 10.1007/BF02932128)
- 44 Институт Элиавы. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://eliava-institute.org/?lang=en>
- 45 Стафилококковый бактериофаг. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <http://phage.ge/products/staphylococcal-bacteriophage>

- 46 Бактериофаг Ферсиси. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://phage.ge/products/fersisi-bacteriophage>
- 47 СЭС-бактериофаг. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://phage.ge/products/ses-bacteriophage>
- 48 Интести-бактериофаг. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://phage.ge/products/intesti-bacteriophage/?lang=en>
- 49 Энко-бактериофаг. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://phage.ge/products/enko-bacteriophage>
- 50 Пио-бактериофаг. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <http://phage.ge/products/pyo-bacteriophage>
- 51 STAFAL. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://www.bohemapharm.eu/en/products/products/stafal>
- 52 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczałnej im. Ludwika Hirszfelda. [(Дата обращения 27.11.2022)]; Доступно онлайн: <https://www.iitd.pan.wroc.pl>
- 53 Letkiewicz S., Międzybrodzki R., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis—case report. *Folia Microbiol.* 2009, 54:457–461 (doi: 10.1007/s12223-009-0064-z)
- 54 Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2000, 48, 6:547–551
- 55 Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2001, 1:131-134 (doi: 10.1016/S1529-1049(01)00015-0)
- 56 Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant. Proc.* 2003, 35:1385–1386 (doi: 10.1016/S0041-1345(03)00525-6)
- 57 Miedzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Pawelczyk Z., Rogoz P., Klak M., Wojtasik E., et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv. Virus Res.*, 2012, 83:73–121 (doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7)
- 58 НПЦ «МИКРОМИР». [(Дата обращения 5.12.2022)]; Доступно онлайн: <https://micromir.bio/products/fagoderm>
- 59 Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. *Мат. Межд. науч.-практ. конф. "Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности"*. Ульяновск, 2013
- 60 АО «Микроген». [(Дата обращения 11.12.2022)]; Доступно онлайн: <https://www.microgen.ru>
- 61 НИИ «Проблем биологической безопасности». [(Дата обращения 11.12.2022)]; Доступно онлайн: <https://biosafety.kz>
- 62 Алексюк П.Г., Алексюк М.С., Богоявленский А.П., Акылова М.А., Молдаханов Е.С., Омиртаева Э.С., Березин В.Э. Изучение спектра активности коктейля бактериофагов на модели клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. *Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины»*. Гвардейский, 2020: 31-36
- 63 Alexyuk, P.; Bogoyavlenskiy, A.; Alexyuk, M.; Akanova, K.; Moldakhanov, Y.; Berezin, V. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Active against Clinical Strains of *E. coli* and Development of a Phage Antimicrobial Cocktail. *Viruses*, 2022 (doi: 10.3390/v14112381)
- 64 Bogoyavlenskiy A., Alexyuk M., Alexyuk P., Moldakhanov Y., Berezin V. Draft genome sequences data of two Rosemountvirus phages isolated from soil near poultry farm. *Data in Brief*, 2022 (doi: 10.1016/j.dib.2022.108488)
- 65 M.S. Alexyuk, A.P. Bogoyavlenskiy, P.G. Alexyuk, K.S. Akanova, Y.S. Moldakhanov, A. Manakbayeva, V.E. Berezin Complete Genome Sequence of a Gamaleyavirus Phage, Lytic against Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Resource Announcements*, 2022 (doi: 10.1128/mra.00896-22)
- 66 Центр инновационного применения фагов и терапии. [(Дата обращения 5.12.2022)]; Доступно онлайн: <http://ipath.ucsd.edu/>
- 67 Pirnay J.P., Verbeken G., Ceysens P.J., Huys I., De Vos D., Ameloot C., Fauconnier A. The Magistral Phage. *Viruses*, 2018, 10(2), 64(doi: 10.3390/v10020064)

68 Chan B.K., Turner P.E., Kim S., Mojibian H.R., Elefteriades J.A., Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol. Med. Public Health*, 2018, 2018:60–66 (doi: 10.1093/emph/eoy005)

69 Duplessis C., Biswas B., Hanisch B., Perkins M., Henry M., Quinones J., Wolfe D., Estrella L., Hamilton T. Refractory *Pseudomonas* Bacteremia in a 2-Year-Old Sterilized by Bacteriophage *Therapy*. *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc.*, 2017, 7:253–256 (doi: 10.1093/jpids/pix056)

70 Fish R., Kutter E., Bryan D., Wheat G., Kuhl S. Resolving Digital Staphylococcal Osteomyelitis Using Bacteriophage—A Case Report. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7(4), 87 (doi: 10.3390/antibiotics7040087)

71 Fish R., Kutter E., Wheat G., Blasdel B., Kutateladze M., Kuhl S. Compassionate Use of Bacteriophage Therapy for Foot Ulcer Treatment as an Effective Step for Moving Toward Clinical Trials. *Methods Mol. Biol.*, 2018, 1693:159–170 (doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_14)

72 Khawaldeh A., Morales S., Dillon B., Alavidze Z., and et al. Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. *J. Med. Microbiol.*, 2011, 60:1697–1700 (doi: 10.1099/jmm.0.029744-0)

А.Н. МАНАКБАЕВА*, П.Г. АЛЕКСЮК

Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

*e-mail: adolat.manakbayeva@mail.ru

БАКТЕРИОФАГТАР: БІР ҒАСЫРДАН КЕЙІН ОЛАР ҚАЙТАДАН НАЗАРДА

Түйін

Қазіргі заманғы денсаулық сақтаудың негізгі проблемаларының бірі-патогендерде көптеген дәрілерге төзімділіктің кең таралуы. ДДСҰ 2050 жылға қарай жұқпалы аурулардан болатын өлім-жітім жылына 10 миллион адамға жетеді деп есептейді, бұл антибиотиктерді медициналық тәжірибеге енгізгенге дейін XX ғасырдың басындағы көрсеткіштермен салыстырылады. Қалыптасқан жағдайда бактериялық инфекциялармен күресудің балама әдістерін іздеу, әзірлеу және енгізу адамның өмірі мен денсаулығын сақтау үшін өте маңызды.

Фаготерапия ерекше қызығушылық тудырады-вирустарды олармен күресу үшін бактериялардың табиғи жауы ретінде пайдалану. Бактериофагтар антибиотиктерге тиімді балама немесе төзімді бактериялық инфекцияларды емдеуде қосымша болуы мүмкін.

Бұл мақалада авторлар фаготерапияның даму кезеңдерін көрсететін қысқаша тарихи схеманы ұсынады, бактериялық инфекциялармен күресуде бактериофагтарды ерте қолдану туралы зерттеулерді сипаттайды, тіпті антибиотиктер ашылғанға және енгізілгенге дейін. Бактериофагтарды зерттеу мысалдары және олардың қазіргі заманғы кезеңде, антибиотиктерге төзімділіктің жаһандық таралу дәуірінде сәтті клиникалық қолданылуы да келтірілген.

Ұсынылған шолу фаготерапия әдістерінің дамуының толық бейнесін жасауға мүмкіндік береді, оның антибиотиктерге төзімді бактериялық инфекциялармен күресудегі тиімділігі мен өзектілігін көрсетеді және анағұрлым тиімді литикалық штаммдарды табуға бағытталған әрі қарай зерттеулердің маңыздылығын атап көрсетеді. Бактериофагтар және фаготерапияның заманауи әдістерін жасау және оларды медицинада кеңінен енгізу.

Кілтгі сөздер: антибиотикке төзімділік, бактериофагтар, фаг терапиясы, лизис, бактериялық инфекциялар.

IRSTI: 34.25.01; 34.25.29

A.N. MANAKBAYEVA*, P.G. ALEXYUK

Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: adolat.manakbayeva@mail.ru

BACTERIOPHAGES: A CENTURY LATER, BACK IN THE SPOTLIGHT**doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.03****Abstract**

One of the major problems of modern public health is the widespread spread of multidrug resistance in pathogenic microorganisms. According to WHO estimates, by 2050 mortality from infectious diseases will reach 10 million people per year, which is comparable with the figures from the beginning of the 20th century, before the introduction of antibiotics into medical practice. In this situation, the search, development and introduction of alternative ways to combat bacterial infections is of paramount importance for the preservation of human life and health.

Of particular interest is phage therapy - the use of viruses as natural enemies of bacteria to fight them. Bacteriophages can be an effective alternative to antibiotics or a complement to them in the treatment of resistant bacterial infections.

In this article the authors present a brief historical sketch showing the stages of development of phage therapy, describing research into the early use of bacteriophages in the control of bacterial infections, even before the discovery and introduction of antibiotics. There are also examples of bacteriophage research and successful clinical use in the modern period, the era of global spread of antibiotic resistance.

This review provides a holistic picture of the development of phage therapy methods, shows its effectiveness and relevance in the fight against antibiotic-resistant bacterial infections and emphasizes the importance of further research, aimed both at finding more effective lytic strains of bacteriophages and at developing modern phage therapy methods and their widespread introduction into medical practice.

Keywords: antibiotic resistance, bacteriophages, phage therapy, lysis, bacterial infections.

Every year, antibiotic resistance in bacteria increases to alarmingly high levels. The current death rate due to declining antibiotic efficacy is 700,000 per year. The WHO predicts that this figure will rise to 10 million by 2050 [1]. Mankind is entering a post-antibiotic era where infectious diseases can again become the main cause of human mortality and minor injuries can lead to death. Although some antibiotics are being developed, none are expected to be effective against the most dangerous forms of antibiotic-resistant bacteria. In this regard, the development of drugs presented by non-traditional agents is particularly relevant. Examples of these are bacteriophages - viruses of bacteria. Bacteriophages open up new possibilities of fighting infections caused by resistant bacteria, they can be used as an adjunct to antibiotic therapy or as an alternative to antibiotics.

Antibiotics were discovered by Alexander Fleming in 1928. Whereas, the first prerequisites for the discovery of bacteriophages appeared as early as 1896. The phenomenon of mass death of bacteria was first noticed by English bacteriologist E.H. Hankin, who conducted an experiment on counting cholera vibriones in the Ganges River. While counting, Hankin found that the water samples taken at the entrance of the city of Agra contained 1111 times more infectious agent than the samples taken at the exit of the city. Puzzled by the results, Hankin decided to study the properties of the water and found that the water retained its lysing properties even after passing through a bacterial filter, but lost them after boiling. Hankin was then unable to explain this phenomenon of self-purification, and it became known as the "Hankin paradox" [2]. [2]. In 1898, a Russian microbiologist, Nikolai Gamaleya, published an article devoted to the control of anthrax bacillus. In his experiment, Gamaleya used a solution of distilled water with an unknown agent that led to lysis of the bacillus and completely destroyed fresh cultures of the pathogen [3]. The next significant contribution to the discovery of bacteriophages was made by the English microbiologist Frederick Tuort. In his paper published in 1915, he described the destruction of purulent staphylococcus aureus by a grafted filter agent. However, he was unable to explain the

cause of this phenomenon (4). The French-Canadian scientist Félix d'Erelle, who had encountered a similar phenomenon before, was able to explain and prove it in 1917. In 1910, when he was in Mexico and Tunisia during a locust invasion, he inoculated the faeces of sick and dead insects to find coccobacilli, the microorganisms that cause deadly locust infections. After examining the Petri dishes with the seeds, he found anomalies in the microbial culture growth - rounded, transparent patches 2-3 mm in diameter on the surface of the nutrient agar. He scraped these transparent plaques off the surface of the agar and prepared smears. However, he did not see anything under the microscope. Based on this and other experiments, he concluded that the agent causing the formation of transparent patches on the microbial culture must be small enough to pass freely through bacteria-holding filters. After Tuort's publication he decided to turn his attention to these agents again. The discovery or rediscovery of bacteriophages by Felix d'Erelle after Frédéric Tuort is often associated with the outbreak of severe haemorrhagic dysentery among French troops stationed on the outskirts of Paris in 1915. In a study of the disease, he made bacteria-free filtrates of patient faecal samples, mixed and incubated them with strains of *Shigella* sp. isolated from the patients. Part of the mixture was inoculated into experimental animals (as part of d'Erelle's research to develop a vaccine against bacterial dysentery), and part was placed on agar medium to monitor bacterial growth. On these agar cultures, d'Erelle again observed the appearance of small transparent patches, which he first called spots, then white patches and later plaques [5,6]. The results of d'Erelle's research were presented at the September 1917 meeting of the Academy of Sciences and subsequently published in the Proceedings of the meeting [7]. Unlike Hankin and Tuort, d'Erelle had little doubt about the nature of the phenomenon and suggested that it was caused by a virus capable of parasitizing on bacteria. The name "bacteriophage" (from "bacteria" and the Greek φάγω - "devour") was also suggested by d'Erelle [8]. Thus, the first article published by d'Erelle caused a great furor in the scientific community, triggering a wave of research by a growing number of scientists proving him right. But Felix d'Erelle's most important achievement is that he advanced the idea of using bacteriophages to treat bacterial diseases in humans and animals. He earned the Nobel Prize for this idea, although he was never awarded it [9].

The founder of phage therapy in the Soviet Union was the Georgian microbiologist George Eliava. Eliava was engaged in the study of colonies of various bacteria and methods of controlling them. For example, in the course of his work, Eliava discovered the bactericidal effect of water in the Kura River. It was the same year that d'Erelle made his discovery public, and it became clear that this phenomenon could be explained by the action of the cholera bacteriophage. In 1919, while working at the Pasteur Institute in Paris, Eliava met Felix d'Erelle. During his work, G.Eliava was fascinated by d'Erelle's ideas about using bacteriophages for therapy. And in 1923, G. Eliava initiated the establishment of the Institute of Bacteriology (current G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology in Tbilisi, Georgia) [10].

The first attempts at the therapeutic use of bacteriophages

Soon after his discovery, d'Erelle began to pave the way for the therapeutic use of phages. The first studies were carried out in 1919 during the treatment of dysentery in a 12-year-old boy. The treatment was carried out under the clinical supervision of Professor Victor-Henri Hutinel, head of paediatrics at the hospital [8]. To assure the safety of the drug, it was first administered to d'Erelle himself, the professor and several hospital interns. After a single administration of antidysentery phage, the patient's symptoms ceased and the boy recovered completely within a few days. The efficacy of the phage drug was "confirmed" when three other patients with bacterial dysentery who received a single dose of the drug began to recover within the first 24 hours. However, the results of these studies were not published immediately, so the first report on the use of phages for the treatment of human infectious diseases appeared later. In 1921 bacteriologist Richard Brunoch and medical researcher Joseph Mysin published a paper describing the use of bacteriophages to treat staphylococcal skin disease. Bacteriophages were injected into and around surgically opened wounds and the authors reported regression of the infection within 24-48 hours [10-12].

The road to commercial production of bacteriophages

Encouraged by these initial results, d'Erelle and others continued research into the therapeutic use of phages. In 1931, d'Erelle and Eliava made their first attempts at the therapeutic use of cholera bacteriophage. This research paved the way for the first commercial production of bacteriophages. Thus, the Institute of Vaccines and Sera in Tbilisi produced the first commercial preparation of anti-cholera phage, which found mass use to combat epidemics that threatened the south-eastern territories of the USSR [13]. According to estimates published at the time, the use of bacteriophages reduced cholera mortality in India by up to 10 per cent [13]. This fact was described by d'Erelle himself in his book "Bacteriophage and the recovery phenomenon", published in Russian in 1935 in Tbilisi, Georgia. But there were failures, for example, in the 1927 cholera epidemic in the state of Punjab, India, out of 14,450 people, only 73 were cured by phages. D'Erelle himself explained this case by the reluctance and resistance of local residents to the use of phage preparations [14].

In his book, d'Erell mentions the establishment of two industrial centres for the production of bacteriophages against cholera in 1931 in India [13,14]. D'Erelle's commercial laboratory in Paris produced at least five phage preparations against various bacterial infections [13,14]. In 1924, the Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro began production of antidyentery bacteriophages to combat dysentery in Latin America [14,15]. Within a year, the institute produced 10,000 vials of phages, which were sent to hospitals in Brazil [9]. Therapeutic phages were also produced in the United States. In the 1940s, Eli Lilly produced seven phage preparations against staphylococci, streptococci, E. coli and other bacterial pathogens [5]. The preparations included phagolyzed, bacteriologically sterile broth cultures of the target bacteria, and the same preparations were also available in a water-soluble jelly base. They were used to treat a variety of infections, including abscesses, septic wounds, vaginitis, acute and chronic upper respiratory tract infections, and mastoid infections. However, the efficacy of phage preparations has been controversial (16, 17). This could be due to a lack of viable phages, a low titer of phages or their narrow host spectrum, as, for example, was found in the case of some commercial anti-staphylococcal phage preparations [18]. In addition, after the discovery and commercialisation of antibiotics, the production of therapeutic phages in most Western countries became irrelevant. However, in the former Soviet Union, active research, development and implementation of new phage therapy methods continued throughout the twentieth century.

Nowadays, when infections caused by multidrug-resistant bacteria have become a worldwide threat [19], patients from all over the world are treated with phage therapy at the Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology in Georgia [20]; and in the Bacteriophage Therapy Department of the Ludwik Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Poland [21].

Some companies in the United States, such as OmniLytics Inc. and Intralytix Inc., have developed various bacteriophage products for use as food disinfectants that can be used against Salmonella, E. coli and Listeria monocytogenes. In Europe, the Dutch company Microcos BV also marketed bacteriophages against Salmonella, E.coli and the German company Fink Tec against E.coli [22]. Greater use of bacteriophages in the food chain, including agriculture and aquaculture, where a wide variety of plant and fish pathogens cause significant economic damage, is expected [23, 24].

Several attempts have been made to establish reliable methods for bacteriophage production. Some researchers have used a theoretical approach with simulation models, while others have taken a practical approach with experiments. Although some bacteriophage products are commercially available, an efficient, permanent and controlled process for producing bacteriophages has yet to be established. Phage production in laboratories can be considered a routine process and protocols are clearly defined; however, these processes are not easily scalable. Industry is primarily interested in obtaining reliable methods for phage production that allow standardisation and scaling of the process. However, this task is difficult to achieve due to the

biological nature of phages, which leads to uncontrollable changes in new generations and little predictable interactions occurring between phages and bacteria.

Mass application of phages in wound care

As previously mentioned, there was active research in the field of phage therapy in the former Soviet Union, with a surge during the years of the Great Patriotic War. Thus, most of the phage therapy trials took place in the 1930s and 1940s.

The first to use phage therapy in surgery was Professor of Medicine A. P. Tsulukidze. An experimental series of phage preparations containing components against bacteria belonging to *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* and *Proteus* species was tested in the late 1930s in surgical and gynaecological clinics in Moscow [25]. It described in detail the symptoms, wound condition, patient performance and treatment algorithm. The majority of patients arriving from the front line with wounds were bedridden and in serious condition: 38.3% had soft tissue injuries and 61.7% had bone damage. In most cases, phages were administered within the first 6 days of initial infection. Initially, phage therapy was used only in the most severe cases where a lethal outcome was expected. Later, a wider group of patients was included in the study. In most cases, the bacteriological analysis indicated the presence of mixed bacterial infections [26]. Only in rare cases was mono-infection observed in patients arriving directly from the battlefield. Subcutaneous phage injections were administered three or four times every other day to avoid the development of antiphage antibodies. In addition, phages were sprayed on top of the wound at every dressing change. According to direct reports at the time, phage treatment resulted in faster pain relief, improvement in the general condition of patients and clear symptoms of wound healing after 2-3 days.

The war and the need for therapeutic preparations inspired Soviet physicians to conduct new experiments with phages and develop new methods of phage administration. This period was one of the most fruitful in the development of phage therapy in the former Soviet Union [25, 27, 28]. Of particular interest to military surgeons is A.P.Tsulukidze's book "Experience with Bacteriophages in Military Trauma" [29], which summarizes the results obtained after the Finnish campaign. A.P.Tsulukidze [29] described 20 hospital cases in which bacteriophages against anaerobic bacteria were used in combination with strepto- and staphylobacteriophages. Seventeen of the 20 wounded soldiers received the phage mixture directly on the battlefield, while three were treated with phages on arrival at the hospital. All 20 patients were in serious condition when they arrived at the hospital, and bacteriological tests showed that they were all infected with *Clostridium perfringens*. In each case the wounds were serious, including 19 cases of wounds to the lower extremities. According to A.P.Tsulukidze [29], there were significant differences in the development of infection between soldiers who received phages soon after wounding and those who received phages later. Soldiers treated earlier had wounds cleared of infection more quickly, granulation appeared quickly, temperature normalized in a shorter time, and there was little or no unpleasant odour. A.P.Tsulukidze [29] reported that soldiers who received phages on the battlefield did not develop any complications. However, two patients who had not received phages before arriving at the hospital developed generalised sepsis and died. Based on the above observations, A.P.Tsulukidze et al. [29] suggested that *C. perfringens* infection usually accompanies streptococcal and staphylococcal infections, as the latter create conditions favourable for the growth of *Clostridia* species. Therefore, the use of a phage mixture directed against all three bacteria was considered useful. A.P.Tsulukidze [29] proposed a treatment strategy for anaerobic infections based on the combined use of phage therapy and anti-gangrene serum. He suggested that phages would lyse the bacteria causing the infection, while the serum would neutralise the toxins.

At conferences held in March, June and December 1940, the methods and instructions for the intramuscular and intravenous administration of phages developed by G.A.Cockin and his colleagues were reported. These developments were particularly important in cases of generalised infections. They were developed as a result of the observation of cases involving road traffic accidents and septic infections carried out at the Ostroumovskaya Hospital in Moscow [25]. These

methods and instructions were approved by the Military Sanitary Directorate of the Red Army Supreme Soviet and were used to treat Red Army soldiers during World War II and continued thereafter.

In 1941 and 1946, G.A.Kokin published reviews of the first mass application of phage therapy for surgical and wound care. It was associated with the Finnish campaign of 1939-1940. G.A.Kokin [27, 28]. In his papers, Kokin described the use of a mixture of bacteriophage infecting anaerobes, staphylococci and streptococci produced at the G.Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology in Georgia for the treatment of gas gangrene. The mixture was applied to 767 infected soldiers. In 1947, a paper was published in which the authors used the same mixture of phages [25]. In addition to its therapeutic use, this phage preparation was used by mobile ambulance crews as an emergency treatment for wounds, prevention of gas gangrene [25].

Treatment of *Salmonella* and *Shigella* intestinal infections

In the 1920s and 1940s, intestinal infections caused by bacteria of the genus *Salmonella* and *Shigella* were a major problem throughout the world [16, 25, 30-34]. They gave rise to a great deal of research into phage therapy. For example, in a study against *Salmonella typhi* and *S. paratyphi* infections described in 1938, the results were unsuccessful. Phages were administered orally to 60 patients once a day in a dose of 10 ml for 10 days. It was noted that phage therapy did not reduce the mortality rate, which remained at 12% in 1936 and was comparable to that of other treatments [34].

Despite this, research into the development of therapeutic phages continued in the former Soviet Union. For example, an interesting study was conducted by D.G.Manolov and colleagues [35], who reported the intravenous use of bacteriophages to treat typhoid fever. The authors administered intravenously 20-25 ml of an appropriate bacteriophage suspension, the safety of which has been proved in experiments on rabbits and mice. In 15-20 min after intravenous administration of phages to the patients, patients noted chills. In 2-3 hours there was increase of temperature, which in some cases was accompanied by nausea and vomiting. In 12 to 14 hours after phage administration, the temperature normalized, but rose again to the same level 24 hours later. This led the authors to apply several phage injections every day or every other day. Unfortunately, the number of patients was not determined in this study. However, a comparison of the results of the aforementioned studies showed that the lysates contained live bacteriophages, solid cellular residues and soluble cellular components, including bacterial antigens. The latter may influence the final outcome of therapy independently of the bacteriophages by stimulating the body's immune system, as observed in the case of vaccination. These are mainly proteins and polysaccharides, i.e. substances that can cause allergic reactions. The results of studies on the use of bacteriophages for the treatment of typhus have led the authors to the following conclusions: 1. Low doses (2-10 ml) of typhoid bacteriophages administered orally are ineffective. In addition, oral administration of bacteriophages is inexpedient because of the specific pathogenesis of typhoid fever. 2. Intravenous administration of 20-25 ml of typhoid bacteriophage prepared in physiological solution daily for 3 days was not accompanied by any serious side effects. However, this treatment resulted in a lower fever and a shorter febrile period, an improvement in the general condition of the patient and a complete cure [35]. How often complete cure was observed is not known.

The most extensive clinical study of the therapeutic effect of dysentery phages was carried out and described by Sapir in 1939 [36]. The author described a total of 1,064 cases of dysentery (Fig. 2) in which phage therapy was used in two different clinics in Moscow. The patient group included 767 males and 297 females, ranging in age from newborn to 79 years. Standard phage therapy using a preparation of dysentery bacteriophage developed at the I.I.Mechnikov Institute in Moscow was used in each age group as described below. The exact content of this preparation is not specified. The daily dose of phage was 20 ml for an adult and 10 ml for a child. The dose was divided into two portions and administered to patients at midnight on the day of admission and at 4:00 am to minimize inactivation of the phage by food residues. The comparable timing of phage administration to all patients facilitated the evaluation of the results of phage therapy. Patients

received a magnesium-soda solution first 6 hours before phage therapy and then every 2 hours six times for 12 hours. Adults received 100 ml of the solution at each administration, and children received 10-50 ml, depending on their age. The solution was administered to create optimal conditions for phage multiplication as well as to cleanse the intestine. For the first 48 hours, the patients were kept on a strict diet. The author concluded that the application of this dose of phage, divided into two portions and administered for one day, was sufficient and did not require repetition. Some of the patients were subjected to either serotherapy or non-specific therapy. Sometimes even a combination of phage and serotherapy was used. In cases of severe intoxication, intravenous transfusion of saline with adrenaline or glucose was used. In 15 of the most severe cases, an antidysentery serum was used in addition to phage medication, but death was not avoided. The author concluded that in those cases where serotherapy was unsuccessful, phage therapy was also ineffective [36]. The average duration of illness was 43.3 sick days. In the author's opinion, the use of phage therapy significantly reduced the length of hospital stay compared to other methods based only on symptomatic treatment or even specific (serological) treatment. The author emphasised the key role of early initiation of phage therapy in reducing hospitalisation time. In addition, he reported that there is usually a dramatic improvement in the patient's condition after 1-2 days of phage therapy, as evidenced by less frequent and less watery stools that do not contain blood and/or mucus. According to the author, the most marked effect was observed in cases where pathological changes did not develop deeper than catarrh and inflammation. The author stressed that sometimes phages from the preparation proved unable to lyse a particular strain, or the toxic syndrome was too severe, or secondary infections developed, and perhaps hence the apparent lack of efficacy of phage therapy in these cases [36]. The author also reported that after 1 day of phage treatment, the number of patients with bloody stools decreased from 100 to 74; on day 5, only 4 patients had this symptom. After 1 week of phage therapy, 95% of patients had no pathological symptoms and could be discharged from hospital. Fatal outcome was reported in 47 cases (4.4%). However, the author emphasised that these patients suffered from dysentery pancolitis and severe degenerative changes of the parenchyma of various organs, colonic ulcers, etc., characteristic of prolonged and severe intoxication, as confirmed by postmortem pathoanatomical investigations. The author concluded that: 1. Phages should be given to every patient who presents with symptoms of dysentery, whether the patient is admitted to hospital, comes by ambulance or seeks medical attention at home. This measure will have both curative and preventive effects. 2. Combined phago- and serotherapy should be used in special cases, e.g. hypertoxicosis in adults and to treat toxic and sub-toxic syndrome in small children. In all the above cases, the author also recommended the use of appropriate doses of serum and its administration at least 6 hours before phage therapy [36]. The basis for the latter recommendation is unclear.

Current state of research into phage therapy

The history of phage therapy is fascinating and shows great potential in the treatment of bacterial infections. But currently, phage therapy is relatively widely used only in Eastern Europe and has still not been approved by the European Union or the US FDA. The main difficulties with admission are related to:

- differences in the biological, physical and pharmacological properties of phages compared to conventional antimicrobials;
- the inability to standardise phage preparations since bacteriophages are biological, self-replicating entities and each generation naturally changes the daughter copies from the mother copies;
- the need to use several phage isolates (cocktails) because of the high specificity of phages, which is necessary for more effective presumptive treatment, i.e. treatment that begins before a precise diagnosis of microbial etiology
- established regulations for the approval of antimicrobials based on preparations of chemical origin and therefore less suitable for phages. [37]

Because of the problems mentioned above, only compassionate treatment is known in modern medicine. Compassionate medicine is applicable only in cases where all approved

therapeutic options have been exhausted. In such cases, individual drugs are developed to treat the patient outside of clinical trials [38]. The premise of compassionate use is set out in Article 37 of the Helsinki Declaration of Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, an international guide to human research [39]. Formal oversight of compassionate use programmes varies from country to country, but is undertaken by regulatory bodies such as the FDA in the US or the EMA in the European Union [40-43].

Some countries have passed legislation for phage therapy without authorisation to sell phage products, such as the Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology in Georgia [44], founded in 1923. The Institute developed such preparations as: Staphylococcus bacteriophage, Bacteriophage Fersi, SES bacteriophage, Intesti bacteriophage, Enco bacteriophage and Pio bacteriophage. In most cases, they are recommended for topical use in patients with pyogenic infections, such as skin and soft tissue infections, respiratory tract, eye, urinary tract and nasal cavity. Intesti-Bacteriophage and Enco-Bacteriophage are mainly aimed at the treatment of gastrointestinal infections (45-50).

In the Czech and Slovak Republic, an anti-staphylococcal drug, Stafal, is officially registered and indicated for topical use [51].

The Ludwik Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wroclaw [52] has been experimentally treating patients with phages in outpatient settings since the 1970s. In 2005, a phage therapy unit was opened in Poland to treat phages according to a national regulatory scheme, and since 2000, researchers have published summaries and reports on nearly 1,500 patients [53-57].

In Russia, there are several companies developing phage preparations. For example, NPC MicroMir [58] has developed the therapeutic and prophylactic preparations Fagodent, Otofag, Fagonin, Fagoderma and Iskrafag for the prevention and treatment of gingivitis and periodontitis, purulent inflammatory diseases of bacterial etiology of the ear, throat and nose, skin. The preparations contain phages against the most common pathogens *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Wolinella* sp., *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, etc. In early 2013, Rospotrebnadzor's G.N. Gabrichevsky Russian Research Institute of EMPI obtained a certificate of state registration for Foodfag, a specialised food product for preventive nutrition. The hygienic characteristic states that the food supplement has specific *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *typhimurium* and *infantis*, *Escherichia coli* O157:H7 and O104:H4, *Listeria monocytogenes*, and is indicated for preventive application to decreed contingent employed at food productions and public catering enterprises [59]. Microgen JSC is developing phage cocktails, such as *Streptophage*, *Staphylophage*, *Sextaphage*, *Piofag*, *Klebsiphage* and others [60]. These drugs have the ability to specifically lyse *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Oxytocin bacteria*. The production of the drugs is controlled by state authorities, which guarantees the quality, safety and efficacy of the bacteriophage preparations. In addition, the collection of production bacterial strains is updated annually, i.e. bacteriophage preparations are regularly adapted to current circulating bacterial pathogens.

In Kazakhstan, bacteriophages are studied by the Research Institute for Biological Safety Problems (NIIPB) and the Scientific and Technical Centre for Microbiology and Virology LLP. In NIIPB on the basis of phage cocktail was developed a preparation intended for disinfection of various surfaces and devices, which are contraindicated for sterilization with the use of aggressive chemical agents or high temperatures [61]. During the last 5 years LLP "RPC microbiology and virology" continuously introduces research on isolation and description of properties of new strains of bacteriophages aimed at combating antibiotic-resistant pathogens of bacterial infections of both humans and animals. At the moment in LLP "NPC microbiology and virology" collected a collection with a full description of 32 strains of bacteriophages, which are active against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *E.coli* [62-65].

The Centre for Innovative Applications of Phages and Therapeutics (IPATH) at the University of California San Diego School of Medicine, which opened in mid-2018 as the only

state-of-the-art phage centre in North America for the use of phage therapy in compassionate medicine [66]. The experience of several types of compassionate phage therapy in Belgium has led to a recently organised authorisation for the use of phages as active ingredients in extemporaneous medicines [67]. However, phages are still considered to be "unauthorised" drug components and the availability of extemporaneous phage preparations is still limited, even in Belgium. Although this model differs from compassionate use, it shows how compassionate use can lead to the development of alternative approval pathways with well-defined guidelines, even if they are unlikely to be replicated in countries such as the USA, where constituent components require approvals. In addition to such phage competence centres, non-related physicians have sometimes independently introduced phages from academic, biotechnological and commercial sources to treat antibiotic-resistant infections [38, 68-72]. However, because compassionate medicine aims to successfully treat patients rather than to obtain evidence of the therapeutic efficacy of bacteriophages, antibiotics have often been included in treatment methods other than phages.

Nevertheless, based on the large amount of data from some phage therapy centres, it is clear that the time has come to consider the benefits of phage therapy in its entirety, including targeting patient groups for whom no alternative treatment is currently available. The effects of phage therapy on infectious agents are also capable of influencing the immune system of patients, which is reminiscent of the effects of antibiotics, which in addition to their antibacterial activity may also have other regulatory properties on the human body. Thus, the impact of phages beyond their presumed antibacterial activity should be carefully evaluated in connection with more standard methods for developing phage therapy. Statistics show that infectious diseases significantly affect developing countries, phage therapy, given its relative technical simplicity and the ease of isolating, characterising and producing phages, may be particularly useful in these circumstances.

Conclusion

An assessment of historical experience with phage therapy shows that, when based on a scientifically sound methodological approach, bacteriophages are a safe and effective means of combating bacterial infections. Only the discovery of antibiotics prevented the development of systematic, standardised phage therapy methods and their widespread introduction into medical practice.

However, in the era of the global spread of multidrug-resistant bacterial pathogens and the critical decline in antibiotic efficacy, bacteriophages and phage therapy are once again coming to the fore. A review of the research carried out above has shown that current developments in phage therapy are highly effective against antibiotic-resistant bacterial infections. At the moment, there is already an extensive practice of therapeutic use of phage preparations, in Georgia and Poland medical centres have been established where both outpatients and inpatients are treated for patients who are no longer able to benefit from antibiotics. The first changes in legislation are beginning to allow for the wider introduction of phage therapy into clinical practice. Nevertheless, to prevent a return to the era of "before antibiotics" with mass mortality from bacterial infections, it is necessary to continue research on both the nature of bacteriophages and the ways they can be used in therapy, to continually add new, most effective lytic phage strains to the collections. It is also necessary to make every effort to form both methodological and legislative bases for the widespread introduction of phage therapy into medical practice throughout the world.

Funding

This work is carried out according to the project AP14870277 "Study of biological characteristics of bacteriophages, isolated on the territory of the Republic of Kazakhstan, effective against antibiotic-resistant forms of *Staphylococcus aureus*" under the Agreement dated October 18, 2022 № 261/30-22-24 for grant financing of scientific and (or) scientific-technical projects for 2022-2024 (MES RK)

References:

- 1 Vsemirnaya organizaciya zdrovoohraneniya. [(Data obrashcheniya 11.11.2022)]; Dostupno onlajn: <https://www.who.int/ru>
- 2 Adhya S., Merrill C. The road to phage therapy. *Nature*, 2006, 443:754–755 (doi: 10.1038/443754a)
- 3 Gamaley N.F. Bakteriolyziny – fermenty, razrushayushchie bakterii. *Russkij arhiv patologii*, 1898, 6:607-613
- 4 Chanishvili N. Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res.*, 2012, 83:3-40 (doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3)
- 5 Sulakvelidze A., Alavidze Z. and Morris J. G. Jr. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45:649–659
- 6 Summers W. C. Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, 55:437–451
- 7 d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1917, 165:373–375
- 8 Summers W. C. *Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale University Press, New Haven, CT, 1999
- 9 Hausler T. “*Viruses vs. Superbugs*”. MacMillan, New York, 2008
- 10 Rice T.B. Use of bacteriophage filtrates in treatment of suppurative conditions: Report of 300 cases. *Am. J. Med. Sci.*, 1930, 179:345–360
- 11 Schless R. A. Staphylococcus aureus meningitis: Treatment with specific bacteriophage. *Am. J. Dis. Child.*, 1932, 44:813–822
- 12 Stout B. F. Bacteriophage therapy. *Texas State J. Med.*, 1933, 29:205–209
- 13 Kazhal N., Iftimovich R. Iz istorii bor'by protiv mikrobov i virusov. Nauchnoe izdatel'stvo, Buharest, 1968:404
- 14 d'Herelle F. Bakteriofag i fenomen vyzdorovleniya. Tiflisskij gosudarstvennyj universitet, Tiflis, 1935:404
- 15 Dublanchet A. and Bourne S. The epic of phage therapy. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 2007, 18:15–18
- 16 Eaton M. D. and Bayne-Jones S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *JAMA*, 1934, 23:1769–1939
- 17 Krueger A. P. and Scribner E. J. Bacteriophage therapy. II. The bacteriophage: Its nature and its therapeutic use. *JAMA*, 1941, 19:2160–2277
- 18 Rakietyen M. L. Studies with *Staphylococcus* bacteriophage. I. The preparation of polyvalent *Staphylococcus* bacteriophage. *Yale J. Biol. Med.*, 1932, 4:807–818
- 19 García R., Latz S., Romero J., Higuera G., García K., Bastías R. Bacteriophage Production Models: An Overview. *Front Microbiol.*, 2019, 10:1187 (doi: 10.3389/fmicb.2019.01187)
- 20 Kutateladze M. and Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 2010, 28:591–595
- 21 Międzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K. et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv. Virus Res.*, 2012, 83:73–121 (doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7)
- 22 Moye Z. D., Woolston J., Sulakvelidze A. Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 2018, 10:E205 (doi: 10.3390/v10040205)
- 23 Buttner C., McAuliffe O., Ross R. P., Hill C., O'Mahony J., Coffey A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Front. Microbiol.*, 2017, 8:34 (doi: 10.3389/fmicb.2017.00034)
- 24 Doss J., Culbertson K., Hahn D., Camacho J., Barekzi N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 2017, 9:50 doi: 10.3390/v9030050
- 25 Krestnikova V.A. Lechenie i profilaktika fagami i ih aprobaciya v rabotah sovetskikh issledovatelej. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*, 1947, 3:56–65

- 26 Culukidze A.P. Lechenie fagami v hirurgii. *Hirurgiya*, 1940, 12:132–133
- 27 Kokin G.A. Primenenie bakteriofagov v hirurgii. *Sovetskaya medicina*, 1941, 9:15-18
- 28 Kokin G.A. Fagoterapiya i fagoprofilaktika gazovoj gangreny. V sb.: Opyt sovetskoj voennoj mediciny v gody Velikoj Otechestvennoj vojny 1941-1945. Medgiz, Moskva, 1946, 3:56-63
- 29 Culukidze A.P. Opyt primeneniya bakteriofaga v usloviyah voennogo travmatizma, Gruzmedgiz, Tbilisi, 1941
- 30 Alessandrini A. and Doria R. (1924). Il batteriofago nella terapia del tifo addominale. *Policlinico, sez prat.*, 1924, 31:109
- 31 Chanishvili N., Chanishvili T., Tediashvili M. and Barrow P. A. Phages and their application against drug-resistant bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2001, 76:689–699
- 32 Compton A. Antidysentery bacteriophage in treatment of dysentery: A record of 66 cases treated, with inferences. *Lancet*, 1929, 2:273
- 33 Costa Cruz J. Le traitement des dysenteries bacillaires par le bacteriophage. *C.R. Soc Biol.*, 1924, 91:845
- 34 Karamov S. Opyt primeneniya fagoterapii dlya lecheniya bryushnogo tifa. V sb.: Izbrannye stat'i Azerbajdzhanskogo instituta epidemiologii i mikrobiologii, 1938, 6:101-105
- 35 Manolov D.G., Sekunova V.N., Somova E.E. Opyt terapii bryushnogo tifa putem vnutrivennogo vvedeniya faga. *ZHurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 4:33
- 36 Sapir I.B. Nablyudeniya i zamechaniya po povodu lecheniya dizenterii bakteriofagom. *Trudy Moskovskogo oblastnogo instituta infekcionnyh boleznej*. – M.: Moskovskij oblastnoj institut infekcionnyh boleznej, 1939: 135-151
- 37 Skurnik M. Can Bacteriophages Replace Antibiotics? *Antibiotics (Basel)*, 2022, 26, 11(5):575 (doi: 10.3390/antibiotics11050575)
- 38 Fadlallah A., Chelala E., Legeais J.-M.M. Corneal Infection Therapy with Topical Bacteriophage Administration. *Open Ophthalmol. J.*, 2015, 9:167–168 (doi: 10.2174/1874364101509010167)
- 39 World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013, 310:2191–2194 (doi: 10.1001/jama.2013.281053)
- 40 Balasubramanian G., Morampudi S., Chhabra P., Gowda A., Zomorodi B. An overview of Compassionate Use Programs in the European Union member states. *Intractable Rare Dis. Res.*, 2016, 5:244–254 (doi: 10.5582/irdr.2016.01054)
- 41 Jarow J.P., Lurie P., Ikenberry S.C., Lemery S. Overview of FDA's Expanded Access Program for Investigational Drugs. *Ther. Innov. Regul. Sci.*, 2017, 51:177–179 (doi: 10.1177/2168479017694850)
- 42 Donovan P. Access to unregistered drugs in Australia. *Aust. Prescr.*, 2017, 40:194–196 (doi: 10.18773/austprescr.2017.062)
- 43 Leszczyński P., Weber-Dabrowska B., Kohutnicka K.M., Łuzcak M., Górecki A., Górski A. Successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) intestinal carrier status in a healthcare worker—Case report. *Folia. Microbiol.* 2006, 51:336–338 (doi: 10.1007/BF02932128)
- 44 Institut Eliavy. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <https://eliava-institute.org/?lang=en>
- 45 Stafilokokkovyj bakteriofag. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <http://phage.ge/products/staphylococcal-bacteriophage>
- 46 Bakteriofag Fersisi. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <https://phage.ge/products/fersisi-bacteriophage>
- 47 SES-bakteriofag. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <https://phage.ge/products/ses-bacteriophage>
- 48 Intesti-bakteriofag. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <https://phage.ge/products/intesti-bacteriophage/?lang=en>

- 49 Enko-bakteriofag. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <https://phage.ge/products/enko-bacteriophage>
- 50 Pio-bakteriofag. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <http://phage.ge/products/pyo-bacteriophage>
- 51 STAFAL. [(Data obrashcheniya 27.11.2022)]; Dostupno onlajn: <https://www.bohemiapharm.eu/en/products/products/stafal>
- 52 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczałnej im. Ludwika Hirszfelda. Available online: <https://www.iitd.pan.wroc.pl> (accessed on 27 November 2022)
- 53 Letkiewicz S., Międzybrodzki R., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis—case report. *Folia Microbiol*, 2009, 54:457–461 (doi: 10.1007/s12223-009-0064-z)
- 54 Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2000, 48, 6:547–551
- 55 Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2001, 1:131-134 (doi: 10.1016/S1529-1049(01)00015-0)
- 56 Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant. Proc.* 2003, 35:1385–1386 (doi: 10.1016/S0041-1345(03)00525-6)
- 57 Miedzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Pawelczyk Z., Rogoz P., Klak M., Wojtasik E., et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv. Virus Res.*, 2012, 83:73–121 (doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7)
- 58 NPC «MIKROMIR». [(Data obrashcheniya 5.12.2022)]; Dostupno onlajn: <https://micromir.bio/products/fagoderm>
- 59 Bakteriofagi: teoreticheskie i prakticheskie aspekty primeneniya v medicine, veterinarii i pishchevoj promyshlennosti. Mat. Mezhd. nauch.-prakt. konf. "Bakteriofagi: teoreticheskie i prakticheskie aspekty primeneniya v medicine, veterinarii i pishchevoj promyshlennosti". Ul'yanovsk, 2013
- 60 AO «Mikrogen». [(Data obrashcheniya 11.12.2022)]; Dostupno onlajn: <https://www.microgen.ru>
- 61 NII «Problem biologicheskoy bezopasnosti». [(Data obrashcheniya 11.12.2022)]; Dostupno onlajn: <https://biosafety.kz>
- 62 Alekseyuk P.G., Alekseyuk M.S., Bogoyavlenskij A.P., Akylova M.A., Moldahanov E.S., Omirtaeva E.S., Berezin V.E. Izuchenie spektra aktivnosti koktejlja bakteriofagov na modeli klinicheskikh shtammov *Rseudomonas aeruginosa*. Mat. Mezhd. nauch.-prakt. konf. «Sovremennye vyzovy dlya biotekhnologii, veterinarii i mediciny». Gvardejskij, 2020: 31-36
- 63 Alexyuk P., Bogoyavlenskij A., Alexyuk M., Akanova K., Moldakhanov Y., Berezin V. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Active against Clinical Strains of *E. coli* and Development of a Phage Antimicrobial Cocktail. *Viruses*, 2022 (doi: 10.3390/v14112381)
- 64 Bogoyavlenskij A., Alexyuk M., Alexyuk P., Moldakhanov Y., Berezin V. Draft genome sequences data of two Rosemountvirus phages isolated from soil near poultry farm. *Data in Brief*, 2022 (doi: 10.1016/j.dib.2022.108488)
- 65 M.S. Alexyuk, A.P. Bogoyavlenskij, P.G. Alexyuk, K.S. Akanova, Y.S. Moldakhanov, A. Manakbayeva, V.E. Berezin Complete Genome Sequence of a Gamaleyavirus Phage, Lytic against Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Resource Announcements*, 2022 (doi: 10.1128/mra.00896-22)
- 66 Centr innovacionnogo primeneniya fagov i terapii. [(Data obrashcheniya 5.12.2022)]; Dostupno onlajn: <http://ipath.ucsd.edu/>
- 67 Pirnay J.P., Verbeken G., Ceysens P.J., Huys I., De Vos D., Ameloot C., Fauconnier A. The Magistral Phage. *Viruses*, 2018, 10(2), 64 (doi: 10.3390/v10020064)

68 Chan B.K., Turner P.E., Kim S., Mojibian H.R., Elefteriades J.A., Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol. Med. Public Health*, 2018, 2018:60–66 (doi: 10.1093/emph/eoy005)

69 Duplessis C., Biswas B., Hanisch B., Perkins M., Henry M., Quinones J., Wolfe D., Estrella L., Hamilton T. Refractory *Pseudomonas* Bacteremia in a 2-Year-Old Sterilized by Bacteriophage Therapy. *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc.*, 2017, 7:253–256 (doi: 10.1093/jpids/pix056)

70 Fish R., Kutter E., Bryan D., Wheat G., Kuhl S. Resolving Digital Staphylococcal Osteomyelitis Using Bacteriophage—A Case Report. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7(4), 87 (doi: 10.3390/antibiotics7040087)

71 Fish R., Kutter E., Wheat G., Blasdel B., Kutateladze M., Kuhl S. Compassionate Use of Bacteriophage Therapy for Foot Ulcer Treatment as an Effective Step for Moving Toward Clinical Trials. *Methods Mol. Biol.*, 2018, 1693:159–170 (doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_14)

72 Khawaldeh A., Morales S., Dillon B., Alavidze Z., and et al. Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. *J. Med. Microbiol.*, 2011, 60:1697–1700 (doi: 10.1099/jmm.0.029744-0)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

MPNТИ: 62.37.35

А.У. ИСАБЕК¹, А.К. БОПИ¹, Р.А. АХМЕТ², К.Т. СУЛТАНКУЛОВА¹, А.К. НАХАНОВ¹,
О.В. ЧЕРВЯКОВА^{1*}¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Гвардейский,
Казахстан²Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: ovch@mail.ru

МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ВИРУСОВ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВЕКТОРНЫХ
ВАКЦИН

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.04

Аннотация

Поксвирусы широко используются в качестве векторов при разработке вакцин против инфекционных заболеваний человека и животных. Ограниченный круг восприимчивых животных и непатогенность для человека каприпоксвирусов определяют огромный потенциал их использования в качестве вакцинных векторов. Технология получения рекомбинантных каприпоксвирусов может быть значительно улучшена путем сочетания временной доминантной селекции по гену *gpt Escherichia coli* (основан на устойчивости к микофеноловой кислоте) с дифференциальной экспрессией флуоресцентного белка.

Рекомбинантный вирус генерируется путем замены зеленого флуоресцирующего белка (в акцепторном вирусе) целевым геном в результате двух последовательных рекомбинаций ДНК. В процессе первого кроссинговера плазида интеграции с целевым геном встраивается в геном акцепторного вируса. В результате образуется нестабильная генетическая конструкция, которая может существовать только под селективным давлением микофеноловой кислоты. После снятия селективного давления происходит внутримолекулярная рекомбинация вирусного генома в участках гомологии, и образуются два типа вирусов: рекомбинант с целевым геном и исходный акцепторный вирус.

Вовлеченные вирусы (зеленый исходный, зеленый промежуточный и бесцветный конечный) визуализируются по-разному с помощью флуоресцентной микроскопии, что позволяет использовать простой и эффективный протокол отбора целевых рекомбинантов. Этот метод (замена генов «от зеленого к бесцветному») значительно сокращает время, необходимое для получения безмаркерного рекомбинантного каприпоксвируса.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, рекомбинация генома, вирусный вектор.

Вакцинация является основным методом профилактики инфекционных заболеваний. Несмотря на большое количество доступных препаратов, создание эффективных и безопасных вакцин все еще остается актуальной задачей. Одним из решений может стать генетическая иммунизация, в результате которой в организм доставляются гены, кодирующие целевые антигены патогенных микроорганизмов [1]. Экспрессия таких генов в организме имитирует вирусную инфекцию, вызывая иммунный ответ. Доставка целевых генов может осуществляться различными путями [2], среди которых использование вирусных векторов. Вирусные векторы, экспрессирующие гетерологичные антигены, сходны с аттенуированными живыми вирусными вакцинами, и в идеале должны обладать способностью включать в свой геном чужеродные гены целевых антигенов, промоторов и

адьювантов и стабильно их экспрессировать. Разработка вирусных векторов направлена на создание поливалентных вакцин, а также вакцин против основных болезней человека и животных, для которых до сих пор эффективные профилактические препараты отсутствуют.

Поксвирусы, сконструированные для экспрессии чужеродных генов, зарекомендовали себя как чрезвычайно ценные инструменты в современной биотехнологии при разработке как медицинских, так и ветеринарных вакцин. Геном с высокой емкостью для рекомбинантной ДНК [3], точный вирус-специфический контроль экспрессии генамишени, отсутствие персистенности или интеграции в геном хозяина [4], высокий уровень иммуногенности [5, 6], исключительная термостабильность, а также простота получения вектора и вакцины являются важными характеристиками, благодаря которым поксвирусы нашли широкое применение в качестве вакцинных векторов.

Вирус нодулярного дерматита относится к роду *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*. К роду *Capripoxvirus* относятся также вирусы оспы овец и оспы коз. Каприпоксвирусы имеют высокую генетическую гомологию [7, 8]. Атенуированные вакцинные штаммы каприпоксвирусов были успешно использованы в качестве векторов при разработке бивалентных вакцин [9, 10, 11]. Каприпоксвирусы имеют ограниченный круг восприимчивых животных и вызывают abortивные инфекции в организме непермиссивных животных. Однако даже в отсутствие репликации рекомбинантные каприпоксвирусы корректно экспрессируют чужеродные гены и вызывают длительные иммунные ответы у иммунизированных хозяев [12, 13]. Эти свойства делают каприпоксвирусы перспективными для разработки векторных вакцин против инфекционных заболеваний различных видов животных.

Способы получения рекомбинантных поксвирусов детально рассмотрены в ряде обзоров [14, 15]. Для селекции и отбора рекомбинантов используют маркерные гены. Это могут быть гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам [16, 17, 18] или визуальные маркеры. Среди них ген бета-галактозидазы, экспрессия которого сопровождается окрашиванием бляшек вируса в синий цвет в присутствии 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) [19, 20]; ген бета-глюкуронидазы в зависимости от используемого субстрата образует цветные или флуоресцентные продукты [21]. Более поздние исследования связаны с использованием флуоресцирующих белков [22, 23].

Наиболее перспективным направлением в селекции и отборе рекомбинантных поксвирусов является использование в качестве маркеров флуоресцирующих белков. В лаборатории молекулярной биологии и геной инженерии НИИ проблем биологической безопасности сконструированы векторные плазмидные ДНК и отработан способ получения рекомбинантных каприпоксвирусов методом гомологичной рекомбинации в условиях временной доминантной селекции с использованием в качестве селективного маркера гена *Escherichia coli*, кодирующего фермент ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (*gpt*) [24]. Целью данных исследований являлась оптимизация отбора рекомбинантных вирусов нодулярного дерматита при разработке векторных вакцин.

Материалы и методы исследования

Клеточные культуры, использованные в этом исследовании, были предоставлены Лабораторией клеточной биотехнологии НИИ проблем биологической безопасности. Первичные клетки тестикул ягненка (ТЯ) культивировали при 37°C в 5% CO₂ в полусинтетической пристеночной среде (ПСП, НИИПББ, РК) с добавлением 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС, Sigma, США).

В работе использовали рекомбинантный вирус нодулярного дерматита Atyrau-B, полученный в результате нокаута гена LSDV008 в геноме вирулентного штамма вируса *Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ*. Вирусы нодулярного дерматита размножали на клетках ТЯ с использованием среды ПСП, содержащей 2% ЭБС, в течение 7-10 дней при

37°C в 5% CO₂. Активность вируса определяли методом микротитрования в 96-луночных планшетах. Титр рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Плазмиды интеграции pIN-LSDV066-EGFP и pIN-LSDV066-IL18 для встраивания гена зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) или бычьего интерлейкина-18, соответственно, в локус тимидинкиназы вирусного генома были сконструированы как описано нами ранее [25].

Рекомбинантные вирусы получали путем гомологичной рекомбинации в условиях временной доминантной селекции, как описано ранее [24]. Вкратце, монослой клеток ТЯ инфицировали вирусом нодулярного дерматита Атугау-В или его производными в дозе 0,1 ТЦД₅₀/клетка в течение 2 ч, а затем трансфицировали соответствующей интеграционной плазмидой с использованием липофектамина 2000. Когда цитопатический эффект (ЦПЭ) достигал 80% (3-5 дней), клетки лизировали тремя циклами замораживания-оттаивания. Для обогащения трансфекционного пула рекомбинантными вирусами проводили 2-3 последовательных пассажа в селективной среде ПСП, содержащей 2% ЭБС, 2,5 мкг/мл микофеноловой кислоты, 25 мкг/мл ксантина и 1,5 мкг/мл гипоксантина. Отбор рекомбинантов проводили клонированием методами предельного разведения и бляшек. Рекомбинантные вирусы идентифицировали методом люминесцентной микроскопии и ПЦР. ПЦР-анализ проводили для определения гомогенности рекомбинантного вируса, т.е. полного отсутствия родительского вируса, с использованием праймеров RCR-ТК-F 5'-aattataggacstatgtttctggc-3' и RCR-ТК-R 5'-cagcgtctttataacattccat-3'. Размер продукта для исходного вируса составляет 413 п.о., со встроенным геном *egfp* – 1225 п.о., со встроенным геном *bIL-18* – 1085 п.о.

ПЦР проводили в 25 μл, содержащих 5 μл 5× реакционного буфера OneTaqStandard, 0,5 μл 10 mM dNTP, по 1 μл каждого праймера (10 пмоль/μл) и 0,125 μл ДНК-полимеразы OneTaq (0,625 ед.), 1 μл матричной ДНК (100 нг/μл) и стерильной дистиллированной воды до конечного реакционного объема. Матричную ДНК денатурировали в течение 30 с при 94°C, отжиг праймеров проводили при 50°C в течение 30 с, удлинение цепи проводили при 72°C в течение 90 с (30 циклов).

Для отбора бляшек вируса и оценки экспрессии зеленого флуоресцирующего белка рекомбинантным вирусом нодулярного дерматита использовали люминесцентный микроскоп Альтами ЛЮМ-2.

Экспрессию интерлейкина 18 рекомбинантным вирусом нодулярного дерматита подтверждали методом вестерн-блота, как описано ранее [24], с использованием поликлональных мышинных анти-bIL18 сывороток.

Результаты и обсуждение

Рекомбинация вирусного генома в условиях временной доминантной селекции происходит следующим образом. В процессе первого кроссинговера вся плазида интеграции встраивается в вирусный геном (рисунок 1А). В результате образуется нестабильная конструкция, которая может существовать только под селективным давлением микофеноловой кислоты. После снятия селективного давления происходит внутримолекулярная рекомбинация вирусного генома в участках гомологии и образуются два типа вирусов; рекомбинант с целевым геном и исходный вариант дикого типа. В некоторых случаях для выделения рекомбинанта требуется 10 и более раундов клонирования методом предельного разведения и бляшкообразования.

Для повышения эффективности отбора рекомбинантов мы разработали акцепторный вирус, в геном которого встроен маркерный ген флуоресцентного белка. При использовании акцепторного вируса для гомологичной рекомбинации в условиях временной доминантной селекции отбор рекомбинантов возможен уже через 2-3 раунда клонирования методом бляшек. Если бляшки акцепторного вируса и вирусов с нестабильным генетическим геномом флуоресцируют за счет экспрессии маркерного гена, бляшки рекомбинантного вируса остаются бесцветными при люминесцентной

микроскопии. Как видно из рисунка 1Б, в результате внутримолекулярной рекомбинации генома после снятия селективного давления образуются два типа вируса - флуоресцирующий и не флуоресцирующий («от зеленого к бесцветному»).

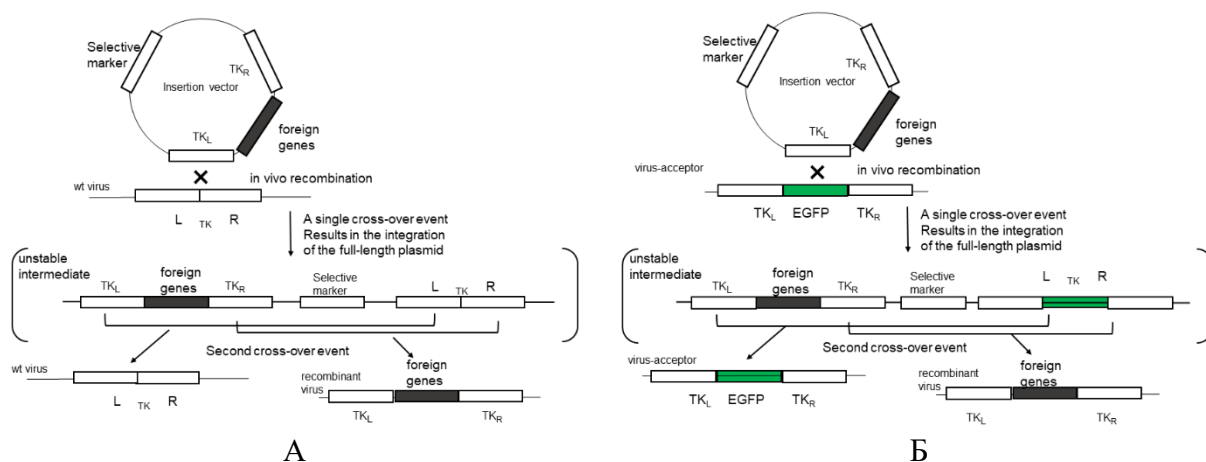
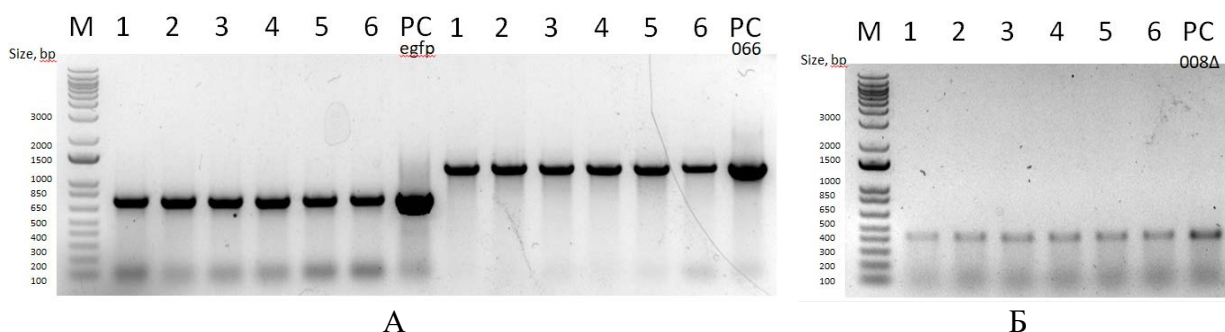


Рисунок 1 – Схема гомологичной рекомбинации вирусного генома в условиях временной доминантной селекции: прямое встраивание чужеродного гена (А) и встраивание чужеродного гена путем замены маркерного гена - стратегия "зеленый-бесцветный" (Б)

На первом этапе исследований нами был разработан вирус-акцептор. В геном вируса нодулярного дерматита Атырау-В был встроен ген зеленого флуоресцирующего белка. Для отбора рекомбинантных вирусов использовали люминесцентную микроскопию в комплексе с ПЦР. В результате было получено три клона рекомбинантных вирусов Атырау-ВJ(EGFP), содержащих в своем геноме ген зеленого флуоресцирующего белка. Генетическая стабильность была подтверждена путем последовательного пассирования рекомбинанта в течение 10 пассажей (рисунок 2А). Как видно из рисунка 2А, локус тимидинкиназы (LSDV066) остается стабильным в течение 10 пассажей, сохраняя встроенный чужеродный ген в своем составе.



А: анализ клонов рекомбинантного вируса Атырау-ВJ(EGFP) на наличие гена EGFP, структуры локуса LSDV066; 1-3 – ДНК клонов вируса после пятого пассажа, 4-6 – ДНК клонов вируса после десятого пассажа, PC – положительный контроль (плазмидная ДНК). Б: анализ клонов рекомбинантного вируса Атырау-ВJ(IL18) на наличие гена IL18, структуры локуса LSDV066; 1 – ДНК вируса после пятого пассажа, 2 – ДНК вируса после десятого пассажа, PC – положительный контроль (плазмидная ДНК).

Рисунок 2 – ПЦР анализ рекомбинантных вирусов после 5 и 10 пассажа

Экспрессию встроенного гена зеленого флуоресцирующего белка оценивали методом люминесцентной микроскопии. Установлено, что уже через три часа после инфицирования клеток рекомбинантным вирусом в монослое регистрируются отдельные

флуоресцирующие клетки (рисунок 3А). Со временем их число увеличивается (рисунок 3 Б и В) и через 24 ч флуоресцируют практически все клетки инфицированного монослоя (рисунок 3Г). При этом цитопатическое действие вируса можно наблюдать только к концу третьих – началу четвертых суток культивирования.

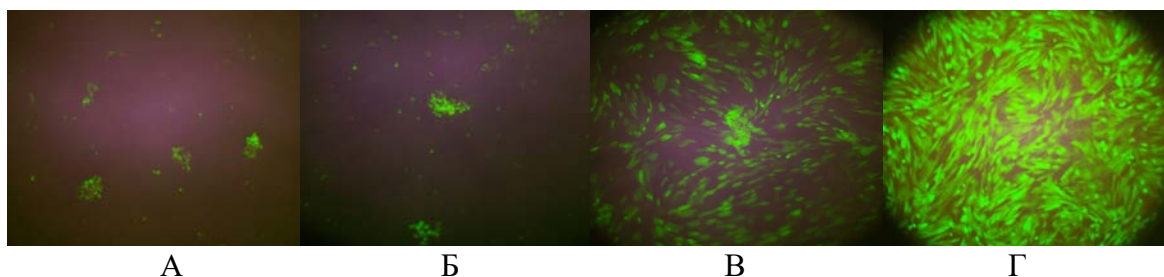
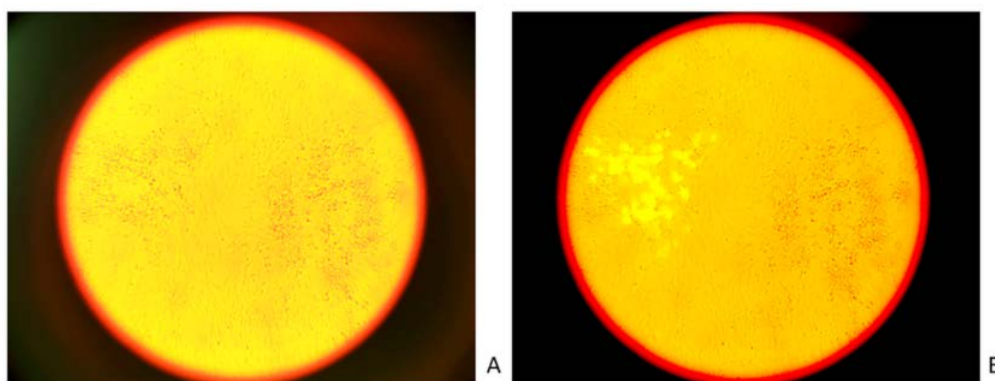


Рисунок 3 – Люминесцентная микроскопия монослоя клеток ТЯ через три (А), шесть (Б), двенадцать (В) и двадцать четыре часа (Г) после инфицирования рекомбинантным вирусом Atyrau-BJ(EGFP) (100×)

Таким образом, нами был получен акцепторный вирус Atyrau-BJ(EGFP), который мы использовали в дальнейшем для встраивания целевого гена, используя стратегию «от зеленого к бесцветному». В качестве целевого гена мы использовали последовательность мРНК, кодирующую бычий интерлейкин-18.

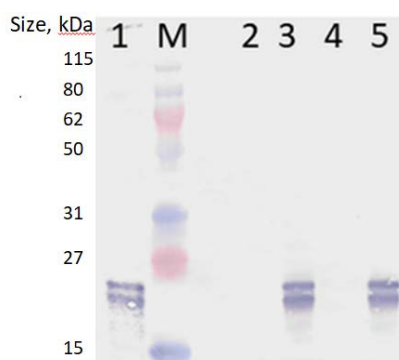
Монослой клеток ТЯ инфицировали акцепторным вирусом Atyrau-BJ(EGFP) и трансфицировали плазмидой интеграции pIN-LSDV066-IL18. Клеточный лизат после трансфекции клонировали методом бляшек под слоем агарозы. Бляшки анализировали световой и люминесцентной микроскопией (рисунок 4).



А – световая микроскопия, Б – одновременная люминесцентная и световая микроскопия

Рисунок 4 – Микроскопия бляшек, образованных в культуре клеток тестикул ягненка рекомбинантными вирусами нодулярного дерматита

Не флуоресцирующие бляшки накапливали и анализировали методом ПЦР. Для полного удаления акцепторного вируса полученные вирусные клоны были повторно клонированы. В результате был получен клон вируса Atyrau-BJ(bIL18) экспрессирующий бычий интерлейкин-18. В течение 10 последовательных пассажей вирус оставался генетически стабильным (рисунок 2Б). Об этом также свидетельствовала экспрессия интерлейкина-18, подтвержденная методом вестерн-блота (рисунок 5). Таким образом, с использованием стратегии «от зеленого к бесцветному» отбор рекомбинантных вирусов стал возможен за 2 раунда клонирования.



1 – бактериально экспрессированный интерлейкин 18 (положительный контроль), 2, 4 – неинфицированные клетки ТЯ, 3 – клетки, инфицированные вирусом Атырау-BJ(IL18), пассаж 5, 5 – клетки, инфицированные вирусом Атырау-BJ(IL18), пассаж 10

Рисунок 5 – Иммунодетекция интерлейкина 18, экспрессированного рекомбинантным вирусом нодулярного дерматита Атырау-BJ(IL18)

Подобные стратегии были использованы при получении рекомбинантных вирусов осповакцины. Di Lillo et al. [26] разработали способ получения рекомбинантов модифицированного вируса осповакцины путем сочетания временной селекции по диапазону хозяев (основанной на восстановлении в MVA делетированного гена осповакцины K1L) с дифференциальной экспрессией флуоресцентных белков. При этом используют два вида культур клеток - RK13 и ВНК-21. Три типа вовлеченных вирусов (красный исходный, зеленый промежуточный и бесцветный конечный рекомбинантный) визуализируют с помощью флуоресцентной микроскопии, что позволяет эффективно и быстро выделять рекомбинантные вирусы. Позднее авторы модифицировали метод очистки используя проточную цитометрию для сортировки клеток [27]. Barbieri et al. [28] использовали данный подход для получения множественных вставок в геном вируса осповакцины.

Заключение

Разработка векторных вакцин для профилактики инфекционных заболеваний животных и человека является перспективным направлением в вакцинологии. Вирус нодулярного дерматита, как и другие представители рода *Capripoxvirus*, имеют ограниченный круг хозяев и не патогенны для человека, что делает их уникальными векторами. Несмотря на простоту встраивания чужеродных последовательностей в геном поксвирусов, проблема отбора рекомбинантов остается актуальной. Разработка акцепторного вируса, экспрессирующего флуоресцирующий маркерный белок, и его использование при рекомбинации в условиях временной доминантной селекции по устойчивости к микофеноловой кислоте позволило значительно сократить число раундов клонирования при отборе рекомбинантов.

Таким образом, для повышения эффективности отбора рекомбинантных вирусов была разработана стратегия «от зеленого к бесцветному». Данная стратегия основана на замене маркерного гена зеленого флуоресцирующего белка целевым геном.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования AP08856376 «Совершенствование вакцинного вектора на основе каприпоксвируса» Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Литература:

- 1 Zuber P.L.F., Gruber M., Kaslow D.C., et al. Evolving pharmacovigilance requirements with novel vaccines and vaccine components. *BMJ Global Health*, 2021; 6: e003403 (doi: 10.1136/bmjgh-2020-003403)
- 2 *Antigen Delivery Systems: Immunological and Technological Issues*. B.Gander, H.P.Merkle, G.Corradin (eds.) Taylor & Francis e-Library, 2003 (doi: 10.3109/9780203304341)
- 3 Merchlinsky M., Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*, 1992, 190(1): 522-526 (doi: 10.1016/0042-6822(92)91246-q)
- 4 Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, 79: 7415-7419 (doi: 10.1073/pnas.79.23.7415)
- 5 Xie L., Li Y. Advances in vaccinia virus-based vaccine vectors, with applications in flavivirus vaccine development. *Vaccine*, 2022, 40(49): 7022–7031 (doi: 10.1016/j.vaccine.2022.10.047)
- 6 Pursell T., Spencer Clinton J.L., Tan J., Peng R., Ling P.D. Modified vaccinia Ankara expressing EEHV1A glycoprotein B elicits humoral and cell-mediated immune responses in mice. *PLoS one*, 2022, 17(3): e0265424 (doi: 10.1371/journal.pone.0265424)
- 7 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F., Rock D. L. Genome of lumpy skin disease virus. *J. Virol.*, 2001, 75: 7122-7130 (doi: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001)
- 8 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J. H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.*, 2002, 76: 6054-6061 (doi: 10.1128/jvi.76.12.6054-6061.2002)
- 9 Li J., Wang J., Guo Y., Gong Z., Cai X. A recombinant capripoxvirus expressing the F protein of peste des petits ruminants virus and the P12A3C of foot-and-mouth disease virus. *BMC veterinary research*, 2023, 19(1): 18 (doi: 10.1186/s12917-022-03529-5)
- 10 Fakri F., Bamouh Z., Ghzal F., Baha W., Tadlaoui K., Fihri O. F., Chen W., Bu Z., Elharrak M. Comparative evaluation of three capripoxvirus-vectored peste des petits ruminants vaccines. *Virology*, 2018, 514: 211-215 (doi: 10.1016/j.virol.2017.11.015)
- 11 Liu F., Fan X., Li L., Ren W., Han X., Wu X., & Wang Z. Development of recombinant goatpox virus expressing Echinococcus granulosus EG95 vaccine antigen. *Journal of Virological Methods*, 2018, 261: 28-33 (doi: 10.1016/j.jviromet.2018.08.002)
- 12 Burgers W. A., Ginbot Z., Shen Y. J., Chege G. K., Soares A. P., Müller T. L., Bunjun R., Kiravu A., Munyanduki H., Douglass N., & Williamson A. L. The novel capripoxvirus vector lumpy skin disease virus efficiently boosts modified vaccinia Ankara human immunodeficiency virus responses in rhesus macaques. *The Journal of general virology*, 2014, 95(Pt 10): 2267-2272 (doi: 10.1099/vir.0.067835-0)
- 13 Shen Y.J.; Shephard E.; Douglass N.; Johnston N.; Adams C.; Williamson C.; Williamson A.L. A novel candidate HIV vaccine vector based on the replication deficient Capripoxvirus, Lumpy skin disease virus (LSDV). *Virol. J.*, 2011, 8: 265 (doi: 10.1186/1743-422X-8-265)
- 14 Liu F., Zhang H., Liu W. Construction of recombinant capripoxviruses as vaccine vectors for delivering foreign antigens: Methodology and application. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2019, 65: 181-188 (doi: 10.1016/j.cimid.2019.05.013)
- 15 Chervyakova O., Tailakova E., Sadikaliyeva S, Orynbayev M., Sultankulova K. Capripoxvirus vectors for vaccine development. *Gene Reports*, 2020, 21: 100890 (doi: 10.1016/j.genrep.2020.100890)
- 16 Franke C.A., Rice C.M., Strauss J.H., Hruby D.E. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for selection and isolation of vaccinia virus recombinants. *Mol. Cell Biol.* 1985, 5(8): 1918-1924 (doi: 10.1128/mcb.5.8.1918-1924.1985)
- 17 Boshra H., Teffera M., Cao J., Babiuk S. Cloning Strategies for the Generation of Recombinant Capripoxvirus Through the Use of Screening and Selection Markers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2022, 2465: 195-207 (doi: 10.1007/978-1-0716-2168-4_11)
- 18 Liu L., Cooper T., Eldi P., Garcia-Valtanen P., Diener K.R., Howley P.M., Hayball J.D. Transient dominant host-range selection using Chinese hamster ovary cells to generate marker-free recombinant viral vectors from vaccinia virus. *BioTechniques*, 2017, 62(4): 183-187 (doi: 10.2144/000114537)
- 19 Ye M., Keicher M., Gentshev I., Szalay A. A. Efficient Selection of Recombinant Fluorescent Vaccinia Virus Strains and Rapid Virus Titer Determination by Using a Multi-Well Plate Imaging System. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 1032 (doi: 10.3390/biomedicines9081032)

- 20 Panicali D., Grzelecki A., Huang C. Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene*, 1986, 47(2-3): 193-199 (doi: 10.1016/0378-1119(86)90063-6)
- 21 Carroll M.W., Moss B. E. coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, 1995, 19(3): 352-354, 356
- 22 Wallace D.B., Weyer J., Nel L.H., Viljoen G.J. Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *J Virol Methods*, 2007, 146(1-2): 52-60 (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.06.004)
- 23 Wallace D.B., Viljoen G.J. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, 2005, 23(23): 3061-3067 (doi: 10.1016/j.vaccine.2004.10.006)
- 24 Chervyakova O., Tailakova E., Kozhabergenov N., Sadikaliyeva S., Sultankulova K., Zakarya K., Maksyutov R.A., Strochkov V., Sandybayev N. Engineering of Recombinant Sheep Pox Viruses Expressing Foreign Antigens. *Microorganisms*, 2021, 9: 1005 (doi: 10.3390/microorganisms9051005)
- 25 Chervyakova O., Issabek A., Sultankulova K., Bopi A., Kozhabergenov N., Omarova Z., Tulendibayev A., Aubakir N., Orynbayev M. Lumpy skin disease virus with four knocked out genes was attenuated *in vivo* and protects cattle from infection. *Vaccines*, 2022, 10: 1705 (doi: 10.3390/vaccines10101705)
- 26 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Erfle V., Staib C., Sutter G., Siccardi A. G. Marker gene swapping facilitates recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara production by host-range selection. *Journal of virological methods*, 2009, 156: 37-43 (doi: 10.1016/j.jviromet.2008.10.026)
- 27 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Agresti A., Comunian C., Milani A., Capua I., Erfle V., Siccardi A.G. The combination of marker gene swapping and fluorescence-activated cell sorting improves the efficiency of recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine production for human use. *Journal of virological methods*, 2010, 163: 195-204 (doi: 10.1016/j.jviromet.2009.09.016)
- 28 Barbieri A., Panigada M., Soprana E., Di Mario G., Gubinelli F., Bernasconi V., Recagni M., Donatelli I., Castrucci M.R., Siccardi, A.G. Strategies to obtain multiple recombinant modified vaccinia Ankara vectors. Applications to influenza vaccines. *Journal of virological methods*, 2018, 251: 7-14 (doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.003)

А.У. ИСАБЕК¹, А.Қ. БОПИ¹, А.Р. АХМЕТ², К.Т. СУЛТАНКУЛОВА¹, А.К. НАХАНОВ¹,
О.В. ЧЕРВЯКОВА^{1*}

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Гвардейский,
Қазақстан

²Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: ovch@mail.ru

ВЕКТОРЛЫҚ ВАКЦИНАЛАРДЫ ӨЗІРЛЕУ ҮШІН РЕКОМБИНАНТТЫ НОДУЛЯРЛЫ ДЕРМАТИТ ВИРУСТАРЫН АЛУДЫҢ ТИІМДІЛІГІН АРТТЫРУ ӘДІСІ

Түйін

Поксвирустар адам мен жануарлардың жұқпалы ауруларына қарсы вакциналарды жасауда вектор ретінде кеңінен қолданылады. Сезімтал жануарлардың шектеулі диапазоны және адам үшін каприпоксвирустардың патогенді болмауы оларды вакцина векторлары ретінде пайдаланудың үлкен мүмкіндіктерін анықтайды. Рекомбинантты каприпоксвирустарды алу технологиясын *gpt* *Escherichia coli* гені арқылы (микофенол қышқылына төзімділікке негізделген) уақытша доминантты селекцияны флуоресцентті ақуыздың дифференциалды экспрессиясымен біріктіру арқылы айтарлықтай жақсартуға болады.

Рекомбинантты вирус ДНҚ-ның екі дәйекті рекомбинациясы нәтижесінде жасыл флуоресцентті ақуызды (акцепторлық вируста) мақсатты генмен ауыстыру арқылы жасалады. Бірінші кроссинговер кезінде мақсатты ген мен интеграциялық плазмида акцепторлық вирустың геномына енгізіледі. Нәтижесінде тек микрофенол қышқылының селективті қысымында өмір сүре алатын тұрақсыз генетикалық құрылым қалыптасады. Селективті қысым жойылғаннан кейін гомологиялық аймақтарда вирустық геномның молекулалық рекомбинациясы жүреді және вирустардың екі түрі түзіледі: мақсатты гені бар рекомбинантты және бастапқы акцепторлық вирус.

Қолданылған вирустар (бастапқы жасыл, аралық жасыл және соңғы түссіз) флуоресцентті микроскопия арқылы әр түрлі көрінеді. Бұл мақсатты рекомбинанттарды таңдаудың қарапайым және тиімді әдістемесін қолдануға мүмкіндік береді. Бұл әдіс (гендерді «жасылдан түссізге» ауыстыру) маркерсіз рекомбинантты каприпоксвирусты алу үшін қажетті уақытты айтарлықтай қысқартады.

Кілтті сөздер: нодулярлы дерматит вирусы, геном рекомбинациясы, вирустық вектор.

IRSTI: 62.37.35

A.U. ISSABEK¹, A.K. BOPI¹, R.A. AKHMET², K.T. SULTANKULOVA¹,
A.K. NAKHANOV¹, O.V. CHERVYAKOVA^{1*}

¹Research Institute for Biological Safety Problems, Gvardeiskiy, Kazakhstan

²Kazakh National University named after Al-Farabi, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: ovch@mail.ru

METHOD OF INCREASING THE EFFICIENCY OF OBTAINING RECOMBINANT NODULAR DERMATITIS VIRUSES FOR THE DEVELOPMENT OF VECTOR VACCINES

doi:10.53729/MV-AS.2023. 02.04

Abstract

Poxviruses are widely used as vectors in the development of vaccines against infectious diseases in humans and animals. The limited range of susceptible animals and the non-pathogenicity of capripoxviruses to humans determine the great potential for their use as vaccine vectors. The technology for producing recombinant capripoxviruses can be greatly improved by combining transient dominant selection for the

gpt gene of *Escherichia coli* (based on resistance to mycophenolic acid) with differential expression of green fluorescent protein.

The recombinant virus is generated by replacing the green fluorescent protein (in the acceptor virus) with the target gene by two consecutive DNA recombinations. During the first crossover, the integration plasmid with the target gene is inserted into the genome of the acceptor virus. As a result, an unstable genetic construct is formed, which can only exist under the selective pressure of mycophenolic acid. After the selective pressure is removed, intramolecular recombination of the viral genome occurs in homology regions, and two types of viruses are formed: a recombinant with a target gene and an initial acceptor virus.

The viruses involved (green parent, green intermediate, and colorless final) are visualized differently by fluorescence microscopy, allowing for a simple and efficient protocol for selecting target recombinants. This method (replacement of genes "from green to colorless") significantly reduces the time required to obtain a marker-free recombinant capripoxvirus.

Keywords: lumpy skin disease virus, genome recombination, viral vector.

Vaccination is the main method of preventing infectious diseases. Despite the large number of available drugs, the development of effective and safe vaccines is still an urgent task. One of the decisions may be genetic immunization, as a result of which genes encoding target antigens of pathogenic microorganisms are delivered to the body [1]. The expression of such genes in the body mimics a viral infection by triggering an immune response. Delivery of target genes can be carried out in various ways [2], including the use of viral vectors. Viral vectors expressing heterologous antigens are similar to attenuated live viral vaccines and should ideally be able to incorporate foreign genes of target antigens, promoters and adjuvants into their genome and express them stably. The development of viral vectors is aimed at creating polyvalent vaccines, as well as vaccines against major human and animal diseases, for which there are still no effective preventive drugs.

Poxviruses engineered to express foreign genes have proven to be extremely valuable tools in modern biotechnology for the development of both medical and veterinary vaccines. Genome with high capacity for recombinant DNA [3], precise virus-specific control of target gene expression, lack of persistence or integration into the host genome [4], high level of immunogenicity [5, 6], exceptional thermostability, as well as ease of obtaining a vector and vaccine are important features that have made poxviruses widely used as vaccine vectors.

Lumpy skin disease virus belongs to the genus *Capripoxvirus* of the *Poxviridae* family. The genus *Capripoxvirus* also includes sheep pox and goat pox viruses. Capripoxviruses have high genetic homology [7, 8]. Attenuated vaccine strains of capripoxviruses have been successfully used as vectors in the development of bivalent vaccines [9, 10, 11]. Capripoxviruses have a limited range of susceptible animals and cause abortive infections in non-permissive animals. However, even in the absence of replication, recombinant capripoxviruses correctly express foreign genes and elicit sustained immune responses in immunized hosts [12, 13]. These properties make capripoxviruses promising for the development of vector vaccines against infectious diseases in various animal species.

Methods for obtaining recombinant poxviruses are considered in detail in a number of reviews [14, 15]. For selection and selection of recombinants, marker genes are used. These can be genes providing resistance to antibiotics [16, 17, 18] or visual markers. Among them, the beta-galactosidase gene, the expression of which is accompanied by blue staining of virus plaques in the presence of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) [19, 20]; the beta-glucuronidase gene produces colored or fluorescent products depending on the substrate used [21]. More recent studies are associated with the use of fluorescent proteins [22, 23].

The most promising direction in the selection and isolation of recombinant poxviruses is the use of fluorescent proteins as markers. In the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering of the Research Institute of Biological Safety Problems, vector plasmid DNAs were constructed and a method for obtaining recombinant capripoxviruses by homologous recombination under conditions of temporary dominant selection using the *Escherichia coli* gene encoding the enzyme xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*gpt*) as a selective marker was

developed [24]. The purpose of these studies was to optimize the selection of recombinant nodular dermatitis viruses in the development of vector vaccines.

Materials and methods of research

Cell cultures used in this study were provided by the Cell Biotechnology Laboratory of the Research Institute for Biological Safety Problems. Primary lamb testicular cells (LT) were cultured at 37°C in 5% CO₂ in a semi-synthetic near-wall medium (SNM, RIBSP, RK) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA).

We used the recombinant Lumpy skin disease virus Atyrau-B obtained as a result of knockout of the LSDV008 gene in the genome of the virulent strain Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ. Lumpy skin disease viruses were propagated on LT cells using SNM containing 2% FBS for 7–10 days at 37°C in 5% CO₂. Virus activity was determined by microtitering in 96-well plates. The titer was calculated according to the method of Reed and Mench and expressed in lg TCID₅₀/cm³.

Integration plasmids pIN-LSDV066-EGFP and pIN-LSDV066-IL18 for inserting the green fluorescent protein (EGFP) gene or bovine interleukin-18 (bIL-18), respectively, into the thymidine kinase locus of the viral genome were constructed as described by us previously [25].

Recombinant viruses were obtained by homologous recombination under transient dominant selection conditions, as described previously [24]. Briefly, a monolayer of LT cells was infected with Lumpy skin disease virus Atyrau-B or its derivatives at a dose of 0.1 TCID₅₀/cell for 2 h, and then transfected with the appropriate integration plasmid using Lipofectamine 2000. When the cytopathic effect (CPE) reached 80% (3–5 days), cells were lysed by three freeze-thaw cycles. To enrich the transfection pool with recombinant viruses, 2–3 successive passages were performed in selective SNM containing 2% FBS, 2.5 µg/ml mycophenolic acid, 25 µg/ml xanthine, and 1.5 µg/ml hypoxanthine. The selection of recombinants was performed by cloning methods of limiting dilution and plaques. Recombinant viruses were identified by fluorescence microscopy and PCR. PCR analysis was performed to determine the homogeneity of the recombinant virus, i.e. complete absence of the parental virus, using primers RCR-TK-F 5'-aattataggacatgttttctggc-3' and RCR-TK-R 5'-cagcgtcttttaataacattccat-3'. The size of the product for the parental virus is 413 bp, with the inserted EGFP gene - 1225 bp, with the inserted bIL-18 gene - 1085 bp.

PCR was performed in 25 µl containing 5 µl 5x OneTaqStandard reaction buffer, 0.5 µl 10 mM dNTP, 1 µl each primer (10 pmol/µl) and 0.125 µl OneTaq DNA polymerase (0.625 U), 1 µl template DNA (100 ng/µl) and sterile distilled water to the final reaction volume. Template DNA was denatured for 30 s at 94°C, primers were annealed at 50°C for 30 s, and the chain was extended at 72°C for 90 s (30 cycles).

To select virus plaques and evaluate the expression of green fluorescent protein by the recombinant lumpy skin disease virus, an Altami LUM-2 luminescent microscope was used.

Expression of interleukin 18 by recombinant lumpy skin disease virus was confirmed by Western blotting as described previously [24] using polyclonal mouse anti-bIL18 sera.

Results and discussion

Recombination of the viral genome under conditions of temporary dominant selection occurs as follows. During the first crossing over, the entire integration plasmid is inserted into the viral genome (Figure 1A). The result is an unstable construct that can only exist under the selective pressure of mycophenolic acid. After the selective pressure is removed, intramolecular recombination of the viral genome occurs in the regions of homology, and two types of viruses are formed: recombinant with the target gene and the original wild-type variant. In some cases, ten or more rounds of cloning by limiting dilution and plaque formation are required to isolate a recombinant virus.

To increase the efficiency of selection of recombinants, we have developed an acceptor virus with a fluorescent protein marker gene inserted into its genome. When using an acceptor virus for homologous recombination under conditions of temporary dominant selection, the selection of

recombinants is possible after 2-3 rounds of plaque cloning. If the plaques of the acceptor virus and viruses with an unstable genetic genome fluoresce due to the expression of the marker gene, the plaques of the recombinant virus remain colorless under fluorescence microscopy. As can be seen from Figure 1B, as a result of intramolecular recombination of the genome after the removal of selective pressure, two types of virus are formed - fluorescent and non-fluorescent ("from green to colorless").

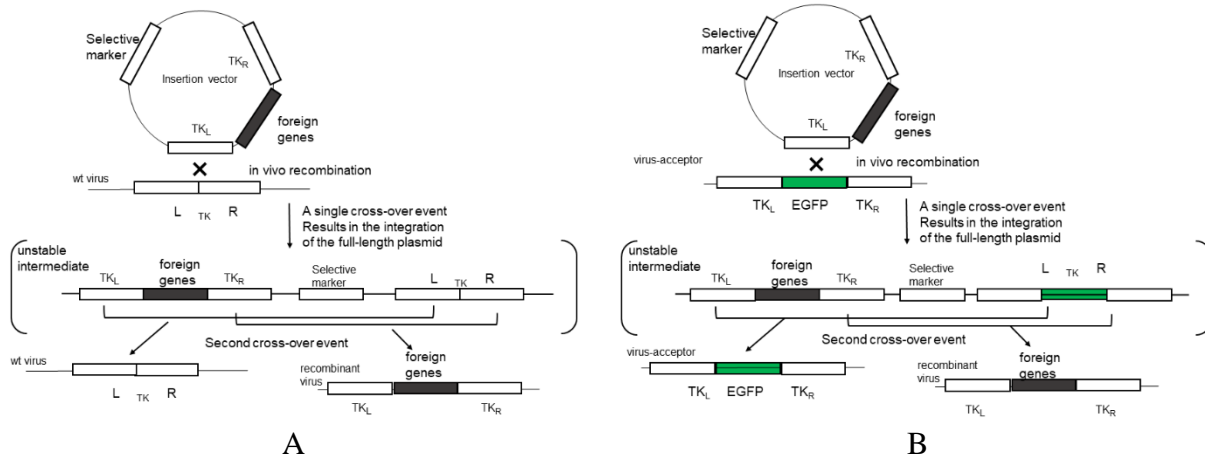
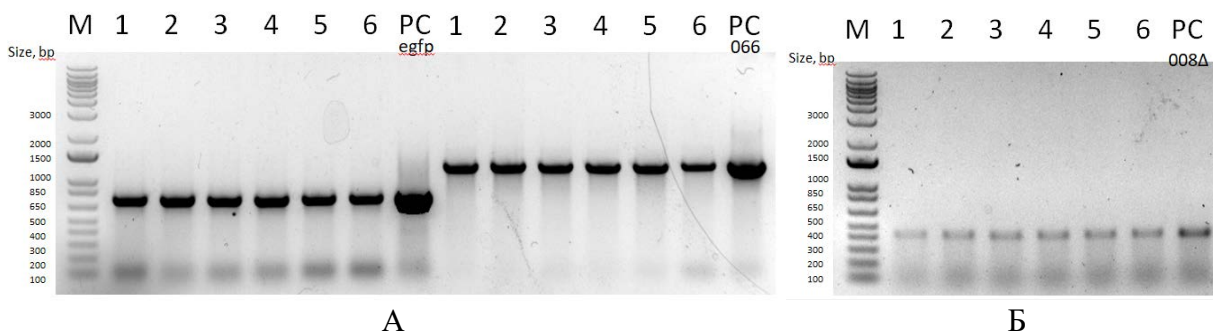


Figure 1 - Scheme of homologous recombination of the viral genome under conditions of temporary dominant selection: direct insertion of a foreign gene (A) and insertion of a foreign gene by replacing the marker gene - the "green to colorless" strategy (B)

At the first stage of research, we developed an acceptor virus. The green fluorescent protein gene has been inserted into the genome of the Atyrau-B lumpy skin disease virus. For the selection of recombinant viruses, fluorescent microscopy was used in combination with PCR. As a result, three clones of recombinant Atyrau-BJ(EGFP) viruses containing the green fluorescent protein gene in their genome were obtained. Genetic stability was confirmed by serial passaging of the recombinant for 10 passages (Figure 2A). As can be seen from Figure 2A, the thymidine kinase locus (LSDV066) remains stable for 10 passages, retaining the inserted foreign gene in its composition.



A: analysis of clones of the recombinant Atyrau-BJ(EGFP) virus for the presence of the EGFP gene, the structure of the LSDV066 locus; 1-3 - DNA of virus clones after the fifth passage, 4-6 - DNA of virus clones after the tenth passage, PC - positive control (plasmid DNA). B: analysis of clones of the recombinant Atyrau-BJ(IL18) virus for the presence of the IL18 gene, the structure of the LSDV066 locus; 1 - virus DNA after the fifth passage, 2 - virus DNA after the tenth passage, PC - positive control (plasmid DNA)

Figure 2 – PCR analysis of recombinant viruses after 5 and 10 passages

Expression of the inserted green fluorescent protein gene was assessed by fluorescent microscopy. It was found that individual fluorescent cells were registered in the monolayer as early as three hours after the cells were infected with the recombinant virus (Figure 3A). Over time, their number increases (Figures 3B and 3C), and after 24 h, almost all cells of the infected monolayer fluoresce (Figure 3D). In this case, the cytopathic effect of the virus can be observed only by the end of the third - the beginning of the fourth day of cultivation.

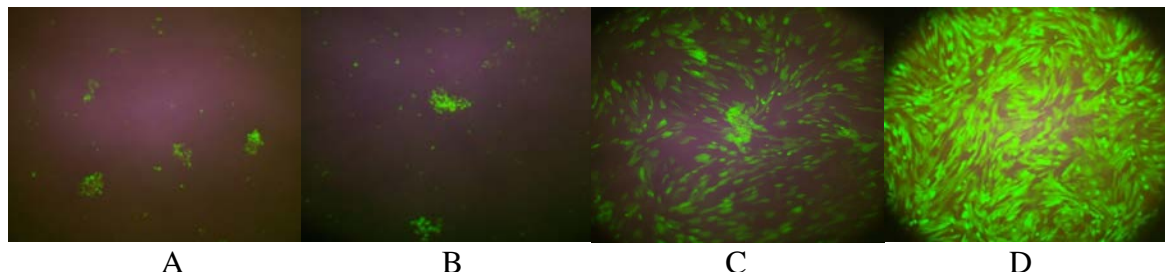
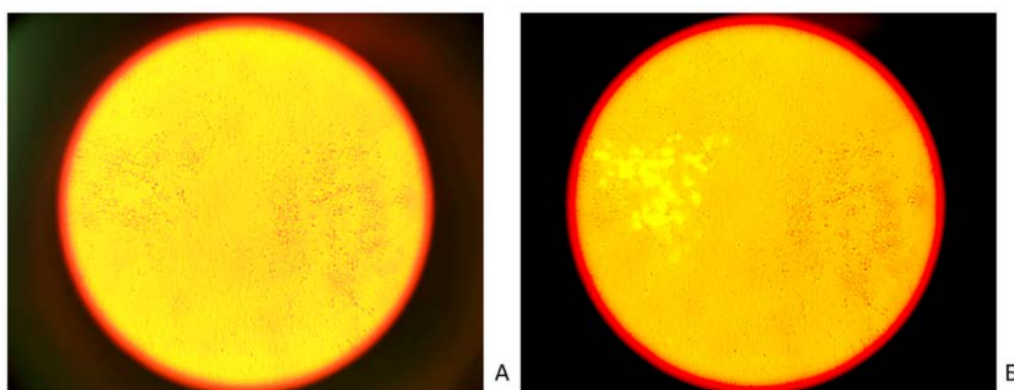


Figure 3 – Fluorescence microscopy of a monolayer of LT cells three (A), six (B), twelve (C) and twenty-four hours (D) after infection with the recombinant Atyrau-BJ(EGFP) virus (100×)

Thus, we obtained the Atyrau-BJ(EGFP) acceptor virus, which we further used to insert the target gene using the “green to colorless” strategy. We used the mRNA sequence encoding bovine interleukin-18 as the target gene.

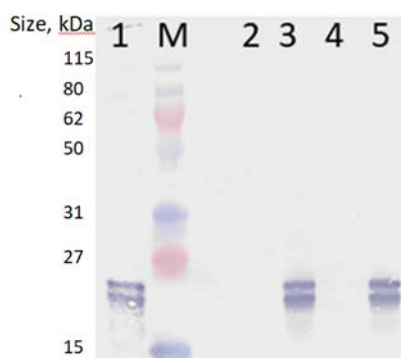
A monolayer of LT cells was infected with the Atyrau-BJ(EGFP) acceptor virus and transfected with the integration plasmid pIN-LSDV066-IL18. The cell lysate after transfection was cloned by the plaque method under a layer of agarose. The plaques were analyzed by light and fluorescent microscopy (Figure 4).



A - light microscopy, B - simultaneous fluorescent and light microscopy

Figure 4 – Microscopy of plaques formed in cell culture of lamb testicles by recombinant Lumpy skin disease viruses

Non-fluorescent plaques were expanded and analyzed by PCR. To completely remove the acceptor virus, the resulting viral clones were re-cloned. As a result, an Atyrau-BJ(bIL18) virus clone expressing bovine interleukin-18 was obtained. During 10 consecutive passages, the virus remained genetically stable (Figure 2B). This was also evidenced by the expression of interleukin-18, confirmed by Western blot (Figure 5). Thus, using the “green to colorless” strategy, the selection of recombinant viruses became possible in two rounds of cloning.



1 - bacterially expressed interleukin 18 (positive control), 2, 4 - uninfected LT cells, 3 - cells infected with Atyrau-BJ(IL18) virus, after the fifth passage, 5 - cells infected with Atyrau-BJ(IL18) virus, after tenth passage

Figure 5 – Immunodetection of interleukin 18 expressed by the recombinant Lumpy skin disease virus Atyrau-BJ(IL18)

Similar strategies have been used in the production of recombinant vaccinia viruses. Di Lillo et al. [26] developed a method for obtaining modified vaccinia virus recombinants by combining transient selection for host range (based on the restoration of the deleted vaccinia K1L gene in MVA) with differential expression of fluorescent proteins. In this case, two types of cell cultures RK13 and BHK-21 are used. The three types of viruses involved (red parent, green intermediate, and colorless final recombinant) are visualized using fluorescence microscopy, allowing efficient and rapid isolation of recombinant viruses. Later, the authors modified the purification method using flow cytometry for cell sorting [27]. Barbieri et al. [28] used this approach to obtain multiple inserts into the vaccinia virus genome.

Conclusion

The development of vector vaccines for the prevention of infectious diseases in animals and humans is a promising direction in vaccinology. Lumpy skin disease virus, like other members of the *Capripoxvirus* genus, has a limited host range and is not pathogenic to humans, which makes them unique vectors. Despite the ease of insertion of foreign sequences into the genome of poxviruses, the problem of selection of recombinants remains relevant. The development of an acceptor virus expressing a fluorescent marker protein and its use in recombination under conditions of temporary dominant selection for resistance to mycophenolic acid made it possible to significantly reduce the number of cloning rounds in the selection of recombinants.

Thus, in order to increase the efficiency of selection of recombinant viruses, a “green to colorless” strategy was developed. This strategy is based on the replacement of the green fluorescent protein marker gene with the target gene.

Funding

The study was carried out within the framework of the grant funding project AP08856376 “Capripoxvirus-based vaccine vector improvement” of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan

References:

1 Zuber P.L.F., Gruber M., Kaslow D.C., et al. Evolving pharmacovigilance requirements with novel vaccines and vaccine components. *BMJ Global Health*, 2021; 6: e003403 (doi: 10.1136/bmjgh-2020-003403)

2 *Antigen Delivery Systems: Immunological and Technological Issues*. B.Gander, H.P.Merkle, G.Corradin (eds.) Taylor & Francis e-Library, 2003 (doi: 10.3109/9780203304341)

- 3 Merchlinsky M., Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*, 1992, 190(1): 522-526 (doi: 10.1016/0042-6822(92)91246-q)
- 4 Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, 79: 7415-7419 (doi: 10.1073/pnas.79.23.7415)
- 5 Xie L., Li Y. Advances in vaccinia virus-based vaccine vectors, with applications in flavivirus vaccine development. *Vaccine*, 2022, 40(49): 7022–7031 (doi: 10.1016/j.vaccine.2022.10.047)
- 6 Pursell T., Spencer Clinton J.L., Tan J., Peng R., Ling P.D. Modified vaccinia Ankara expressing EEHV1A glycoprotein B elicits humoral and cell-mediated immune responses in mice. *PloS one*, 2022, 17(3): e0265424 (doi: 10.1371/journal.pone.0265424)
- 7 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F., Rock D. L. Genome of lumpy skin disease virus. *J. Virol.*, 2001, 75: 7122-7130 (doi: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001)
- 8 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J. H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.*, 2002, 76: 6054-6061 (doi: 10.1128/jvi.76.12.6054-6061.2002)
- 9 Li J., Wang J., Guo Y., Gong Z., Cai X. A recombinant capripoxvirus expressing the F protein of peste des petits ruminants virus and the P12A3C of foot-and-mouth disease virus. *BMC veterinary research*, 2023, 19(1): 18 (doi: 10.1186/s12917-022-03529-5)
- 10 Fakri F., Bamouh Z., Ghzal F., Baha W., Tadlaoui K., Fihri O. F., Chen W., Bu Z., Elharrak M. Comparative evaluation of three capripoxvirus-vectored peste des petits ruminants vaccines. *Virology*, 2018, 514: 211-215 (doi: 10.1016/j.virol.2017.11.015)
- 11 Liu F., Fan X., Li L., Ren W., Han X., Wu X., & Wang Z. Development of recombinant goatpox virus expressing Echinococcus granulosus EG95 vaccine antigen. *Journal of Virological Methods*, 2018, 261: 28-33 (doi: 10.1016/j.jviromet.2018.08.002)
- 12 Burgers W. A., Ginbot Z., Shen Y. J., Chege G. K., Soares A. P., Müller T. L., Bunjun R., Kiravu A., Munyanduki H., Douglass N., & Williamson A. L. The novel capripoxvirus vector lumpy skin disease virus efficiently boosts modified vaccinia Ankara human immunodeficiency virus responses in rhesus macaques. *The Journal of general virology*, 2014, 95(Pt 10): 2267-2272 (doi: 10.1099/vir.0.067835-0)
- 13 Shen Y.J.; Shephard E.; Douglass N.; Johnston N.; Adams C.; Williamson C.; Williamson A.L. A novel candidate HIV vaccine vector based on the replication deficient Capripoxvirus, Lumpy skin disease virus (LSDV). *Virol. J.*, 2011, 8: 265 (doi: 10.1186/1743-422X-8-265)
- 14 Liu F., Zhang H., Liu W. Construction of recombinant capripoxviruses as vaccine vectors for delivering foreign antigens: Methodology and application. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2019, 65: 181-188 (doi: 10.1016/j.cimid.2019.05.013)
- 15 Chervyakova O., Tailakova E., Sadikaliyeva S, Orynbayev M., Sultankulova K. Capripoxvirus vectors for vaccine development. *Gene Reports*, 2020, 21: 100890 (doi: 10.1016/j.genrep.2020.100890)
- 16 Franke C.A., Rice C.M., Strauss J.H., Hruby D.E. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for selection and isolation of vaccinia virus recombinants. *Mol. Cell Biol.* 1985, 5(8): 1918-1924 (doi: 10.1128/mcb.5.8.1918-1924.1985)
- 17 Boshra H., Teffera M., Cao J., Babiuk S. Cloning Strategies for the Generation of Recombinant Capripoxvirus Through the Use of Screening and Selection Markers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2022, 2465: 195-207 (doi: 10.1007/978-1-0716-2168-4_11)
- 18 Liu L., Cooper T., Eldi P., Garcia-Valtanen P., Diener K.R., Howley P.M., Hayball J.D. Transient dominant host-range selection using Chinese hamster ovary cells to generate marker-free recombinant viral vectors from vaccinia virus. *BioTechniques*, 2017, 62(4): 183-187 (doi: 10.2144/000114537)
- 19 Ye M., Keicher M., Gentschev I., Szalay A. A. Efficient Selection of Recombinant Fluorescent Vaccinia Virus Strains and Rapid Virus Titer Determination by Using a Multi-Well Plate Imaging System. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 1032 (doi: 10.3390/biomedicines9081032)
- 20 Panicali D., Grzelecki A., Huang C. Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene*, 1986, 47(2-3): 193-199 (doi: 10.1016/0378-1119(86)90063-6)
- 21 Carroll M.W., Moss B. E. coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, 1995, 19(3): 352-354, 356

22 Wallace D.B., Weyer J., Nel L.H., Viljoen G.J. Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *J Virol Methods*, 2007, 146(1-2): 52-60 (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.06.004)

23 Wallace D.B., Viljoen G.J. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, 2005, 23(23): 3061-3067 (doi: 10.1016/j.vaccine.2004.10.006)

24 Chervyakova O., Tailakova E., Kozhabergenov N., Sadikaliyeva S., Sultankulova K., Zakarya K., Maksyutov R.A., Strochkov V., Sandybayev N. Engineering of Recombinant Sheep Pox Viruses Expressing Foreign Antigens. *Microorganisms*, 2021, 9: 1005 (doi: 10.3390/microorganisms9051005)

25 Chervyakova O., Issabek A., Sultankulova K., Bopi A., Kozhabergenov N., Omarova Z., Tulendibayev A., Aubakir N., Orynbayev M. Lumpy skin disease virus with four knocked out genes was attenuated *in vivo* and protects cattle from infection. *Vaccines*, 2022, 10: 1705 (doi: 10.3390/vaccines10101705)

26 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Erfle V., Staib C., Sutter G., Siccardi A. G. Marker gene swapping facilitates recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara production by host-range selection. *Journal of virological methods*, 2009, 156: 37-43 (doi: 10.1016/j.jviromet.2008.10.026)

27 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Agresti A., Comunian C., Milani A., Capua I., Erfle V., Siccardi A.G. The combination of marker gene swapping and fluorescence-activated cell sorting improves the efficiency of recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine production for human use. *Journal of virological methods*, 2010, 163: 195-204 (doi: 10.1016/j.jviromet.2009.09.016)

28 Barbieri A., Panigada M., Soprana E., Di Mario G., Gubinelli F., Bernasconi V., Recagni M., Donatelli I., Castrucci M.R., Siccardi, A.G. Strategies to obtain multiple recombinant modified vaccinia Ankara vectors. Applications to influenza vaccines. *Journal of virological methods*, 2018, 251: 7-14 (doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.003)

МРНТИ: 34.27.39, 68.03.07

Д.Д. БОКЕНОВ^{1,2}, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2},
Д.Е. АБДИЛЬМАНОВ^{1,2}, М.Г. САУБЕНОВА¹¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОТБОР ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ И
АНТАГОНИСТОВ МИКРОМИЦЕТОВ-ЗАСОРИТЕЛЕЙ ИЗ
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ****doi:10.53729/MV-AS.2023.02.05****Аннотация**

Рост населения мира и проблема нехватки продовольствия и кормов требуют развития технологий в области пищевой промышленности и кормопроизводства, повышающих эффективность использования вторичных возобновляемых ресурсов, а именно целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности. Культивирование высших грибов для получения пищевого и кормового белка и биологически активных соединений является наиболее рациональным способом переработки лигноцеллюлозных отходов растениеводства. Использование плодовых тел высших грибов способно в значительной мере сократить потребность в производстве мяса и обеспечить население высококачественным и ценным продуктом питания. Однако присутствие в целлюлозосодержащем сырье разнообразных плесневых грибов тормозит развитие высших грибов, требует энергоемкой предварительной подготовки субстрата и сдерживает развитие данной отрасли. Использование микроорганизмов, обладающих целлюлолитической активностью и антагонизмом в отношении плесневых грибов, является перспективным решением проблемы. В данном исследовании было выделено 49 изолятов целлюлолитических бактерий из пшеничной, овсяной и ячменной соломы, а также разрушенной древесины. Показана наибольшая эффективность выделения целлюлолитических микроорганизмов из длительно хранящихся образцов пшеничной соломы. Среди изолятов с наиболее высокой целлюлолитической активностью и коллекционных культур микроорганизмов отобраны антагонисты выделенных ранее из соломы микромицетов, относящихся к родам *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*. Также определена антагонистическая активность выделенных микроорганизмов к одному из основных возбудителей зеленой плесени высших грибов *Trichoderma longibrachiatum*. Отобрано 8 изолятов с наиболее выраженной целлюлолитической активностью и антагонизмом в отношении микромицетов - засорителей вторичного целлюлозосодержащего сырья. Отобранные микроорганизмы будут использованы в дальнейшей работе по разработке способа комплексного использования лигноцеллюлозных отходов в культивировании высших грибов для пищевой промышленности, сельского хозяйства, медицины и фармацевтики.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, антагонизм, противогрибковая активность, целлюлозосодержащие отходы растениеводства, плесневые грибы.

Нехватка продовольствия в связи с ростом населения планеты – актуальная проблема, которая становится все более выраженной со временем. Растущее население Земли означает, что все больше людей нуждаются в еде. Согласно отчетам ООН, население Земли превысило 8,02 миллиарда человек и достигнет к 2050 году 9,7 миллиардов, причем большая часть роста будет приходиться на менее развитые страны [1]. Это означает, что потребность в продовольствии продолжит расти, и в некоторых регионах уже существует дефицит продуктов питания. С другой стороны, нехватка продовольствия может быть вызвана рядом факторов, таких как изменение климата, ухудшение почвы, убыль природных ресурсов, нарастающие затраты на производство и распространение продуктов питания, а также ограниченные возможности для развития животноводства и сельского хозяйства.

Решение проблемы нехватки продовольствия может быть достигнуто через улучшение технологий животноводства и сельского хозяйства и повышение эффективности использования вторичных ресурсов. Важную роль здесь играют развитие инноваций и научных исследований, которые могут помочь увеличить производительность и улучшить качество продуктов питания. Использование белка высших грибов является хорошей альтернативой повышению продукции мяса [2]. В настоящее время производство высших грибов считается одним из наиболее разумных решений, которые могут улучшить качество жизни человека. В течение многих веков грибы использовались в пищевой, медицинской и косметической промышленности, а также в народной медицине для лечения различных заболеваний. Богатство питательными веществами и биологически активными соединениями делает высшие грибы ценным источником пищевой и медицинской продукции [3,4]. Отработанный грибной субстрат, содержащий мицелий и отходы высших грибов может быть ценной кормовой добавкой для животноводства благодаря своей пищевой и биологической ценности [5-7]. Более того, производство грибов может быть экологически безопасным и эффективным с точки зрения использования земельных ресурсов. Выращивание грибов может осуществляться на широком спектре лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства [8], что может способствовать снижению количества отходов и уменьшению негативного влияния на окружающую среду. В целом, производство высших грибов является перспективным направлением развития не только сельского хозяйства, но и медицины, пищевой и косметической промышленности, а также экологии.

Для обеспечения устойчивого роста высших грибов необходима соответствующая предподготовка субстрата, направленная на подавление роста засоряющих микромицетов [8,9]. Одним из наиболее перспективных решений этой проблемы является применение микроорганизмов, проявляющих одновременно целлюлолитическую и антагонистическую активность. Наличие у таких микроорганизмов целлюлолитической активности будет способствовать предподготовке субстрата для культивирования высших грибов, а антагонизм в отношении засоряющих и конкурирующих микромицетов обеспечит контролируемость процесса культивирования. Целью данного исследования было выделение целлюлолитических бактерий из природных субстратов и получение изолятов с высокой целлюлазной и антагонистической активностью для дальнейшего использования в процессе культивирования высших грибов.

Материалы и методы исследования

Для выделения целлюлолитических бактерий использовались солома злаковых культур таких как ячмень, овес и пшеница, а также древесина, разрушенная жуками-древоточцами. Сбор целлюлозосодержащих растительных остатков проводили стерильным пинцетом и помещали в стерильную тару. Целлюлолитические бактерии выделяли на селективной плотной питательной среде Гетчинсона с Na-карбоксиметилцеллюлозой (Na-КМЦ) в качестве единственного источника углерода и энергии. Для подавления роста грибковых микроорганизмов в среду добавляли антибиотик нистатин. Для выделения на агаризованной среде мелконарезанные кусочки соломы раскладывали на чашки Петри с питательной средой и культивировали в термостате при 37°C в течение 3 суток. Для получения накопительных культур использовали жидкую среду Гетчинсона с пшеничной соломой, инкубировали 14 суток при температуре 37°C. Выделение чистых культур целлюлолитических бактерий проводили путем высева из последовательных разведений накопительных культур на агаризованную питательную среду Гетчинсона с добавлением Na-КМЦ. Чистоту выделенных культур микроорганизмов проверяли визуально и путем микроскопирования.

Для определения целлюлолитической активности колонии бактерии культивировали на жидкой среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой. Засеянные пробирки инкубировали в термостате при 30°C до 40 суток. Степень разложения целлюлозы

определяли визуально в процентах и выражали символически в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Уровень целлюлолитической активности целлюлозоразрушающих бактерий

| Целлюло-литическая активность | Обозначение | Степень разложения фильтровальной бумаги, % | Описание |
|-------------------------------|-------------|---|--|
| Высокая | +++ | 50-70 | Распадение фильтровальной бумаги на мелкие кусочки, образование густой мути. |
| Средняя | ++ | 30-40 | Значительное разложение с сохранением целостности части бумаги. |
| Слабая | + | 10-20 | Образование мути, разложение части бумаги. |
| Очень слабая | ± | <10 | Образование мути. |

Для определения антагонистической активности отобранных изолятов использовали засоряющие микромицеты родов *Penicillium* sp. Пш 2-2, *Aspergillus niger* Пш 1-1 и *Fusarium* sp. Яч-1, выделенные из различных видов соломы, а также два штамма возбудителя зеленой плесени шляпочных грибов *Trichoderma longibrachiatum* V и *T. longibrachiatum* VG, изолированные ранее из вешенки и неидентифицированного пластинчатого гриба [9]. Определяли антагонистическую активность как у новых изолятов целлюлолитических бактерий, так и у микроорганизмов из коллекции антагонистов лаборатории пищевой микробиологии.

Определение антагонистической активности ассоциаций проводили методом диффузии в агар и совместного культивирования на чашке Петри. Для газона гриба использовали питательную среду Чапека 7. Мицелиальные грибы предварительно культивировали в жидкой среде Чапека 7 на кусочке хлопковой ваты при 30°C в течение 7 суток. Посев тестовых грибов для получения газона производили на поверхности чашки Петри. Далее в газоне готовили лунки диаметром 10мм, в которые вносили культуральные жидкости изучаемых целлюлолитических бактерий. Чашки инкубировали до 5–7 суток при 30°C. Эксперименты повторяли в 3-х повторностях. Результаты выражали в виде среднего значения и ошибки среднего.

Для выявления антагонизма изолятов в отношении грибов *T. longibrachiatum* использовали также метод совместного культивирования. В качестве питательной среды использовали смесь Wort Agar (сусло агар) и Гетчинсона с Na-КМЦ (1:1). В середине чашки Петри засекали триходерму методом штриха, а по краям чашки на расстоянии 2-3 см от штриха триходермы засекали целлюлолитические бактерии-антагонисты. Чашки культивировались при 30°C в течение 7 суток.

Результаты и обсуждение

Из накопительных культур с использованием различных целлюлозосодержащих субстратов и с поверхности соломы изолированы целлюлолитические бактерии. Всего получено 49 изолятов. Из образцов пшеничной соломы выделено 17 изолятов, с ячменной - 9, с овсяной – 10, с разрушенной древесины и выделений жуков-древоточцев - 13 изолятов.

По эффективности разложения целлюлозы изоляты с различных источников значительно различались. Из 17 изолятов с пшеничной соломы 6 обладали высокой целлюлолитической активностью, 6 – средней. Из 9 изолятов, выделенных с ячменной соломы, только 2 проявили среднюю активность, остальные же слабо и очень слабо разлагали целлюлозу фильтровальной бумаги (таблица 2). Только 1 из 10 изолятов с овсяной соломы показал высокую целлюлолитическую активность. Из разрушенной древесины было получено 3 изолята с высокой целлюлолитической активностью.

В целом 20,4% изолятов хорошо расщепляли целлюлозу.

Таблица 2 – Целлюлолитическая активность изолированных микроорганизмов

| Источник выделения | Изолят | Уровень целлюлолитической активности | Изолят | Уровень целлюлолитической активности |
|---|---------|--------------------------------------|----------|--------------------------------------|
| Пшеничная солома, урожай 2020 г. | Пш 1-1 | + | Пш 1 I | + |
| | Пш 1-2 | ++ | Пш 1 II | ± |
| | Пш 1-3 | ++ | | |
| Пшеничная солома со следами порчи | Пш 2-1 | ++ | Пш 2 I | ++ |
| | Пш 2-2 | +++ | Пш 2 II | ++ |
| | Пш 2-3 | +++ | Пш 2 III | +++ |
| | Пш 2-4 | +++ | | |
| Пшеничная солома, урожай 2015 г. | Пш 3-1 | +++ | Пш 3 II | ± |
| | Пш 3-2 | +++ | Пш 3 III | ++ |
| | Пш 3 I | ± | | |
| Ячменная солома, урожай 2020 г. | Яч 1 | ++ | Яч II | ± |
| | Яч 2 | ++ | Яч III | ± |
| | Яч 3 | + | Яч 3 I | ± |
| | Яч 4 | ± | Яч 3 II | ± |
| | Яч I | ± | | |
| Овсяная солома, урожай 2019 г. | Ов 1 | + | Ов 6 | ± |
| | Ов 2 | +++ | Ов 7 | + |
| | Ов 3 | ± | Ов 8 | ± |
| | Ов 4 | ± | Ов 9 | ± |
| | Ов 5 | + | Ов 10 | + |
| Различные образцы разрушенной древесины | Дв 1 I | ± | Дв 3 I | +++ |
| | Дв 1 II | ± | Дв 3 II | ± |
| | Дв I | ± | Дв 3 III | ± |
| | Дв 2 I | + | Дв III | +++ |
| | Дв 2 II | ± | Дв 4 I | +++ |
| | Дв II | + | Дв 4 II | + |
| Выделения жука древооточца | Дв 1 | ++ | Контроль | - |

Наиболее высокая целлюлолитическая активность отмечена у изолятов Пш 2-2, Пш 2-3, Пш 2-4, Пш 2 III, Пш 3-1 и Пш 3-2 из пшеничной соломы, изолята Ов 2 - из овсяной соломы, Дв 3 I, Дв III и Дв 4 I - из разрушенной древесины. Изоляты с ячменной и овсяной соломы характеризовались наиболее слабой целлюлолитической активностью, а с пшеничной – самой высокой. Указанные различия в активности изолятов, по всей видимости, связаны не с разным составом пшеничной и ячменной соломы, а с отбором для исследования нескольких образцов пшеничной соломы, часть из которых хранилась длительное время, что позволило целлюлолитическим бактериям развиваться в данных образцах. Так, данные, представленные в таблице 2, показывают, что все 7 изолятов из образца пшеницы со следами порчи проявили высокую или среднюю целлюлолитическую активность. Два из пяти изолятов с соломы урожая 2015 г обладали высокой способностью к разложению целлюлозы, а в образце соломы 2020 года сбора не выявлены микроорганизмы с высокой целлюлолитической активностью. Изоляты высокоактивных целлюлолитических бактерий из разрушенной древесины также были получены с более старых образцов древесины с высокой степенью разрушения. Изолят из выделений жука древооточца проявил средний уровень активности.

В результате проведенного исследования отобрано 19 изолятов целлюлолитических бактерий с высокой и средней целлюлолитической активностью: 12 - из образцов пшеничной соломы, 2 - из ячменной, 1 - из овсяной соломы и 4 - из разрушенной древесины. Данные изоляты были проверены на способность к подавлению роста микромицетов-

засорителей культивирования высших грибов.

Результаты исследования противогрибковой активности отобранных изолятов целлюлолитических бактерий и коллекционных бактерий антагонистов показаны в таблице 3. Как видно из представленных в таблице результатов, антагонистическая активность в отношении всех четырех тестовых мицелиальных грибов выявлена у 10 изолятов, 4-х новых и 6 коллекционных. Три из четырех тестов подавляли новых 6 изолятов и 1 коллекционный. Наиболее выраженный антагонизм проявили среди новых изолятов Пш 2-2, Пш 2-3, Пш 2 III, Пш 3-1, Пш 3-2, В1 2, Дв 1, Дв III и Дв 4 I, семь из которых обладали наиболее высокой целлюлолитической активностью, несмотря на то, что наличие целлюлозы в клеточной стенке не характерно для аскомицетных грибов [10]. Вероятной причиной является более широкая специфичность ряда гликозидазных ферментов [11], а также сложнокомпонентный состав клеточных стенок мицелиальных грибов, включающих кроме хитина также глюканы и другие полимеры [10]. В то же время наличие литической активности не всегда является признаком присутствия антагонистической активности [12].

Таблица 3 – Противогрибковая активность изолятов целлюлолитических бактерий и коллекционных бактерий антагонистов

| № | Изолят | Диаметр зон задержки роста/спорообразования*, мм | | | |
|----|------------------------|--|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | | <i>Penicillium</i> sp. Пш 2-2 | <i>Fusarium</i> sp. Яч-1 | <i>Aspergillus niger</i> Пш 1-1 | <i>T. longibrachiatum</i> V |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | Пш 1-2 | 0 | 0 | 14,0*±1,0 | 15,0*±1,0 |
| 2 | Пш 1-3 | 13,0*±1,0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | Пш 2-1 | 0 | 0 | 23,0*±1,0 | 0 |
| 4 | Пш 2-2 | 12,0*±0,0 | 0 | 15,0*±0,0 | 28,0*±1,5 |
| 5 | Пш 2-3 | 22,0*±1,0 | 12±1,0 | 30,0*±0,5 | 20,0±3,0 30,0*±5,0 |
| 6 | Пш 2-4 | 0 | 0 | 12,0*±1,0 | 0 |
| 7 | Пш 2 I | 0 | 0 | 34,0*±4,0 | 11,0*±1,0 |
| 8 | Пш 2 III | 44,0±6,5 | 0 | 41,5*±1,5 | 32,0±8,0 37,0*±3,0 |
| 9 | Пш 2 II | 0 | 0 | 15,0*±0,0 | 11,0±1,0 12,5*±2,5 |
| 10 | Пш 3-1 | 18,0±1,0 | 12,0*±0,0 | 19,0*±1,0 | 23,0*±1,5 |
| 11 | Пш 3-2 | 12,0±0,0 17,0*±1,0 | 15,0*±0,0 | 23,0*±3,0 | 30,0*±1,0 |
| 12 | Пш 3 III | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | Яч 1 | 20,0±0,0 | 0 | 0 | 28,0*±1,0 |
| 14 | Яч 2 | 17,0±3,0 | 18,0±3,0 | 0 | 17,0±0,0 30,0*±1,0 |
| 15 | Ов 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | Дв 1 | 25,0±5,0 | 12,0±1,0 | 21,0*±5,7 | 33,0±6,5 |
| 17 | Дв 3 I | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | Дв III | 20,0±5,0 | 0 | 30,0*±2,5 | 29,5*±2,5 |
| 19 | Дв 4 I | 12,5±2,5 | 0 | 15,0*±1,0 | 35,0±10,0 |
| 20 | ПГ 1 св. | 0 | 22,0±3,5 | 13,0*±1,0 | 18,5±1,5 |
| 21 | <i>Bacillus</i> sp. 98 | 27,5±3,0 | 35,6±2,7 | 28,5±1,5 40,0*±4,5 | 26,0±3,0 |

Продолжение таблицы 3

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|------------------------------|-----------|----------|-----------|----------|
| 22 | <i>Bacillus coagulans</i> 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | PG 1-2 | 30,2±4,5 | 27,5±1,5 | 35,0±3,0 | 25,0±2,5 |
| 24 | PG 3 | 11,0*±1,0 | 23,5±0,5 | 15,0±1,0 | 16,2±2,1 |
| 25 | PG 6 | 20,6±0,6 | 22,0±1,0 | 10,5*±0,5 | 22,0±1,0 |
| 26 | PG | 0 | 20,5±1,5 | 11,0*±1,0 | 15,0±1,5 |
| 27 | <i>Bacillus</i> sp. СВ 1-2 | 32,0±1,0 | 35,3±4,7 | 30,5±1,2 | 38,0±3,5 |
| 28 | В1 2 | 16,0±0,5 | 20,0±1,0 | 38,4±2,7 | 19,5±1,5 |

При исследовании антагонизма в отношении *Trichoderma*, являющихся основными возбудителями болезней гриба вешенка [13,14], показана наибольшая антагонистическая активность новых изолятов Пш 2–3, Пш 2 III, Пш 3-2. Среди коллекционных микроорганизмов выраженный антагонизм в отношении *T. longibrachiatum* проявили *Bacillus* sp СВ 1-2, *Bacillus* sp. 98, и изоляты В1 2, PG 1-2 и PG 6. Влияние изолированных и коллекционных бактерий на рост *T. longibrachiatum* при совместном культивировании на одной чашке Петри представлено на рисунке 1. Полученные результаты демонстрируют зависимость полученных результатов по уровню антагонистической активности микроорганизмов от применяемого метода исследования. Так, при совместном культивировании изоляты PG 3, В1 2 и Дв 4 I не проявляли антагонизма в отношении *T. longibrachiatum* V, хотя при исследовании влияния методом отсроченного антагонизма были получены положительные результаты.

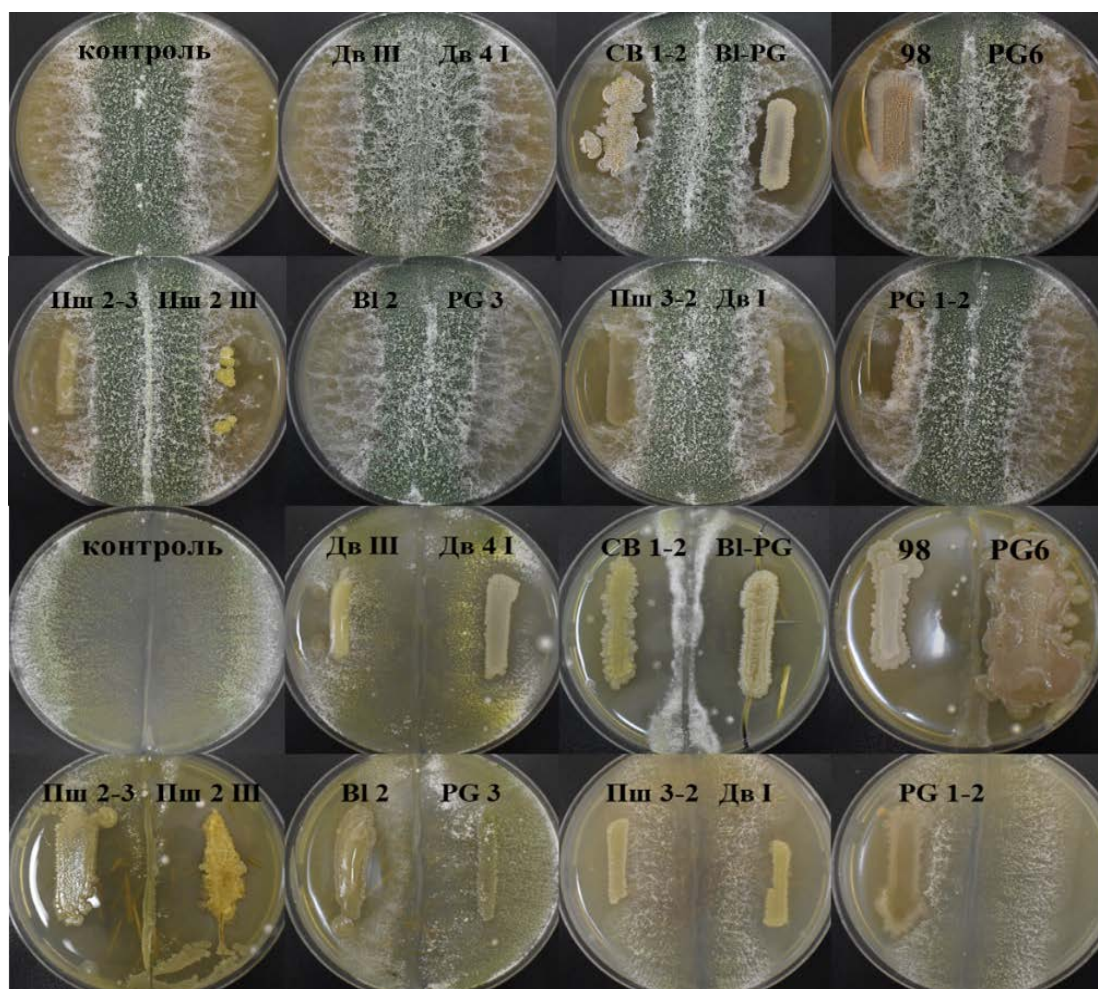


Рисунок 1 – Противогрибковая активность целлюлолитических бактерий в отношении *T. longibrachiatum* V (сверху) и *T. longibrachiatum* VG (снизу)

Заклучение

По результатам проведенных исследований отобрано 3 изолята вновь выделенных целлюлолитических бактерий и 5 изолятов из коллекции. Отобранные микроорганизмы обладают как выраженной целлюлолитической активностью, так и антагонизмом в отношении наиболее распространенных в целлюлозосодержащих отходах растениеводства плесневых грибов. Дальнейшая работа будет нацелена на исследование взаимоотношений отобранных микроорганизмов с высшим грибом вешенка обыкновенная и подбором микроорганизмов спутников для предварительной подготовки субстрата при культивировании гриба. Полученные данные внесут вклад в разработку комплексного метода переработки целлюлозосодержащих отходов растениеводства с использованием высших грибов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Комитета Науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP09258654).

Литература:

- 1 Саубенова М., Олейникова Е., Ермекбай Ж., Айтжанова А., Бокенов Д., Потороко И. Микробиологические аспекты выращивания высших грибов. *Микробиология және вирусология*, 2021, 3 (34): 4–36 (doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.01)
- 2 Li C., Xu S. Edible mushroom industry in China: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 106(11): 3949–3955 (doi: 10.1007/s00253-022-11985-0)
- 3 Sun Y., Zhang M., Fang Z. Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities: A review. *Trends Food. Sci. Technol.*, 2020, 105: 468–482 (doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.026)
- 4 Martinez-Medina G.A., Chávez-González M.L., Verma D.K., Prado-Barragán L.A., Martínez-Hernández J.L., Flores-Gallegos A.C., Thakur M., Srivastav P.P., Aguilar C.N. Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *J. Funct. Foods*, 2021, 77: 1–17 (doi: 10.1016/j.jff.2020.104326)
- 5 van Kuijk S.J.A., Sonnenberg A.S.M., Baars J.J.P., Hendriks W.H., Cone J.W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(1): 191–202 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.014)
- 6 Ivarsson E., Grudén M., Södergren J., Hultberg M. Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus* – Potential for combined mushroom and feed production. *J. Clean Prod.*, 2021, 313: 127969 (doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127969)
- 7 Leong Y.K., Ma T.W., Chang J.S., Yang F.C. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. *Biores. Technol.*, 2022, 344(A): 126157 (doi: 10.1016/j.biortech.2021.126157)
- 8 Saubenova M., Oleinikova Y., Sadanov A., Yermekbay Z., Bokenov D., Shorabaev Y. The input of microorganisms to the cultivation of mushrooms on lignocellulosic waste. *AIMS Agriculture and Food*, 2023, 8(1): 239–277 (doi: 10.3934/agrfood.2023014)
- 9 Ермекбай Ж., Олейникова Е., Даугалиева С., Бокенов Д., Саубенова М., Алтекей А., Айтжанова А. Выделение микромицетов засорителей лигноцеллюлозных отходов злаковых культур. *Микробиология және вирусология*, 2022, 4(39): 45–64 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04)
- 10 Феофилова Е.П. Клеточная стенка грибов: современные представления о составе и биологической функции. *Микробиология*, 2010, 79(6): 723–733 (https://elibrary.ru/download/elibrary_15523903_39962136.pdf)
- 11 Рабинович М. Л., Мельник М. С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы. *Успехи современной биологии*, 2000, 40: 205–266 (<https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/rabinovich.pdf>)
- 12 Sindhu S.S., Dadarwal K.R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, 2001, 156(4): 353–358 (doi: 10.1078/0944-5013-00120)
- 13 Kredics L., Kocsubé S., Nagy L., Komoń-Zelazowska M., Manczinger L., Sajben E., Nagy A., Vágvölgyi C., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., Hatvani L. Molecular identification of *Trichoderma* species

associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 300: 58-67 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x)

14 Al-Ani B.M., Owaid M.N., Al-Saeedi S.S.S. Fungal interaction between *Trichoderma* spp. and *Pleurotus ostreatus* on the enriched solid media with licorice *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(3): 268-273 (doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001).

Д.Д. БОКЕНОВ^{1,2}, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2},
Д.Е. АБДИЛЬМАНОВ^{1,2}, М.Г. САУБЕНОВА¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ҚҰРАМЫНДА ЦЕЛЛЮЛОЗА БАР СУБСТРАТТАРДАН ЛАСТАУШЫ МИКРОМИЦЕТТЕРГЕ ҚАРСЫ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАР МЕН АНТАГОНИСТЕРДІ ОҚШАУЛАУ ЖӘНЕ ТАҢДАУ

Түйін

Әлемде халық санының өсуі және азық-түлік пен жемшөп тапшылығы мәселесі қайталама жанартылатын ресурстарды, атап айтқанда, құрамында целлюлоза бар ауыл шаруашылығы мен қайта өңдеу өнеркәсібінің қалдықтарын пайдалану тиімділігін арттыратын тамақ өнеркәсібі мен жемшөп өндірісі саласындағы технологияларды дамытуды талап етеді. Тағамдық және жемшөп ақуыздары мен биологиялық белсенді қосылыстар үшін жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіру өсімдік шаруашылығының лигноцеллюлоза қалдықтарын өндеудің ең ұтымды әдісі болып табылады. Жоғары сатыдағы саңырауқұлақтардың жемісті денелерін пайдалану ет өндірісіне деген қажеттілікті айтарлықтай төмендетіп, халықты жоғары сапалы және бағалы азық-түлік өнімімен қамтамасыз етеді. Бірақ құрамында целлюлоза бар шикізатта әртүрлі зең саңырауқұлақтарының болуы жоғары сатыдағы саңырауқұлақтардың дамуын тежейді, субстратты энергияны көп қажет ететін алдын ала дайындауды қажет етеді және бұл саланың дамуына кедергі келтіреді. Зең саңырауқұлақтарына қарсы целлюлолитикалық белсенділігі бар және антагонизмі бар микроорганизмдерді қолдану мәселенің перспективалы шешімі болып табылады. Бұл зерттеуде бидай, сұлы және арпа сабанынан, сондай-ақ бұзылған ағаштан целлюлолитикалық бактериялардың 49 изоляты бөлініп алынды. Бидай сабанының ұзақ уақыт сақталған үлгілерінен целлюлолитикалық микроорганизмдерді бөліп алудың ең жоғары тиімділігі көрсетілді. Ең жоғары целлюлолитикалық белсенділікке ие изоляттардың және микроорганизмдердің коллекциялық дақылдарының ішінен *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* тұқымдастарына жататын сабаннан бұрын бөлініп алынған микромицеттердің антагонистері таңдалды. Бөлінген микроорганизмдердің *Trichoderma longibrachiatum* жоғары саңырауқұлақтарының жасыл зеңінің негізгі қоздырғыштарының біріне антагонистік белсенділігі де анықталды. Құрамында екінші ретті целлюлоза бар шикізаттың микромицеттер арамшөптеріне қарсы неғұрлым айқын целлюлолитикалық белсенділігі және антагонизмі бар 8 изолят таңдалды. Таңдалған микроорганизмдер тағам өнеркәсібі, ауыл шаруашылығы, медицина және фармацевтика үшін жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіруде лигноцеллюлозды қалдықтарды кешенді пайдалану әдісін әзірлеу бойынша одан әрі жұмыста пайдаланылатын болады.

Кілтті сөздер: целлюлолитикалық бактериялар, антагонизм, саңырауқұлаққа қарсы белсенділік, құрамында целлюлоза бар өсімдік қалдықтары, зең саңырауқұлақтары.

IRSTI: 34.27.39, 68.03.07

D.D. BOKENOV^{1,2}, Y.A. OLENIKOVA^{1*}, Z.N. YERMEKBAY^{1,2},
D.E. ABDILMANOV^{1,2}, M.G. SAUBENOVA¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ISOLATION AND SELECTION OF CELLULOLYTIC BACTERIA AND ANTAGONISTS OF SPOILING MICROMYCETES FROM CELLULOSE-CONTAINING SUBSTRATES

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.05

Abstract

The growth of the world's population and the problem of food and feed shortages require the development of technologies in the field of food and feed production, which increase the efficiency of the use of secondary renewable resources, namely cellulose-containing waste from agriculture and the processing industry. The cultivation of mushrooms to obtain food and feed protein and biologically active compounds is the most rational way to process lignocellulosic crop waste. The use of mushroom fruiting bodies can significantly reduce the need for meat production and provide the population with a high-quality and valuable food product. However, the presence of various mold fungi in cellulose-containing raw materials inhibits the development of higher fungi, requires energy-intensive preliminary preparation of the substrate, and hinders the development of this industry. The use of microorganisms with cellulolytic activity and antagonism against molds is a promising solution to the problem. In this study, 49 isolates of cellulolytic bacteria were isolated from wheat, oat and barley straw, as well as degraded wood. The highest efficiency of isolation of cellulolytic microorganisms from long-term stored samples of wheat straw has been shown. Among isolates with the highest cellulolytic activity and collection cultures of microorganisms, antagonists of micromycetes previously isolated from straw belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* were selected. The antagonistic activity of the isolated microorganisms to one of the main mushroom pathogens *Trichoderma longibrachiatum* was also determined. Eight isolates with the most pronounced cellulolytic activity and antagonism against micromycetes spoiling secondary cellulose-containing raw materials were selected. The selected microorganisms will be used in further work on the development of a method for the integrated use of lignocellulosic waste in the cultivation of higher fungi for the food industry, agriculture, medicine and pharmaceuticals.

Keywords: cellulolytic bacteria, antagonism, antifungal activity, cellulose-containing crop waste, mold fungi.

The lack of food due to the growth of the world's population is an urgent problem that is becoming more pronounced over time. The growing population of the Earth means that more and more people need food. According to UN reports, the world's population has exceeded 8.02 billion people and will reach 9.7 billion by 2050, with most of the growth coming from less developed countries [1]. This means that the need for food will continue to grow, and there are already food shortages in some regions. On the other hand, food shortages can be caused by a number of factors, such as climate change, soil degradation, depletion of natural resources, rising costs of food production and distribution, and limited opportunities for livestock and agriculture development.

The solution to the problem of food shortage can be achieved through the improvement of livestock and agricultural technologies and the efficiency of the use of secondary resources. An important role here is played by the development of innovations and scientific research, which can help increase productivity and improve the quality of food. The use of protein from higher fungi is a good alternative to increasing meat production [2]. At present, the production of mushrooms is considered one of the most intelligent solutions that can improve the quality of human life. For centuries, mushrooms have been used in the food, medical and cosmetic industries, as well as in

folk medicine to treat various diseases. The richness in nutrients and biologically active compounds makes mushrooms a valuable source of food and medical products [3,4]. The spent mushroom substrate containing mycelium and waste of mushrooms can be a valuable feed additive for animal husbandry due to its nutritional and biological value [5-7]. Moreover, mushroom production can be environmentally friendly and efficient in terms of land use. Mushroom cultivation can be carried out on a wide range of lignocellulosic agricultural waste [8], which can help reduce the amount of waste and the negative impact on the environment. In general, mushroom production is a promising direction for the development of not only agriculture, but also medicine, food and cosmetic industries, as well as ecology.

To ensure the stable growth of mushrooms, appropriate pretreatment of the substrate is required, aimed at suppressing the growth of contaminating micromycetes [8, 9]. One of the most promising solutions to this problem is the use of microorganisms that exhibit both cellulolytic and antagonistic activity. The presence of cellulolytic activity in such microorganisms will contribute to the pretreatment of the substrate for the cultivation of higher fungi, and the antagonism against contaminating and competing micromycetes will ensure the controllability of the cultivation process. The aim of this study was to isolate cellulolytic bacteria from natural substrates and obtain isolates with high cellulase and antagonistic activity for further use in the cultivation of higher fungi.

Materials and methods of research

For the isolation of cellulolytic bacteria, straw of cereal crops such as barley, oats and wheat, as well as wood destroyed by carpenter beetles, were used. The collection of cellulose-containing plant residues was carried out with sterile tweezers and placed in a sterile container. Cellulolytic bacteria were isolated on Getchinson's elective dense nutrient medium with Na-carboxymethylcellulose (Na-CMC) as the sole source of carbon and energy. To suppress the growth of fungal microorganisms, the antibiotic nystatin was added to the medium. For isolation on an agar medium, finely chopped pieces of straw were laid out on plates with a nutrient medium and cultivated in a thermostat at 37°C for 3 days. To obtain enrichment cultures, Getchinson's liquid medium with wheat straw was used and incubated for 14 days at a temperature of 37°C. Isolation of pure cultures of cellulolytic bacteria was carried out by seeding from serial dilutions of enrichment cultures on Getchinson's agar nutrient medium with the addition of Na-CMC. The purity of isolated cultures of microorganisms was checked visually and by microscopy.

For defining the cellulolytic activity, bacteria were cultivated in liquid Getchinson's medium with filter paper. The inoculated tubes were incubated in a thermostat at 30°C for up to 40 days. The degree of cellulose decomposition was determined visually as a percentage and expressed symbolically in accordance with table 1.

Table 1 - The level of cellulolytic activity of cellulose-destroying bacteria

| Cellulolytic activity | Designation | Degree of decomposition of filter paper, % | Description |
|-----------------------|-------------|--|---|
| High | +++ | 50-70 | The disintegration of the filter paper into small pieces, the formation of thick mud. |
| Medium | ++ | 30-40 | Significant decomposition while partly maintaining the integrity of the paper. |
| Weak | + | 10-20 | The formation of turbidity, the decomposition of part of the paper. |
| Very weak | ± | <10 | The formation of turbidity. |

To determine the antagonistic activity of the selected isolates, contaminating micromycetes of the genera *Penicillium* sp. Psh 2-2, *Aspergillus niger* Psh 1-1 and *Fusarium* sp. Yach-1, isolated from various types of straw, as well as two strains of the green mold pathogen *Trichoderma*

longibrachiatum V and *T. longibrachiatum* VG, previously isolated from oyster mushrooms and an unidentified agaric fungus were used [9]. Antagonistic activity was determined both in new isolates of cellulolytic bacteria and in mycoorganisms from the collection of antagonists of the laboratory of food microbiology.

Determination of the antagonistic activity of associations was carried out by agar well diffusion assay and by co-cultivation on a surface of nutrient medium. For the lawn of the fungus, Czapek 7 medium was used. Mycelial fungi were preliminarily cultivated in Czapek 7 liquid medium on a piece of cotton wool at 30°C for 7 days. Sowing of test molds to obtain a lawn was carried out on the surface of a Petri dish. Further, wells 10 mm in diameter were prepared in the lawn, into which the culture liquids of the studied cellulolytic bacteria were introduced. The plates were incubated up to 5-7 days at 30°C. The experiments were repeated in 3 replications. The results were expressed as mean and error of the mean.

Co-cultivation was also used to detect antagonism of the isolates against *T. longibrachiatum*. A mixture of Wort Agar and Getchinson medium with Na-CMC (1:1) was used as a nutrient medium. *Trichoderma* was seeded in the middle of the plate by the stroke method, and cellulolytic bacteria antagonists were seeded along the edges of the cup at a distance of 2-3 cm from the *Trichoderma* streak. The plates were cultivated at 30°C for 7 days.

Results and discussion

Cellulolytic bacteria were isolated from enrichment cultures using various cellulose-containing substrates and from the surface of straw. A total of 49 isolates were obtained. 17 isolates were isolated from samples of wheat straw, 9 from barley straw, 10 from oat straw, and 13 isolates from destroyed wood and excretions of carpenter beetles.

The isolates from various sources differed significantly in the efficiency of cellulose decomposition. Of the 17 isolates from wheat straw, 6 had high cellulolytic activity, 6 - medium. Of the 9 isolates isolated from barley straw, only 2 showed moderate activity, while the rest weakly and very weakly decomposed filter paper cellulose (Table 2).

Only 1 out of 10 isolates from oat straw showed high cellulolytic activity. From the destroyed wood, 3 isolates with high cellulolytic activity were obtained. Overall, 20.4% of the isolates digested cellulose well.

The highest cellulolytic activity was noted in isolates Psh 2-2, Psh 2-3, Psh 2-4, Psh 2 III, Psh 3-1 and Psh 3-2 from wheat straw, isolate Ov 2 from oat straw, Dv 3 I, Dv III and Dv 4 I from destroyed wood. Isolates from barley and oat straw were characterized by the weakest cellulolytic activity, and from wheat – by the highest. These differences in the activity of isolates, apparently, are associated not with the different composition of wheat and barley straw, but with taking several samples of wheat straw for research, some of which were stored for a long time, which allowed cellulolytic bacteria to develop in these samples. Thus, the data presented in Table 2 show that all 7 isolates from a wheat sample with traces of spoilage showed high or medium cellulolytic activity. Two out of five isolates from the 2015 harvest straw had a high ability to decompose cellulose, and microorganisms with high cellulolytic activity were not detected in the 2020 straw sample. Isolates of highly active cellulolytic bacteria from degraded wood were also obtained from older samples of highly degraded wood. The isolate from the secretions of the carpenter beetle showed an average level of activity.

As a result of the study, 19 isolates of cellulolytic bacteria with high and medium cellulolytic activity were selected: 12 ones from the samples of wheat straw, 2 from barley straw, 1 from oat straw, and 4 from destroyed wood. These isolates were tested for the ability to suppress the growth of micromycetes spoiling substrates for mushroom cultivation.

The data on the investigation of the antifungal activity of selected isolates of cellulolytic bacteria and collection bacteria antagonists is shown in table 3.

Table 2 - Cellulolytic activity of isolated microorganisms

| Selection source | Isolate | Level of cellulolytic activity | Isolate | Level of cellulolytic activity |
|-------------------------------------|---------|--------------------------------|-----------|--------------------------------|
| Wheat straw, harvest 2020 | Psh 1-1 | + | Psh 1 I | + |
| | Psh 1-2 | ++ | Psh 1 II | ± |
| | Psh 1-3 | ++ | | |
| Wheat straw with traces of spoilage | Psh 2-1 | ++ | Psh 2 I | ++ |
| | Psh 2-2 | +++ | Psh 2 II | ++ |
| | Psh 2-3 | +++ | Psh 2 III | +++ |
| | Psh 2-4 | +++ | | |
| Wheat straw, harvest 2015 | Psh 3-1 | +++ | Psh 3 II | ± |
| | Psh 3-2 | +++ | Psh 3 III | ++ |
| | Psh 3 I | ± | | |
| Barley straw, harvest 2020 | Yach 1 | ++ | Yach II | ± |
| | Yach 2 | ++ | Yach III | ± |
| | Yach 3 | + | Yach 3 I | ± |
| | Yach 4 | ± | Yach 3 II | ± |
| | Yach I | ± | | |
| Oat straw, harvest 2019 | Ov 1 | + | Ov 6 | ± |
| | Ov 2 | +++ | Ov 7 | + |
| | Ov 3 | ± | Ov 8 | ± |
| | Ov 4 | ± | Ov 9 | ± |
| | Ov 5 | + | Ov 10 | + |
| Various samples of destroyed wood | Dv 1 I | ± | Dv 3 I | +++ |
| | Dv 1 II | ± | Dv 3 II | ± |
| | Dv I | ± | Dv 3 III | ± |
| | Dv 2 I | + | Dv III | +++ |
| | Dv 2 II | ± | Dv 4 I | +++ |
| | Dv II | + | Dv 4 II | + |
| Excretions of the carpenter beetle | Dv 1 | ++ | Control | - |

As can be seen from the results presented in the table, antagonistic activity against all four test filamentous fungi was detected in 10 isolates, of which 4 are new and 6 are collection ones. Six new and one collection isolates suppressed three of the four fungal tests. The most pronounced antagonism was shown among the new isolates Psh 2-2, Psh 2-3, Psh 2 III, Psh 3-1, Psh 3-2, Bl 2, Dv 1, Dv III and Dv 4 I, seven of which had the highest cellulolytic activity, despite the fact that the presence of cellulose in the cell wall is not characteristic of ascomycete fungi [10]. The likely reason is the broader specificity of a number of glycosidase enzymes [11], as well as the complex composition of the cell walls of filamentous fungi, which include, in addition to chitin, also glucans and other polymers [10]. At the same time, the presence of lytic activity is not always a sign of the presence of antagonistic activity [12].

In the study of antagonism against *Trichoderma*, which are the main pathogens of the oyster mushroom [13,14], the highest antagonistic activity of new isolates Psh 2-3, Psh 2 III, Psh 3-2 was shown. Among the collection microorganisms, *Bacillus* sp CB 1-2, *Bacillus* sp. 98, and isolates Bl 2, PG 1-2 and PG 6 were the best. The effect of isolated and collection bacteria on the growth of *T. longibrachiatum* during co-cultivation on one Petri dish is shown in Figure 1. The results obtained demonstrate the dependence of the obtained results concerning the level of antagonistic activity of microorganisms on the research method used. Thus, when co-cultivated, isolates PG 3, Bl 2, and Dv 4 I did not show antagonism against *T. longibrachiatum* V, although positive results were obtained in the study of the effect by the method of delayed antagonism.

Table 3 - Antifungal activity of isolates of cellulolytic bacteria and collection antagonistic bacteria

| No | Isolate | Diameter of growth/sporulation stunting zones*, mm | | | |
|----|------------------------------|--|-------------------------------|--|--------------------------------|
| | | <i>Penicillium</i> sp. Psh 2-2 | <i>Fusarium</i> sp. Yach-1 | <i>Aspergillus</i> <i>niger</i> Psh 1-1 | <i>T. longibrachiatum</i> V |
| 1 | Psh 1-2 | 0 | 0 | 14,0*±1,0 | 15,0*±1,0 |
| 2 | Psh 1-3 | 13,0*±1,0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | Psh 2-1 | 0 | 0 | 23,0*±1,0 | 0 |
| 4 | Psh 2-2 | 12,0*±0,0 | 0 | 15,0*±0,0 | 28,0*±1,5 |
| 5 | Psh 2-3 | 22,0*±1,0 | 12±1,0 | 30,0*±0,5 | 20,0±3,0 30,0*±5,0 |
| 6 | Psh 2-4 | 0 | 0 | 12,0*±1,0 | 0 |
| 7 | Psh 2 I | 0 | 0 | 34,0*±4,0 | 11,0*±1,0 |
| 8 | Psh 2 III | 44,0±6,5 | 0 | 41,5*±1,5 | 32,0±8,0 37,0*±3,0 |
| 9 | Psh 2 II | 0 | 0 | 15,0*±0,0 | 11,0±1,0 12,5*±2,5 |
| 10 | Psh 3-1 | 18,0±1,0 | 12,0*±0,0 | 19,0*±1,0 | 23,0*±1,5 |
| 11 | Psh 3-2 | 12,0±0,0 17,0*±1,0 | 15,0*±0,0 | 23,0*±3,0 | 30,0*±1,0 |
| 12 | Psh 3 III | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | Yach 1 | 20,0±0,0 | 0 | 0 | 28,0*±1,0 |
| 14 | Yach 2 | 17,0±3,0 | 18,0±3,0 | 0 | 17,0±0,0 30,0*±1,0 |
| 15 | Ov 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | Dv 1 | 25,0±5,0 | 12,0±1,0 | 21,0*±5,7 | 33,0±6,5 |
| 17 | Dv 3 I | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | Dv III | 20,0±5,0 | 0 | 30,0*±2,5 | 29,5*±2,5 |
| 19 | Dv 4 I | 12,5±2,5 | 0 | 15,0*±1,0 | 35,0±10,0 |
| 20 | PG 1 cv. | 0 | 22,0±3,5 | 13,0*±1,0 | 18,5±1,5 |
| 21 | <i>Bacillus</i> sp. 98 | 27,5±3,0 | 35,6±2,7 | 28,5±1,5 40,0*±4,5 | 26,0±3,0 |
| 22 | <i>Bacillus coagulans</i> 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | PG 1-2 | 30,2±4,5 | 27,5±1,5 | 35,0±3,0 | 25,0±2,5 |
| 24 | PG 3 | 11,0*±1,0 | 23,5±0,5 | 15,0±1,0 | 16,2±2,1 |
| 25 | PG 6 | 20,6±0,6 | 22,0±1,0 | 10,5*±0,5 | 22,0±1,0 |
| 26 | PG | 0 | 20,5±1,5 | 11,0*±1,0 | 15,0±1,5 |
| 27 | <i>Bacillus</i> sp. CB 1-2 | 32,0±1,0 | 35,3±4,7 | 30,5±1,2 | 38,0±3,5 |
| 28 | Bl 2 | 16,0±0,5 | 20,0±1,0 | 38,4±2,7 | 19,5±1,5 |

Conclusion

Based on the results of the studies, 3 isolates of newly selected cellulolytic bacteria and 5 isolates from the collection were picked out. The selected microorganisms had both a pronounced cellulolytic activity and antagonism against the most common molds of cellulose-containing crop wastes. Further work will be aimed at studying the relationship of selected microorganisms with the higher fungus oyster mushroom and the selection of satellite microorganisms for preliminary preparation of the substrate during the cultivation of the mushroom. The data obtained will contribute to the development of an integrated method for processing cellulose-containing crop waste using higher fungi.

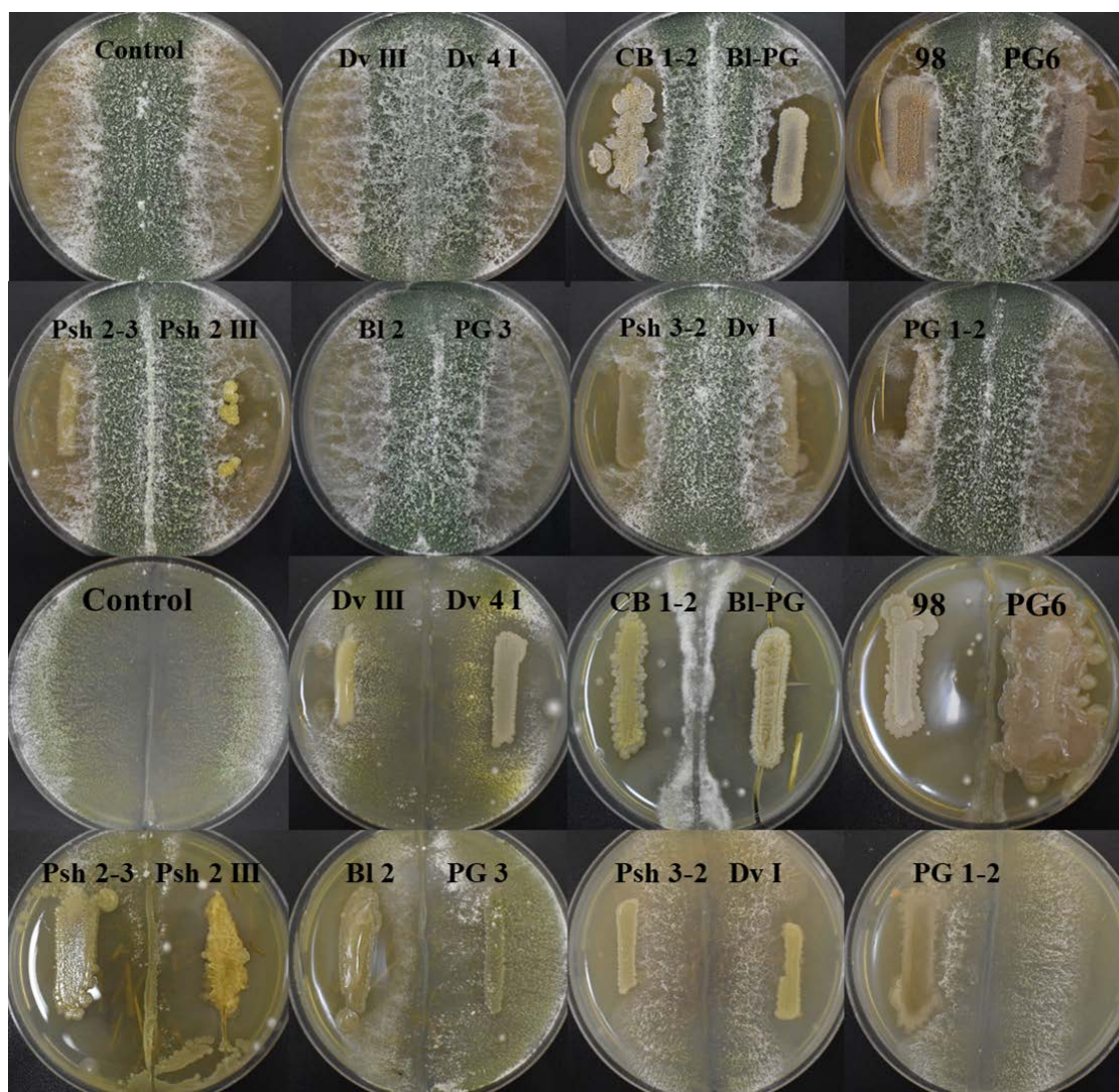


Figure 1 - Antifungal activity of cellulolytic bacteria against *T. longibrachiatum* V (top) and *T. longibrachiatum* VG (bottom)

Funding

This research was funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP09258654).

References:

- 1 Saubenova, M., Olejnikova, E., Ermekbaj, Zh., Ajtzhanova A., Bokenov, D., Potoroko, I. Mikrobiologicheskie aspekty vyrashhivaniya vysshih gribov. *Mikrobiologiya zhәне virusologiya*, 2021, 3 (34): 4–36 (doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.01)
- 2 Li C., Xu S. Edible mushroom industry in China: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 106(11): 3949-3955 (doi: 10.1007/s00253-022-11985-0)
- 3 Sun Y., Zhang M., Fang Z. Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities: A review. *Trends Food. Sci. Technol.*, 2020, 105: 468–482 (doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.026)
- 4 Martinez-Medina G.A., Chávez-González M.L., Verma D.K., Prado-Barragán L.A., Martínez-Hernández J.L., Flores-Gallegos A.C., Thakur M., Srivastav P.P., Aguilar C.N. Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *J. Funct. Foods*, 2021, 77: 1-17 (doi: 10.1016/j.jff.2020.104326)
- 5 van Kuijk S.J.A., Sonnenberg A.S.M., Baars J.J.P., Hendriks W.H., Cone J.W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(1): 191-202 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.014)

6 Ivarsson E., Grudén M., Södergren J., Hultberg M. Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus* – Potential for combined mushroom and feed production. *J. Clean Prod.*, 2021, 313: 127969 (doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127969)

7 Leong Y.K., Ma T.W., Chang J.S., Yang F.C. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. *Biores. Technol.*, 2022, 344(A): 126157 (doi: 10.1016/j.biortech.2021.126157)

8 Saubenova M., Oleinikova Y., Sadanov A., Yermekbay Z., Bokenov D., Shorabaev Y. The input of microorganisms to the cultivation of mushrooms on lignocellulosic waste. *AIMS Agriculture and Food*, 2023, 8(1): 239-277 (doi: 10.3934/agrfood.2023014)

9 Ermekbay Zh., Olejnikova E., Daugalieva S., Bokenov D., Saubenova M., Altekej A., Ajtzhanova A. Vydelenie mikromicetov zasoritelej lignocelljuloznyh othodov zlakovyh kul'tur. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, 2022, 4(39): 45–64 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04)

10 Feofilova E.P. Kletochnaja stenka gribov: sovremennye predstavlenija o sostave i biologicheskoj funkcii. *Mikrobiologija*, 2010, 79(6): 723-733 (https://elibrary.ru/download/elibrary_15523903_39962136.pdf)

11 Rabinovich M. L., Mel'nik M. S. Progress v izuchenii celljuloliticheskikh fermentov i mehanizm biodegradacii vysokouporjadochennyh form celljulozy. *Uspehi sovremennoj biologii*, 2000, 40: 205-266 (https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/rabinovich.pdf)

12 Sindhu S.S., Dadarwal K.R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, 2001, 156(4): 353-358 (doi: 10.1078/0944-5013-00120)

13 Kredics L., Kocsubé S., Nagy L., Komoń-Zelazowska M., Manczinger L., Sajben E., Nagy A., Vágvölgyi C., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., Hatvani L. Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 300: 58-67 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x)

14 Al-Ani B.M., Owaid M.N., Al-Saeedi S.S.S. Fungal interaction between *Trichoderma* spp. and *Pleurotus ostreatus* on the enriched solid media with licorice *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(3): 268-273 (doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001)

МРНТИ: 62.09.39

М.А. АБДУЛЖАНОВА^{1*}, А.С. КИСТАУБАЕВА¹, Л.В. ИГНАТОВА¹,
С.Д. ЖАНТЛЕСОВА¹, А.А. КАБЫКЕНОВА¹, СОБХИ-ЭЛЬ-СОХАЙМИ²
¹Казахский Национальный Университет имени Аль-Фараби, Алматы, Казахстан
²Южно-Уральский Государственный Университет, Челябинск, Россия
*e-mail: malika_81_@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ ЙОГУРТА НА ОСНОВЕ СУХОГО КОБЫЛЬЕГО МОЛОКА, ОБОГАЩЕННОГО ПРОБИОТИЧЕСКИМИ МИКРОКАПСУЛАМИ

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.06

Аннотация

На сегодняшний день проблема разработки кисломолочных продуктов из кобыльего молока с повышенной пищевой и биологической ценностью, максимальной усвояемостью и максимально адаптированных по своему химическому составу недостаточно исследована. Остаются до конца неизученными вопросы влияния различных микроорганизмов на сбраживающую способность молока, оценка внесения различных пищевых добавок (загустителей, наполнителей, ароматизаторов) на степень образования сгустка, реологические и физико-химические показатели продукта. Изучение основных подходов к разработке новых функциональных продуктов на основе сухого кобыльего молока позволяет расширить и дополнить имеющиеся технологические приемы использования данных сырьевых источников для правильного питания. Актуальность проводимой работы связана также с отсутствием эффективных функциональных продуктов на основе сухого кобыльего молока. Впервые на основе изучения динамики биохимических, микробиологических и органолептических показателей обоснованы параметры технологических режимов переработки сухого кобыльего молока в кисломолочный продукт с высокой массовой долей сухого вещества - йогурт. Обогащение восстановленного сухого кобыльего молока 7,5% сухим обезжиренным коровьим молоком позволило получить молочную основу с массовой долей сухих веществ: 15,7%, белков - 3,9% и жира - 2,8% при кислотности 20°Т. Определен оптимальный режим ферментации молочной основы - 38-39°С в течение 6 часов. Для стабилизации и улучшения текстуры йогурта впервые использован пуллулан. Подобрана оптимальная концентрация стабилизатора равная 1% от массы сырья. Пробиотические микрокапсулы пуллулан-бактериальная целлюлоза, содержащие *Lactobacillus rhamnosus* GG, впервые использованы в технологии создания обогащенного пробиотиками ферментированного продукта на основе сухого кобыльего молока.

Ключевые слова: сухое кобылье молоко, пуллулан, йогурт, бактериальная целлюлоза, микрокапсулирование.

Функциональные продукты питания — это тренд будущего, поскольку современная биотехнология позволяет перерабатывать источники пищевого сырья в полезные для здоровья продукты, что отвечает требованиям потребителей. К функциональным продуктам питания можно отнести кисломолочные продукты, производство которых основано на использовании специально подобранных микроорганизмов, обеспечивающих в продуктах заданные свойства [1].

Производство и потребление кисломолочных продуктов неуклонно расширяется. Однако, их ассортимент представлен в основном ферментированными продуктами, произведенными из коровьего молока. Практически не используется такая пищевая матрица, как кобылье молоко, которое имеет массу полезных свойств. Оно обладает высокой пищевой и биологической ценностью, а также максимальной усвояемостью. Следует особо отметить, что по составу белка оно сходно с женским молоком, обладает гипоаллергенными свойствами, имеет богатый аминокислотный состав. Кобылье молоко обладает лечебно-профилактическими свойствами [2-5]. Представляется, что кобылье молоко, вследствие уникальности химического состава и свойств, является более предпочтительным сырьем для производства продуктов массового потребления. Традиционный и пока единственный

продукт, выпускаемый промышленностью из кобыльего молока в Казахстане — это кумыс. Однако он содержит спирт, что ограничивает круг его потребителей. Несмотря на то, что кобылье молоко по сути является казахским национальным «брендом», производству кисломолочных продуктов из него уделяется мало внимания.

Касательно полезных свойств кобылье молоко до сегодняшних дней не оценено по достоинству. Использование кобыльего молока для производства функциональных продуктов питания на его основе ограничивается слабой изученностью вопросов технологии переработки молочного сырья, стабилизации химического состава и технологических свойств молока [6]. Кроме того, это связано с сезонностью удоя и трудной доступностью. В связи с этим актуальным вопросом является использование сухого кобыльего молока в производстве кисломолочных функциональных продуктов питания.

В данной работе актуальной задачей для получения йогурта из сухого кобыльего и сухого коровьего молока в качестве основы является повышение эффективности процесса восстановления сухого молока. Этот процесс представляет собой гетерогенную химическую реакцию, протекающую между твердым веществом и жидкостью, и сопровождающуюся переходом вещества в раствор. Сущность процесса растворения заключается во взаимодействии сухих молочных продуктов с водой и включает несколько этапов: растворение лактозы и минеральных веществ, распределение белка и жира в растворе, гидратация дисперсной фазы, выделение из продукта избыточного воздуха. Интенсивность процесса и его эффективность определяются свойствами воды и сухого молочного продукта. [7]. В связи с этим были изучены методы восстановления сухого кобыльего молока (СКМ) для дальнейшего его использования в качестве молочной основы для функциональных кисломолочных продуктов.

На молочном рынке самым динамичным по росту потребления является йогурт - кисломолочный продукт с высокой массовой долей сухого вещества. Существующие технологии получения йогуртов из кобыльего молока предусматривают использование только заквасочных культур, осуществляющих ферментацию. Введение в рецептуру такого йогурта специально подобранных штаммов бактерий-пробиотиков позволит отнести его к функциональным продуктам, поскольку он будет обладать не только высокими питательными, но и лечебными свойствами.

Применение пробиотических бактерий в качестве нутрицевтиков — это область, которая быстро расширилась в последние годы. Большое значение имеет жизнеспособность клеток и их достаточное количество в кишечном тракте. Пероральное введение большинства бактерий приводит к большой потере жизнеспособности, связанной с их прохождением через желудок, что объясняется наличием высокой концентрации кислоты и желчных солей, это снижает эффективность введённой добавки. Жизнеспособность пробиотических микроорганизмов, то есть количество живых и активных клеток в определенном объеме в момент потребления является ключевой характеристикой качества этих продуктов, поскольку определяет их эффективность [8]. Поэтому важно обеспечить высокую выживаемость бактерий-пробиотиков как во время производства и хранения продукта, так и в процессе его потребления. Вшивание этих пробиотиков в матрицу, то есть иммобилизация, является новым методом, снижающим гибель клеток во время прохождения через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) [9]. Предлагаемая технология основана на иммобилизации бактерий в полимерную матрицу, которая сохраняет свою структуру в желудке до разложения и растворяется в кишечнике, в отличие от высвобождения на основе диффузии.

Микроорганизмы, наиболее часто используемые в пробиотических продуктах, относятся к роду *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, поскольку являются постоянными компонентами микробиоты кишечника человека и имеют статус GRAS (Generally recognized as safe), данный статус также присвоен пуллулану, который будет применяться в качестве загустителя. Как правило, лактобациллы технологически более пригодны для применения в пищевых продуктах, нежели бифидобактерии. Они устойчивы к низким pH и другим стрессовым условиям производства, традиционно используются в ферментированных продуктах,

адаптированы к молоку и другим пищевым субстратам, не образуют уксусную кислоту в процессе ферментации, которая часто ухудшает сенсорные и органолептические свойства продуктов с бифидобактериями [10].

Успешный опыт микрокапсулирования в области пробиотической биотехнологии послужил основанием для проведения настоящего исследования, направленного на создание микрокапсулированных пробиотиков для повышения их устойчивости, жизнеспособности и эффективной доставки в кишечник. Разработанные на основе пуллулана полисахаридных матриц и покрытий из бактериальной целлюлозы (БЦ) в пробиотические микрокапсулы будут впервые использованы для создания обогащенных пробиотиками ферментированных продуктов на основе сухого кобыльего молока.

Полезность ферментированных продуктов из кобыльего молока, да еще и с пробиотиками в микрокапсулированном виде определяет актуальность данного исследования.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследований служили сухое кобылье молоко (СКМ) «Saumal», ТОО «ЕвразияИнвестLtd», Республика Казахстан; сухое обезжиренное коровье молоко (СОМ) АО «Молоко», Россия, ГОСТ 33629-2015; пищевая добавка Пуллулан (П), Hayashibara Biochemical Laboratories, Окаяма, Япония; гибридные микрокапсулы, покрытые оболочкой из пуллулана и бактериальной целлюлозы; функциональный молочный продукт йогурт на основе восстановленного сухого кобыльего молока, обогащенный микрокапсулами пробиотика *Lactobacillus rhamnosus* GG (штамм ATCC® 53103TM был приобретен в Американской коллекции типовых культур).

Определение химического состава восстановленного сухого молока.

Для определения содержания массовой доли сухого вещества, измерения массовой доли жира, белка и плотности восстановленного СКМ, использовался анализатор молока ЛАКТАН 1-4 МИНИ (ООО ВПК «Сибагроприбор», районный пункт Краснообск, Новосибирская область, Российская Федерация).

Определение химического состава молочной основы.

Для определения содержания массовой доли сухого вещества молочной основы использовался метод, основанный на высушивании анализируемой пробы при постоянной температуре (102 ± 2) °С в соответствии с требованиями ГОСТ Р 54668 [11] и вычислении массовой доли сухого вещества ($X_{с.в.}$, %) по потере массы анализируемой пробы в процентах с помощью формулы:

$$X_{с.в.} = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{m - m_0}, \quad (1)$$

где m_1 – масса бюксы с анализируемой пробой после высушивания, г; m_0 – масса бюксы, г; m – масса бюксы с анализируемой пробой до высушивания, г.

Определение белка производилось колориметрическим методом согласно ГОСТ 25179-90 [12]. Метод осуществлялся при помощи спектрофотометра с выделяемой длиной волны 590 нм. Массовую долю белка X_b , %, вычисляли по формуле:

$$X_b = 7.78D - 1.34, \quad (2)$$

где D – измеренная оптическая плотность, ед. оп. плотности; 7.78 – эмпирический коэффициент, % /ед. оп. плотности; 1.34 – эмпирический коэффициент, %.

Содержание жира в молочной основе определяли при помощи кислотного метода согласно ГОСТ 5867-90 [13] под действием концентрированной серной кислоты и изоамилового спирта с последующим центрифугированием в течение 5 минут и измерением объема выделившегося жира в градуированной части жиромера.

Определение плотности молочной основы проводилось ареометрическим методом по ГОСТ 3625–84 [14] при температуре 20 ± 2 °С.

Титруемая кислотность определялась по методу, который основывался на нейтрализации кислот, содержащихся в продукте, раствором гидроксида натрия. Суточные культуры лактобактерий центрифугировали и по стандарту мутности готовили суспензию, содержащую 10^{10} клеток в 1 мл. По 1 мл такой взвеси вносили в пробирки с 9 мл среды MRS и культивировали при 37°С в анаэробных условиях. Затем отбирали по 10 мл культуральной жидкости и добавляли 20 мл дистиллированной воды, 1-2 капли фенолфталеина. Пробы титровали 0,1н NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Количество щелочи, пошедшей на титрование, соответствует количеству образуемой кислоты в 10 мл культуральной жидкости.

Из полученных значений вычисляли среднюю величину. Окончательный результат выражали в градусах Тернера (°Т):

$$^{\circ}\text{T} = \text{A} \cdot \text{K} \cdot 20 \quad (3)$$

где А – величина, выражающая количество 0,1н NaOH, пошедшее на титрование 10 мл исследуемого образца; К – поправка к титру, определяемая при титровании 0,1н NaOH 0,1н янтарной кислотой (0,009 г); °Т – величина, выражающая количество 0,1н щелочи, пошедшее на титрование 100 мл исследуемого образца.

Восстановление сухого молока.

Для восстановления сухого кобыльего молока брали навеску от 5 до 30 г (с шагом 5 г) и растворяли в 100 мл воды, с постепенным нагревом до температуры 65-75°С при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки с подогревом С-MAG HS 7 ИКА, Германия. После этого молоко выдерживали в течение 30-90 минут, с охлаждением за счет естественного теплообмена с окружающей средой до комнатной температуры 20-24°С. Сухое коровье молоко растворяли согласно инструкции производителя.

Приготовление йогурта.

Готовили несколько вариантов состава молочной основы (таблица 1).

Таблица 1 - Варианты состава молочной основы

| Вариант | Восстановленное СКМ, % | СОМ, % |
|---|------------------------|--------|
| 1 | 96,5 | 3,5 |
| 2 | 94,5 | 5,5 |
| 3 | 92,5 | 7,5 |
| 4 | 90 | 10 |
| Примечание: СКМ – сухое кобылье молоко, СОМ – сухое обезжиренное коровье молоко | | |

Ферментацию всех вариантов молочной основы производили при разных температурных режимах: 38-39°С; 42-43°С. При ферментации молочной основы молоко пастеризовали при 63°С на водяной бане, гомогенизировали для повышения прочности и улучшения консистенции белковых сгустков и исключения образования жировой пробки на поверхности готового продукта, охлаждали до температуры заквашивания (38-39°С), затем вносили закваску, сквашивали, перемешивали и охлаждали образовавшийся сгусток. Стабилизацию йогурта проводили посредством внесения пищевой добавки ПУЛ в вариантах внесения - 0,5; 1; 1,5% при температуре 45°С, смесь подвергали интенсивному перемешиванию и оставляли для набухания в течение 30 минут. В готовый йогурт вносили ПУЛ-БЦ пробиотические микрокапсулы с *L. rhamnosus* GG в соотношении 10:1.

Определение органолептических показателей кисломолочного продукта.

Органолептическую оценку готового продукта проводили методом закрытой дегустации, который был разработан в соответствии со СТ РК 1732-2007 [15]. Контроль осуществлялся по следующим показателям: запах, вкус, консистенция, внешний вид и цвет.

Статистический анализ.

Все анализы проведены в трех повторностях, и результаты были представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, если не указано иное. Данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Тьюки. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS (версия 28.0, IBM Corp., Армонк, штат Нью-Йорк, США). Значимость определяли как $p < 0,05$. Выполнение статистических расчетов, построение графиков и схем производилось в полуавтоматическом режиме средствами Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение

Существуют различные методы восстановления сухого коровьего молока, однако данные по восстановлению СКМ отсутствуют. В молочной промышленности широко используется способ, предусматривающий растворение сухого молока при температуре 38-42°C, с последующим мгновенным охлаждением до 6-8°C, выдержкой не менее 3-4 часов с целью наибольшего набухания белков, устранения водянистого вкуса, а также для достижения нормальной плотности и вязкости [16]. Недостатком этого способа являются большие затраты времени и энергии на охлаждение.

На потребительском уровне для получения молока существует способ, при котором берут 8-9 столовых ложек (125 г) сухого молока и размешивают в небольшом количестве воды с температурой 35-40°C, затем постепенно доливают воду, доводя до 1 л, при этом идет непрерывное перемешивание и нагрев до кипения [17]. Недостатком данного метода заключается то, что при кипении молоко теряет нативные свойства сывороточных белков, снижается содержание витаминов (например, потери витамина С достигают до 70%), что ведет к снижению питательной ценности полученного молока.

Для восстановления сухого кобыльего и коровьего молока был выбран способ, при котором растворение сухого молока в воде, включает постоянное перемешивание с помощью магнитной мешалки, с постепенным нагревом до температуры 65-75°C. После этого молоко выдерживают в течение 30-90 минут с охлаждением за счет естественного теплообмена с окружающей средой или путем принудительного охлаждения до комнатной температуры 20-24°C. За это время белковая фракция набухает и молоко приобретает такие свойства как вкус и запах наиболее близкие к натуральному [18].

Согласно инструкции производителя, СКМ «Saumal», для употребления в максимально приближенном к цельному кобыльему молоку рекомендуется разбавить порошок в количестве 3 столовые ложки (20-22г) с 200 мл теплой воды (36-40°C). Однако при сквашивании такого молока образуется достаточно жидкий молочный продукт. Поэтому была проведена серия экспериментов по подбору оптимальной массы СКМ для ее дальнейшего восстановления и использования в качестве молочной основы.

Для этого в 100 мл воды растворяли СКМ в диапазоне масс 5-30 г (с шагом 5 г), смесь постепенно нагревали до температуры 65-75°C и охлаждали в течение 30-60 минут при комнатной температуре. Затем добавляли закваску YO-MIX-601 компании «Danisco» в количестве 1 г/100 мл и оставляли сквашиваться в течение 6-8 часов. Результаты эксперимента приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Органолептические показатели восстановленного кобыльего молока

| Вариант | Масса сухого кобыльего молока г на 100мл воды | Внешний вид и консистенция | Цвет | Запах | Вкус |
|---------|---|--|------------------------------|--|---|
| 1 | 5 | Однородная, жидкая | Белый с голубоватым оттенком | Неприятный, свойственный сырому молоку | Сладковатый, с привкусом кобыльего молока |
| 2 | 10 | Неоднородная, с осадком | Белый с кремовым оттенком | Неприятный, свойственный сырому молоку | Сладковатый, с привкусом кобыльего молока |
| 3 | 15 | Неоднородная, с осадком | Белый с кремовым оттенком | Свойственный сырому молоку | Кислый, с привкусом кобыльего молока |
| 4 | 20 | Неоднородная, с наличием единичных хлопьев | Кремовый | Кисломолочный | Кислый, с привкусом кобыльего молока |
| 5 | 25 | Неоднородная, с наличием единичных хлопьев | Кремовый | Кисломолочный | Кислый, с привкусом кобыльего молока |
| 6 | 30 | Неоднородная, с наличием единичных хлопьев | Кремовый | Кисломолочный | Кислый, с привкусом кобыльего молока |

По результатам исследования, при восстановлении и дальнейшем сквашивании СКМ в большинстве случаев получаются образцы жидкой консистенции. В вариантах 2, 3 выпадает осадок белого цвета, идет разделение фаз и образование сыворотки. При увеличении массы СКМ до 15 г консистенция приобретает неоднородный характер с наличием единичных хлопьев. Варианты 4-6 оказались наиболее подходящими по органолептическим показателям. В связи с этим для восстановления СКМ был выбран вариант 4, данный вариант наиболее выгоден с экономической точки зрения (20 г на 100 мл воды).

Поскольку при скашивании СКМ получается довольно жидкий и неоднородный молочный продукт со специфическим вкусом и запахом, было решено дополнительное внесение определенных количеств сухого обезжиренного коровьего молока. Данная процедура проводится для повышения массовой доли сухого вещества в продукте, улучшения консистенции, а также вкусовых качеств получаемой продукции [19]. Более того, данная процедура позволяет оптимизировать жирность СКМ.

Применение в определенных концентрациях СОМ при производстве йогурта предусмотрено нормативной документацией и широко используется в промышленных условиях [20]. Поэтому было проведено изучение возможности обогащения восстановленного кобыльего молока СОМ с химическим составом: массовая доля белка - 34,0; жира - 1,5; сухого вещества - 95,0 и углеводов - 50%.

Результаты исследования степени влияния количества СОМ на химический состав и интенсивность сквашивания (время достижения кислотности 30°Т) молочной основы для йогурта приведены в таблице 3. Все опытные и контрольные образцы молочной основы, подвергали ферментации (скашиванию) при стандартных для традиционной технологии йогурта условиях: температура 42-43°С, закваска прямого внесения со стандартной микрофлорой для йогурта YO-MIX-601.

Таблица 3 - Влияние количества СОМ на химический состав и показатели молочной основ

| Доза внесенного СОМ, % | Массовая доля, % | | | Плотность, кг/м ³ | Кислотность, °Т |
|------------------------|------------------|-----------|-----------|------------------------------|-----------------|
| | сухого вещества | жира | белка | | |
| 3,5 | 14,11±1,23 | 2,13±0,15 | 2,9±0,18 | 1040,1±11,3 | 11±1,23 |
| 5,5 | 14,87±1,31 | 2,12±0,16 | 3,2±0,3 | 1045,2±10,5 | 19±0,2 |
| 7,5 | 16,25±1,77 | 2,11±0,2 | 4,15±0,39 | 1054,2±11,2 | 20±0,21 |
| 10 | 18,12±1,59 | 2±0,19 | 4,99±0,47 | 1066,9±11,3 | 31,29±0,2 |

Примечание: СОМ – сухое обезжиренное молоко

Обогащение восстановленного кобыльего молока СОМ позволяет значительно повысить массовые доли сухого вещества и белка. Максимальные значения этих параметров наблюдаются при внесении 10% СОМ, однако это сопровождается нарастанием титруемой кислотности до 30°Т и выше. Поэтому наиболее подходящими можно считать варианты с добавлением 5,5% и 7,5% СОМ, обеспечивающие обогащение смеси сухим веществом соответственно на 35,4 и 48,7% и белком - на 89,7 и 122,0 % при кислотности смеси не более 20°Т.

На следующем этапе был произведен подбор заквасок, обладающих наилучшей сбраживающей активностью. Типы заквасок, используемые для сквашивания:

1) YO-MIX 601 10 DCU, DANISCO (*Streptococcus thermophilus* u *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*)

2) YOGURT IMMUNITY, YOLACTIS (Сахароза; *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus (delbrueckii ssp. bulgaricus, acidophilus, casei, rhamnosus, paracasei, plantarum)*; *Bifidobacterium (lactis, longum)*)

3) Закваска YOGURT, VIVO (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*)

Все вышеперечисленные закваски – прямого внесения, оптимальная температура сквашивания 38-42°С. Данные закваски являются общедоступными и широко известными. В них содержатся пробиотические штаммы молочнокислых бактерий, сбраживающих углеводы с образованием молочной кислоты. Благодаря этому, они широко используется в пищевой промышленности при приготовлении различных молочных продуктов, включая ряженку, йогурты и другие. *Streptococcus thermophilus* поглощает и перерабатывает лактозу (молочный сахар) и поэтому применяется при лактазной недостаточности, оказывает подкисляющее действие, обеспечивая бактерицидный эффект в отношении патогенных микроорганизмов, а также способен синтезировать и выделять полисахариды. *Lactobacillus delbrueckii* обладают набором протеаз, например, специфическая пептидаза *Lactobacillus delbrueckii* – пролидаза гидролизует белки с высоким содержанием пролина и имеет уникальные пути регуляции биосинтеза [21, 22]. В состав всех трех заквасок входят эти пробиотики, кроме того, выбор этих заквасок обосновывается их низкой стоимостью.

На рисунке 1 представлены данные по сквашиванию комбинированной молочной основы с использованием трех видов заквасок.

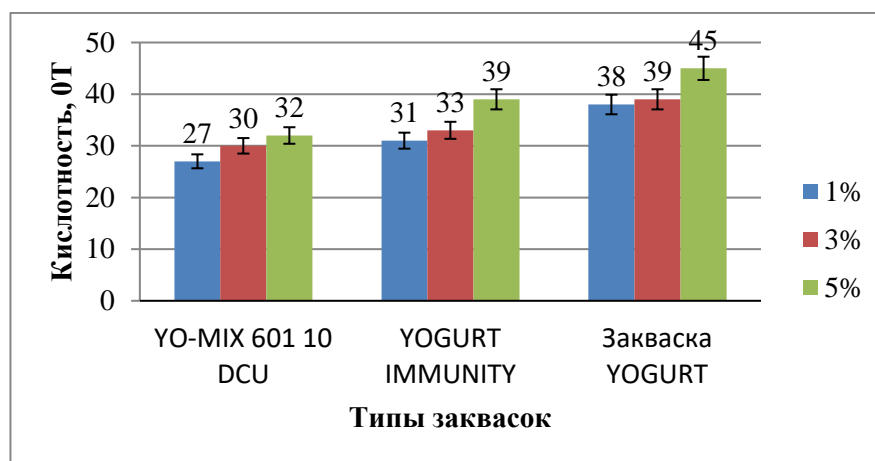


Рисунок 1 - Влияние различных заквасок и их концентраций на повышение кислотности при сквашивании молока в течение 6 часов

Как видно из данных, представленных на рисунке 1, при внесении закваски в количестве 3% и выше кислотность продукта повышается. Максимальная кислотность установлена при сквашивании закваской YOGURT компании VIVO и внесении 5% заквасочного материала. При использовании закваски YOGURT IMMUNITY наблюдается более медленный набор титруемой кислотности, сквашиваемое молоко не образует нужной консистенции и полученный продукт характеризуется кислым вкусом.

Таким образом, в процессе отработки технологии приготовления йогурта были опробованы 3 вида заквасок. Закваска для йогуртов включали разные комбинации пробиотических микроорганизмов. Наиболее приемлемо внесение закваски YO-MIX 601 10 DCU, содержащей *S. thermophilus* и *L. delbrückii* в концентрации 1%. Использование данной комбинации штаммов позволяет получить йогурт с достаточно густой консистенцией, плотным сгустком и стойким ароматом, а также с гомогенной однородной структурой и мягким вкусом.

При разработке технологии получения йогурта из СКМ следовало учесть то обстоятельство, что помимо повышенной биологической и питательной ценности, обусловленной уникальными качествами сырья, он должен обладать привычной для потребителя консистенцией. Дело в том, что существенным недостатком, ухудшающим качество готового продукта из СКМ, является жидкая, неоднородная, хлопьевидная консистенция с отстоем сыворотки при хранении. Современные требования к увеличению срока годности продукта выдвигают проблему сохранения товарного вида в процессе длительного хранения [23].

Одним из возможных способов достижения устойчивой однородной, не расслаивающейся, вязкой консистенции кисломолочных напитков, наряду с обогащением белкового состава исходного сырья, подбором заквасок, обладающих загущающими свойствами, является использование стабилизирующих пищевых добавок на основе натуральных компонентов [24].

Определение особенностей применения стабилизирующих добавок, их влияния на формирование консистенции йогурта из СКМ, подбор дозы внесения, уточнение параметров технологического процесса - актуальные задачи следующего этапа исследования.

В качестве стабилизатора консистенции йогурта из восстановленного кобыльего молока была выбрана пищевая добавка Пуллулан (Pullulan). Внешне пуллулан представляет собой безвкусный порошок белого цвета, который хорошо растворим в воде. ПУЛ широко используется в пищевой промышленности, в том числе в качестве связующего компонента и стабилизатора [25]. Недавно было обнаружено, что пуллулан оказывает стимулирующее

действие на пробиотики [26]. Предполагается, что пуллулан, за счет перечисленных свойств, может придать йогурту гладкий вид и улучшить его вязкость.

Для предварительной активации, стабилизатор вносили в 1/5 часть молочной основы при температуре 45°C, смесь подвергали интенсивному перемешиванию и оставляли для набухания в течение 30 минут. Затем полученную смесь вносили в основную массу нормализованного обогащенного 7,5% СОМ восстановленного кобыльего молока, заквашивали закваской прямого внесения YO-MIX 601 10 DCU, перемешивали 15 минут и оставляли для сквашивания. Испытаны варианты внесения стабилизатора - 0,5; 1; 1,5%.

По окончании сквашивания продукт охлаждали до 25 °С, перемешивали и разливали в полистироловые стаканчики, закрытые металлизированной фольгой, направляли на охлаждение и хранение в холодильную камеру до температуры в продукте 4±2 °С. Оптимальной оказалась концентрация стабилизатора 1% от массы сырья. Полученный йогурт обладал удовлетворяющими потребителя органолептическими показателями: кисломолочным запахом, привкусом кобыльего молока; однородной, в меру вязкой консистенцией с кремовым оттенком.

Кисломолочные продукты с пробиотиками составляют от 60 до 70% от общего рынка функциональных продуктов питания. В связи с этим их производство можно выделить в самостоятельную отрасль пищевой биотехнологии [10]. Однако, многочисленные исследования показывают, что значительная часть пробиотических клеток теряет свою активность вследствие повреждения и гибели микроорганизмов при производстве заквасок прямого внесения, в пищевой матрице, при хранении продуктов, а также в процессе прохождения через желудочно-кишечный тракт [8]. Микрокапсуляция микробных клеток обеспечивает защиту от неблагоприятных условий, что было показано не только в целом ряде работ [27-29], но и экспериментально установлено в ходе выполнения исследования. Поскольку целью данной работы является создание технологии получения продуктов из СКМ, обогащенных микрокапсулированными пробиотическими микроорганизмами, то для получения пробиотического йогурта были использованы микрокапсулы ПУЛ-БЦ, полученные методом экструзии по технологии layer-by-layer, содержащие штамм *Lactobacillus rhamnosus* GG. Этот штамм по совокупности исследованных свойств: активности кислотообразования, спектру и уровню антагонистической активности и резистентности к стрессовым факторам был выбран для включения в микрокапсулы [30]. В готовый йогурт вносили ПУЛ-БЦ пробиотические микрокапсулы в соотношении 1:10. Полученный продукт получил название «Микролакт».

Заключение

Продукты из кобыльего молока с микрокапсулами сохраняют высокую жизнеспособность пробиотических микроорганизмов в процессе производства, и обеспечивают повышенную терапевтическую и профилактическую эффективность, что способствует оздоровлению населения.

В результате исследовательской работы подобран оптимальный состав молочной смеси для производства йогурта на основе сухого восстановленного кобыльего молока с повышенной массовой долей сухих веществ. Обогащение восстановленного кобыльего молока 7,5% СОМ позволило получить молочную основу с массовой долей сухих веществ: 15,7%, белков - 3,9% и жира - 2,8% при кислотности 20°Т. Определен оптимальный режим ферментации молочной основы - 38-39°C в течение 6 часов. Сквашивание при данном температурном режиме и внесение стабилизатора П в концентрации 1% приводит к образованию равномерного сгустка, а полученный продукт имеет удовлетворительные органолептические характеристики. Результаты экспериментальных исследований использованы при разработке технологии нового йогурта «Микролакт» с микрокапсулированным пробиотиком.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта AP09259491 "Биотехнологии использования полисахаридной матрицы с пробиотическими биопленками для создания комбинированных молочных продуктов".

Литература:

- 1 Bogue J., Collins O., Troy A. J. Market analysis and concept development of functional foods In: *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, 2017: 29-45 (doi:10.1016/B978-0-12-802780-6.00002-X).
- 2 Pieszka M., Luszczynski J., Szeptalin A. Comparison of mare's milk composition of different breeds In: *Nauka Przyroda Technologie*, 2011, 6 (5): 1-5.
- 3 Markiewicz-Kęszycka M. Chemical composition and whey protein fraction of late lactation mares' milk In: *Int. Dairy J*, 2013, 2: 62-64 (doi:10.1016/j.idairyj.2013.02.006)
- 4 Orlandi M., Goracci J., Curadi M. C. Essential fatty acids (EFA) in Haflinger and Thoroughbred mare's milk In: *Annali della Facoltà di Medicina veterinaria*, 2007, 55: 319-325
- 5 Kanareykina S.G., Chernyshenko Yu.N., Kanareykin V.I., Researching of fatty acids and amino acid structure of yogurts with use of mare's milk: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 315 (7): 1-6 (doi:10.1088/1755-1315/315/7/072036)
- 6 Канарейкин В.И., Канарейкина С.Г. Кисломолочный продукт из кобыльего молока функциональной направленности. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*, 2016, 57 (1): 189–192.
- 7 Попова Н. В. Инновации в технологии восстановления сухого молока как фактор управления качеством восстановленных продуктов переработки молока: *Вестник ЮУрГУ. Серия «Экономика и менеджмент»*, 2013, 7 (4): 181-186.
- 8 Mortazavian A. M., Mohammadi R., Sohrabvandi S., Delivery of probiotic microorganisms into gastrointestinal tract by food products In: *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*, 2012, 61: 121-146 (doi:10.5772/47946)
- 9 Abdulzhanova M. A., Savitskaya I. S., Kistaubayeva A. S., Shokatayeva D. H., Pogrebnyak A., Ignatova L. V., Delivery of probiotic to microbiome by layer-by-layer encapsulation In: *Springer Proceedings in Physic.* A.D. Pogrebnyak, M. Pogorielov, Viter, R. Eds.; Springer: Singapore, 2019: 9–18 (doi: 10.1109/NAP47236.2019.216929)
- 10 Khani S., Hosseini H. M., Taheri M., Nourani M. R., Imani Fooladi A. A. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review In: *Inflamm. Allergy Drugs Targets*, 2012, 11: 79-89.
- 11 ГОСТ 54668-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли влаги и сухого вещества. – М.: Стандартинформ, 2013: 25.
- 12 ГОСТ 25179-90. Молоко. Методы определения белка. – М.: Стандартинформ, 2009: 15.
- 13 ГОСТ 5867-90. Молоко и молочные продукты. Методы определения жира. – М.: Стандартинформ, 2011: 33.
- 14 ГОСТ 3625-84. Молоко и молочные продукты. Методы определения плотности. – М.: Стандартинформ, 2009: 21.
- 15 СТ РК 1732-2007. Молоко и молочные продукты. Органолептический метод определения показателей качества.
- 16 Лепилкина О. В., Шутов В. Е., Чубенко А. В. и др. *Способ производства мягкого сырного продукта*. Патент 2403792 (РФ) МПК А23С19/076. RU2009126128/10А. Заявл. 07.07.2009. Оpubл. 20.12.2010.
- 17 ГОСТ Р 54074-2010. Молоко сухое обезжиренное. - М.: Стандартинформ, 2012: 33
- 18 Трубецков Д. В. *Способ восстановления сухого молока*. Патент 2452186 (РФ) МПК А23С9/00. RU2011108235/10. Заявл. 04.03.2011. Оpubл. 10.06.2012: 5
- 19 Тамим А.И. *Йогурты и другие кисломолочные продукты* - СПб: Профессия, 2003: 664.
- 20 Ахатова И. А. Молочное коневодство: племенная работа, технологии производства и переработки кобыльего молока, Уфа: Тилем, 2007: 324.
- 21 Heller K. J., Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics reid and starter organisms: *Am. J. of Clin. Nutrition*, 2001, 73 (2): 374-379 (doi: 10.1093/ajcn/73.2.374s)

22 Shakerian M., Razavi S. H., Ziai S. A., Khodaiyan F., Yarmand M. S., Moayedi A. Proteolytic and ACE-inhibitory activities of probiotic yogurt containing non-viable bacteria as affected by different levels of fat, inulin and starter culture: *J. Food Sci. Technol*, 2015, 52: 2428–2433 (doi:10.1007/s13197-013-1202-9)

23 Betoret E., Betoret N., Vidal D., Fito P., Functional foods development: trends and technologies: *Trends Food Sci Technol*, 2011, 22: 498-508 (doi:10.1016/j.tifs.2011.05.004)

24 Мунро П. А., Новые технологии создания молочных продуктов будущего: *Молочная промышленность*, 2013, 3: 39-40.

25 Oguzhan P., Yangilar F., Pullulan: production and usage in food industry In: *Afr. J. Food Sci. Technol*, 2013, 3(4), 57-63.

26 Nithya Bala Sundaria S., Niveditab V., Chakravarthyb M., Srisowmeyab G., Usha Antonyc, Nandhini Devb G., Characterization of microbial polysaccharides and prebiotic enrichment of wheat bread with pullulan In: *LWT - Food Sci. Technol*, 2020, 122: 1-7 (doi:10.1016/j.lwt.2019.109002)

27 Carvalho A.S., Microcapsulation as a method of new technologies In: *J. food sci*, 2013, 68: 2538-2541.

28 Rashidinejad, A.; Bahrami, A.; Rehman, A.; Rezaei, A.; Babazadeh, A.; Singh, H.; Jafari, S.M. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products In: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020, 62: 2470–2494 (doi:10.1080/10408398.2020.1854169).

29 Rodrigues F., Cedran M., Bicas J., Sato H., Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications—A narrative review In: *Food Res. Int*, 2020, 137: 109682 (doi: 10.1016/j.foodres.2020.109682)

30 Kistaubayeva A., Abdulzhanova M., Zhantlessova S., Savitskaya I., Karpenyuk T., Goncharova A., Sinyavskiy Y., The Effect of Encapsulating a Prebiotic-Based Biopolymer Delivery System for Enhanced Probiotic Survival In: *Polymers*, 2023, 15(7): 1752 (doi:10.3390/polym15071752)

М.А. АБДУЛЖАНОВА^{1*}, А.С. КИСТАУБАЕВА¹, Л.В. ИГНАТОВА¹, С.Д. ЖАНТЛЕСОВА¹,
А.А. КАБЫКЕНОВА¹, СОБХИ-ЭЛЬ-СОХАЙМИ²

¹әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

²Оңтүстік Орал Мемлекеттік университеті, Челябинск, Ресей

*e-mail: malika_81_@mail.ru

ПРОБИОТИКАЛЫҚ МИКРОКАПСУЛАЛАРМЕН БАЙЫТЫЛҒАН ҚҰРҒАҚ БИЕ СҮТІ НЕГІЗІНДЕГІ ЙОГУРТ АЛУ

Түйін

Бүгінгі таңда тағамдық және биологиялық құндылығы, сіңімділігі жоғары және химиялық құрамы бойынша барынша бейімделген бие сүтінен қышыл сүт өнімдерін әзірлеу мәселесі жеткілікті зерттелмеген. Әр түрлі микроорганизмдердің сүттің ашыту қабілетіне әсері, әр түрлі тағамдық қоспалардың (қоюландырғыштар, толтырғыштар, хош иістендіргіштер) сүттің ұюына әсер ету дәрежесіне, өнімнің реологиялық және физика-химиялық көрсеткіштеріне әсерін бағалау мәселелері толық зерттелмеген күйінде қалып отыр. Ұнтақталған бие сүтіне негізделген жаңа функционалды өнімдерді әзірлеудің негізгі тәсілдерін зерттеу негізінен дұрыс тамақтану үшін осы шикізат көздерін пайдаланудың қолда бар технологиялық әдістерін кеңейтуге және толықтыруға мүмкіндік береді. Жүргізіліп жатқан жұмыстың өзектілігі биенің құрғақ сүтіне негізделген тиімді функционалды өнімдердің болмауымен де байланысты. Алғаш рет биохимиялық, микробиологиялық және органолептикалық көрсеткіштердің динамикасын зерттеу және технологиялық режимдерінің параметрлерін өңдеу арқылы құрамындағы құрғақ заттардың жоғары массалық үлесіне ие бие сүтінен дайындалған ашытылған сүт өнімі ретінде йогуртқа негізделді. Қалпына келтірілген ұнтақталған бие сүтін 7,5% құрғақ майсыз сиыр сүтімен байыту арқылы құрғақ заттардың массалық үлесі бар сүт негізін алуға мүмкіндік берді: 15,7%, ақуыздар - 3,9% және май - 2,8% қышқылдығы 20°Т. Сүт негізін ашытудың оңтайлы режимі - 6 сағат және температуралық көрсеткіш 38-39°С. Йогурт құрылымын тұрақтандыру және жақсарту үшін алғаш рет пуллулан қолданылды. Тұрақтандырғыштың оңтайлы концентрациясы шикізат массасының 1% - на тең. Құрамында *Lactobacillus rhamnosus* gg бактериясы бар бактериялық целлюлоза-пуллулан пробиотикалық микрокапсулалары алғаш рет бие сүтінің ұнтағы негізінде пробиотиктермен байытылған ашытылған өнімді жасау технологиясында қолданылған.

Түйінді сөздер: бие сүті ұнтағы, пуллулан, йогурт, бактериялық целлюлоза, микрокапсуляция.

МРПТИ: 62.09.39

M.A. ABDULZHANOVA^{1*}, A.S. KISTAUBAYEVA¹, L.V. IGNATOVA¹,
S.D. ZHANTLESOVA¹, A.A. KABYKENOVA¹, SOBHY EL-SOHAIMY²

¹ Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

² South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

*e-mail: malika_81_@mail.ru

OBTAINING YOGURT BASED ON MARE'S MILK POWDER ENRICHED WITH PROBIOTIC MICROCAPSULES

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.06

Abstract

Currently, there is a lack of sufficient research on developing fermented milk products from mare's milk with increased nutritional and biological value, maximum digestibility, and optimal chemical composition. Important aspects such as the influence of microorganisms on milk fermentation, the effect of food additives (such as thickeners, fillers, and flavorings) on clot formation and the rheological and physico-chemical properties of the product are still unexplored. Studying new approaches to the development of functional products based on mare's milk powder can expand and complement existing technological methods for using this raw material in proper nutrition.

This work is also relevant due to the absence of effective functional products based on dry mare's milk. For the first time, in this study, the parameters of technological regimes for processing dried mare's milk into a fermented milk product - yogurt with a high mass fraction of dry matter, were substantiated. Enrichment of reconstituted dry mare's milk with 7.5% dry skimmed cow's milk allowed us to obtain a milk base with a mass fraction of solids: 15.7%, proteins - 3.9%, and fat - 2.8%, with an acidity of 20°T. The optimal fermentation mode of the milk base was determined - 38-39 °C for 6 hours.

Pullulan was used for the first time to stabilize and improve the texture of yogurt. The optimal concentration of the stabilizer was found to be 1% by weight of the raw material. Pullulan-bacterial cellulose probiotic microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus* GG were used for the first time in the technology of creating a fermented product enriched with probiotics based on dry mare's milk.

Keywords: mare's milk powder, pullulan, yogurt, bacterial cellulose, microencapsulation.

Functional foods are the trend of the future, as modern biotechnology makes it possible to process raw food sources into healthy products that meet the requirements of consumers. The functional foods include fermented milk products, the production of which is based on the use of specially selected microorganisms that provide the desired properties in the products [1].

The production and consumption of fermented milk products are steadily expanding. However, their range is mainly represented by fermented products made from cow's milk. Such a food matrix as mare's milk, which has a lot of useful properties, is practically not used. It has a high nutritional and biological value, as well as maximum digestibility. It should be specially noted that in terms of protein composition, it is similar to human milk, has hypoallergenic properties, and has a rich amino acid composition. Mare's milk has therapeutic and prophylactic properties [2-5]. It seems that mare's milk, due to the uniqueness of its chemical composition and properties, is the preferred raw material for the production of consumer products. Traditional and yet the only product produced by the industry from mare's milk in Kazakhstan is koumiss. However, it contains alcohol, which limits the range of its consumers. Even though mare's milk is essentially the Kazakh national "brand", little attention is paid to the production of fermented milk products from it.

Regarding the beneficial properties, mare's milk has not been appreciated to this day. The use of mare's milk for the production of functional food products based on it is limited by the poor knowledge of the technology of processing raw milk, stabilization of the chemical composition, and technological properties of milk [6]. In addition, this is due to the seasonality of milk yield

and difficult accessibility. In this regard, the topical issue is the use of mare's milk powder in the production of sour-milk functional food products.

In this paper, an urgent task for obtaining yogurt from dried mare's and cow's milk as a base is to increase the efficiency of the process of restoring milk powder. This process is a heterogeneous chemical reaction that occurs between a solid and a liquid and is accompanied by the transition of the substance into a solution. The essence of the dissolution process is the interaction of dry dairy products with water and includes several stages: the dissolution of lactose and minerals, the distribution of protein and fat in the solution, the hydration of the dispersed phase, and the release of excess air from the product. The intensity of the process and its efficiency is determined by the properties of water and dry milk product. [7]. In this regard, methods of MMP restoration were studied for its further use as a dairy base for functional fermented milk products.

In the dairy market, the most dynamic in terms of consumption growth is yogurt - a fermented milk product with a high mass fraction of dry matter. Existing technologies for producing yogurts from mare's milk provide for the use of only starter cultures that carry out fermentation. The introduction of specially selected strains of probiotic bacteria into the recipe of such yogurt will make it possible to classify it as a functional product since it will have not only high nutritional but also medicinal properties.

The use of probiotic bacteria as nutraceuticals is an area that has expanded rapidly in recent years. Of great importance is the fact that the cells are viable and whether there are enough of them in the intestinal tract. Oral administration of most bacteria leads to a large loss of viability associated with their passage through the stomach, due to the presence of a high concentration of acid and bile salts, this reduces the effectiveness of the introduced supplement. The viability of probiotic microorganisms, that is, the number of living and active cells in a certain volume at the time of consumption, is a key characteristic of the quality of these products, since it determines their effectiveness [8]. Therefore, it is important to ensure the high survival of probiotic bacteria both during the production and storage of the product and during its consumption. Sewing these probiotics into a matrix, i.e., immobilization, is a new method to reduce cell death during passage through the gastrointestinal tract. The proposed technology is based on the immobilization of the bacterium in a polymeric matrix, which retains its structure in the stomach until degraded and dissolves in the intestine, as opposed to diffusion-based release.

The microorganisms most commonly used in probiotic products belong to the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, since they are permanent components of the human gut microbiota and have the status of GRAS (Generally recognized as safe), this status is also assigned to pullulan, which will be used as a thickener. As a rule, lactobacilli are technologically more suitable for use in food products than bifidobacteria. They are resistant to low pH and other stressful production conditions, are traditionally used in fermented products, adapted to milk and other food substrates, do not form acetic acid during fermentation, which often worsens the sensory and organoleptic properties of products with bifidobacteria [10].

Successful experience with microencapsulation in the field of probiotic biotechnology served as the basis for conducting this study aimed at creating microencapsulated probiotics to increase their stability, viability, and efficient delivery to the intestine. Polysaccharide matrices developed based on pullulan (PUL) and bacterial cellulose (BC) coatings into probiotic microcapsules will be used for the first time to create probiotic-enriched fermented products based on dry mare's milk.

The usefulness of fermented products made from mare's milk, and even more so with probiotics in microencapsulated form, determines the relevance of this research.

Materials and methods

The material for the research was mare's milk powder (MMP) "Saumal", EurasiaInvest Ltd, the Republic of Kazakhstan; skimmed milk powder (SMP) JSC "Moloko", Russia, GOST 33629-2015; food additive Pullulan (P), Hayashibara Biochemical Laboratories, Okayama, Japan; hybrid microcapsules coated with P and BC; functional dairy product yogurt based on reconstituted dry

mare's milk, enriched with microcapsules of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG (strain ATCC® 53103TM was purchased from the American Type Culture Collection).

Determination of the chemical composition of reconstituted milk powder

To determine the content of the mass fraction of dry matter, measurements of the mass fraction of fat, protein, and density restored MMP, we used a milk analyzer LACTAN 1-4 MINI (VPK "Sibagopribor" LLC, Krasnoobsk district settlement, Novosibirsk region, Russian Federation).

Determination of the chemical composition of the milk base

To determine the content of the mass fraction of dry matter of the milk base, a method was used based on drying the analyzed sample at a constant temperature (102 ± 2) °C following the requirements of GOST R 54668 [11] and calculation of the mass fraction of dry matter (X d.m., %) by the mass loss of the analyzed sample in percent using the formula:

$$Xd. m. = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{m - m_0}, \quad (1)$$

where m_1 is the weight of the bottle with the analyzed sample after drying, g; m_0 is the weight of the bottle, g; m is the weight of the weighing bottle with the analyzed sample before drying, g.

Protein determination was carried out by colorimetric method according to GOST 25179-90 [12]. The method was carried out using a spectrophotometer with a wavelength of 590 nm. The mass fraction of protein X_b , %, was calculated by the formula:

$$X_b = 7.78D - 1.34, \quad (2)$$

where D is the measured optical density, units. opt. density; 7.78 – empirical coefficient, %/unit. opt. density; 1.34 – empirical coefficient, %.

The fat content in the milk base was determined using the acid method according to GOST 5867-90 [13] under the action of concentrated sulfuric acid and isoamyl alcohol, followed by centrifugation for 5 minutes and measurement of the volume of released fat in the graduated part of the butyrometer.

Density determination of milk base was carried out by the hydrometric method according to GOST 3625-84 [14] at a temperature of 20 ± 2 °C.

Titrate acidity was determined by a method that was based on the neutralization of the acids contained in the product with a solution of sodium hydroxide. Daily cultures of lactobacilli were centrifuged, and a suspension containing 10^{10} cells per 1 ml was prepared according to the turbidity standard. 1 ml of this suspension was added to test tubes with 9 ml of MRS medium and cultivated at 37°C under anaerobic conditions. Then, 10 mL of culture liquid was taken, and 20 mL of distilled water was added. 1-2 drops of phenolphthalein were then added. The samples were titrated with 0.1n NaOH with constant shaking until a stable slightly pink color appeared. The amount of alkali used for titration corresponds to the amount of acid formed in 10 ml of culture liquid.

The average value was calculated from the obtained values. The final result was expressed in Turner degrees (°T):

$$^{\circ}T = A \cdot K \cdot 20 \quad (3)$$

where A is a value expressing the amount of 0.1n NaOH used for titration of 10 ml of the test sample; K - correction to the titer, determined by titration of 0.1n NaOH with 0.1n succinic acid (0.009 g); $^{\circ}T$ is a value expressing the amount of 0.1 n alkali used for titration of 100 ml of the test sample.

Powdered milk recovery

To reconstitute dry mare's milk, a sample of 5 to 30 g was taken (in 5 g increments) and dissolved in 100 ml of water, with gradual heating to a temperature of 65-75°C with constant stirring using a heated magnetic stirrer C-MAG HS 7 IKA, Germany. After that, the milk was kept for 30-90 minutes, with cooling due to natural heat exchange with the environment to room temperature 20-24°C. The powdered cow's milk was dissolved according to the manufacturer's instructions.

Producing yogurt

Prepared several variants for the composition of the milk base, which are shown in Table 1.

Table 1- Variants for the composition of the milk base

| Variant | Recovered MMP, % | SMP, % |
|---------|------------------|--------|
| 1 | 96,5 | 3,5 |
| 2 | 94,5 | 5,5 |
| 3 | 92,5 | 7,5 |
| 4 | 90 | 10 |

Note: MMP- mare's milk powder, SMP- skimmed milk powder

Fermentation of all variants of the milk base was carried out at different temperature conditions: 38-39°C; 42-43°C. During the fermentation of the milk base, milk was pasteurized at 63°C in a water bath, homogenized to increase strength and improve the consistency of protein clots and prevent the formation of a fatty plug on the surface of the finished product, cooled to the fermentation temperature (38-39°C), then the starter was added, fermented, mixed and cooled clot formed. Stabilization of yogurt was carried out by adding the food additive PUL in the variants of adding 0.5; 1; 1.5% at 45°C, the mixture was vigorously agitated and allowed to swell for 30 minutes. PUL-BC probiotic microcapsules with *L. rhamnosus* GG in a ratio of 10:1.

Determination of organoleptic indicators of a fermented milk product

The organoleptic evaluation of the finished product was carried out by the closed-tasting method, which was developed following ST RK 1732-2007 [15]. The control was carried out according to the following indicators: smell, taste, consistency, appearance, and color.

Statistical analysis

All analyzes were performed in triplicate and results were presented as mean \pm standard deviation unless otherwise indicated. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test. Statistical analysis was performed using SPSS software (version 28.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA). Significance was defined as $p < 0.05$. Statistical calculations and plotting of graphs and diagrams were performed in a semi-automatic mode using Microsoft Office Excel.

Results and discussion

There are various methods of reconstitution of cow's milk powder, however, data on the reconstitution of MMP are not available. In the dairy industry, a method is widely used that involves dissolving milk powder at a temperature of 38-42°C, followed by instant cooling to 6-8 °C, with an exposure of at least 3-4 hours in order to maximize the swelling of proteins, eliminate watery taste, and also to achieve normal density and viscosity [16]. The disadvantage of this method is the large expenditure of time and energy for cooling.

At the consumer level, there is a method for obtaining milk, in which 8-9 tablespoons (125 g) of powdered milk are taken and stirred in a small amount of water with a temperature of 35-40°C, then water is gradually added, bringing to 1 liter, while continuous stirring and heating to boiling [17]. The disadvantage of this method is that when boiling milk loses the native properties of whey proteins, the content of vitamins decreases (for example, vitamin C losses reach up to 70%), which leads to a decrease in the nutritional value of the resulting milk.

To restore dry mare's and cow's milk, a method was chosen in which the dissolution of milk powder in water includes constant stirring with a magnetic stirrer, with gradual heating to a temperature of 65-75°C. After that, the milk is kept for 30-90 minutes, with cooling due to natural heat exchange with the environment or by forced cooling to a room temperature of 20-24°C. During this time, the protein fraction swells and milk acquires such properties as taste and smell closest to natural [18].

According to the manufacturer's instructions, MMP "Saumal" for use in as close as possible to whole mare's milk is recommended to dilute the powder, in the amount of 3 tablespoons (20-22 g) with 200 ml of warm water (36-40°C). However, when fermenting such milk, a rather liquid dairy product is formed. Therefore, a series of experiments was carried out to select the optimal mass of MMP for its further recovery and use as a milk base.

To do this, MMP was dissolved in 100 ml of water in the mass range of 5–30 g (in increments of 5 g), the mixture was gradually heated to a temperature of 65–75°C and cooled for 30–60 minutes at room temperature. Then YO-MIX-601 starter from Danisco was added in the amount of 1 g/100 ml and left to ferment for 6-8 hours (Table 2).

Table 2– Organoleptic characteristics of reconstituted mare's milk

| Variant | Mass of dry mare's milk g per 100 ml of water | Appearance and texture | Color | Smell | Taste |
|---------|---|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 5 | Homogeneous, liquid | White with a bluish tint | Unpleasant, peculiar to raw milk | Sweetish, with a taste of mare's milk |
| 2 | 10 | Heterogeneous, with sediment | Creamy white | Unpleasant, peculiar to raw milk | Sweetish, with a taste of mare's milk |
| 3 | 15 | Heterogeneous, with sediment | Creamy white | Peculiar to raw milk | Sour, with a taste of mare's milk |
| 4 | 20 | Heterogeneous, with single flakes | Cream | Sour milk | Sour, with a taste of mare's milk |
| 5 | 25 | Heterogeneous, with single flakes | Cream | Sour milk | Sour, with a taste of mare's milk |
| 6 | 30 | Heterogeneous, with single flakes | Cream | Sour milk | Sour, with a taste of mare's milk |

According to the results of the study, during the restoration and further fermentation of MMP, in most cases, samples of a liquid consistency are obtained. In 2 and 3 variants, a white precipitate is formed, phases are separated and whey is formed. With an increase in the mass of MMP up to 15 g, the consistency becomes heterogeneous with the presence of single flakes. Variants 4-6 turned out to be the most optimal in terms of organoleptic parameters. In this regard, option 4 was chosen for the restoration of MMP; this option is the most profitable from an economic point of view (20 g per 100 ml of water).

Since mowing MMP produces a rather liquid and heterogeneous dairy product with a specific taste and smell, it was decided to additionally add certain amounts of skimmed cow's milk powder. This procedure is carried out to increase the mass fraction of dry matter in the product, and improve the consistency, as well as the taste of the resulting product [19]. Moreover, this procedure allows you to optimize the fat content of the MMP.

The use of SMP in certain concentrations in the production of yogurt is provided for by regulatory documentation and is widely used in industrial conditions [20]. Therefore, a study was

made on the possibility of enriching reconstituted mare's milk with the chemical composition: mass fraction of protein - 34.0; fat - 1.5; dry matter - 95.0, and carbohydrates - 50%.

The results of the study of the degree of influence of the amount of SMP on the chemical composition and intensity of fermentation (time to reach an acidity of 30°T) of the milk base for yogurt are shown in Table 3. All experimental and control samples of the milk base were fermented (fermented) under standard conditions for traditional yogurt technology: temperature 42-43°C, direct introduction starter with standard microflora for yogurt YO-MIX-601.

Table 3- Influence of the amount of SMP on the chemical composition and indicators of the milk base

| Dose of applied SMP, % | Mass fraction, % | | | Density, kg/m ³ | Acidity, °T |
|------------------------|------------------|-----------|-----------|----------------------------|-------------|
| | dry matter | fat | squirrel | | |
| 3.5 | 14.11±1.23 | 2.13±0.15 | 2.9±0.18 | 1040.1±11.3 | 11±1.23 |
| 5.5 | 14.87±1.31 | 2.12±0.16 | 3.2±0.3 | 1045.2±10.5 | 19±0.2 |
| 7.5 | 16.25±1.77 | 2.11±0.2 | 4.15±0.39 | 1054.2±11.2 | 20±0.21 |
| 10 | 18.12±1.59 | 2±0.19 | 4.99±0.47 | 1066.9±11.3 | 31.29±0.2 |

Note: SMP- skimmed milk powder

Enrichment of reconstituted mare's milk with SMP can significantly increase the mass fractions of dry matter and protein. The maximum values of these parameters are observed when adding 10% SMP, however, this is accompanied by an increase in titratable acidity up to 30°T and above. Therefore, options with the addition of 5.5% and 7.5% SMP can be considered the most suitable, ensuring the enrichment of the mixture with the dry matter by 35.4 and 48.7%, respectively, and with protein by 89.7 and 122.0% with the acidity of the mixture not more than 20°T.

At the next stage, the selection of starter cultures with the best fermenting activity was carried out. Types of starter cultures used for fermentation:

1) YO-MIX 601 10 DCU, DANISCO (*Streptococcus thermophilus* u *Lactobacillus delbrueckii nodbus bulgaricus*)

2) YOGURT IMMUNITY, YOLACTIS (Sucrose; *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus (delbrueckii ssp. bulgaricus, acidophilus, casei, rhamnosus, paracasei, plantarum)*; *Bifidobacterium (lactis, longum)*)

3) Sourdough YOGURT, VIVO (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*)

All of the above starter cultures are directly introduced, and the optimum fermentation temperature is 38-42°C. These starter cultures are publicly available and widely known. They contain probiotic strains of lactic acid bacteria that ferment carbohydrates with the formation of lactic acid. Due to this, they are widely used in the food industry in the preparation of various dairy products, including fermented baked milk, yogurts, and others. *Streptococcus thermophilus* absorbs and processes lactose (milk sugar) and is therefore used for lactase deficiency, has an acidifying effect, providing a bactericidal effect against pathogenic microorganisms, and is also able to synthesize and release polysaccharides. *Lactobacillus delbrueckii* has a set of proteases, for example, a specific peptidase *Lactobacillus delbrueckii* - prolidase hydrolyzes proteins with a high content of proline and has unique ways of regulation of biosynthesis [21; 22]. All three starter cultures include these probiotics, in addition, the choice of these starter cultures is justified by their low cost.

Figure 1 shows data on the fermentation of a combined milk base using three types of starter cultures.

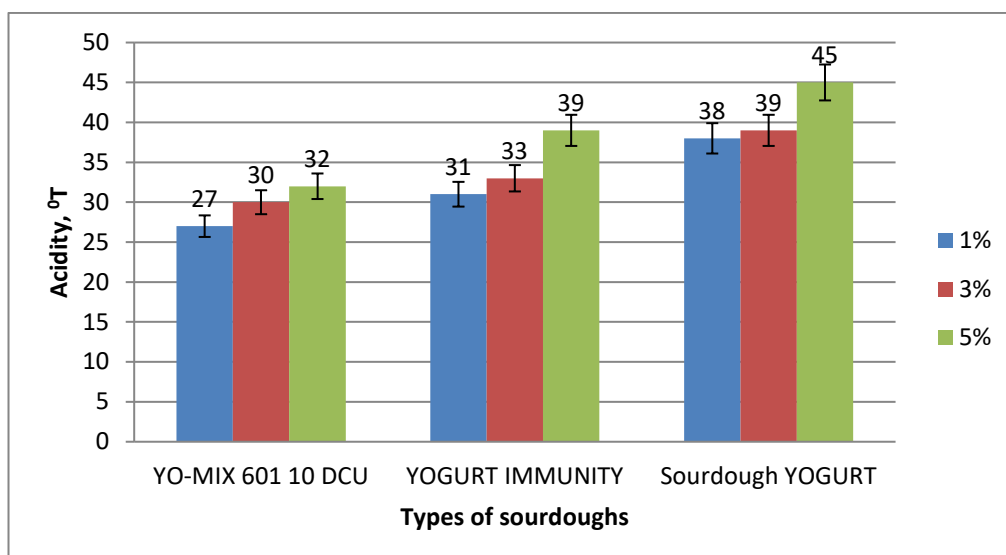


Figure 1- Influence of various starter cultures and their concentrations on the acidity raising when fermenting milk for 6 hours.

As can be seen from the data presented in Figure 1, when the starter is introduced in an amount of 3% or more, the acidity of the product increases. The maximum acidity was established when fermenting with YOGURT starter, VIVO company, and adding 5% starter material. When using a YOGURT IMMUNITY starter, a slower increase in titratable acidity is observed, the fermented milk does not form the desired consistency, and the resulting product is characterized by a sour taste.

Thus, in the process of developing the technology for preparing yogurt, 3 types of starter cultures were tested. Yogurt starter cultures included different combinations of probiotic microorganisms. The most optimal introduction of YO-MIX 601 10 DCU starter culture containing *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruckii* at a concentration of 1%. The use of this combination of strains makes it possible to obtain a yogurt with a sufficiently thick consistency, a dense clot, and a persistent aroma, as well as a homogeneous, uniform structure and a mild taste.

When developing a technology for obtaining yogurt from MMP, it was necessary to take into account the fact that in addition to the increased biological and nutritional value due to the unique qualities of raw materials, it should have a consistency familiar to the consumer. The fact is that a significant drawback that worsens the quality of the finished product from MMP is a liquid, heterogeneous, flaky consistency with whey sludge during storage. Modern requirements for increasing the shelf life of the product put forward the problem of preserving the presentation during long-term storage [23].

One of the possible ways to achieve a stable homogeneous, non-separating, viscous consistency of fermented milk drinks, along with the enrichment of the protein composition of the feedstock, the selection of starter cultures with thickening properties, is the use of stabilizing food additives based on natural components [24].

Determination of the features of the use of stabilizing additives, their influence on the formation of the consistency of yogurt from MMP, the selection of the dose of application, the refinement of the parameters of the technological process are the urgent tasks of the next stage of the study.

PUL was chosen as a consistency stabilizer for reconstituted mare's milk yogurt. Externally, PUL is a tasteless white powder, which is highly soluble in water. PUL is widely used in the food industry, including as a binder and stabilizer [25]. Recently, PUL has been found to have a stimulating effect on probiotics [26]. It was hypothesized that PUL, due to these properties, can give yogurt a smooth appearance and improve its viscosity.

For pre-activation, the stabilizer was added to 1/5 of the milk base at a temperature of 45°C, and the mixture was subjected to vigorous stirring and left to swell for 30 minutes. Then the resulting mixture was added to the main mass of normalized reconstituted mare's milk enriched with 7.5% SMP, fermented with direct ferment YO-MIX 601 10 DCU, mixed for 15 minutes and left for fermentation. Options for adding a stabilizer 0.5 were tested; 1; 1.5%.

Upon completion of fermentation, the product was cooled to 25°C, mixed and poured into polystyrene cups covered with metalized foil, and sent for cooling and storage in a refrigerator to a temperature of $4 \pm 2^\circ\text{C}$ in the product. The optimal concentration of the stabilizer was 1% by weight of the raw material. The resulting yogurt had organoleptic characteristics satisfying the consumer: a sour-milk smell, with a taste of mare's milk; homogeneous, moderately viscous consistency with a creamy tint.

Fermented milk products with probiotics account for 60 to 70% of the total functional food market. For this reason, their production can be identified as an independent branch of food biotechnology [10]. However, numerous studies show that a significant part of probiotic cells lose their activity due to damage and death of microorganisms during the production of direct starter cultures, in the food matrix, during storage of products, and also during the passage through the gastrointestinal tract [8]. Microencapsulation of microbial cells protects from unfavorable conditions, which was shown not only in SMP works [27-29], but also experimentally established in the course of the study. Since the purpose of this work was to create a technology for obtaining products from MMP enriched with microencapsulated probiotic microorganisms, then to obtain probiotic yogurt, P-BC microcapsules were used, obtained by extrusion according to the technology layer-by-layer containing strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. This strain, according to the totality of the studied properties: the activity of acid formation, the spectrum and level of antagonistic activity, and resistance to stress factors was chosen for inclusion in microcapsules [30]. PUL-BC probiotic microcapsules were added to the finished yogurt in a ratio of 1:10. The resulting product was named "Microlact"

Conclusion

Products made from mare's milk with microcapsules retain the high viability of probiotic microorganisms during the production process and provide increased therapeutic and prophylactic efficacy, which contributes to the improvement of the population.

As a result of the research work, the optimal composition of the milk mixture for the production of yogurt based on dried reconstituted mare's milk with an increased mass fraction of solids was selected. Enrichment of reconstituted mare's milk with 7.5% SMP made it possible to obtain a milk base with a mass fraction of solids: 15.7%, proteins - 3.9%, and fat - 2.8% at an acidity of 20°T. The optimal mode of fermentation of the milk base was determined - 38-39°C for 6 hours. Fermentation at a given temperature regime and the introduction of a stabilizer PUL at a concentration of 1% leads to the formation of a uniform clot, and the resulting product has satisfactory organoleptic characteristics. The results of experimental studies were used in the development of technology for a new yoghurt "Microlact" with microencapsulated probiotics.

Funding

The work was carried out within the framework of the AP09259491 project "Biotechnology of using a polysaccharide matrix with probiotic biofilms to create combined dairy products

References:

- 1 Bogue J., Collins O., Troy A. J. Market analysis and concept development of functional foods In: *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, 2017: 29-45 (doi:10.1016/B978-0-12-802780-6.00002-X).
- 2 Pieszka M., Luszczynski J., Szeptalin A. Comparison of mare's milk composition of different breeds: *Nauka Przyroda Technologie*, 2011, 6 (5): 1-5.

- 3 Markiewicz-Kęszycka M. Chemical composition and whey protein fraction of late lactation mares' milk: *Int. Dairy J.*, 2013, 2: 62-64 (doi:10.1016/j.idairyj.2013.02.006)
- 4 Orlandi M., Goracci J., Curadi M. C. Essential fatty acids (EFA) in Haflinger and Thoroughbred mare's milk: *Annali della Facoltà di Medicina veterinaria*, 2007, 55: 319-325
- 5 Kanareykina S.G., Chernyshenko Yu.N., Kanarejkin V.I., Researching of fatty acids and amino acid structure of yogurts with use of mare's milk: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 315 (7): 1-6 (doi:10.1088/1755-1315/315/7/072036)
- 6 Kanarejkin V.I., Kanareykina S.G. Kislomolochnyj produkt iz kobyly'ego moloka funkcional'noj napravlenosti. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2016, 57 (1): 189–192.
- 7 Popova N. V. Innovacii v tekhnologii vosstanovleniya suhogo moloka kak faktor upravleniya kachestvom vosstanovlennykh produktov pererabotki moloka In: *Vestnik YUURGU. Seriya «Ekonomika i menedzhment»*, 2013, 7(4): 181-186.
- 8 Mortazavian A. M., Mohammadi R., Sohrabvandi S. Delivery of probiotic microorganisms into gastrointestinal tract by food products In: *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*, 2012, 61: 121-146 (doi:10.5772/47946)
- 9 Abdulzhanova M. A., Savitskaya I. S., Kistaubayeva A. S., Shokatayeva D. H., Pogrebnyak A., Ignatova L. V. Delivery of probiotic to microbiome by layer-by-layer encapsulation In: *Springer Proceedings in Physic. A.D. Pogrebnyak, M. Pogorielov, Viter, R. Eds.; Springer: Singapore*, 2019: 9–18 (doi: 10.1109/NAP47236.2019.216929)
- 10 Khani S., Hosseini H. M., Taheri M., Nourani M. R., Imani Fooladi A. A. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review In : *Inflamm. Allergy Drugs Targets*, 2012, 11: 79-89.
- 11 GOST 54668-2011. Moloko i produkty pererabotki moloka. Metody opredeleniya massovoj doli vlagi i suhogo veshchestva. – M.: Standartinform, 2013: 25
- 12 GOST 25179-90. Moloko. Metody opredeleniya belka. – M.: Standartinform, 2009:15
- 13 GOST 5867-90. Moloko i molochnye produkty. Metody opredeleniya zhira. – M.: Standartinform, 2011: 33
- 14 GOST 3625-84. Moloko i molochnye produkty. Metody opredeleniya plotnosti. – M.: Standartinform, 2009:21
- 15 ST RK 1732-2007. Moloko i molochnye produkty. Organolepticheskij metod opredeleniya pokazatelej kachestva.
- 16 Lepilkina O. V., Shutov V. E., Chubenko A. V. etc. *Sposob proizvodstva myagkogo syrnoogo produkta*. Patent 2403792 (RF) MPK A23C19/076. RU2009126128/10A. Zayavl. 07.07.2009. Opubl. 20.12.2010.
- 17 GOST R 54074-2010. Moloko suhoe obezhhirenoe. - M.: Standartinform, 2012:33
- 18 Trubeckov D. V. Sposob vosstanovleniya suhogo moloka. Patent 2452186 (RF) MPK A23C9/00. RU2011108235/10. Zayavl. 04.03.2011. Opubl. 10.06.2012:5
- 19 Tamim A.I. *Jogurty i drugie kislomolochnye produkty*. SPb: Professiya, 2003: 664.
- 20 Ahatova I. A. Molochnoe konevodstvo: plemennaya rabota, tekhnologii proizvodstva i pererabotki kobyly'ego moloka. Ufa: Tilem, 2007: 324.
- 21 Heller K. J., Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics reid and starter organisms: *Am. J. of Clin. Nutrition*, 2001, 73 (2): 374-379 (doi: 10.1093/ajcn/73.2.374s)
- 22 Shakerian M., Razavi S. H., Ziai S. A., Khodaiyan F., Yarmand M. S., Moayedi A. Proteolytic and ACE-inhibitory activities of probiotic yogurt containing non-viable bacteria as affected by different levels of fat, inulin and starter culture: *J. Food Sci. Techno*, 2015, 52: 2428–2433 (doi:10.1007/s13197-013-1202-9)
- 23 Betoret E., Betoret N., Vidal D., Fito P. Functional foods development: trends and technologies: *Trends Food Sci Technol*, 2011, 22: 498-508 (doi:10.1016/j.tifs.2011.05.004)
- 24 Munro P. A. Novye tekhnologii sozdaniya molochnyh produktov budushhego In: *Molochnaja promyshlennost'*, 2013, 3: 39-40.
- 25 Oguzhan P., Yangilar F. Pullulan: production and usage in food industry: *Afr. J. Food Sci. Technol*, 2013, 3(4): 57-63.
- 26 Nithya Bala Sundaria S., Niveditab V., Chakravarthyb M., Srisowmeyab G., Usha Antonyc, Nandhini Devb G. Characterization of microbial polysaccharides and prebiotic enrichment of wheat bread with pullulan: *LWT - Food Sci. Technol*, 2020, 122: 1-7 (doi:10.1016/j.lwt.2019.109002)

27 Carvalho A.S. Microcapsulation as a method of new technologies: *J. food sci*, 2013, 68: 2538-2541.

28 Rashidinejad, A.; Bahrami, A.; Rehman, A.; Rezaei, A.; Babazadeh, A.; Singh, H.; Jafari, S.M. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020, 62: 2470–2494 (doi:10.1080/10408398.2020.1854169).

29 Rodrigues F., Cedran M., Bicas J., Sato H. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications—A narrative review: *Food Res. Int*, 2020, 137: 109682 (doi: 10.1016/j.foodres.2020.109682)

30 Kistaubayeva A., Abdulzhanova M., Zhantlessova S., Savitskaya I., Karpenyuk T., Goncharova A., Sinyavskiy Y. The Effect of Encapsulating a Prebiotic-Based Biopolymer Delivery System for Enhanced Probiotic Survival In: *Polymers*, 2023, 15(7): 1752 (doi:10.3390/polym15071752)

МРНТИ: 34.27.17

И.Э. СМИРНОВА^{1*}, А.К. САДАНОВ¹, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

² Институт микробиологии НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

*e-mail: iesmirnova@mail.ru

ШТАММ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОУДОБРЕНИЯ ДЛЯ КУЛЬТУРЫ СОИ (*GLYCINE MAX* (L.) Merr.)

doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.07

Аннотация

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является ведущей культурой среди бобовых и ее востребованность в мире ежегодно растет. Для Казахстана соя является стратегической культурой, так как позволяет снизить дефицит белка в питании людей и животных. Однако урожайность сои в Республике по сравнению с другими странами низкая. Из-за низкой урожайности ее производство становится нерентабельным. Для повышения продуктивности сои применяют минеральные азотные удобрения, что создает опасность для окружающей среды. Решением проблемы повышения урожайности сои является применение биоудобрений на основе клубеньковых бактерий, которые фиксируют азот атмосферы и снабжают им растения. Целью данного исследования было выделение нового штамма клубеньковых бактерий с высокой азотфиксирующей активностью, способного увеличивать всхожесть семян, эффективно образовывать клубеньки на корнях сои, стимулировать рост и повышать урожайность сои. Из клубеньков на корнях растений сои, собранных на полях Алматинской области Казахстана, выделен высокоэффективный штамм бактерий *Bradyrhizobium japonicum* Н7, способный образовывать большое количество клубеньков, активно фиксировать молекулярный азот атмосферы, улучшать азотное питание растений и повышать урожайность сои. В полевых условиях установлено, что инокуляция штаммом Н7 увеличивает всхожесть семян сои до 90%, повышает густоту посевов на 26–30%, высоту растений - на 25%, а урожайность - на 9-11 ц/га. Таким образом, штамм клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* Н7 можно использовать для создания бактериального удобрения для культуры сои.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, соя, инокуляция, азотфиксация, урожайность.

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является ведущей культурой среди бобовых, она возделывается более чем в 60 странах и ее востребованность в мире ежегодно растет. Производство сои занимает четвертое место после пшеницы, риса и кукурузы и рассматривается в качестве дешевого решения проблемы белкового дефицита [1]. Кроме того, высокое содержание в зерне сои белка, масла и витаминов группы В определяют её широкое применение [5]. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации при ООН (FAO) в 2018 году производство сои во всем мире составило 334,89 млн т, по прогнозам к 2050 году оно увеличится вдвое [2]. Лидерами производства сои являются Бразилия, США и Аргентина, на которые приходится 81% мирового производства [3,4].

Для Казахстана соя является стратегической культурой, её использование позволяет снизить дефицит белка в питании людей и животных [6]. В настоящее время площади выращивания сои в Казахстане увеличиваются, однако урожайность по сравнению с другими странами низкая. Так, если средняя урожайность сои в Бразилии и США составляет 3,3 т/га, в Канаде - 2,6 т/га, то в Казахстане в среднем она не превышает 1,1–1,2 т/га. При этом зерно сои характеризуется низкими показателями качества [7]. Из-за низкой урожайности ее производство в Казахстане становится нерентабельным. Для получения высокой урожайности соя нуждается в основных элементах питания, таких как азот, фосфор и калий, поэтому при производстве сои применяют минеральные химические удобрения.

Однако в настоящее время земледелие стремится к применению зеленых технологий, поэтому улучшение азотного и фосфорного питания растений без применения химических удобрений является одной из основных задач органического земледелия [8]. Исходя из этого, поиск путей повышения продуктивности сои является весьма актуальным.

Решением проблемы повышения урожайности сои является применение биоудобрений на основе клубеньковых бактерий, способных фиксировать азот атмосферы и снабжать им растения. Инокуляция сои клубеньковыми бактериями даёт возможность сократить применение минеральных азотных удобрений и существенно повысить её урожайность [9,10]. Следует отметить, что в почвах Казахстана аборигенных клубеньковых бактерий для культуры сои нет, поскольку дикая соя в естественных фитоценозах не встречается. Поэтому при выращивании сои в юго-восточном Казахстане - основном регионе производства сои, в почвах которого отсутствуют спонтанные популяции ризобий, применение инокуляции семян сои клубеньковыми бактериями, является обязательным [11].

В мире производится огромное количество биопрепаратов на основе клубеньковых бактерий для сои [12]. Основными производителями биопрепаратов являются США - 20 млн га/порций ежегодно, Бразилия - 4-6 млн га/порций, Индия - 2-4 млн га/порций [13]. Только в России производится более 20 наименований препаратов на основе клубеньковых бактерий («Нитрагин», «Ризобактерин», «Ризоторфин» и др.) [14,15]. В Казахстане используют биопрепараты под культуру сои, но в основном, импортного происхождения («Нитрогин», «Ризоторфин», Россия; «HiStick Soy», Германия; «Nitrazon», Чехия), отечественных препаратов крайне мало (Ризовит АКС) [16-18].

Однако при использовании импортных биоудобрений существуют определенные проблемы, основными из которых являются неспособность штаммов биоудобрений преодолевать конкуренцию с коренными популяциями бактерий ризосферы, их несовместимость с местными сортами сои и неприспособленность бактерий к почвенным и климатическим условиям Казахстана [20,21]. Задачей данного исследования было выделение нового штамма клубеньковых бактерий с высокой азотфиксирующей активностью, способного увеличивать всхожесть семян, эффективно образовывать клубеньки на корнях сои, стимулировать рост и повышать урожайность сои.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования является штамм клубеньковых бактерий, выделенный из клубеньков на корнях растений сои (*Glycine max* (L.) Merr.) сорта «Эврика», собранных в Алматинской области Казахстана, с последующей селекцией активного варианта на жидкой и твердой питательной среде Мазе. Для выделения клубеньковых бактерий были отобраны здоровые и крупные растения сои с хорошо развитой корневой системой и большим числом клубеньков на корнях. Корни растений были тщательно промыты под проточной водой. От корней отделяли крупные, розовые клубеньки и переносили в чашки Петри, где их разрезали скальпелем на части. Для выделения ризобий использовали питательную среду Мазе следующего состава, г/л: K_2HPO_4 - 1,0; $MgSO_4$ - 0,3; сахароза - 10,0; отвар из 100 г гороха, водопроводная вода - 1000 мл. Для культивирования штамма использовали питательную среду Исварана. Состав среды Исварана (г/л): сахароза - 4,0; K_2HPO_4 - 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; глюконат кальция - 1,5; $FeCl_3$ - 0,01; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,005; дрожжевой экстракт - 2,0; pH 6,8–7,0. вода водопроводная - 1000 мл.

Для изучения способности бактерий к образованию клубеньков (нодуляция) бактерии выращивали на жидкой среде Исварана при 180 об/мин, 28°C в течение 5 суток. Перед посевом семена инокулировали суспензией бактерий с титром клеток 1×10^8 кл/мл в течение двух часов при температуре 23°C и высевали в вегетационные сосуды объемом 500 мл (три семя на сосуд). В качестве субстрата для роста растений использовали вермикулит, для питания проростков применяли раствор Кнопа (г/л): $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 1,00, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -

0,25, KH_2PO_4 - 0,25, KCl - 0,12, $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ - 0,004 г, стерильной воды - 1000 мл [22]. Контролем служили семена сои без инокуляции.

Нитрогеназную активность бактерий определяли ацетиленовым методом [23]. Для этого исследуемые бактерии выращивали на среде Исварана в условиях аэрации до концентрации 1×10^8 кл./мл. Ацетилен вводили в сосуды с культурами до концентрации 10% (по объему). После инкубации культур в течение 1,5 ч в атмосфере ацетилена пробы газа отбирали шприцем по 1,0 мл из сосуда и определяли наличие этилена на газовом хроматографе “Agilent Technology 7890 B” (США) с пламенно-ионизационным детектором [24].

Культурально-морфологические и биохимические свойства бактерий изучали по стандартным методикам [25].

Бактерии идентифицировали молекулярно-генетическим методом Сенгера путем секвенирования гена 16S рРНК. Геномную ДНК выделяли из суточной культуры бактерий с помощью наборов PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, США). Бактерии идентифицировали путем изучения последовательности участка гена 16S рРНК с универсальными праймерами [26,27].

Для постановки опытов по влиянию бактерий на развитие растений сои бактерии выращивали на среде Исварана при 28°C 180 об/мин до концентрации 1×10^8 кл./мл. Семена сои «Эврика» перед посевом обрабатывали суспензией бактерий ($T=1 \times 10^8$ кл./мл), в количестве 5,0 мл на 1,0 г семян в течение 2 ч при комнатной температуре. В контроле семена замачивали в водопроводной воде. Обработанные семена раскладывали на чашки Петри с агаризованной средой Ковровцева следующего состава (г/л): $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0, K_2HPO_4 - 1,0, $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$ - 0,2, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - следы, агар - 6,0, вода водопроводная - 1000 мл. Через 20 суток проводили подсчет и взвешивание проростков растений, измерение надземной части, корней и листьев.

Полевой опыт по влиянию клубеньковых бактерий на развитие и урожайность сои был проведен в крестьянском хозяйстве «Жанико» Илийского района Алматинской области. Клубеньковые бактерии выращивали на среде Исварана при 28°C , 180 об/мин в течение 5 дней. Перед посевом семена сои инокулировали суспензией бактерий в концентрации 1×10^8 кл./мл, из расчета 800 мл суспензии на 100 кг семян. В опытах использовали сорта сои «Жансая» и «Эврика». Инокулированные семена высевали сеялкой СК-2 (предшественник - пшеница) в ряды шириной 70 см, посев двухстрочный с 15 см между строками. Норма высева семян составляла 120–125 кг/га, глубина посева 6–9 см. Контролем служили необработанные семена. В течение всего вегетационного периода осуществляли необходимые агрономические мероприятия (полив, прополка и др.).

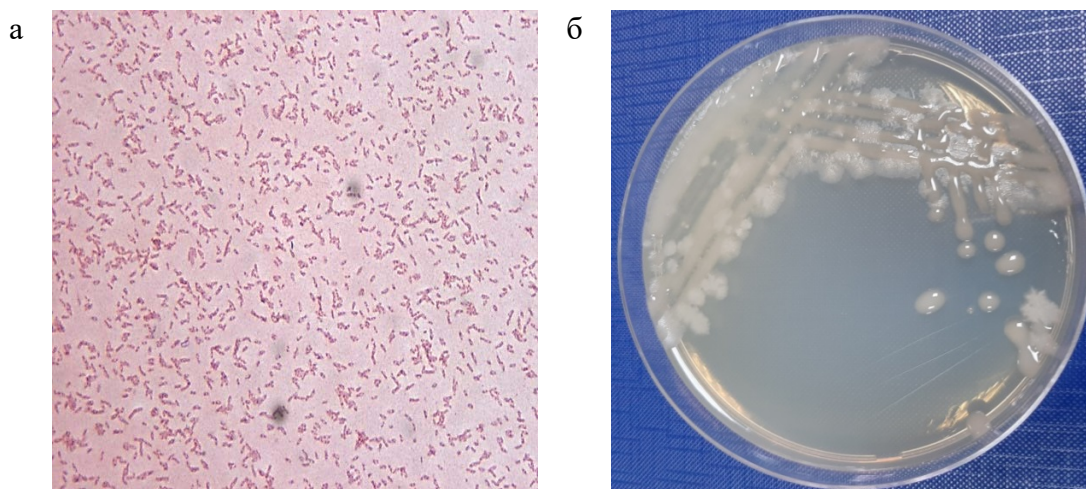
Все эксперименты проводились в 3–5-ти кратной повторности. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [28].

Результаты и обсуждение

Для выделения клубеньковых бактерий были отобраны растения сои сорта «Эврика» с хорошо развитой корневой системой и большим числом клубеньков на корнях. Из клубеньков провели выделение бактерий на среде Мазе. В общей сложности было выделено 24 изолята. В лабораторных условиях проведен их скрининг по способности к активному росту изолятов на безазотистых средах и отобран изолят Н7 как наиболее эффективный.

Изучены основные культурально-морфологические и биохимические свойства изолята Н7. Установлено, что клетки бактерий имеют форму палочек с закругленными концами, подвижные. Размер клеток 0,5–0,7 \times 4,5–5,0 мкм, спор не образуют, бактерии грамотрицательные, с течением времени клетки принимают округлую форму (рисунок 1а). На плотной питательной среде Мазе образует слизистые, выпуклые, круглые, полупрозрачные колонии с ровными краями, чуть кремовые, диаметром 3–4 мм, пигмент в среду не выделяется (рисунок 1б). Штамм не растет на МПА, МПБ, желатине и других

средах, содержащих животные белки, слабо растет на жидкой и агаризованной среде Эшби. Штамм Н7 является аэробным и требовательным к кислороду. Оптимальная температура роста штамма 28-30°C, оптимальное значение рН среды - 6,8-7,2.



а - клетки двухсуточной культуры (1×300); б - рост бактерий на среде Мазе

Рисунок 1 - Клубеньковые бактерии Н7

В качестве источника углерода штамм Н7 использует арабинозу, ксилозу, глюкозу, галактозу и фруктозу с образованием кислоты, не утилизирует маннит, сахарозу и лактозу. Желатину не разжижает, крахмал не гидролизует, молоко не пептонизирует, H_2S и индол не образует, нитраты восстанавливает до нитритов. Дает положительную реакцию на каталазу.

Для изучения влияния изолята Н7 на всхожесть, рост и развитие растений сои были проведены исследования. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Влияния изолята Н7 на всхожесть, рост и развитие растений сои

| Варианты опыта | Всхожесть, % | Длина стебля, см | Длина корня, см | Кол-во листьев, шт. |
|------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| Контроль | 51,6±1,0 | 10,3±0,1 | 7,0±0,1 | 1,2±0,03 |
| Изолят Н7 | 98,7±2,1 | 22,3±0,2 | 12,7±0,1 | 4,4±0,1 |
| Примечание: $p < 0,05$ | | | | |

Результаты, приведенные в таблице 1, показывают, что инокуляция изолятом Н7 существенно повышает всхожесть семян сои. Так, если в контроле этот показатель составлял 51,6%, то в варианте с инокуляцией всхожесть составляла 98,7%. Также установлено, что инокуляция стимулирует рост и развитие растений сои. При этом, длина стебля увеличилась в 2,2 раза, корней - в 1,8 раза, а число листьев - в 3,7 раза по сравнению с контролем (таблица 1).

Одним из важных свойств клубеньковых бактерий является их способность образовывать клубеньки на корнях сои и фиксировать азот атмосферы. В этой связи изучили способность штамма к нодуляции и его азотфиксирующую активность. В опытах использовали сою сортов «Эврика» и «Жансая». Перед посевом семена обрабатывали суспензией бактерий Н7, контролем служили семена, замоченные в стерильной водопроводной воде. После 30 дней выращивания растения вынимали, корни отмывали, взвешивали, подсчитывали количество клубеньков на растениях. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Образование клубеньков и азотфиксирующая способность изолята Н7

| Варианты опыта | Кол-во клубеньков на растение, шт. | Сухой вес клубеньков, мг/растение | Нитрогеназная активность, $\mu\text{моль } \text{C}_2\text{H}_4/\text{мл/ч}$ |
|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|
| сорт «Жансая» | | | |
| Контроль | 0 | 0 | - |
| Изолят Н7 | 18,4±0,1 | 158,5±2,2 | 7,79±0,02 |
| сорт «Эврика» | | | |
| Контроль | 0 | 0 | - |
| Изолят Н7 | 19,3±0,1 | 164,8±2,3 | 8,42±0,01 |
| Примечание: $p < 0,05$ | | | |

Их данных таблицы 2 следует, что изолят Н7 способен образовывать большое количество клубеньков на корнях растений сои, в среднем 18–19 штук на одно растение. Известно, что бобовые культуры очень требовательны к азотному питанию. Клубеньковые бактерии способны фиксировать молекулярный азот атмосферы и преобразовывать его в соединения доступные растениям. Установлено, что изолят Н7 обладает высокой азотфиксирующей активностью (8,0–8,4 $\mu\text{моль } \text{C}_2\text{H}_4/\text{мл/ч}$), что является важной характеристикой бактерий для применения в сельском хозяйстве, так как дополнительный биоазот оказывает существенное влияние на рост и урожайность сои, поскольку улучшает азотное питание растений.

Проведена идентификация изолята Н7 молекулярно-генетическим методом Сенгера и установлено его таксономическое положение. Для видовой идентификации бактерий был проведен филогенетический анализ путем сравнения нуклеотидной последовательности штаммов (603 bp) с последовательностями 16S rRNA штаммов родственных бактерий из базы данных GenBank NCBI. В программе МЕГА 6.0 построено филогенетическое дерево с использованием Neighbor-Joining кластерного метода расчета генетических расстояний (рисунок 2).

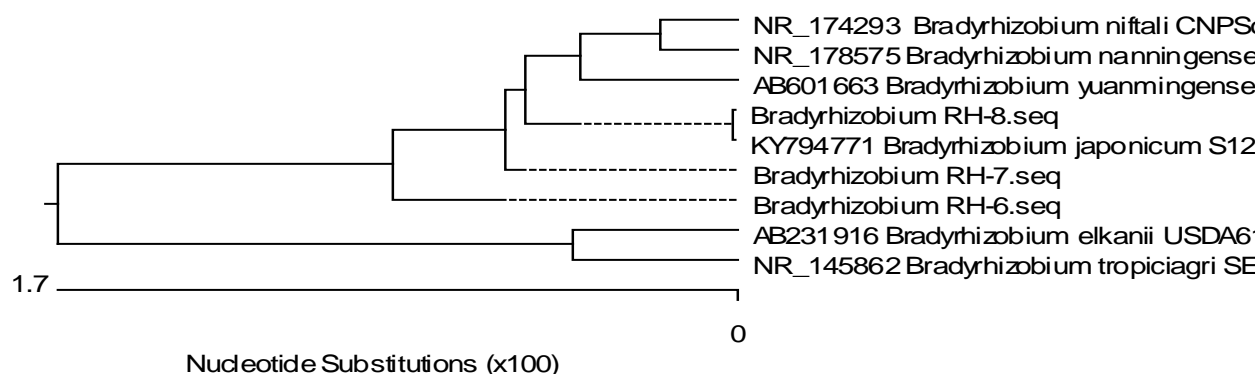
Рисунок 2 - Филогенетическое дерево клубеньковых бактерий штамм Н7 (*Bradyrhizobium* RH-7. seq)

Рисунок 2 показывает, что в филогенетическом отношении изолят Н7 (указан как *Bradyrhizobium* RH-7. seq) наиболее близок к штаммам рода *Bradyrhizobium* и находится на одной ветви с референсным штаммом из базы данных GenBank NCBI KY794771 *Bradyrhizobium japonicum* S12. Процент идентичности с этим штаммом составил 99,98%.

Тестирование штамма в полевых условиях показало его высокую эффективность. В опытах использовали два сорта сои «Жансая» и «Эврика» (таблица 3).

Таблица 3 - Влияние штамма *Bradyrhizobium japonicum* Н7 на агробиологические показатели и урожайность сои в полевых условиях

| Варианты опыта | Всхожесть, % | Густота всходов, шт./м ² | Высота растений, см | Урожайность, ц/га |
|-------------------------------------|-----------------|--|------------------------|----------------------|
| сорт «Жансая» | | | | |
| Контроль | 54,1±2,7 | 48,3±1,5 | 73,2±2,7 | 24,0±1,2 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> Н-7 | 89,6±2,7 | 63,4±2,3 | 92,0±1,8 | 33,1±1,4 |
| сорт «Эврика» | | | | |
| Контроль | 53,2±2,7 | 51,1±1,5 | 72,2±2,7 | 23,8±1,3 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> Н-7 | 90,7±2,7 | 64,5±2,3 | 90,0±2,8 | 35,2±1,5 |
| Примечание: $p < 0,05$ | | | | |

Из данных таблицы 3 следует, что инокуляция семян штаммом *Bradyrhizobium japonicum* Н7 повышает всхожесть, густоту посевов и увеличивает урожайность сои. Так, всхожесть семян в вариантах с инокуляцией повышалась до 90%, в контроле (без инокуляции) всхожесть составляла только 53–54%, густота посевов увеличилась на 26-30%, высота растений - на 25% по сравнению с контролем без инокуляции. При этом, урожайность сои повысилась до 33-35 ц/га, в контроле этот показатель составлял только 24 ц/га.

Таким образом, из клубеньков растений сои, собранных на полях Алматинской области Казахстана, выделен штамм бактерий *Bradyrhizobium japonicum* Н7, способный образовывать большое количество клубеньков на корнях растений, активно фиксировать молекулярный азот атмосферы, улучшать азотное питание растений и повышать урожайность сои. В полевых опытах установлено, что инокуляция штаммом *Bradyrhizobium japonicum* Н7 повышает всхожесть семян сои до 90%, густоту посевов - на 26-30%, высоту растений - на 25%, а урожайность культуры - на 9-11 ц/га. Штамм *Bradyrhizobium japonicum* Н7 является не токсичным и не патогенным, его использование экологически безопасно и соответствует требованиям охраны окружающей среды. Применение штамма не приводит к загрязнению почвы и нарушению биологического равновесия. Штамм является активным азотфиксатором, который способствует обогащению почвы биологическим азотом, тем самым повышает ее плодородие. Использование штамма Н7 в качестве бактериального удобрения дает возможность снизить или полностью избежать применения минеральных химических азотных удобрений, отрицательно влияющих на экологическое состояние почв и нарушающих систему: почва-растение-потребитель и ухудшающих качество продуктов питания.

Таким образом, применение штамма *Bradyrhizobium japonicum* Н7 для инокуляции семян сои повышает всхожесть семян, стимулирует рост и развитие растений сои и повышает ее урожайность. Штамм клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* Н7 можно использовать для создания бактериального удобрения для культуры сои.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового проекта АР09259080.

Литература:

1 Mudriyan E. *SOYA-2019/20: at the junction of a record supply and a trade war*. (<https://www.apk-inform.com/ru/exclusive/topic/1504880>)

2 FAO 2020. *World Food and Agriculture - Statistical Yearbook*. (<https://doi.org/10.4060/cb1329en>)

- 3 Lysenko Y. *TOP-10 soybean producers in the world in 2019*. (<https://latifundist.com/rating/top-10-proizvoditelej-soi-v-mire-v-2019-godu>)
- 4 Abbott Ch. *Brazil and Argentina grow half of World's soybeans*. (<https://www.agriculture.com/news/business/brazil-and-argentina-grow-half-of-world-s-soybeans>)
- 5 Wijewardana C, Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. *Food Chemistry*, 2019, 278: 92-100 (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.035>).
- 6 Akimbekova G.U., Nikitina G.A. Priority directions of development of the Agro-industrial complex of Kazakhstan. *Problems of the agricultural market*, 2020, 4: 13-23 (<https://doi.org/10.46666/2020-4-2708-9991.0>).
- 7 Global Market Analysis, FAS, USDA. World Agricultural Production 2021. (<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production>)
- 8 Roos E., Mie A., Wivstad M. Risks and opportunities of increasing yields in organic farming. *Agronomy for Sustainable Development*, 2018, 38: 14-21 (<https://doi.org/10.1007/s13593-018-0489-3>).
- 9 Mathenge C., Thuita M., Masso C., Gweyi-Onyango J., Vanlauwe B. Variability of soybean response to rhizobia inoculant, vermicompost, and a legume-specific fertilizer blend in Siaya County of Kenya. *Soil and Tillage Research*, 2019, 194: 104290 (<https://doi.org/10.1016/j.still.2019.06.007>).
- 10 Han Q., Ma Q., Chen Y. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. *Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 2020, 14: 915-1928 (<https://doi.org/10.1038/s41396-020-0648-9>).
- 11 Garcia M.V.C., Nogueira M.A., Hungria M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. *AMB Express*, 2021, 11: 71-78 (<https://doi.org/10.1186/s13568-021-01230-8>).
- 12 Nguyen H.P., Miwa H., Obirih-Opereh J., Suzaki T. Novel rhizobia exhibit superior nodulation and biological nitrogen fixation even under high nitrate concentrations. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96, 2: 184 (<https://doi.org/10.1093/femsec/fiz184>).
- 13 *Микробиологические и бактериальные удобрения*. <https://universityagro.ru/>. (20.03.2023).
- 14 Никитин А. *Бактериальные удобрения для бобовых*. (<https://www.agroxxi.ru/zhurnal-agromir-xxi/stati-rasteniievodstvo/bakterialnye-udobrenija-dlja-bobovyh.html>)
- 15 *Микробиологические препараты ЭКОС*. (<https://ekosspb.ru/catalog>)
- 16 *Агротехника выращивания сои*. (<http://abkaz.kz/agrotexnika-vyrashhivaniya-soi/>)
- 17 *Бобовые культуры. Рекомендации по применению препаратов BASF для защиты бобовых культур в Казахстане 2020*. (<https://www.agro.basf.kz/Documents/Brochures-2020/2020.pdf>)
- 18 Смирнова И.Э., Саданов А.К. Бактерии для повышения урожайности сои. *Актуальная биотехнология*, 2021, 1(35): 61-65.
- 19 Береговая Ю.В., Тычинская И.Л., Петрова С.Н., Парахин Н.В. Сортовая специфичность эффектов ризобактерий в отношении азотфиксирующего симбиоза и минерального питания сои в условиях агроценоза. *Сельскохозяйственная биология*, 2018, 53(5): 977-993.
- 20 Pannecoucq J., Goormachtigh S., Ceusters J., Debode J. Temperature as a key factor for successful inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. under cool growing conditions in Belgium. *Journal of Agricultural Science*, 2018, 156: 493-503 (<https://doi.org/10.1017/S0021859618000515>).
- 21 De Rijckm G., Schrevels E. Comparison of the mineral composition of twelve standard nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition*, 1998, 21:10, 2115-2125 (doi: 10.1080/01904169809365548).
- 22 Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *Methods X*, 2018, 5: 909-914 (<https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.11.010>).
- 23 Kaushal M, Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. *Indian Journal of Biotechnology*, 2015, 14: 221-227.
- 24 Ившина И.Б. *Большой практикум по микробиологии*. СПб., 2019.
- 25 Ko K.S., Kim J.W., Kim J.M., Kim W. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infection and Immunity Journal*, 2004, 72(9): 5253-5261.
- 26 Winand R., Bogaerts B., Hoffman S., Lefevre L. Targeting the 16S rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: comparative evaluation of second (Illumina) and third (Oxford

nanopore technologies) generation sequencing technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 298 (<https://doi.org/10.3390/ijms21010298>).

27 Боровиков В.П. *Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA*. М., 2016.

И.Э. СМИРНОВА^{1*}, А.К. САДАНОВ¹, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹Микробиология и вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Әзербайжан Ұлттық ғылым академиясының Микробиология институты, Баку,
Әзірбайжан

*e-mail: iesmirnova@mail.ru

СОЯ (*GLYCINE MAX* (L.) Merr.) ДАҚЫЛДАРЫ ҮШІН БИОТЫҢАЙТҚЫШ ҚҰРУҒА АРНАЛҒАН ТҮЙНЕК БАКТЕРИЯЛАР ШТАММЫ

Түйін

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) бұршақ дақылдары арасында жетекші дақыл болып табылады және оның әлемдегі сұранысы жыл сайын өсіп отыр. Қазақстан үшін соя стратегиялық дақыл болып табылады, себебі ол адамдар мен жануарлардың қоректенуіндегі ақуыз тапшылығын азайтуға мүмкіндік береді. Дегенмен, Қазақстандағы соя шығымдылығы басқа елдермен салыстырғанда төмен. Өнімділігі төмен болғандықтан, оның өндірісі тиімсіз болады. Сояның өнімділігін арттыру үшін қоршаған ортаға қауіп төндіретін минералды азот тыңайтқыштары қолданылады. Сояның азотпен қоректенуін жақсарту мәселесінің шешімі атмосфералық азотты бекітетін және оны өсімдіктерге беретін түйнек бактериялар негізіндегі биотыңайтқыштарды қолдану болып табылады. Бұл зерттеудің мақсаты соя тамырларында түйнектерді тиімді қалыптастыруға, тұқымның өнуін арттыруға, дамуды ынталандыруға және соя өнімділігін арттыруға қабілетті, азотты бекіту белсенділігі жоғары түйнек бактерияларының жаңа штаммын бөліп алу. Қазақстанның Алматы облысының егістік алқаптарында жиналған соя өсімдігінің тамырындағы түйнектерден *Bradyrhizobium japonicum* H7 бактериясының жоғары тиімді штаммы бөлініп алынды, ол көптеген түйнектер түзуге, атмосфералық молекулалық азотты белсенді бекітуге, өсімдіктердің қоректенуінде азотты жақсартуға және соя өнімділігін арттыруға қабілетті. Далалық тәжірибелерде H7 штаммымен инокуляциялау соя тұқымының өнгіштігін 90%-ға дейін арттырып, өну тығыздығын 26-30%-ға, өсімдік биіктігін 25%-ға, өнімділікті 9-11 ц/га арттыратыны анықталды. Осылайша, түйнек бактериялардың *Bradyrhizobium japonicum* H7 штаммын соя дақылна арналған бактериялық тыңайтқыш жасау үшін пайдалануға болады.

Кілтті сөздер: түйнек бактериялар, соя, инокуляция, азот бекіту, өнімділік.

IRSTI: 34.27.17

I.E. SMIRNOVA^{1*}, A.K. SADANOV¹, Sh.A. BABAEVA², E.R. FAYZULINA¹,
L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOV¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan

*e-mail: iesmirnova@mail.ru

RHIZOBIA STRAIN FOR CREATING BIOFERTILIZER FOR SOYBEAN (*GLYCINE MAX* (L.) Merr.)

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.07

Abstract

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is the leading crop among legumes and its demand in the world will melt away every year. For Kazakhstan, soybean is a strategic crop, as it allows to reduce the protein deficiency in the nutrition of people and animals. However, soybean productivity in Kazakhstan is low compared to other countries. Due to low yields, its production becomes unprofitable. To increase the productivity of soybeans, mineral nitrogen fertilizers are used, which pose a threat to the environment. The solution to the problem of improving the nitrogen nutrition of soybeans is the use of biofertilizers based on rhizobia, which fix atmospheric nitrogen and supply it to plants. The goal of this study was to isolate a novel strain of rhizobia with high nitrogen-fixing activity, effectively forming nodules on soybean roots, increasing seed germination, promoting growth and increasing soybean productivity. From nodules on the roots of soybean plants collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan, a highly effective strain of rhizobia *Bradyrhizobium japonicum* H7 was isolated. The strain forms a large number of nodules, actively fixes atmospheric molecular nitrogen, improves nitrogen nutrition of plants and increases soybean yield. Under field conditions, it was found that inoculation with strain H7 increases the germination of soybean seeds up to 90%, seeding density by 26-30%, plant length by 25%, and productivity by 9-11 c/ha. Thus, the rhizobia *Bradyrhizobium japonicum* H7 can be used to create a bacterial fertilizer for soybean culture.

Key words: nodule bacteria, soybean, inoculation, nitrogen fixation, productivity.

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is the leading legumes, cultivated in more than 60 countries, and its demand in the world will melt away every year. Soybean production ranks fourth after wheat, rice and corn and is seen as a cheap solution to the problem of protein deficiency [1]. In addition, the high content of protein, oil and B vitamins in soybean grain determines its widespread use [5]. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), in 2018 soybean production worldwide amounted to 334.89 million tons, according to forecasts, by 2050 it will double [2]. The leaders in soybean production are Brazil, the USA and Argentina, which account for 81% of world production [3,4].

For Kazakhstan, soybean is a strategic crop; its use can reduce the protein deficiency in the nutrition of people and animals [6]. Currently, soybean cultivation areas in Kazakhstan are increasing, but productivity is low compared to other countries. So, if the average soybean yield in Brazil and the USA is 3.3 t/ha, in Canada - 2.6 t/ha, then in Kazakhstan it does not exceed 1.1-1.2 t/ha on average. At the same time, soybean grain is characterized by low quality [7]. Due to low yields, its production in Kazakhstan becomes unprofitable. To obtain high yields, soybeans need basic nutrients such as nitrogen, phosphorus and potassium, so mineral chemical fertilizers are used in the production of soybeans. However, at present, agriculture is striving for the use of green technologies and improving the nitrogen and phosphorus nutrition of plants without the use of chemical fertilizers is one of the main tasks of organic farming [8]. Based on this, the search for ways to increase soybean productivity is very actual.

The solution to the problem of improving the nitrogen nutrition of soybeans is the use of biofertilizers based on rhizobia that can fix atmospheric nitrogen and supply plants with biological

nitrogen. Inoculation soybean seeds with rhizobia makes it possible to reduce the use of mineral nitrogen fertilizers and significantly increase its productivity [9,10]. It should be noted that there are no aboriginal rhizobia for soybeans in the soils of Kazakhstan, since wild soybeans do not occur in natural phytocenoses. Therefore, when growing soybeans in south-east of Kazakhstan, the main region of growing soybean, in the soils of which there are no spontaneous populations of rhizobia and inoculation with rhizobia use of soybean seed to increase its productivity is mandatory [11].

The world produces a huge number of biopreparations based on rhizobia for soybeans [12]. The main producers are the USA - 20 million ha/portions annually, Brazil - 4-6 million ha/portions, India - 2-4 million ha/portions [13]. More than 20 types of preparations based on rhizobia are produced in Russia alone (Nitragin, Rizobacterin, Risotorfin, etc.) [14,15]. In Kazakhstan, biological preparations for soybeans are used, but mostly imported ones (Nitrogin, Rizotorfin, Russia; HiStick Soy, Germany; Nitrazon, Czech Republic), there are very few domestic preparations (Rizovit-AKS) [16-18].

However, there are certain problems when using imported biofertilizers. The main ones are the inability of biofertilizer strains to overcome competition with local populations of bacteria in the rhizosphere, their incompatibility with local soybean varieties, and the inability of bacteria to soil and climatic conditions of Kazakhstan [20,21]. The goal of this study was to isolate a novel strain of rhizobia with high nitrogen-fixing activity, capable of effectively forming nodules on soybean roots, increasing seed germination, promoting growth and development of plants, and increasing soybean productivity.

Materials and methods of research

The object of the study is a strain isolated from nodules on the roots of soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.) of the "Eureka" variety, collected in the Almaty region of Kazakhstan, with subsequent selection of the active variant on Maze medium. For the isolation of rhizobia, healthy and large soybean plants with a well-developed roots and a large number of nodules on the roots were selected. Plant roots were thoroughly washed with water. Large, pink nodules were separated from the roots and transferred to a Petri dish, where they were cut into pieces with a scalpel. To isolate rhizobia, Maze nutrient medium was used, with the following composition, g/l: K_2HPO_4 - 1.0; $MgSO_4$ - 0.3; sucrose - 10.0; decoction of 100 g of peas, table water - 1000 ml. The Iswaran's medium was used for cultivation of strains. The composition of the Iswaran's medium (g/l): sucrose - 4.0; K^2HPO_4 - 0.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.2; calcium gluconate - 1.5; $FeCl_3$ - 0.01; $ZnSO_4 \times 5H_2O$ - 0.005; yeast extract - 2.0; pH 6.8-7.0. table water - 1000 ml.

To study the nodulation of rhizobia, it's were grown on liquid Iswaran's medium at 180 rpm, 28°C for 5 days. Before sowing, the seeds were inoculated with a suspension of rhizobia with a cell concentration of 1×10^8 cells/ml for two hours at 23°C and sown in 500 ml vegetative vessels (three seeds per vessel). Vermiculite was used as a substrate for plant growth, Knop's solution (g/l) was used to feed seedlings: $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ - 1.00, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.25, KH_2PO_4 - 0.25, KCl - 0.12, $FeCl_3 \times 6H_2O$ - 0.004 g, sterile water - 1000 ml [22]. Soybean seeds without inoculation used as control.

The nitrogenase activity of bacteria was determined by the acetylene method [23]. Rhizobia were grown on Iswaran's medium under aeration conditions to a concentration of 1×10^8 cells/ml. Acetylene was introduced into vessels to a concentration of 10% (by volume). After cultures were incubated for 1.5 h in an acetylene atmosphere, gas samples were taken with a 1.0 ml syringe and ethylene was determined on an Agilent Technology 7890 B gas chromatograph (USA) with a flame ionization detector [24].

Morphological and biochemical properties of bacteria were studied according to standard procedures [25].

Bacteria were identified by the Sanger molecular genetic method by sequencing the 16S rRNA gene. Genomic DNA was isolated from a daily culture of bacteria using PureLink®

Genomic DNA Kits (Invitrogen, USA). Bacteria were identified by studying the sequence of the 16S rRNA gene region with universal primers [26, 27].

For experiments on the effect of rhizobia on the growth of soybean plants, bacteria were grown on Iswaran's medium at 28°C 180 rpm to a concentration of 1×10^8 cells/ml. Soybean seeds "Eureka" variety before sowing are treated with a suspension of bacteria ($T=1 \times 10^8$ cells/ml), in the amount of 5.0 ml per 1.0 g of seeds for 2 hours. In the control, the seeds were soaked in table water. The inoculated seeds were put on Petri dishes with Kovrovtssev's medium of the following composition (g/l): $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 1,0, K_2HPO_4 - 1,0, $Ca(HPO_4)_2$ - 0,2, $FeSO_4 \times 7H_2O$ very little, agar - 6,0, table water - 1000 ml. After 20 days, plant seedlings were counted, the aerial part, roots, and leaves were measured.

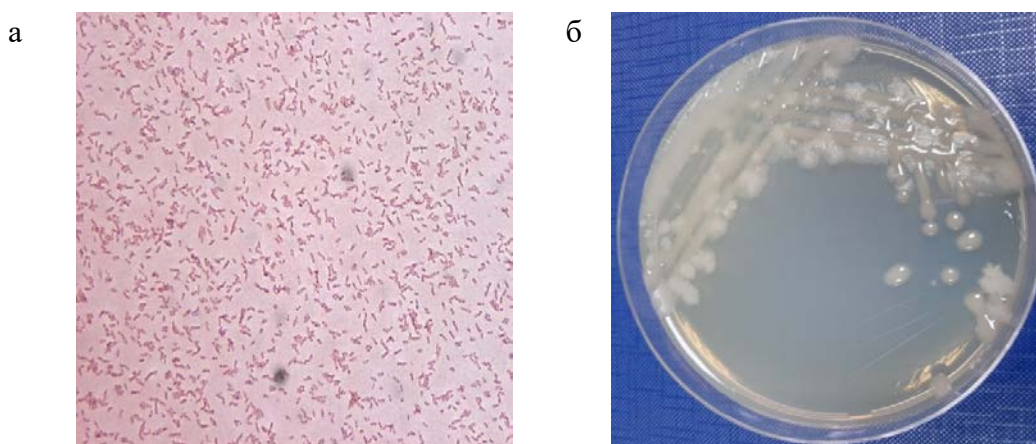
A field test on the effect of rhizobia on the growth and productivity of soybeans was carried out in the farm "Zhaniko" in the Ili district of the Almaty region. Rhizobia were grown on Iswaran's medium at 28°C, 180 rpm for 5 days. Before sowing, soybean seeds were inoculated with rhizobia at a concentration of 1×10^8 cells/ml, at the rate of 800 ml of suspension per 100 kg of seeds. Soybean varieties "Zhansaya" and "Eureka" were used in the experiments. The inoculated seeds were sown with a seeder SK-2 (precursor wheat) in rows 70 cm wide, two-line sowing with 15 cm between the rows. The seeding rate was 120-125 kg/ha; the sowing depth was 6-9 cm. Uninoculated seeds used as control. During the entire growing season, the necessary agronomic measures were carried out (watering, weeding, etc.).

All experiments were carried out in 3-5 replications. Statistical processing of the results was carried out using the STATISTICA 10.0 software package [28].

Results and discussion

For the isolation of rhizobia, soybean plants of the "Eureka" variety with well-development roots and a large number of nodules were selected. Rhizobia were isolated from the nodules on Maze medium. A total of 24 isolates were isolated. Under laboratory conditions, they were screened for their ability to actively grow on nitrogen-free media, and the H7 isolate was selected as the most effective.

The main cultural-morphological and biochemical properties of the isolate H7 were studied. It has been established that the cells are rod-shaped with rounded ends, mobile. The cell size is $0.5-0.7 \times 4.5-5.0 \mu m$, does not form spores, the bacteria are gram-negative, over time the cells took on a rounded shape (Figure 1a). On agar Maze medium forms slimy, convex, round, translucent colonies with smooth edges, slightly creamy, 3-4 mm in diameter, no pigment is released into the medium (Figure 1b). The strain does not grow on MPA (Meat-Peptone Agar) MPB (Meat-Peptone Broth), gelatin and other media containing animal proteins, grows weakly on Ashby's liquid and agar medium. The strain H7 is aerobic and oxygen demanding. The optimum growth temperature of the strain is 28-30°C; the optimum pH of the medium is 6.8-7.2.



a - cells of two daily culture (1×300); b - growth of bacteria on Maze medium
Figure 1 - Rhizobia isolate H7

Strain H7 uses arabinose, xylose, glucose, galactose and fructose with acid formation as a carbon source, does not utilize mannitol, sucrose and lactose. It does not liquefy gelatin, does not hydrolyze starch, does not peptonize milk, does not form H₂S and indole, and reduces of nitrates to nitrites. The isolate has a catalase positive result.

To study the effect of isolate H7 on the germination, growth and development of soybean plants, studies were carried out. The results obtained are presented in table 1.

Table 1 - Effects of isolate H7 on germination and growth of soybean plants

| Variants | Germination, % | Shoot length, sm | Root length, sm | Number of leaves, pcs. |
|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------------|
| Control | 49,6±1,0 | 10,3±0,1 | 7,0±0,1 | 1,2±0,03 |
| Isolate H7 | 98,7±2,1 | 22,3±0,2 | 12,7±0,1 | 4,4±0,1 |
| Note: $p < 0,05$ | | | | |

The results of Table 1 show that the inoculation with isolate H7 significantly increased soybean seed germination. So, if in the control germination was 49.6%, then in the variant with inoculation it was 98.7%. It was also found that inoculation stimulated soybean growth. At the same time, the shoot length increased by 2.2 times, the roots length by 1.8 times, and the number of leaves by 3.7 times compared with the control (table 1).

One of the important properties of rhizobia is their ability to form nodules on soybean roots and fix atmospheric nitrogen. In this regard, nodulation and nitrogen fixation of rhizobia were studied. In the experiments, soybeans of the “Eureka” and “Zhansaya” varieties were used. Before sowing, the seeds were inoculated with rhizobia H7; seeds soaked in sterile table water served as a control. After 30 days of growing, the soybean plants were taken out, the roots were washed, weighed, and the number of nodules on the plants was counted (Table 2).

Table 2 - Nodulation and nitrogen fixation of isolate H7

| Variants | Number of nodules per plant, pcs | Dry weight of nodules, mg/plant | Nitrogenase activity, $\mu\text{MOL} \text{ C}_2\text{H}_4/\text{ml/h}$ |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|
| variety “Zhansaya” | | | |
| Control | 0 | 0 | - |
| Isolate H7 | 18,4±0,1 | 158,5±2,2 | 7,79±0,02 |
| variety “Eureka” | | | |
| Control | 0 | 0 | - |
| Isolate H7 | 19,3±0,1 | 164,8±2,3 | 8,42±0,01 |
| Note: $p < 0,05$ | | | |

From the data in Table 2, it follows that the isolate H7 formed a large number of nodules on the roots of soybean plants, on average 18-19 pieces per plant. It is known that legumes are very demanding on nitrogen nutrition, rhizobia fix atmospheric molecular nitrogen and transform it into compounds available to plants.. It was found that the isolate H7 had a high nitrogen-fixing activity (8.0-8.4 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{ml/h}$), which is an important characteristic of bacteria for agriculture, since additional biological nitrogen has a significant impact on soybean growth and productivity, since it improves nitrogen nutrition of plants.

The isolate H7 was identified by the Sanger molecular genetic method and its taxonomic position was found. For species identification of bacteria, phylogenetic analysis was performed by comparing the nucleotide sequence of the strains (603 bp) with the sequences of 16S rRNA strains of related bacteria from the GenBank NCBI database. In the MEGA 6.0 program, a phylogenetic

tree was built using the Neiighbor-Joining cluster method for calculating genetic distances (Figure 2).

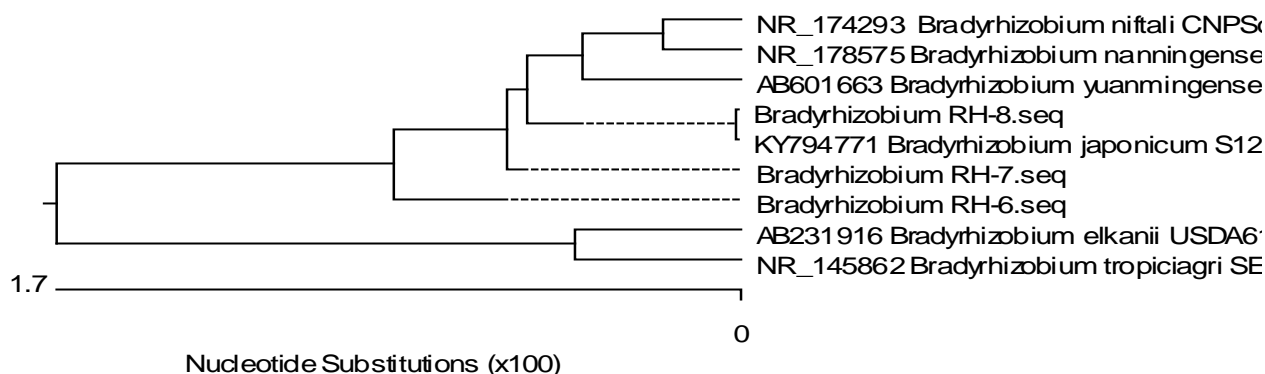


Figure 2 - Phylogenetic tree of rhizobia strain H7 (*Bradyrhizobium* RH-7. seq)

Figure 2 shows that, phylogenetically, the isolate H7 (shown as *Bradyrhizobium* RH-7. seq) is belong to strains of the genus *Bradyrhizobium* and is on the same branch as the reference strain from the GenBank NCBI KY794771 *Bradyrhizobium japonicum* S12 database. The percentage of identity with this strain was 99.98%.

The study of the effectiveness of the strain H7 under field conditions showed its high perspective. In the experiments, two varieties of soybean "Zhansaya" and "Eureka" were used (table 3).

Table 3 - Effect of the *Bradyrhizobium japonicum* H7 on agrobiological indicators and soybean productivity under field conditions

| Variants | Germination, % | Seeding density, pcs/m ² | Plant length, cm | Productivity, c/ha |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------------------|------------------|--------------------|
| variety "Zhansaya" | | | | |
| Control | 54,1±2,7 | 48,3±1,5 | 73,2±2,7 | 24,0±1,2 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> H-7 | 89,6±2,7 | 63,4±2,3 | 92,0±1,8 | 33,1±1,4 |
| variety "Eureka" | | | | |
| Control | 53,2±2,7 | 51,1±1,5 | 72,2±2,7 | 23,8±1,3 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> H-7 | 90,7±2,7 | 64,5±2,3 | 90,0±2,8 | 35,2±1,5 |
| Note: p<0,05 | | | | |

From the data of table 3 it follows that the inoculation of seeds with *Bradyrhizobium japonicum* H7 increased germination, seeding density and increased soybean productivity. So, seed germination in variants with inoculation increased up to 90%, in control (without inoculation) germination was only 53-54%, seeding density increased by 26-30%, plant height by 25% compared with control without inoculation. At the same time, soybean productivity increased to 33-35 c/ha, in the control this figure was only 24 c/ha.

Conclusion

From the nodules of soybean plants collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan, the bacterial strain *Bradyrhizobium japonicum* H7 was isolated, which forms a large number of nodules on the roots of soybean plants, actively fixes atmospheric molecular nitrogen and increases productivity of plants. Under field conditions, it was found that inoculation with a strain of *Bradyrhizobium japonicum* H7 increased the germination of soybean seeds up to 90%,

seeding density increased by 26-30%, plant length by 25%, and productivity by 9-11 c/ha. The strain of *Bradyrhizobium japonicum* H7 is non-toxic and non-pathogenic, its use is environmentally friendly and meets the requirements of environmental protection. The use of the strain H7 does not lead to soil contamination and disruption of biological balance. The strain H7 is an active nitrogen fixer, which contributes to the enrichment of the soil with biological nitrogen, thereby increasing its fertility. The application of the strain H7 as a bacterial fertilizer makes it possible to reduce or completely avoid the use of mineral chemical nitrogen fertilizers, which negatively affect the ecological state of soils and violate the system: soil-plant-consumer and worsen the quality of food.

Thus, the application of the rhizobia *Bradyrhizobium japonicum* H7 for inoculation of seeds increases germination, promotes the growth and development of soybean plants, and increases its productivity. The rhizobia strain *Bradyrhizobium japonicum* H7 can be used to create a bacterial fertilizer for soybeans.

Funding

The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan within the grant project AP09259080.

References:

- 1 Mudriyan E. *SOYA-2019/20: at the junction of a record supply and a trade war*. (<https://www.apk-inform.com/ru/exclusive/topic/1504880>)
- 2 FAO 2020. *World Food and Agriculture - Statistical Yearbook*. (<https://doi.org/10.4060/cb1329en>.)
- 3 Lysenko Y. *TOP-10 soybean producers in the world in 2019*. (<https://latifundist.com/rating/top-10-proizvoditelej-soi-v-mire-v-2019-godu>)
- 4 Abbott Ch. *Brazil and Argentina grow half of World's soybeans*. (<https://www.agriculture.com/news/business/brazil-and-argentina-grow-half-of-world-s-soybeans>)
- 5 Wijewardana C, Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. *Food Chemistry*, 2019, 278: 92-100 (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.035>).
- 6 Akimbekova G.U., Nikitina G.A. Priority directions of development of the Agro-industrial complex of Kazakhstan. *Problems of the agricultural market*, 2020, 4: 13-23 (<https://doi.org/10.46666/2020-4-2708-9991.0>).
- 7 Global Market Analysis, FAS, USDA. *World Agricultural Production 2021*. (<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production>)
- 8 Roos E., Mie A., Wivstad M. Risks and opportunities of increasing yields in organic farming. *Agronomy for Sustainable Development*, 2018, 38: 14-21 (<https://doi.org/10.1007/s13593-018-0489-3>).
- 9 Mathenge C., Thuita M., Masso C., Gweyi-Onyango J., Vanlauwe B. Variability of soybean response to rhizobia inoculant, vermicompost, and a legume-specific fertilizer blend in Siaya County of Kenya. *Soil and Tillage Research*, 2019, 194: 104290 (<https://doi.org/10.1016/j.still.2019.06.007>).
- 10 Han Q., Ma Q., Chen Y. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. *Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 2020, 14: 915-1928 (<https://doi.org/10.1038/s41396-020-0648-9>).
- 11 Garcia M.V.C., Nogueira M.A., Hungria M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. *AMB Express*, 2021, 11: 71-78 (<https://doi.org/10.1186/s13568-021-01230-8>).
- 12 Nguyen H.P., Miwa H., Obirih-Opareh J., Suzuki T. Novel rhizobia exhibit superior nodulation and biological nitrogen fixation even under high nitrate concentrations. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96, 2: 184 (<https://doi.org/10.1093/femsec/fiz184>).
- 13 *Mikrobiologicheskie i bakterial'nye udobrenija*. (<https://universityagro.ru/>)
- 14 Nikitin A. *Bakterial'nye udobrenija dlja bobovyh*. (<https://www.agroxxi.ru/zhurnal-agromir-xxi/stati-rasteniievodstvo/bakterialnye-udobrenija-dlja-bobovyh.html>)
- 15 *Mikrobiologicheskie preparaty JeKOS*. (<https://ekosspb.ru/catalog>)
- 16 *Agrotehnika vyrashhivaniya soi*. (<http://abkaz.kz/agrotehnika-vyrashhivaniya-soi/>)

- 17 Bobovye kul'tury. Rekomendacii po primeneniju preparatov BASF dlja zashhity bobovyh kul'tur v Kazahstane 2020. (<https://www.agro.basf.kz/Documents/Brochures-2020/2020.pdf>)
- 18 Smirnova I.Je., Sadanov A.K. Bakterii dlja povyshenija urozhajnosti soi. *Aktual'naja biotehnologija*, 2021, 1(35): 61-65.
- 19 Beregovaja Ju.V., Tychinskaja I.L., Petrova S.N., Parahin N.V. Sortovaja specifichnost' jeffektov rizobakterij v otnoshenii azotfiksirujushhego simbioza i mineral'nogo pitaniya soi v uslovijah agrocenoza. *Sel'skohozjajstvennaja biologija*, 2018, 53(5): 977-993.
- 20 Pannecoucq J., Goormachtigh S., Ceusters J., Debode J. Temperature as a key factor for successful inoculation of soybean with Bradyrhizobium spp. under cool growing conditions in Belgium. *Journal of Agricultural Science*, 2018, 156: 493-503 (<https://doi.org/10.1017/S0021859618000515>).
- 21 De Rijckm G., Schrevens E. Comparison of the mineral composition of twelve standard nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition*, 1998, 21:10, 2115-2125 (<https://doi.org/10.1080/01904169809365548>).
- 22 Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *Methods X*, 2018, 5: 909-914 (<https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.11.010>).
- 23 Kaushal M, Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. *Indian Journal of Biotechnology*, 2015, 14: 221-227.
- 24 Ivshina I.B. *Bol'shoj praktikum po mikrobiologii*. SPb., 2019.
- 25 Ko K.S., Kim J.W., Kim J.M., Kim W. Population structure of the Bacillus cereus group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the plcR gene. *Infection and Immunity Journal*, 2004, 72(9): 5253-5261.
- 26 Winand R., Bogaerts B., Hoffman S., Lefevre L. Targeting the 16S rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: comparative evaluation of second (Illumina) and third (Oxford nanopore technologies) generation sequencing technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 298 (<https://doi.org/10.3390/ijms21010298>).
- 27 Borovikov V.P. *Populjarnoe vvedenie v sovremennyj analiz dannyh v sisteme STATISTICA*. M., 2016.

МРНТИ: 31.27.19, 31.27.22

А.В. ЧИЖАЕВА¹, М.Б. АЛИМЖАНОВА¹, Қ. АШИМУЛЫ¹, А.К. САДАНОВ¹,
А.Ж. АЛЫБАЕВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2}, А.А. АМАНГЕЛДІ^{1,2}, М.Е. ЕЛУБАЕВА¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

СПЕКТР ЛЕТУЧИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРОБИОТИЧЕСКОГО КОНСОРЦИУМА ДЛЯ РЫБ В АКВАКУЛЬТУРЕ

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.08

Аннотация

Летучие органические соединения представляют интерес во многих областях. Среди них анализ продуктов питания и ароматизаторов, исследования окружающей среды и атмосферы, промышленное применение, безопасность или медицина и наука о жизни. Характеристика этих соединений в основном выполнялась путем сбора образцов и анализа за пределами предприятия с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией в качестве золотого стандарта. С целью определения химической природы метаболитов консорциума антагонистически активных микроорганизмов *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 и *Propionibacterium freudenreichii* P-8 был исследован спектр летучих соединений консорциума с применением газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Обнаружены метаболиты, обладающие антибактериальной и противогрибковой активностью – органические кислоты, ароматические кислоты (префеновая кислота, гидроксифениллактат, пирролидонкарбоновая кислота и полимолочная кислота), уксусная кислота и другие летучие вещества, а именно диацетил, ацетоин и др.

Ключевые слова: летучие органические соединения, метаболиты, газовая хроматография, масс-спектрометрия.

В настоящее время разработка и использование пробиотических продуктов в аквакультуре нужно для поддержания здоровья и благополучия многих аквакультурных животных. Пробиотические бактерии нетоксичны, их можно использовать в качестве добавки для роста и развития рыб, а также в качестве альтернативного источника антибиотиков для улучшения использования корма, повышения стрессоустойчивости, иммунитета и устойчивости к болезням, а также для улучшения качества воды.

Большинство бактерий живут в активных сообществах и производят большое разнообразие вторичных метаболитов. Эти метаболиты служат сигналами, потенциально участвующими в конкуренции, что позволяет микроорганизмам адаптироваться к различным стрессам [1,2]. Выделяемые бактериями молекулы с низкой молекулярной массой (<300 Да) и высоким давлением паров (0,01 кПа при 20°C) могут легко испаряться и проникать через гетерогенные смеси жидкостей, газов и твердых веществ [3]. На сегодняшний день известны более 1000 бактериальных летучих соединений, но это может быть грубой недооценкой разнообразия летучих органических и неорганических соединений, продуцируемых бактериями [4,5]. Обнаружение и количественная оценка летучих органических соединений (ЛОС), как привлекательных или отталкивающих запахов и ароматов, представляет большой интерес для пищевых и косметических биопроцессов. ЛОС также способствуют способности бактерий взаимодействовать с их собственной средой [6].

Обнаружение ЛОС микробного происхождения является альтернативным подходом, который потенциально может стать надежным, быстрым и относительно недорогим методом дифференциации и идентификации микроорганизмов. Различные аналитические

методы позволяют обнаруживать и идентифицировать летучие органические соединения [7]. Растет объем знаний о наличии и составе летучих метаболитов, выделяемых бактериями и другими микробами [8]. В современном мире для обнаружения ЛОС используют спектрометрические методы.

В настоящее время метаболические пути бактерий подробно исследуются [9]. В основном, появление ЛОС должно быть связано с известным метаболическим путем. Однако на производство бактериями ЛОС влияют условия их роста [10]. Наши знания о путях бактериального метаболизма и, следовательно, производства ЛОС в различных условиях в организме человека все еще очень ограничены.

Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) является золотым стандартом обнаружения ЛОС [7]. ГХ-МС обладает большими базами данных для идентификации веществ и возможностью разделения и однозначной идентификации соединений. Полученные результаты в области определения бактериальных ЛОС с помощью ГХ-МС показали его применимость для этой цели. Однако химическая идентификация неизвестных ЛОС невозможна [11].

Материалы и методы

Определение содержания летучих соединений консорциума молочнокислых и пропионовокислых бактерий проводили методом твердофазной микроэкстракции (SPME) и последующей газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Для проведения SPME 10 мл культуральной жидкости консорциума помещали в 20-мл виалу с завинчивающейся крышкой (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США) и выдерживали при 30°C в течение 30 минут для достижения равновесного состояния. Летучие вещества в свободном пространстве адсорбировали на волокне SPME, покрытом 85-мм карбоксеном/полидиметилсилоксаном (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, США).

Газохроматографический анализ проводили с использованием газового хроматографа 7890, соединенного с 5977A MSD масс-спектрометр (Agilent, Санта-Клара, США). Использовали колонку DBWAXetr (30 м×0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм, J&W Scientific Inc., Фолсом, Калифорния, США), а подвижной фазой (газом-носителем) был гелий (>99,995%, Оренбург-Техгаз, Россия) со скоростью потока 1,0 мл/мин. Объем инъекции составлял 0,5 мкл при соотношении компонентов 10:1, а задержка растворителя составляла 1,5 мин. Температура печи GC была увеличена с начальной температуры 40°C до 200°C при скорости 10 °C/мин. Температуры инжектора и передаточной линии были 250 и 280°C, соответственно. Выполнено обнаружение МС при 70 эВ с диапазоном масс сканирования m/z 34-550 а.е.м. Для управления прибором и обработки результатов использовалась Agilent MSD ChemStation (версия 1701EA). Обработка данных включала определение времени удерживания, площадей пиков, а также идентификацию пиков с использованием их масс-спектров. Масс-спектры идентифицированы с использованием библиотек Wiley 7-е издание и NIST'02. Анализ культуральных супернатантов проводили в трех экземплярах. Пустые эксперименты проводились в трех различных режимах: заготовка волокна, заготовка пустого флакона и заготовка питательной среды без бактерий (MPC бульон (TM Media, Индия)). Калибровка для определения содержания уксусной кислоты в молоке была построена в диапазоне от 2 мг/мл до 50 мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,93. В качестве холостого образца использовали жидкую среду MPC.

Все результаты были средними из трех независимых экспериментов с тремя параллельными повторениями (n=9). Для оценки результатов использовались стандартные статистические методы в Excel (Microsoft® Office 2010) с использованием критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование спектра летучих соединений проводили у двух вариантов консорциума: 1 образец (S1) – консорциум только молочнокислых бактерий *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20; 2 образец (S2) - консорциум молочнокислых и пропионовокислых

бактерий *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 и *Propionibacterium freudenreichii* P-8. Определение содержания летучих соединений у консорциумов бактерий проводили методом твердофазной микроэкстракции (SPME) и последующей газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ–МС).

Результаты качественного и количественного определения летучих соединений показали наличие 22 противомикробных соединений в обоих вариантах консорциумов (таблица 1), среди которых обнаружены органические кислоты и их ангидриды, хинолины, насыщенные коротко- и среднецепочечные жирные кислоты, жирные спирты, эфиры, кетоны, алканы и каротиноиды. При этом учитывались все соединения с вероятностью идентификации выше 60%. Контрольный образец (среда MPC) содержал: диоксид углерода; 1,4:3,6-диангидро- α -D-глюкопиранозу; гептиловый эфир бензойной кислоты и гексадекановую кислоту.

Таблица 1 – Спектр летучих соединений, образуемых консорциумами отобранных бактерий, обладающих антибактериальными и антифунгальными свойствами

| Летучие соединения, % | | Время удерживания, с | Вероятность идентификации, % | Образец (консорциум), % | |
|-----------------------|---|----------------------|------------------------------|-------------------------|------------|
| Сокращенное название | Химическое название | | | S1 МКБ | S2 МКБ+ПКБ |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| FA | Уксусная кислота, ангидрид с муравьиной кислотой (формацетат) | 1,75 | 81 | 71,17±2,15 | 65,08±0,04 |
| DHIMBM | 3,4-дигидроизохинолин, 1-[3-метоксибензил]-6-метокси- | 6,55 | 71 | 6,59±0,15 | 6,8±0,19 |
| PA | Пропановая кислота | 11,20 | 78 | nd | 1,86±0,03 |
| PAM | Пропановая кислота, 2-метил- | 11,47 | 82 | nd | 1,97±0,09 |
| DHIBM | 3,4-Дигидроизохинолин-7, 1-бензил-6-метокси- | 11,88 | 61 | 0,70±0,03 | nd |
| BA | Бутановая кислота | 12,23 | 76 | nd | 1,61±0,05 |
| BAM | Бутановая кислота, 3-метил- | 12,44 | 81 | nd | 1,68±0,05 |
| NN | 2-нонанон | 13,72 | 68 | 0,64±0,04 | 0,7±0,06 |
| MNE | Метилловый нонилловый эфир | 18,83 | 70 | 0,98±0,15 | 1,1±0,11 |
| UDN | 2-ундеканол | 19,18 | 70 | 1,34±0,04 | 0,7±0,04 |
| PDN | Пентадекан | 22,53 | 66 | nd | 0,3±0,01 |
| CDN | Циклодеканол | 24,33 | 73 | nd | 3,9±0,03 |
| TDN | 2-тридеканон | 24,64 | 82 | 1,30±0,08 | 1,1±0,09 |
| CPDN | Циклопентадеканон | 29,19 | 70 | 1,67±0,05 | 1,0±0,07 |
| TDNA | Тетрадекановая кислота | 30,97 | 66 | 1,40±0,10 | 1,2±0,09 |
| PDNA | Пентадекановая кислота | 33,03 | 62 | 1,61±0,07 | nd |
| PhAHIBE | Фталевая кислота, гепт-4-ил изобутиловый эфир | 34,89 | 72 | nd | 0,5±0,02 |
| HDNA | Гексадекановая кислота | 35,02 | 90 | 8,36±0,12 | 7,6±0,11 |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------|---|-------|----|-----------|----------|
| PhABMHE | Фталевая кислота, 6-метилгепт-2-ил бутиловый эфир | 37,00 | 78 | 0,62±0,02 | nd |
| PhABTE | Фталевая кислота, тридец-2-ин-1-ил бутиловый эфир | 37,01 | 68 | nd | 0,7±0,03 |
| ODNA | Октадекановая кислота | 38,79 | 74 | 2,23±0,06 | 1,2±0,05 |
| SQ | Сквален | 48,80 | 72 | 1,40±0,03 | 1,0±0,04 |

Большинство летучих соединений, 19 из 22-х, продуцирует созданный нами консорциум молочнокислых и пропионовокислых бактерий (образец S2), немногим меньше, 14 из 22-х соединений образует консорциум, состоящий только из молочнокислых бактерий (образец S1) (рисунок 1).

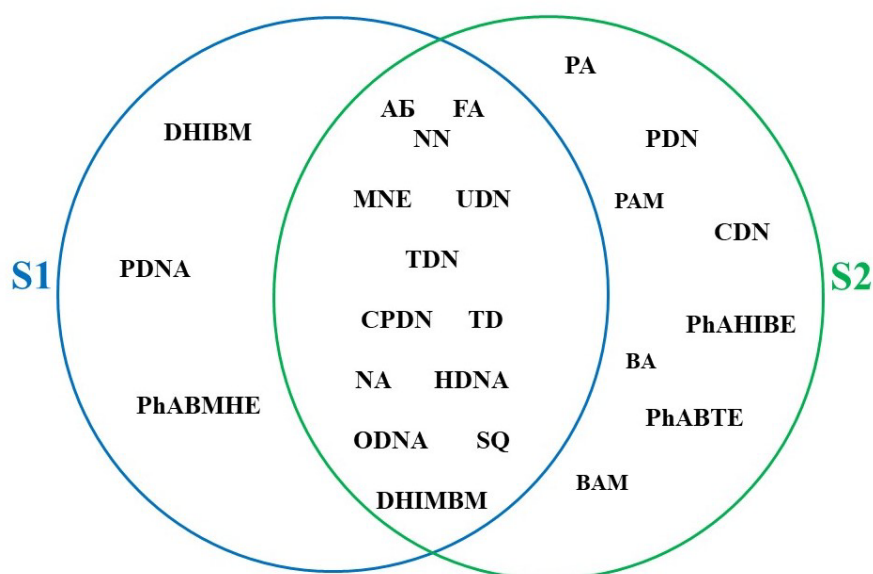


Рисунок 1 – Содержание летучих веществ в образцах консорциумов S1 и S2. Аббревиатуру соединений см. в таблице 1

Обнаруженные летучие соединения присутствовали либо в значительных, либо в умеренных, либо в низких концентрациях, как показано на рисунке 2, соответственно.

Три наиболее распространенных соединения – смешанный ангидрид уксусной и муравьиной кислот; хинолин (2,3-бензопиридин) и пальмитиновая (рисунок 2) в образце S1 составили в сумме 86,12%, а в образце S2 – 79,48% от общего количества всех обнаруженных противомикробных летучих соединений.

Их количество варьировало в зависимости от штаммового состава исследуемого консорциума и колебалось от 65,08% до 72,2 % для уксусной кислоты (acetic acid, anhydride with formic acid); от 6,59 до 6,8% - для хинолина 3,4-Dihydroisoquinoline, 1-[3-methoxybenzyl]-6-methoxy-; от 7,6 до 8,36% - для среднецепочечной гексадекановой кислоты (рисунок 2А). Тринадцать других органических летучих соединений присутствовали в промежуточных умеренных количествах и составляли 1,0–3,9% от общего количества противомикробных соединений (рисунок 2В). Наконец, 6 соединений из групп алканов, кетонов и эфиров присутствовали в более низких концентрациях (рисунок 2С).

В целом, как показано на рисунке 2, среднецепочечные жирные насыщенные кислоты содержались в более высоких концентрациях в культуральной жидкости консорциума S1, состоящем только из молочнокислых бактерий (МКБ). При этом, пентадекановая кислота

была обнаружена только в образце S1 (1,61%). А вот короткоцепочечные жирные кислоты – пропионовая кислота или пропионат (1,8%), изомасляная кислота (1,97%), масляная кислота или бутират (1,61%), изовалериановая кислота (1,68%), присутствовали только в образце S2 (консорциум МКБ и пропионовокислых бактерий). Содержание жирных спиртов также различалось в зависимости от рассматриваемого консорциума. Так, 2-Undecanol был определен в культуральных жидкостях обоих консорциумов, однако, его количество в образце S1 было в 2 раза выше, чем в образце S2. Тогда как, Cyclododecanol присутствовал только в образце S2, причем в довольно значимом количестве - 3,9% (рисунок 1, рисунок 2B). Только в образце S2 был найден и алкан пентадекан (PDN).

Различаются образцы S1, S2 и по содержанию сложных эфиров фталевой кислоты: в образце S1 определены фталевая кислота, 6-метилгепт-2-ил бутиловый эфир; а в образце S2 - фталевая кислота, гепт-4-ил изобутиловый эфир и фталевая кислота, тридец-2-ин-1-ил бутиловый эфир (рисунок 1). Следует отметить, что количество этих эфиров очень мало и примерно одинаковое в обоих консорциумах – 0,5-0,7% (рисунок 2 C), что могло бы быть связано с погрешностью методики (загрязнения от крышек виал). Однако, учитывая достаточно высокую вероятность их идентификации (68-78%), отсутствие их в контроле и низкое стандартное отклонение, эти эфиры было решено учесть в исследовании.

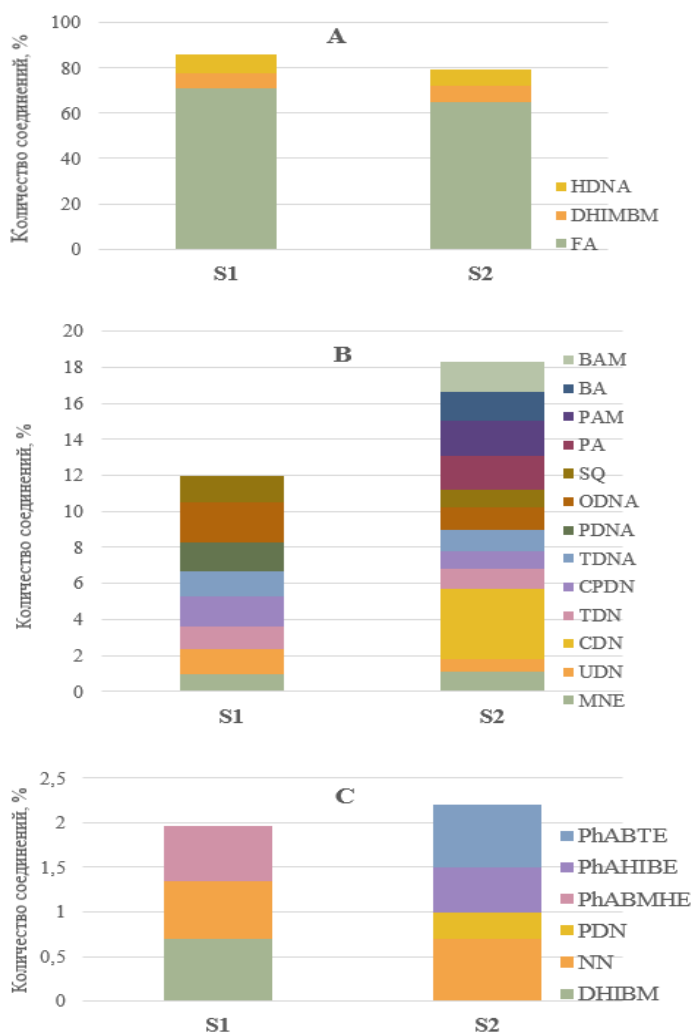


Рисунок 2 – Средние концентрации органических летучих соединений в %, образуемые консорциумами S1 и S2 в высоких концентрациях – больше 6% по меньшей мере для одного соединения в образце (A), в средних – от 1 до 4 % по меньшей мере для одного соединения в образце (B), в низких - менее 1% по меньшей мере для одного соединения в образце (C).

Сокращения приведены в таблице 1.

Метил-кетоны 2-Nonanone (NN), 2-Tridecanone (TDN) и cyclopentadecanone (CPDN), а также сквален (SQ) присутствуют в обоих образцах в умеренном количестве – 0,64-1,67% (рисунок 2).

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что отобранный нами консорциум молочнокислых и пропионовокислых бактерий продуцирует более широкий спектр антимикробных метаболитов, по сравнению с консорциумом, состоящем только из лактобацилл, и может обоснованно служить основой для создания пробиотического препарата для ценных видов рыб в аквакультуре.

Литература:

1 Hughes DT Sperandio V Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts *Nat Rev Microbiol* 2008 6 11120 (doi:10.1038/nrmicro1836)

2 Surette MG Davies J Winans SC Bassler BL A new look at secondary metabolites *Chemical Communication Among Bacteria* 2008 Washington, DC ASM Press 30722 (https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083244464)

3 Schulz S Dickschat JS Bacterial volatiles: the smell of small organisms *Nat Prod Rep* 2007(doi: 10.1039/b507392h)

4 Kai M Haustein M Molina Fet al. Bacterial volatiles and their action potential *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 81,2009, 1001–1012 (https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1760-3)

5 Lemfack MC Nickel J Dunkel Met al. mVOC: a database of microbial volatiles *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue D1, 1 January 2014, Pages D744–D748, (https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250)

6 Kai M Piechulla B Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens* *Plant Signal Behav.* 2010 Apr;5(4):444-6. (doi: 10.4161/psb.5.4.11340)

7 Ratiu IA, Ligor T, Bocos-Bintintan V, Buszewski B. Mass spectrometric techniques for the analysis of volatile organic compounds emitted from bacteria. *Bioanalysis.* 2017;9(14):1069–1092. (doi: 10.4155/bio-2017-0051).

8 Bos LD, Sterk PJ, Schultz MJ. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003311. doi: 10.1371/journal.ppat.1003311.

9 Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep.* 2007;24(4):814–842. (doi: 10.1039/b507392h).

10 O'Hara M, Mayhew CA. A preliminary comparison of volatile organic compounds in the headspace of cultures of *Staphylococcus aureus* grown in nutrient, dextrose and brain heart bovine broths measured using a proton transfer reaction mass spectrometer. *J Breath Res.* 2009;3(2):027001. (doi: 10.1088/1752-7155/3/2/027001).

11 Liebeke M, Dorries K, Meyer H, Lalk M. Metabolome analysis of gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* by GC-MS and LC-MS. *Methods Mol Biol.* 2012;815:377–398. (doi: 10.1007/978-1-61779-424-7_28).

11 Tait E, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Anal Chim Acta.* 2014;848:80–87. (doi: 10.1016/j.aca.2014.07.029).

А.В. ЧИЖАЕВА¹, М.Б. АЛИМЖАНОВА¹, Қ. АШИМУЛЫ¹, А.К. САДАНОВ¹,
А.Ж. АЛЫБАЕВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2}, А.А. АМАНГЕЛДІ^{1,2}, М.Е. ЕЛУБАЕВА¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

АКВАКУЛЬТУРАДАҒЫ БАЛЫҚТАРҒА АРНАЛҒАН ПРОБИОТИКАЛЫҚ КОНСОРЦИУМНЫҢ ҰШҚЫШ ҚОСЫЛЫСТАРЫНЫҢ СПЕКТРЫ

Түйін

Ұшқыш органикалық қосылыстар көптеген салаларда қызығушылық тудырады. Оларға тағам мен ароматизаторларды талдау, қоршаған орта мен атмосфераны зерттеулер, өнеркәсіптік қолданбалар, қауіпсіздік немесе медицина және өмір туралы ғылымдар кіреді. Бұл қосылыстардың сипаттамасы бірінші кезекте алтын стандарт ретінде масс-спектрометриямен біріктірілген газ хроматографиясын пайдалана отырып, алаңнан тыс сынамаларды алу және талдау арқылы орындалды. *Lactaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-28 және *Propionibacterium freudenreichii* P-8, антагонистік белсенді микроорганизмдер консорциумының метаболиттерінің химиялық табиғатын анықтау үшін. консорциумның ұшқыш қосылыстары масс-спектрометриялық анықтаумен газ хроматографиясын қолдану арқылы зерттелді. Антибактериалды және зенге қарсы белсенділігі бар метаболиттер табылды - органикалық қышқылдар, хош иісті қышқылдар (префен қышқылы, гидроксифениллактат, пирролидонкарбон қышқылы және полилакт қышқылы), сірке қышқылы және басқа ұшқыш заттар, атап айтқанда диацетил, ацетон және т.б.

Кілтті сөздер: ұшқыш органикалық қосылыстар, метаболиттер, газ хроматографиясы, масс-спектрометрия.

IRSTI: 31.27.19, 31.27.22

A.V. CHIZHAEVA¹, M.B. ALIMZHANOVA¹, K. ASHIMULY¹, A.K. SADANOV¹,
A.Zh. ALYBAYEVA^{1*}, Zh.N. ERMEKBAY^{1,2}, A.A. AMANGELDI^{1,2}, M.Y. YELUBAYEVA¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University,

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

SPECTRUM OF VOLATILE COMPOUNDS OF THE PROBIOTIC CONSORTIUM FOR FISH IN AQUACULTURE

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.08

Abstract

Volatile organic compounds are of interest in many fields. These include food and flavor analysis, environmental and atmospheric research, industrial applications, safety or medicine, and life sciences. The characterization of these compounds was primarily performed by off-site sampling and analysis using gas chromatography combined with mass spectrometry as the gold standard. In order to determine the chemical nature of the metabolites of the consortium of antagonistically active microorganisms *Lactaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 and *Propionibacterium freudenreichii* P-8, the spectrum of volatile compounds of the consortium was studied using gas chromatography with mass spectrometric detection. Metabolites with antibacterial and antifungal activity were found - organic acids, aromatic acids (prefenic acid, hydroxyphenyl lactate, pyrrolidonecarboxylic acid and polylactic acid), acetic acid and other volatile substances, namely diacetyl, acetoin, etc.

Keywords: volatile organic compounds, metabolites, gas chromatography, mass spectrometry.

Currently, the development and use of probiotic products in aquaculture is essential to the health and well-being of many aquaculture animals. Probiotic bacteria are non-toxic and can be used as a supplement for fish growth and development, and as an alternative source of antibiotics to improve feed utilization, improve stress tolerance, immunity and disease resistance, and improve water quality.

Most bacteria live in active communities and produce a wide variety of secondary metabolites. These metabolites serve as signals potentially involved in competition, which allows microorganisms to adapt to various stresses [1,2]. Molecules released by bacteria with low molecular weight (<300 Da) and high vapor pressure (0.01 kPa at 20°C) can easily evaporate and permeate through heterogeneous mixtures of liquids, gases, and solids [3]. To date, more than 1000 bacterial volatile compounds are known, but this may be a gross underestimation of the diversity of volatile organic and inorganic compounds produced by bacteria [4,5]. The detection and quantification of volatile organic compounds (VOC) as attractive or repulsive odors and flavors is of great interest to food and cosmetic bioprocesses, VOC also contribute to the ability of bacteria to interact with their own environment [6].

Detection of VOC of microbial origin is an alternative approach that has the potential to become a reliable, fast and relatively inexpensive method for differentiating and identifying microorganisms. Various analytical methods make it possible to detect and identify volatile organic compounds [7]. There is a growing body of knowledge about the presence and composition of volatile metabolites released by bacteria and other microbes [8]. In the modern world, spectrometric methods are used to detect VOC.

Currently, the metabolic pathways of bacteria are being studied in detail [9]. Basically, the appearance of VOCs must be associated with a known metabolic pathway. However, the production of VOCs by bacteria is affected by their growth conditions [10]. Our knowledge of the pathways of bacterial metabolism and hence the production of VOCs under various conditions in the human body is still very limited.

Gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS) is the gold standard for VOC detection [7]. GC-MS has large databases for substance identification and the ability to separate and uniquely identify compounds. The results obtained in the field of determination of bacterial VOC using GC-MS showed its applicability for this purpose. However, chemical identification of unknown VOC is impossible [11].

Materials and methods

Determination of the content of volatile compounds of the consortium of lactic acid and propionic acid bacteria was carried out by the method of solid phase microextraction (SPME) and subsequent gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS). For SPME, 10 ml of consortium culture broth was placed in a 20 ml screw cap vial (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and kept at 30° C. for 30 minutes to reach equilibrium. Headspace volatiles were adsorbed onto SPME fiber coated with 85 mm carboxene/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Gas chromatographic analysis was performed using a 7890 gas chromatograph connected to a 5977A MSD mass spectrometer (Agilent, Santa Clara, USA). A DBWAXetr column (30 m×0.25 mm, film thickness 0.25 µm, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) was used, and the mobile phase (carrier gas) was helium (>99.995%, Orenburg-Tekhgaz, Russia) with a flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume was 0.5 µl at a 10:1 mixing ratio and the solvent retention was 1.5 minutes. The temperature of the GC oven was increased from an initial temperature of 40°C to 200°C at a rate of 10°C/min. The injector and transfer line temperatures were 250 and 280 °C, respectively. MS was detected at 70 eV with a scan mass range m/z of 34-550 amu. An Agilent MSD ChemStation (version 1701EA) was used to control the instrument and process the results. Data processing included determination of retention times, peak areas, and identification of peaks using their mass spectra. Mass spectra were identified using the Wiley 7th edition and NIST'02 libraries. Culture supernatants were analyzed in triplicate. Blank experiments were performed in

three different modes: fiber preparation, empty vial preparation, and culture medium preparation without bacteria (MRS broth (TM Media, India)). Calibration for determining the content of acetic acid in milk was built in the range from 2 mg/ml to 50 mg/ml. The correlation coefficient was 0.93. The MRS liquid medium was used as a blank sample.

All results were the average of three independent experiments with three parallel repetitions (n=9). The results were evaluated using standard statistical methods in Excel (Microsoft® Office 2010) using Student's t-test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

The study of the spectrum of volatile compounds was carried out in two variants of the consortium: 1 sample (S1) - a consortium of only lactic acid bacteria *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lactocaseibacillus casei* Wf-10, *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-20; 2 sample (S2) - a consortium of lactic and propionic acid bacteria *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lactocaseibacillus casei* Wf-10, *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-20 and *Propionibacterium freudenreichii* P-8. The content of volatile compounds in bacterial consortiums was determined by solid phase microextraction (SPME) and subsequent gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS).

The results of qualitative and quantitative determination of volatile compounds using showed the presence of 22 antimicrobial compounds in both variants of consortiums (Table 1), among which organic acids and their anhydrides, quinolines, saturated short- and medium-chain fatty acids, fatty alcohols, esters, ketones, alkanes were found and carotenoids. In this case, all compounds with a probability of identification above 60% were taken into account. The control sample (MPC medium) contained: carbon dioxide; 1,4:3,6-dianhydro- α -D-glucopyranose, benzoic acid heptyl ester and hexadecanoic acid.

Table 1 - Spectrum of volatile compounds formed by consortiums of selected bacteria with antibacterial and antifungal properties

| Volatile compounds, % | | Retention time, s | Probability of identification, % | Sample (consortium), % | |
|-----------------------|--|-------------------|----------------------------------|------------------------|------------|
| Abbreviation | Chemical name | | | S1 LAB | S2 LAB+PAB |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| FA | Acetic acid, anhydride with formic acid (Formyl acetate) | 1,75 | 81 | 71,17±2,15 | 65,08±0,04 |
| DHIMBM | 3,4-Dihydroisoquinoline, 1-[3-methoxybenzyl]-6-methoxy- | 6,55 | 71 | 6,59±0,15 | 6,8±0,19 |
| PA | Propanoic acid | 11,20 | 78 | nd | 1,86±0,03 |
| PAM | Propanoic acid, 2-methyl- | 11,47 | 82 | nd | 1,97±0,09 |
| DHIBM | 3,4-Dihydroisoquinolin-7-ol, 1-benzyl-6-methoxy- | 11,88 | 61 | 0,70±0,03 | nd |
| BA | Butanoic acid | 12,23 | 76 | nd | 1,61±0,05 |
| BAM | Butanoic acid, 3-methyl- | 12,44 | 81 | nd | 1,68±0,05 |
| NN | 2-Nonanone | 13,72 | 68 | 0,64±0,04 | 0,7±0,06 |
| MNE | Methyl nonyl ether | 18,83 | 70 | 0,98±0,15 | 1,1±0,11 |
| UDN | 2-Undecanol | 19,18 | 70 | 1,34±0,04 | 0,7±0,04 |
| PDN | Pentadecane | 22,53 | 66 | nd | 0,3±0,01 |
| CDN | Cyclodecanol | 24,33 | 73 | nd | 3,9±0,03 |
| TDN | 2-Tridecanone | 24,64 | 82 | 1,30±0,08 | 1,1±0,09 |
| CPDN | Cyclopentadecanone | 29,19 | 70 | 1,67±0,05 | 1,0±0,07 |
| TDNA | Tetradecanoic acid | 30,97 | 66 | 1,40±0,10 | 1,2±0,09 |

Table 1 continued

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------|--|-------|----|-----------|----------|
| PDNA | Pentadecanoic acid | 33,03 | 62 | 1,61±0,07 | Nd |
| PhAHIBE | Phthalic acid, hept-4-yl isobutyl ester | 34,89 | 72 | nd | 0,5±0,02 |
| HDNA | Hexadecanoic acid | 35,02 | 90 | 8,36±0,12 | 7,6±0,11 |
| PhABMHE | Phthalic acid, butyl 6-methylhept-2-yl ester | 37,00 | 78 | 0,62±0,02 | nd |
| PhABTE | Phthalic acid, butyl tridec-2-yn-1-yl ester | 37,01 | 68 | nd | 0,7±0,03 |
| ODNA | Octadecanoic acid | 38,79 | 74 | 2,23±0,06 | 1,2±0,05 |
| SQ | Squalene | 48,80 | 72 | 1,40±0,03 | 1,0±0,04 |

Most of the volatile compounds, 19 out of 22, are produced by the consortium of lactic acid and propionic acid bacteria we created (sample S2), a little less, 14 out of 22 compounds form a consortium consisting only of lactic acid bacteria (sample S1) (Figure 1).

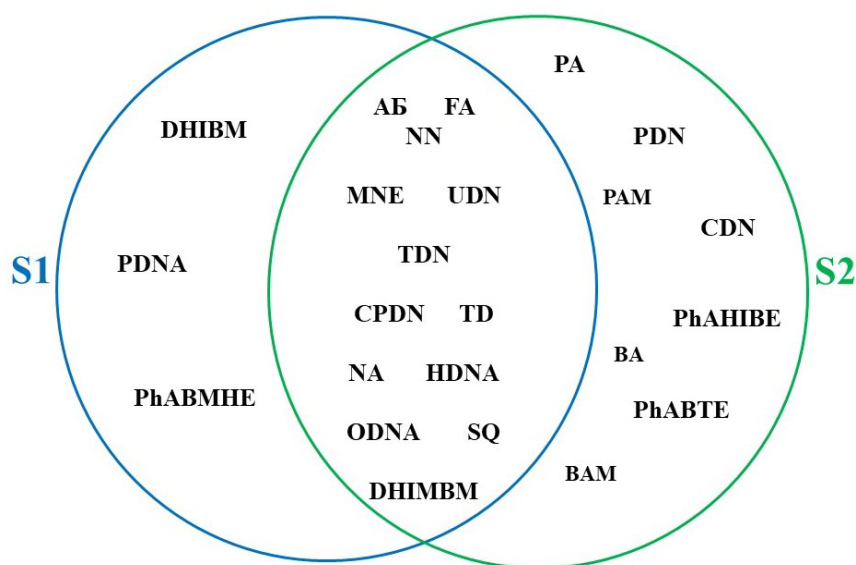


Figure 1 - The content of volatile substances in the samples of consortiums S1 and S2. See table 1 for compound abbreviation.

The detected volatile compounds were present in either significant or moderate or low concentrations, as shown in Figure 2, respectively.

The three most common compounds are mixed anhydride of acetic and formic acids; quinoline (2,3-benzopyridine) and palmitic (Figure 2) in sample S1 amounted to a total of 86.12%, and in sample S2 - 79.48% of the total amount of all detected antimicrobial volatile compounds. Their number varied depending on the strain composition of the studied consortium and ranged from 65.08% to 72.2% for acetic acid (acetic acid, anhydride with formic acid); 6.59 to 6.8% for quinoline 3,4-Dihydroisoquinoline, 1-[3-methoxybenzyl]-6-methoxy-; 7.6 to 8.36% for medium chain hexadecanoic acid (Figure 2A).

Thirteen other organic volatile compounds were present in intermediate moderate amounts and ranged from 1.0-3.9% of the total antimicrobial compounds (Figure 2B). Finally, 6 compounds from the groups of alkanes, ketones and ethers were present at lower concentrations (Figure 2C).

In general, as shown in Figure 2, medium chain saturated fatty acids were at higher concentrations in the culture broth of the consortium S1, consisting only of lactic acid bacteria(LAB). At the same time, pentadecanoic acid was found only in sample S1 (1.61%). But short-chain fatty acids - propionic acid or propionate (1.8%), isobutyric acid (1.97%), butyric acid

or butyrate (1.61%), isovaleric acid (1.68%) were present only in the sample S2 (consortium of LAB and propionic acid bacteria). The content of fatty alcohols also differed depending on the considered consortium. Thus, 2-Undecanol was determined in the culture liquids of both consortiums, however, its amount in sample S1 was 2 times higher than in sample S2. Whereas, Cyclodecanol was present only in sample S2, and in a rather significant amount - 3.9% (Figure 1, Figure 2B). The alkane pentadecane (PDN) was found only in sample S2.

Samples S1 and S2 also differ in the content of phthalic acid esters phthalic acid, butyl 6-methylhept-2-yl ester, was determined in sample S1; and in sample S2, phthalic acid, hept-4-yl isobutyl ester и phthalic acid, butyl tridec-2-yn-1-yl ester (Figure 1). It should be noted that the amount of these esters is very small and approximately the same in both consortiums - 0.5-0.7% (Figure 2 C), which could be due to the error of the method (contamination from vial caps). However, given the rather high probability of their identification (68-78%), their absence in the control and the low standard deviation, it was decided to take these ethers into account in the study.

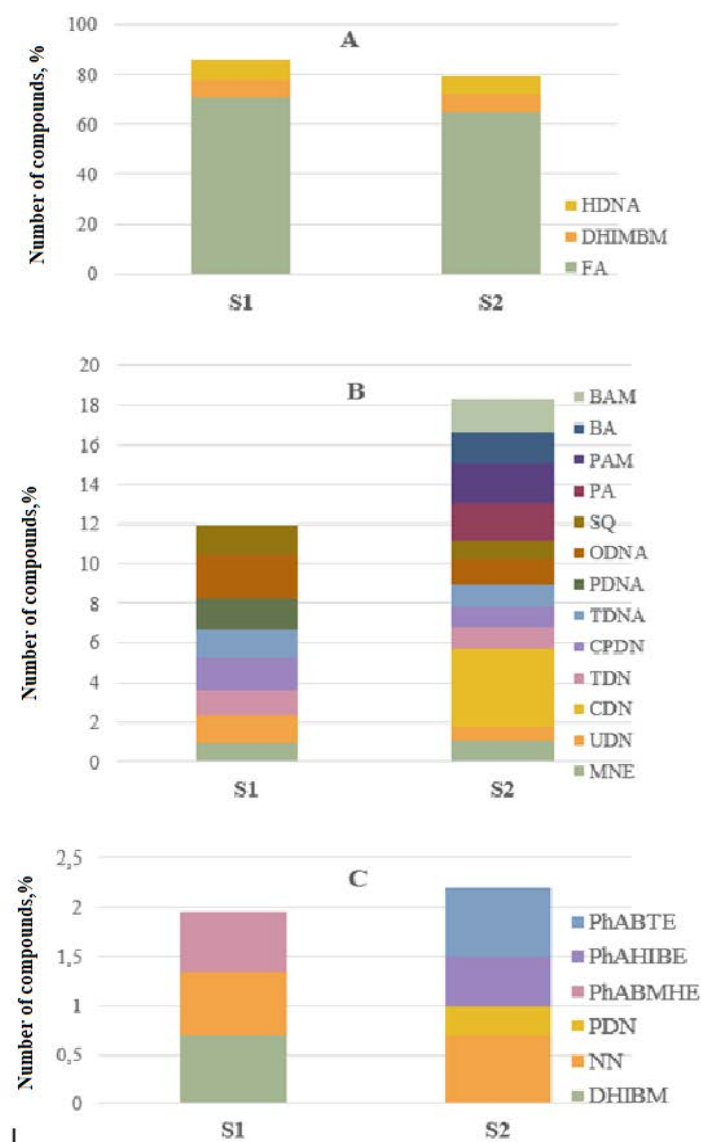


Figure 2 - Average concentrations of organic volatile compounds in%, formed by consortiums S1 and S2 in high concentrations - more than 6% for at least one compound in the sample (A), in average - from 1 to 4% for at least one compound in sample (B), in low - less than 1% for at least one compound in the sample (C). Abbreviations are given in Table 1.

The methyl ketones 2-Nonanone (NN), 2-Tridecanone (TDN) and cyclopentadecanone (CPDN), as well as squalene (SQ) are present in both samples in a moderate amount - 0.64-1.67% (Figure 2).

The presented experimental data indicate that the consortium of lactic acid and propionic acid bacteria selected by us produces a wider range of antimicrobial metabolites compared to the consortium consisting only of lactobacilli, and can reasonably serve as the basis for creating a probiotic preparation for valuable fish species in aquaculture.

References:

- 1 Hughes DT Sperandio V Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts *Nat Rev Microbiol* 2008 6 11120 (doi:10.1038/nrmicro1836)
- 2 Surette MG Davies J Winans SC Bassler BL A new look at secondary metabolites Chemical Communication Among Bacteria 2008 Washington, DC ASM Press 30722 (<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083244464>)
- 3 Schulz S Dickschat JS Bacterial volatiles: the smell of small organisms *Nat Prod Rep* 2007(doi: 10.1039/b507392h)
- 4 Kai M Hausteil M Molina Fet al. Bacterial volatiles and their action potential *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 81,2009, 1001–1012 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1760-3>)
- 5 Lemfack MC Nickel J Dunkel Met al. mVOC: a database of microbial volatiles *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue D1, 1 January 2014, Pages D744–D748, (<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250>)
- 6 Kai M Piechulla B Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens* *Plant Signal Behav.* 2010 Apr;5(4):444-6. (doi: 10.4161/psb.5.4.11340)
- 7 Ratiu IA, Ligor T, Bocos-Bintintan V, Buszewski B. Mass spectrometric techniques for the analysis of volatile organic compounds emitted from bacteria. *Bioanalysis.* 2017;9(14):1069–1092. (doi: 10.4155/bio-2017-0051).
- 8 Bos LD, Sterk PJ, Schultz MJ. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003311. doi: 10.1371/journal.ppat.1003311.
- 9 Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep.* 2007;24(4):814–842.(doi: 10.1039/b507392h).
- 10 O'Hara M, Mayhew CA. A preliminary comparison of volatile organic compounds in the headspace of cultures of *Staphylococcus aureus* grown in nutrient, dextrose and brain heart bovine broths measured using a proton transfer reaction mass spectrometer. *J Breath Res.* 2009;3(2):027001.(doi: 10.1088/1752-7155/3/2/027001).
- 11 Liebeke M, Dorries K, Meyer H, Lalk M. Metabolome analysis of gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* by GC-MS and LC-MS. *Methods Mol Biol.* 2012;815:377–398. (doi: 10.1007/978-1-61779-424-7_28).
- 11 Tait E, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Anal Chim Acta.* 2014;848:80–87. (doi: 10.1016/j.aca.2014.07.029).

FTAMP: 65.63.33

Х.Ж. АБДРЕШ¹, Э.К. АСЕМБАЕВА^{1*}, А.Е. РЯБОВА², К.А. МЫРЗАБЕК³,
З.Ж. СЕЙДАХМЕТОВА¹

¹Алматы технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

²Бүкілресейлік сүт өнеркәсібі ғылыми-зерттеу институты, Мәскеу, Ресей

³Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: elmiraasembaeva@mail.ru

АРАЛАС АШЫТУ ӨНІМДЕРІНІҢ САПА КӨРСЕТКІШТЕРІН ЗЕРТТЕУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.09

Түйін

Бұл мақалада аралас ашыту негізінде алынған сиыр мен ешкі сүттерінен әзірленген айран өнімдерінің органолептикалық, физика-химиялық және микробиологиялық көрсеткіштеріне, олардың құрамындағы суда еритін витаминдер мөлшерін анықтауға талдаулар жүргізілді. Дайын өнім үлгілері 12±2°C температурада ары қарай жетілу 12 сағат бойы ұсталады. Жетілу процесі кезіндегі айран өнімдерде түзілетін этил спиртінің, сүт қышқылының және көмірқышқыл газдарының мөлшері анықталды.

Аралас ашыту нәтижесінде алынған ашытылған сүт сусындары ерекше құнды болып табылады. Сүтқышқылды және спирттік ашу үрдісі кезінде лактоза мөлшері азайып, сүт қышқылы, этил спирті және көмірқышқыл газының мөлшері артады.

Алынған айран өнімдері сапасы жағынан дәстүрлі айраннан кем түспеді. Өнімдердегі қышқылдылық сақтау мерзімі соңында айранға арналған стандарттағы қышқылдық көрсеткішінен аспады. Осылайша, әдебиет деректерін және зерттеу нәтижелерін талдау алынған айран өнімдері ағзаның жалпы денсаулығына ықпал ететін өте маңызды пробиотикалық қасиеттері бар тағам өнімі болып табылады деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді.

Кілтті сөздер: аралас ашыту, айран өнімі, сүт қышқылы, этил спирті, көмірқышқыл газы, ашытқы, пробиотикалық микроорганизмдер.

Соңғы жылдары тұтынушылар арасында дәстүрлі аралас ашыту өнімдеріне ерекше қызығушылық туды. Микрофлораның әртүрлілігі ерекше дәм сипаттамалары және емдік-профилактикалық қасиеттері бұл өнімдерді танымал етеді. Құрамында пробиотикалық микроорганизмдер (бифидобактериялар, ацидофильді таяқшалар және басқа да микроорганизмдер) бар ашытылған сүт сусындарына тұрғындар арасында қызығушылық артады.

Бүкіл әлемде функционалды тамақ өнімдерін өндіру мен тұтынудың тұрақты үрдісі байқалады, олардың көпшілігі сүтқышқылды пробиотикалық өнімдер болып табылады. Құрамында микроорганизмдер мен микробтық заттар бар бұл өнімдер адам ағзасының микробиологиялық жағдайын оңтайландыру арқылы оның физиологиялық функциялары мен биохимиялық реакцияларына пайдалы әсер етеді. Технологиясында сүтқышқылды бактериялар, сүт ашытқылары қолданылатын аралас ашыту үрдісі жүретін биологиялық өнімдер дұрыс тамақтануды ұйымдастыру үшін өте қажет.

Сүтқышқылды сусындардың жаһандық нарығы тамақ өнеркәсібінің өсіп келе жатқан саласы болып табылады, өйткені бүгінгі тұтынушылар әл-ауқатты жақсартатын және ауру қаупін азайтатын өнімдерді белсенді түрде тұтынады. Атап айтқанда, функционалды тағамдар мен сусындардың жаһандық нарығы 2012 және 2018 жылдар арасында 1,5 есе өсті және 2018 және 2025 жылдар арасында тағы 22,8% өседі деп күтілуде, болжамды нарық көлемі 21,7 миллиард еуроны құрайды. Сүт өнімдері функционалды нарықтың шамамен 43% құрайды және ол негізінен сүтқышқылды сусындардан тұрады [1].

Аралас ашыту нәтижесінде алынған сүтқышқылды сусындардың ішінде дәстүрлі түрде айран көшбасшылықты сақтайды. Соңғы уақытта Еуропада, Жапонияда және

Америка Құрама Штаттарында кефирдың танымалдығы артып келеді, бұл оның дәлелденген пробиотикалық қасиеттеріне және айранның асқазан-ішек жолдарының кейбір ауруларына оң әсерін тигізуіне байланысты болуы мүмкін. Айран зәр шығару жүйесінің жұмысын қалыпқа келтіреді: диурезді арттырады, азот алмасуына әсер етеді, оның өнімдерінің шығарылуының жоғарылауына ықпал етеді, сонымен қатар ағзадан мочевиная, фосфаттар мен хлоридтерді ығыстырып шығарады [2].

Айран – бірегей табиғи ұйытқы – айран саңырауқұлақтарында дайындалған аралас сүтқышқылды мен спирттік ашыту үрдісінің өнімі. Айран тек дәмі мен сергітетін қасиетімен ғана бағаланбайды, сонымен қатар оның бүкіл ағзаға пайдасы үшін де бағаланады [3,4].

Айран саңырауқұлақтарында табиғи симбиозда әртүрлі микроорганизмдер түрлері кездеседі. Шын мәнінде, айран саңырауқұлақтары гетероферментативті микрофлораның симбиозы болып табылады: сүтқышқылды мезофильді стрептококктар, хош иіс түзетін стрептококктар (өзінің дамуы нәтижесінде олар хош иісті заттар түзеді), мезофильді және термофильді таяқшалар, сірке қышқылы бактериялары (тұтқыр ұйындының түзілуіне ықпал етеді) және ашытқылар (спирттік ашытуды қамтамасыз етеді).

Ашытқы тек спирттік ашуды ғана емес, сонымен қатар В тобының витаминдерін, туберкулез таяқшасының және басқа да патогенді микроорганизмдердің дамуын басуға қабілетті антибиотиктік заттарды шығарады. Ашытқылардың қалдықтары сүтқышқылды бактериялардың дамуын белсендіреді [5].

Айран ашытқысын алу үрдісі өте қиын және көп уақытты қажет етеді. Сондықтан көптеген кәсіпорындар табиғи ашытқыдан айран өндіруден бас тартып, заманауи – тікелей ашытқыларды пайдаланады. Бұл алынған ашытылған сүт өнімін айран деп атауға болмайды, ол айран өнімі болады. Айранды дәстүрлі технология бойынша сүтқышқылды микроорганизмдердің таза дақылдарын және ашытқыларды қоспай, айран саңырауқұлақтарында дайындалған өнім деп атауға болады [6].

Сүт өнеркәсібі негізінен сиыр сүтін және оның негізінде дайындалған өнімдерді шығарады. Бүгінгі таңда сүт өнімдерінің ішкі нарығы қарқынды дамып келеді. Қазіргі кезде ерекше зат алмасу және физиологиялық ерекшеліктері бар ешкі сүті өнімдерін өндіру өсуде [7]. Сондықтан нарықта ешкі сүтінен дайындалған өнімдерді көбейту өзекті мәселе болып табылады.

Зерттеу жұмысының мақсаты аралас ашыту негізінде алынған сиыр және ешкі сүттерінен дайындалған айран өнімдерінің сапалық көрсеткіштерін зерттеу болып табылады.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу нысаны ретінде алынған айран өнімдерін әзірлеу үшін Жамбыл облысы Шу ауданы Көкқайнар ауылында орналасқан «Қаршыға» жеке шаруа қожалығында өсіріліп жатқан сиыр және ешкі сүттері алынды. Қожалықта өсіріліп жатқан малдар үнемі ветеринариялық-зоотехникалық бақылауда.

Ұйытқы ретінде коммерциялық ұйытқы «Vivo Кефир» пайдаланылды, оның құрамында: айран ашытқысы, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *Lactococcus lactis ssp. Lactis* бар.

Сүтті ашыту технологиялары өндірушінің ұсыныстарына сәйкес жүргізілді. Зерттеу нысаны ретінде 2 үлгі алынды:

Үлгі №1 – сиыр сүтінен әзірленген айран өнімі;

Үлгі №2 – ешкі сүтінен әзірленген айран өнімі.

Зерттеуге алынған айран өнімдері үлгілеріне талдау жұмыстары Алматы технологиялық университетінің «Тағамдық биотехнология» және «Тамақ қауіпсіздігі» ғылыми зерттеу институтының зертханаларында жүргізілді.

Айран өнімдері үлгілерінің органолептикалық көрсеткіштері «МЕМСТ 31454-2012 Айран. Техникалық талаптар» бойынша анықталды [8].

Титрлеу қышқылдығы МЕМСТ 3624-92 [9] бойынша Тернер градусымен көрсетілген фенолфталеинмен 0,1 н NaOH ерітіндісімен титрлеу арқылы анықталды.

Көмірқышқыл газының (CO₂) болуы. CO₂ анықтау үшін диаметрі 15 мм пробиркаға 20 мл өнімді құйып, деңгейін белгілеп, салқын суы бар су моншасына салып, судың температурасын біртіндеп 90 °C дейін жеткізіп, содан кейін пробирканы алып, ұйынды деңгейін белгілеу керек (егер өнімде CO₂ болса, онда ұйынды губка тәрізді болады және сарысудан 6 мм-ден 20-30 мм немесе одан жоғары көтеріледі).

Этил спиртінің мөлшері МЕМСТ 3629-47 бойынша пикнометриялық әдіспен анықталды (№1 өзгертулермен) [10].

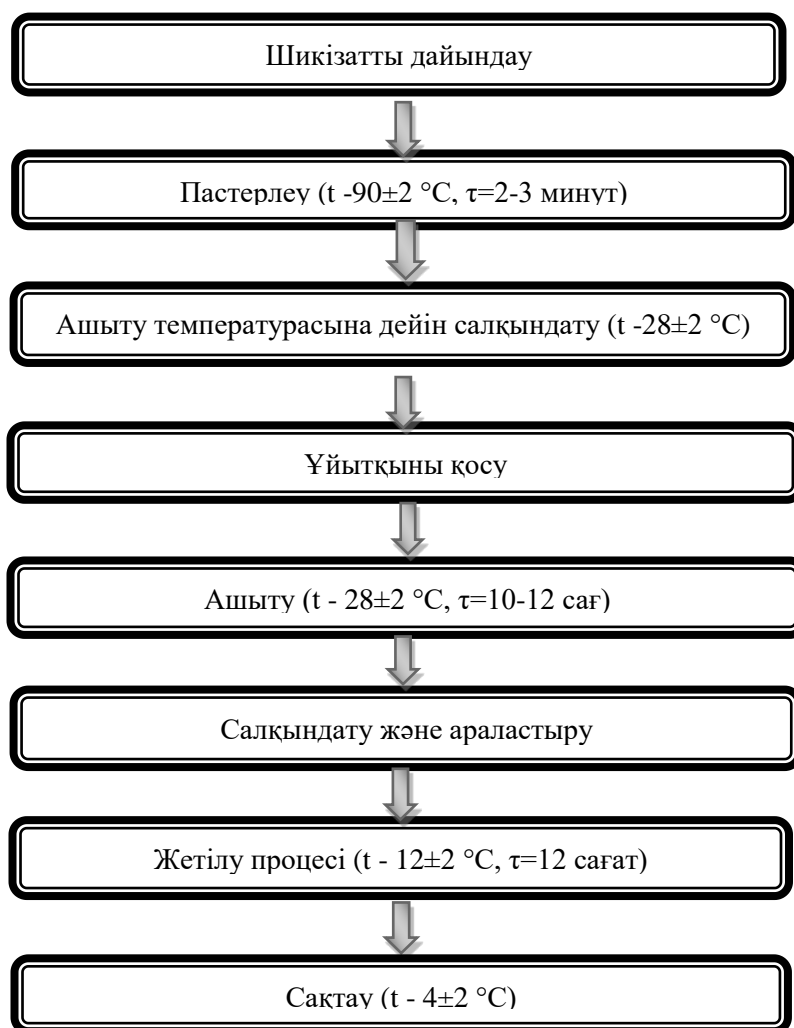
Суда еритін витаминдер «Капель-105» капиллярлық электрофорез жүйесін пайдалана отырып анықталды.

Айран өнімдерінің микробиологиялық көрсеткіштеріне МЕМСТ бойынша талдаулар жүргізілді [11-15].

Тәжірибелер 5-7 рет қайталана отырып орындалды. Кестелер мен суреттер зерттелген айран өнімі үлгілерінің физика-химиялық, микробиологиялық көрсеткіштерінің орташа арифметикалық мәндерін көрсетеді.

Зерттеу нәтижелері және оны талдау

Зертхана жағдайында ашытылған кефир өнімдерінің жалпы технологиясы (сурет 1).



Сурет 1 – Айран өнімін алу технологиясы

Айран өнімі алынатын сүтке белгілі талаптар қойылады. Органолептикалық және физика-химиялық сапа көрсеткіштері бойынша ол стандартқа [16,17] сәйкес болуы керек. Сапа бойынша таңдалған сүт үлгілері 90 ± 2 °С температурада, 2-3 минут пастерленеді. Содан кейін 28 ± 2 °С температураға дейін салқындатылып ұйытқы қосылады. Ұйытқыны қосқаннан кейін қоспаны 10 минут бойы мұқият араластырылады және 28 ± 2 °С температурада 10-12 сағат ашытылады. Содан кейін алынған ұйынды 12 ± 2 °С температурада ары қарай жетілу процесі жүруі үшін ұсталады. Бұл уақытта ашытқылардың дамуы белсендіріледі, нәтижесінде өнімде спирт, көмірқышқыл газы және басқа заттар жиналып, сусынға ерекше қасиеттер береді. Содан кейін өнім қолданыстағы техникалық шарттар талаптарына сәйкес араласады және 4 ± 2 °С температурада сақталады.

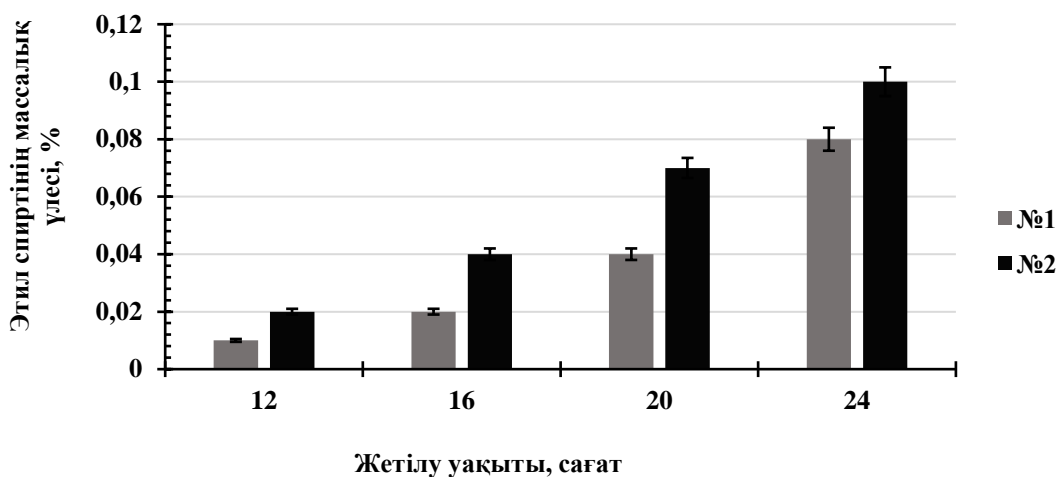
Органолептикалық талдау – өнімнің қасиеттерін адамның сезім мүшелері арқылы сапалық және сандық бағалау. Қабылдау көру, сипап сезу, иіс және дәм сезу мүшелерінің көмегімен жүзеге асады. Органолептикалық бағалау арқылы өнімнің тағамдық құндылығы және ішінара қауіпсіздігі туралы алғашқы түсінік алуға болады. Ашыған сүт өнімдерінің жаңа түрін шығару үшін олардың органолептикалық және физика-химиялық көрсеткіштерін бағалау арқылы тәжірибелік үлгілердің сапасын салыстырмалы зерттеу арқылы бағалау жүргізіледі, нәтижесі төмендегі 1-кестеде көрсетілген.

Кесте 1 – Айран өнімі үлгілерінің салыстырмалы көрсеткіштері

| Өнім түрі | Дайындау уақыты, сағат | Қышқылдығы, °Т | Органолептикалық көрсеткіштері | | | Сақтау уақыты, тәулік |
|----------------------------------|------------------------|----------------|---|--|------------------------|-----------------------|
| | | | Дәмі мен иісі | Консистенциясы және сыртқы түрі | Түсі | |
| Сиыр сүтінен алынған айран өнімі | 10-12 | 94 | Сүтқышқылды, жағымды, бөтен дәмі мен иісі жоқ | Ұйынды бұзылмаған, аз мөлшерде газ көпіршіктері бар, консистенциясы біртекті. Сарысу шамалы бөлінген | Аздап сарғыш, біркелкі | 7 |
| Ешкі сүтінен алынған айран өнімі | 10-12 | 101 | Аздап ашытқы дәмі, ешкі сүтіне тән иісі бар | Аздаған көпіршіктері бар, жақсы бұзылмаған ұйынды, консистенциясы біртекті | Сүттей ақ, біркелкі | 5 |

Айран өнімдерінің үлгілері жағымды сергітетін сүтқышқылды, сәл ашытқы дәмі мен иісі бар, біртекті консистенцияға ие болды. Дәм мен иістің бұлай сезілуі айран өнімдеріндегі сүтқышқылды бактериялар мен ашытқылардың тіршілік әрекетінің өнімдері болып табылатын сүт қышқылдының, спирттің, көмірқышқыл газының және басқа заттардың болуына байланысты.

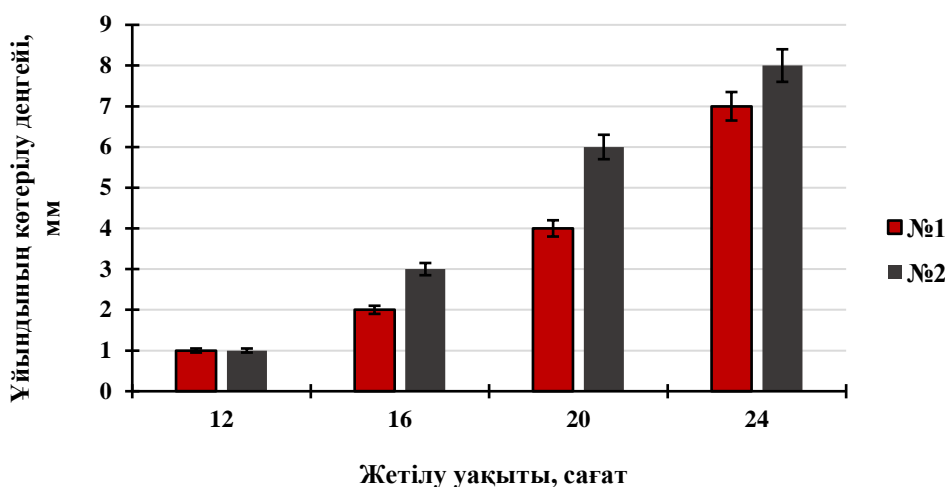
Айранға тән органолептикалық қасиеттер спирттік ашу нәтижесінде қалыптасады, сондықтан келесі кезеңде айран өнімдерінің жетілуі кезіндегі спирттік ашу динамикасына әсері зерттелді. Ферментациядан кейін айран өнімі үлгілері жетілу үшін 12 ± 2 °С температурада 12 сағат бойы ұсталды. Жетілу процесінде ашытқылардың біртіндеп көбеюі және микроорганизмдердің зат алмасу өнімдерінің жинақталуы орын алды. Жетілу процесі соңында титрлеу қышқылдығы 110-120 °Т болды. Айран өнімдерінің жетілу процесі кезіндегі спирттің түзілу динамикасы төменде көрсетілген (2-сурет).



Сурет 2 – Спирт түзілу динамикасы (№1 – сыыр сүтінен әзірленген айран өнімі; №2 – ешкі сүтінен әзірленген айран өнімі)

2-суретте жетілу процесі кезінде ашытқылардың көбеюі нәтижесінде спирттік ашу жүретіні көрсетілген. Сонымен бірге жетілу процесі кезінде зерттеу үлгілерінің құрамындағы спирт мөлшері біртіндеп артып, 24 сағаттан кейін сыыр сүтінен алынған айран өнімінде этил спиртінің массалық үлесі – 0,08%, ешкі сүтінен алынған айран өнімінде – 0,1% жетеді.

Ферментация динамикасын одан әрі зерттеу өнімде спирттің жиналуымен бір мезгілде көмірқышқыл газының мөлшері жоғарылайтынын көрсетті (3-сурет).



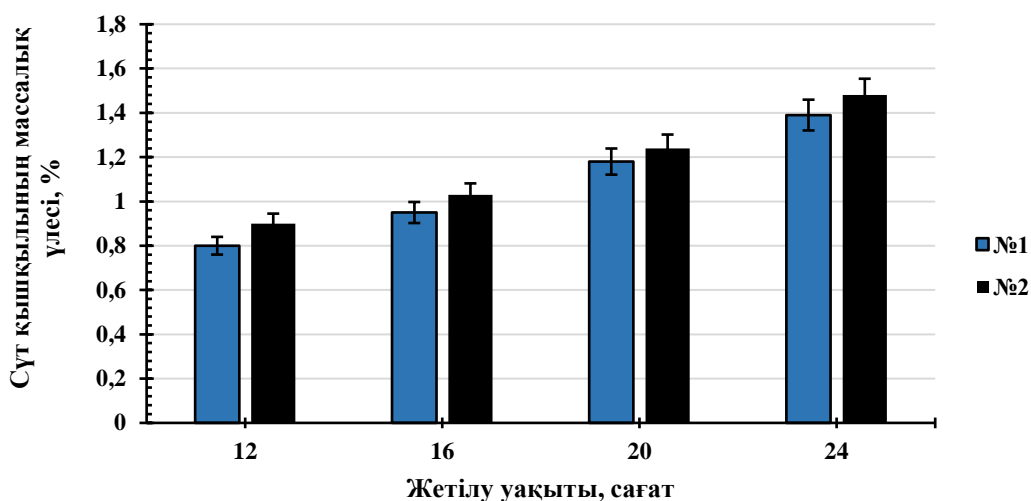
Сурет 3 – Газдың пайда болу динамикасы (№1 – сыыр сүтінен әзірленген айран өнімі; №2 – ешкі сүтінен әзірленген айран өнімі)

24 сағаттан кейін ұйындының көтерілу деңгейі №1 үлгіде 7 мм, №2 үлгіде 8 мм болды, яғни ферментация процесінде көмірқышқыл газының бөлінетіндігін көрсетті.

Сүт қышқылы бактерияларының дамуы лактозаның одан әрі ашытуына және сүт қышқылының түзілуіне әкеледі. Сүт қышқылы жинақталған сайын өнімдердің титрлеу қышқылдығы өзгереді. Жиналған сүт қышқылы газ түзетін, май және басқа да жағымсыз бактериялардың дамуын тежейтінін атап өткен жөн. Сүт қышқылы сусынға белгілі бір дәм беріп қана қоймайды, сонымен қатар оның диеталық және профилактикалық қасиеттерін анықтайды, ішек жолындағы ас қорыту ферменттерінің босатылуын белсендіреді және

олардың әрекетін күшейтеді. Ол сондай-ақ ағзаның фосфор, кальций, темір және D витаминінің сіңуін жақсартады.

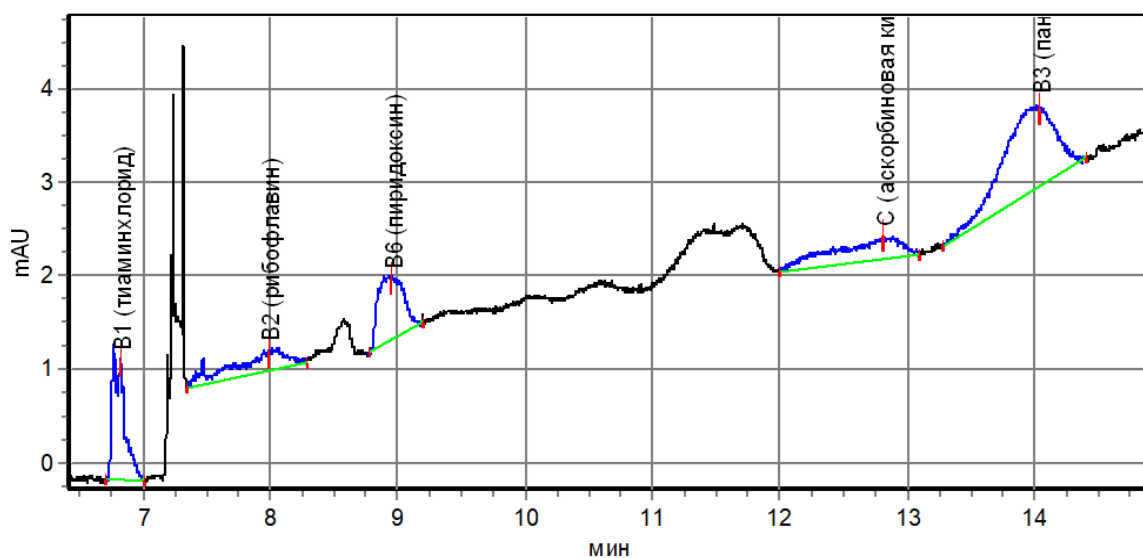
Жұмыстың барысында зерттелетін айран өнімдері үлгілерінің құрамындағы сүт қышқылының массалық үлесі анықталды, нәтижесі төмендегі 4-суретте келтірілген.



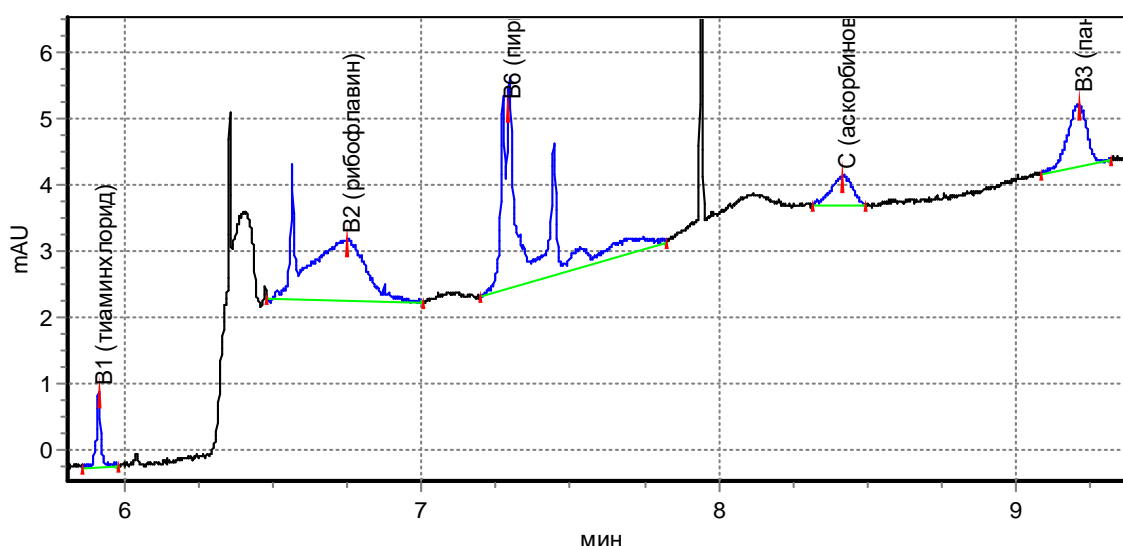
Сурет 4 – Сүт қышқылының массалық үлесі (№1 – сыыр сүтінен әзірленген айран өнімі; №2 – ешкі сүтінен әзірленген айран өнімі)

Зерттеу нәтижелерінен жетілу процесі кезінде уақыт өткен сайын бөлінетін сүт қышқылының массалық үлесі жоғарлайтынын көрсетті, 24 сағаттан кейін №1 үлгіде 1,39%, №2 үлгіде 1,48 % болды.

Зерттеу барысында сыыр және ешкі сүттерінен әзірленген кефир өнімі үлгілерінің құрамындағы суда еритін витаминдерге талдау жүргізілді, нәтижелері төмендегі 5,6-суреттерде және 2-кестеде келтірілген.



Сурет 5 – Сыыр сүтінен әзірленген кефир өнімінің құрамындағы суда еритін витаминдердің типтік хроматограммасы



Сурет 6 – Ешкі сүтінен әзірленген кефир өнімінің құрамындағы суда еритін витаминдердің типтік хроматограммасы

Кесте 2 – Айран өнімдеріндегі суда еритін витаминдер мөлшері

| Витаминдер | Үлгі №1 | Үлгі №2 |
|-----------------------------------|-------------|-------------|
| B ₁ (тиамин) | 0,033±0,007 | 0,047±0,009 |
| B ₂ (рибофлавин) | 0,02±0,008 | 0,42±0,176 |
| B ₃ (пантатен қышқылы) | 0,20±0,040 | 0,33±0,066 |
| B ₆ (пиридоксин) | 0,021±0,001 | 0,35±0,07 |
| C (аскорбин қышқылы) | 0,16±0,054 | 0,42±0,143 |

2-кестедегі ұсынылған деректерге сүйене отырып, айран өнімдері үлгілеріндегі С және В тобы витаминдерінің мөлшері оның жоғары емдік-профилактикалық қасиеттерін растайды деп қорытынды жасауға болады. Өнімдердің құрамында адам ағзасындағы биохимиялық және физиологиялық үрдістердің қалыпты жүруін қамтамасыз ететін витаминдердің (С, В тобы) көп мөлшері бар екені анықталды. Ешкі сүтінен әзірленген айран өнімінде сиыр сүтінен дайындалған айран өніміне қарағанда витаминдердің мөлшері жоғары болатынын көруге болады.

Зерттеу барысында айран өнімдері үлгілеріне микробиологиялық талдаулар жүргізілді. Айран өнімдеріндегі тіршілікке қабілетті сүтқышқылды бактериялардың саны анықталды, олар кемінде $1 \cdot 10^7$ КТБ/см³, ашытқыда – кемінде $1 \cdot 10^4$ КТБ/см³ болуы керек. Микробиологиялық талдау нәтижелері төмендегі 3-кестеде келтірілген.

Кесте 3 – Айран өнімдерінің микробиологиялық көрсеткіштері

| Микробиологиялық көрсеткіштер | НҚ бойынша | Үлгі №1 | Үлгі №2 |
|---|----------------|------------------|------------------|
| Сүтқышқылды бактериялар, КТБ/см ³ , кем емес | $1 \cdot 10^7$ | $3,8 \cdot 10^8$ | $2,4 \cdot 10^7$ |
| Ашытқылар, КТБ/ см ³ , кем емес | $1 \cdot 10^4$ | $1,2 \cdot 10^5$ | $2,3 \cdot 10^5$ |

Кестедегі келтірілген талдау нәтижелерінен сиыр сүтінен әзірленген айран өнімінде сүтқышқылды бактериялар саны – $3,8 \cdot 10^8$ КТБ/см³ болса, ешкі сүтінен алған айран өнімінде – $2,4 \cdot 10^7$ КТБ/см³; ал ашытқы мөлшері сәйкесінше $1,2 \cdot 10^5$ және $2,3 \cdot 10^5$ КТБ/см³ болғанын көрсетті.

Бүкіл сақтау мерзімі ішінде сүтқышқылды бактериялар мен ашытқылардың жалпы саны аздап өзгереді, ал жарамдылық мерзімінің соңында ол ашытудың аралас түрі бар сүтқышқылды сусындардың нормасына сәйкес келеді.

Қорытынды

Алынған айран өнімдері сапасы жағынан дәстүрлі айраннан кем түспейді. Өнімдердегі қышқылдылық мерзім соңында айранға арналған стандарттағы қышқылдық көрсеткішінен аспады. Айран өнімдерінің жетілуі кезінде сапасына тікелей әсер ететін факторлар анықталды. Осылайша, әдебиет деректерін және зерттеу нәтижелерін талдау алынған айран өнімдері ағзаның жалпы денсаулығына ықпал ететін өте маңызды пробиотикалық тағам өнімі болып табылады деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді.

Әдебиеттер:

- 1 Калинина И.В., Ботвинникова В.В., Зотова Н.А., Фаткуллин Р.И., Науменко Е.Е. Формирование пищевой системы молочного продукта смешанного брожения, обогащенного дигидрокверцетином. Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии», 2020, 8(2): 46-55. (doi: 10.14529/food200206)
- 2 Дьяченко А.Н. Оценка качества кефира. Достижения науки и образования, 2017, 18(5): 9-12. (<https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-kachestva-kefira-1>)
- 3 Анисимов С.В., Гришина А.С., Папина М.В. Кефир вкусный, полезный, лечебный молочный комбинат «Ставропольский». Молочная промышленность, 2009, 7:75.
- 4 Гаврилова Н.Н., Баркова М.В., Хилкова Н.Л. О кефире и его пользе. Сетевой научный журнал ОрелГАУ, 2014, 3(2): 3-4. (<https://cyberleninka.ru/article/n/o-kefire-i-ego-polze>)
- 5 Калмакова Т.С., Белик С.Н., Чистяков В.А., Моргуль Е.В., Чистякова И.Б. Характеристика кефира как ценного пробиотического продукта и его биологических свойств. Медицинский вестник Юга России, 2014, 3: 36-42. (<https://cyberleninka.ru/article/n/harakteristika-kefira-kak-tsennogo-probioticheskogo-produktai-ego-biologicheskikh-svoystv>).
- 6 Харитонов В.Д., Рожкова И.В., Семенихина В.Ф. Почему кефирный напиток не может называться кефиром. Молочная промышленность, 2011, 11: 44.
- 7 Карнаухова И.В., Ширяева О.Ю. Качественный состав и свойства молока зааненской породы коз. Известия ОГАУ, 2016 61(5): 164-167. (<https://cyberleninka.ru/article/n/kachestvennyy-sostav-i-svoystva-moloka-zaanenskoj-porody-koz>)
- 8 ГОСТ 31454-2012 Кефир. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2019. – 8с.
- 9 ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – М.:Изд-во стандартов, 2001. – 10 с.
- 10 ГОСТ 3629-47. Молочные продукты. Метод определения спирта (алкоголя). – М.: Стандартинформ, 2009. - 4с.
- 11 ГОСТ 10444.11-89. Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М.: Изд-во стандартов, 1990. – 18 с.
- 12 ГОСТ 33566-2015 Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов. – М.: Стандартиформ, 2016. – 16 с.
- 13 ГОСТ 30347-2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*. – М.: Стандартинформ, 2016. – 16 с.
- 14 ГОСТ 30519-97 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2001. – 13 с.
- 15 ГОСТ 31747-2012. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (кооформных бактерий). – М.: Стандартинформ, 2013. – 20 с.
- 16 ГОСТ 32940-2014. Молоко козье сырое. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2019. – 9 с.
- 17 ГОСТ 31449-2013. Молоко коровье сырое. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2019. – 9 с.

Х.Ж. АБДРЕШ¹, Э.К. АСЕМБАЕВА^{1*}, А.Е. РЯБОВА², К.А. МЫРЗАБЕК³,
З.Ж. СЕЙДАХМЕТОВА¹

¹ Алматинский технологический университет, Алматы, Казахстан

²Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности,
Москва, Россия

³ Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан
*e-mail: elmiraasembayeva@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ПРОДУКТОВ СМЕШАННОГО БРОЖЕНИЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.09

Аннотация

В данной статье проведен анализ органолептических, физико-химических и микробиологических показателей, определения содержания водорастворимых витаминов кефирных продуктов, полученных на основе смешанного брожения из коровьего и козьего молока. Образцы готового продукта выдерживают при температуре 12 ± 2 °С для дальнейшего созревания в течение 12 часов. Определено количество этилового спирта, молочной кислоты и углекислого газа, образующихся в кефирных продуктах при созревании.

Особую ценность представляют кисломолочные напитки, полученные в результате смешанного брожения. В процессе молочнокислого и спиртового брожения количество лактозы уменьшается, а количество молочной кислоты, этилового спирта и углекислого газа увеличивается.

Полученные кефирные продукты по качеству не уступали традиционным кефирам. Кислотность в продуктах не превышала показатель кислотности в стандарте для кефира в конце срока хранения. Таким образом, анализ литературных данных и результатов исследований позволяет сделать вывод о том, что полученные кефирные продукты являются пищевым продуктом с очень важными пробиотическими свойствами, способствующими общему здоровью организма.

Ключевые слова: смешанное брожение, кефирный продукт, молочная кислота, этиловый спирт, углекислый газ, дрожжи, пробиотические микроорганизмы.

IRSTI: 65.63.33

Kh. Zh. ABDRESH¹, E.K. ASSEMBAYEVA^{1*}, A.E. RYABOVA²
K.A. MYRZABEK³, Z.Zh. SEIDAKHMETOVA¹

¹Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan

²All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia

³Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan
*e-mail: elmiraasembayeva@mail.ru

INVESTIGATION OF QUALITY INDICATORS OF MIXED FERMENTATION PRODUCTS

doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.09

Abstract

This article analyzes organoleptic, physical-chemical and microbiological indicators, determines the content of water-soluble vitamins in kefir products obtained on the basis of mixed fermentation from cow's and goat's milk. Samples of the finished product are kept at a temperature of 12 ± 2 °C for further maturation for 12 hours. The amount of ethyl alcohol, lactic acid and carbon dioxide formed in kefir products during maturation was determined.

Fermented milk drinks obtained as a result of mixed fermentation turns out to be particularly valuable. In the process of lactic acid and alcoholic fermentation, the amount of lactose decreases, and the amount of lactic acid, ethyl alcohol and carbon dioxide increases.

The resulting kefir products were not inferior in quality to traditional kefir. The acidity in the products did not exceed the acidity standard for kefir at the end of the shelf life. Thus, the analysis of literature data and research results allows us to conclude that the obtained kefir products are a food product with very important probiotic properties that contribute to the overall health of the body.

Keywords: mixed fermentation, kefir product, lactic acid, ethyl alcohol, carbon dioxide, yeast, probiotic microorganisms.

In recent years, there has been a special interest among consumers in traditional mixed opening products. The variety of microflora, special taste characteristics and therapeutic and preventive properties make these products popular. Interest in fermented milk drinks containing probiotic microorganisms (bifidobacteria, acidophilic bacilli and other microorganisms) is growing among the population.

Worldwide, there is a steady trend in the production and consumption of functional food products, most of which are lactic acid probiotic products. These products, containing microorganisms and microbial substances, have a beneficial effect on the physiological functions and biochemical reactions of the human body by optimizing its microbiological condition. Biological products with a mixed fermentation process, which use both lactic acid bacteria and yeast, are essential for proper nutrition.

The global lactic acid beverage market is a growing sector of the food industry as today's consumers actively consume products that improve well-being and reduce the risk of disease. In particular, the global market for functional foods and beverages grew 1.5 times between 2012 and 2018 and is expected to grow another 22.8% between 2018 and 2025, with a forecast market size of €1.7 billion. Dairy products make up about 43% of the functional market and it mainly consists of lactic acid drinks [1].

Among the lactic acid drinks obtained as a result of mixed fermentation, kefir traditionally retains leadership. Recently, the popularity of kefir has been increasing in Europe, Japan and the United States, which may be due to its proven probiotic properties and the positive effect of kefir on some diseases of the gastrointestinal tract. Kefir normalizes the work of the urinary system: it increases diuresis, affects nitrogen metabolism, contributes to an increase in the release of its products, and also removes urea, phosphates and chlorides from the body [2].

Kefir is a unique natural yeast – a product of the mixed lactic acid and alcoholic fermentation process prepared in kefir mushrooms. Kefir is valued not only for its taste and refreshing properties, but also for its benefits for the whole body [3,4].

Different types of microorganisms are found in natural symbiosis in kefir mushrooms. In fact, kefir mushrooms are a symbiosis of heterofermentative microflora: lactic acid mesophilic streptococci, aroma-producing streptococci (as a result of their development, they produce aromatic substances), mesophilic and thermophilic bacilli, acetic acid bacteria (contribute to the formation of viscous sludge) and yeasts (produce alcoholic fermentation provides).

Yeast produces not only alcohol fermentation, but also vitamins of group B, antibiotic substances capable of suppressing the development of tuberculosis bacilli and other pathogenic microorganisms. Yeast residues activate the development of lactic acid bacteria [5].

The process of obtaining kefir yeast is very difficult and takes a lot of time. Therefore, many enterprises refuse to produce kefir from natural yeast and use modern - live yeast. This resulting fermented milk product cannot be called kefir, it is a kefir product. Kefir can be called a product prepared in kefir mushrooms according to traditional technology without adding pure cultures of lactic acid microorganisms and yeast [6].

The dairy industry mainly produces cow's milk and products based on it. Today, the domestic market of dairy products is developing rapidly. Currently, the production of goat milk products with special metabolic and physiological characteristics is increasing [7]. Therefore, it is important to increase the number of goat milk products on the market.

The purpose of the research work is to study the quality indicators of kefir products made from cow's and goat's milk obtained on the basis of mixed fermentation.

Materials and methods

For the development of kefir products obtained as a research object, cow and goat's milk grown at the private farm «Karshaga» located in the village of Kokkainar, Shu district, Zhambyl region, was taken. The animals raised in the farm are always under veterinary and zootechnical control.

Commercial yeast «Vivo Kefir» was used as yeast, which, according to labeling data, contains: kefir yeast, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *Lactococcus lactis ssp. Lactis*.

Milk fermentation technologies were carried out according to the manufacturer's recommendations. 2 samples were taken as research object:

Sample №1 – is a kefir product made from cow's milk;

Sample №2 – is a kefir product made from goat's milk.

Analysis of kefir product samples taken for research was carried out by the scientific research institute «Food Biotechnology» and «Food Safety» of Almaty Technological University.

Organoleptic indicators of samples of kefir products were determined by «MEMST 31454-2012 Kefir. Technical requirements» [8].

Titration acidity was determined by titration with 0.1N NaOH solution with phenolphthalein expressed in degrees Turner according to GOST 3624-92 [9].

Presence of carbon dioxide (CO₂). To determine CO₂, pour 20 ml of the product into a test tube with a diameter of 15 mm, mark the level, put it in a water bath with cold water, gradually bring the temperature of the water to 90°C, then remove the test tube and mark the level of the sediment (if the product contains CO₂, then the sediment is spongy and rises from 6 mm of serum to 20-30 mm or more).

The amount of ethyl alcohol was determined by the pycnometric method according to GOST 3629-47 (with changes №1) [10].

Water-soluble vitamins were determined using the Capel-105 capillary electrophoresis system. Microbiological indicators of kefir products were analyzed according to GOST [11-15].

The experiments were repeated 5-7 times. Tables and figures show average arithmetical values of physico-chemical, microbiological indicators of studied kefir product samples.

Research results and analysis

The general technology of kefir products fermented under laboratory conditions is shown in Figure 1 below.

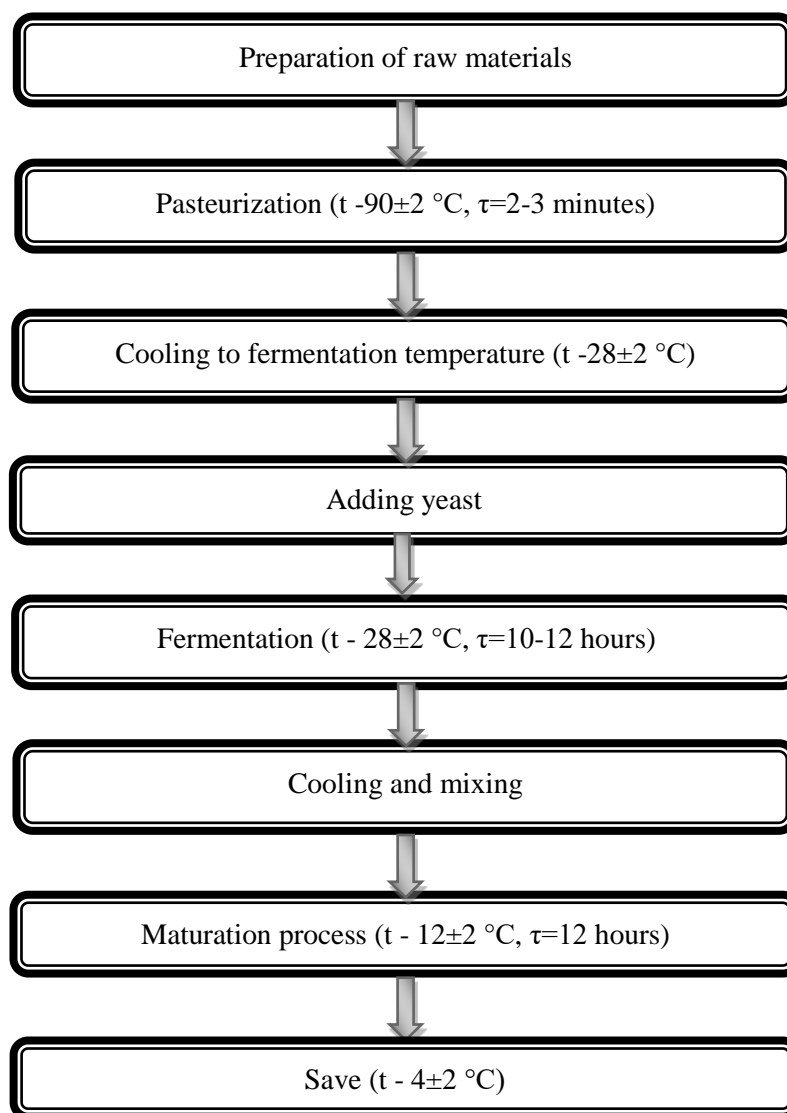


Figure 1 – Kefir production technology

There are certain requirements for milk from which kefir products are obtained. According to organoleptic and physico-chemical quality indicators, it should comply with the standard [16,17]. Milk samples selected by quality are pasteurized at a temperature of 90 ± 2 °C for 2-3 minutes.

Then it is cooled to a temperature of 28 ± 2 °C and yeast is added. After adding the yeast, the mixture is thoroughly mixed for 10 minutes and fermented for 10-12 hours at a temperature of 28 ± 2 °C. Then the resulting clot is kept at a temperature of 12 ± 2 °C so that the process of further maturation takes place. At this time, yeast development is activated, as a result of which alcohol, carbon dioxide and othersubstances accumulate in the product, giving the drink special properties. Then the product is mixed according to the requirements of the current specifications and stored at a temperature of 4 ± 2 °C.

Organoleptic analysis is a qualitative and quantitative evaluation of product properties by human senses. Perception takes place with the help of the senses of sight, touch, smell and taste. Through organoleptic assessment, you can get a first idea about the nutritional value and partial safety of the product. In order to produce a new type of fermented milk products, the evaluation of the quality of experimental samples is carried out by evaluating their organoleptic and physico-chemical indicators, the results of which are shown in Table 1 below.

Table 1 – Comparative indicators of kefir product samples

| Product type | Cooking time, hours | Acidity, °T | Organoleptic indications | | | Storage time, day |
|-------------------------------|---------------------|-------------|--|--|-----------------------------|-------------------|
| | | | Taste and smell | Консистенциясы және сыртқы түрі | Color | |
| Kefir product from cow's milk | 10-12 | 94 | Lactic acid, pleasant, without foreign taste and smell | The clot is intact, with a small amount of gas bubbles, the consistency is homogeneous. The serum is slightly separated. | Slightly yellowish, uniform | 7 |
| Kefir product from goat milk | 10-12 | 101 | There is a slight yeast taste, a characteristic smell of goat milk | A good intact clot with a small number of bubbles, the consistency is homogeneous. | Milky white, uniform | 5 |

Samples of kefir products had a homogeneous consistency with a pleasant refreshing lactic acid, slightly yeasty taste and smell. This sense of taste and smell is due to the presence of lactic acid, alcohol, carbon dioxide and other substances, which are the products of the activity of lactic acid bacteria and yeast in kefir products.

The organoleptic properties of kefir are formed as a result of alcohol fermentation, therefore, the effect on the dynamics of alcohol fermentation during maturation process of kefir products was studied at the next stage. After fermentation, kefir product samples were kept for 12 hours at 12±2 °C for maturation. In the process of maturation, a gradual increase of yeasts and accumulation of metabolic products of microorganisms took place. At the end of maturation process, titration acidity was 110-120 °T. The dynamics of alcohol formation during maturation process of kefir products is shown below (Figure 2).

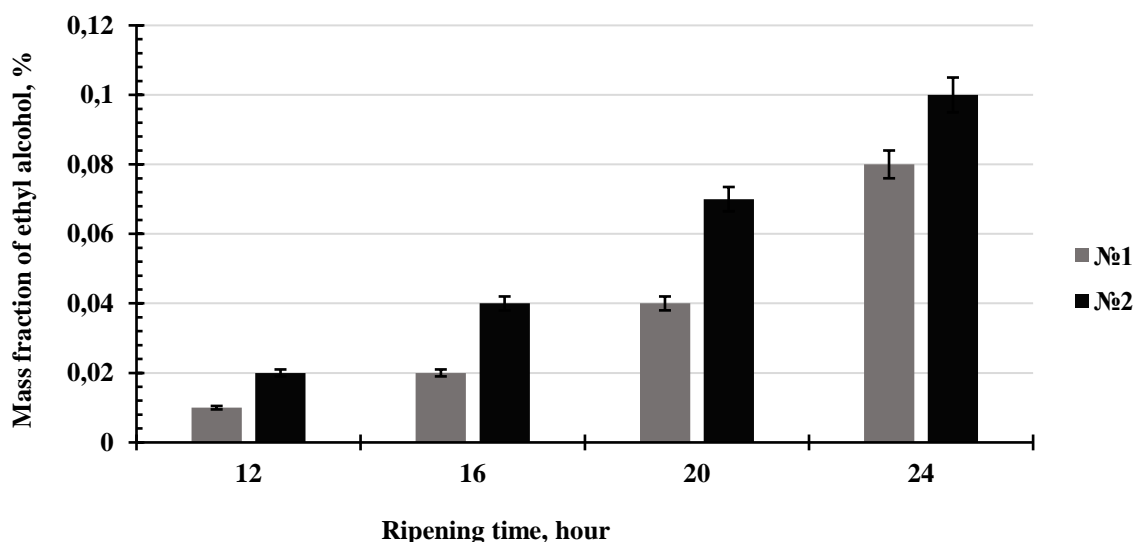


Figure 2 – Dynamics of alcohol formation (№1 – kefir product made from cow's milk; №2 – kefir product made from goat's milk)

Figure 2 shows that fermentation takes place as a result of yeast growth during maturation. At the same time, during maturation, the alcohol content of the research samples gradually increases, and after 24 hours, the mass fraction of ethyl alcohol in the kefir product obtained from cow's milk reaches 0.08%, and in the kefir product obtained from goat's milk reaches 0.1%.

Further study of the dynamics of fermentation showed that the amount of carbon dioxide increases simultaneously with the accumulation of alcohol in the product (Figure 3).

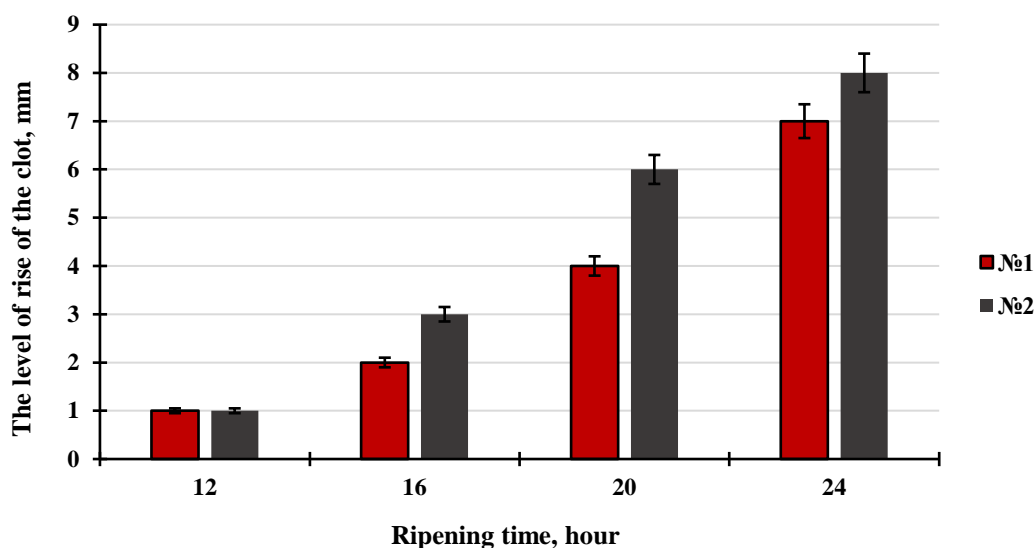


Figure 3 – Dynamics of gas formation (№1 – kefir product made from cow's milk; №2 – kefir product made from goat's milk)

After 24 hours, the level of sedimentation was 7 mm in sample №1 and 8 mm in sample №2, thus indicates the release of carbon dioxide during the fermentation process.

The development of lactic acid bacteria leads to further fermentation of lactose and the formation of lactic acid. As lactic acid accumulates, the titration acidity of the products changes. It should be noted that the accumulated lactic acid inhibits the development of gas-forming fat and other unpleasant bacteria. Lactic acid does not only give the drink a certain taste, but also determines its dietary and preventive properties, activates the release of digestive enzymes in the intestinal tract and enhances their action. It also improves the body's absorption of phosphorus, calcium, iron and vitamin D.

During the research, the mass fraction of lactic acid in the studied kefir product samples was determined, the result is shown in Figure 4 below.

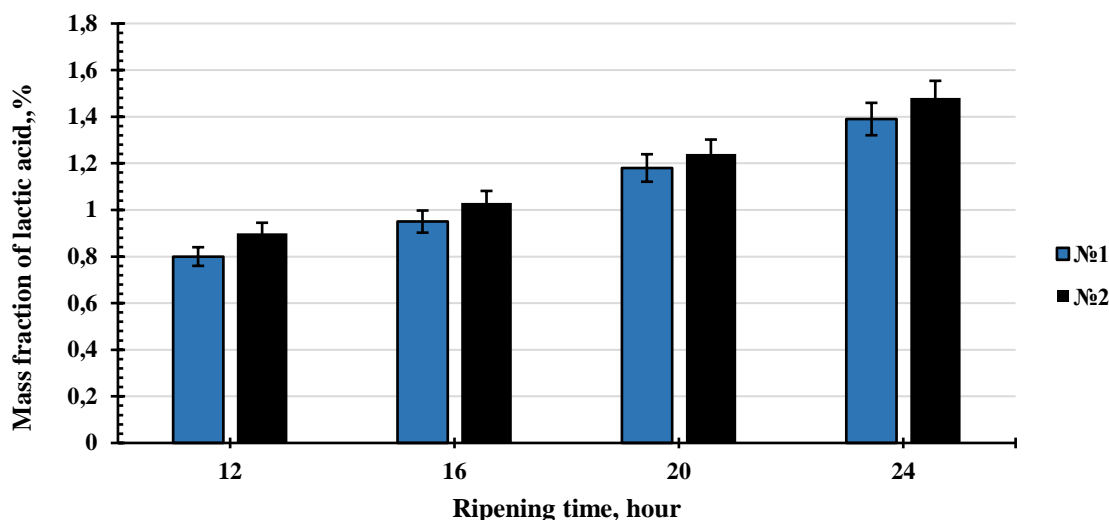


Figure 4 – Mass fraction of lactic acid (№1 – kefir product made from cow's milk; №2 – kefir product made from goat's milk)

The results of the study showed that the mass fraction of lactic acid released over time during maturation increases, after 24 hours it was 1.39% in sample №1 and 1.48% in sample №2. In the course of the research, the analysis of water-soluble vitamins in the samples of kefir products made from cow and goat milk was carried out, the results are presented in Figures 5, 6 and Table 2 below.

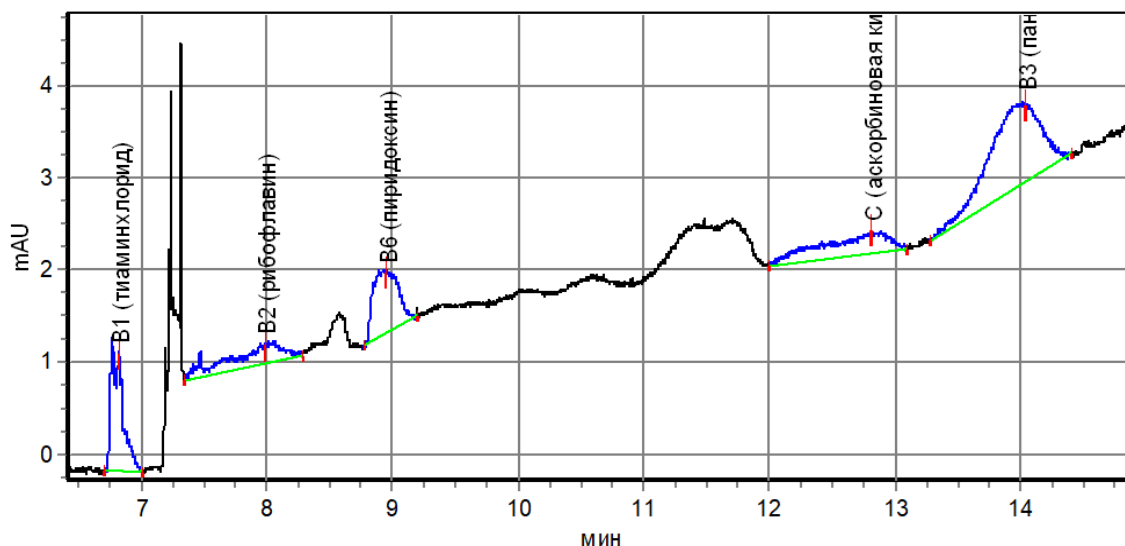


Figure 5 – Water-soluble content of a kefir product made from cow's milk typical chromatogram of vitamins

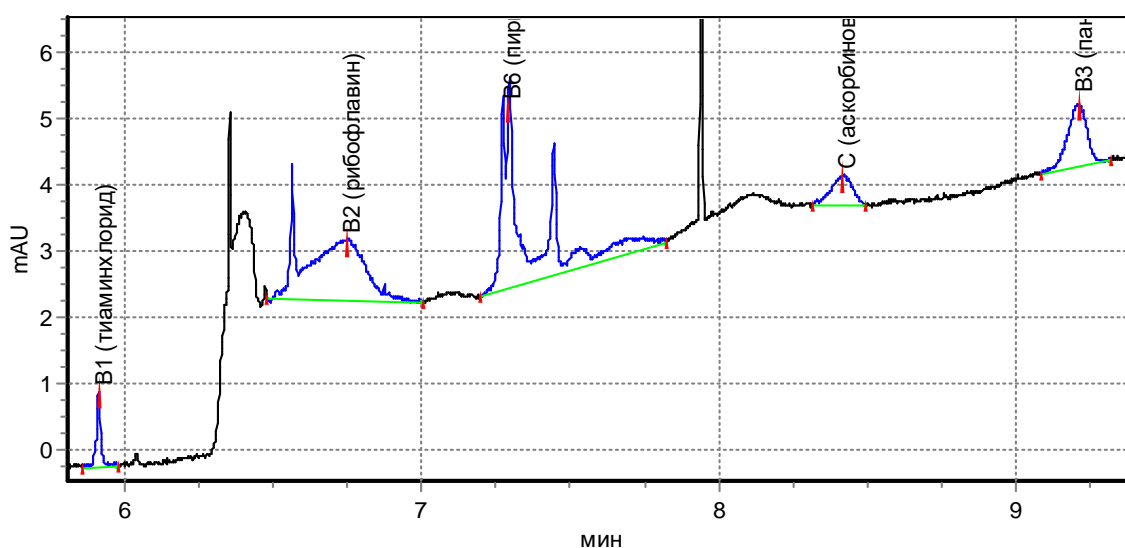


Figure 6 – Water-soluble content of a kefir product made from goat's milk typical chromatogram of vitamins

Table 2 – Amount of water-soluble vitamins in kefir

| Vitamins | Sample №1 | Sample №2 |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| B ₁ (thiamine)) | 0.033±0.007 | 0.047±0.009 |
| B ₂ (riboflavin) | 0.02±0.008 | 0.42±0.176 |
| B ₃ (panthoic acid) | 0.20±0.040 | 0.33±0.066 |
| B ₆ (pyridoxine) | 0.021±0.001 | 0.35±0.07 |
| C (ascorbic acid) | 0.16±0.054 | 0.42±0.143 |

Based on the data presented in Table 2, it can be concluded that the amount of C and B group vitamins in kefir product samples confirms its high therapeutic and preventive properties. It was found that the products contain a large amount of vitamins (group C, B) that ensure the normal course of biochemical and physiological processes in the human body. It can be seen that the kefir product made from goat's milk contains more vitamins than the kefir product made from cow's milk.

In the course of the research, microbiological analyzes of samples of kefir products were carried out. The number of viable lactic acid bacteria in kefir products was determined, they should be at least 1×10^7 CFU/cm³(g), in yeast – at least 1×10^4 CFU/cm³(g). The results of microbiological analysis are presented in Table 3 below.

Table 3 – Microbiological indicators of kefir products

| Microbiological indications | According to regulatory documents | Sample №1 | Sample №2 |
|--|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| Lactic acid bacteria CFU/cm ³ (g), not less | 1×10^7 | 3.8×10^8 | 2.4×10^7 |
| Yeast, CFU/cm ³ (g), not less | 1×10^4 | 1.2×10^5 | 2.3×10^5 |

The results of the analysis presented in the table, shows that the number of lactic acid bacteria in the kefir product made from cow's milk is 3.8×10^8 CFU/cm³(g), and in the kefir product made from goat's milk – 2.4×10^7 CFU/cm³(g); and the amount of yeast was 1.2×10^5 and 2.3×10^5 CFU/cm³(g), respectively.

During the entire storage period, the total number of lactic acid bacteria and yeast changes slightly, and at the end of the shelf life, it corresponds to the norms of lactic acid drinks with a mixed type of fermentation.

Conclusion

The resulting kefir products are not inferior in quality to traditional kefir. At the end of the period, the acidity of the products did not exceed the standard acidity index for kefir. Factors that directly affect the quality of kefir products during maturation have been identified. Thus, the analysis of literature data and research results allows us to conclude that kefir products are a very important probiotic food product that contributes to the overall health of the body.

References:

- 1 Kalinina I.V., Botvinnikova V.V., Zotova N.A., Fatkullin R.I., Naumenko E.E. Formirovanie pishhevoj sistemy molochnogo produkta smeshannogo brozhenija, obogashennogo digidrokvercetinom. Vestnik JuUrGU. Serija «Pishhevye i biotehnologii», 2020, 8(2): 46-55. (doi: 10.14529/food200206)
- 2 D'jachenko A.N. Ocenka kachestva kefira. Dostizhenija nauki i obrazovaniya, 2017, 18(5): 9-12. (<https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-kachestva-kefira-1>)
- 3 Anisimov S.V., Grishina A.S., Papina M.V. Kefir vkusnyj, poleznyj, lechebnyj molochnyj kombinat «Stavropol'skij». Molochnaja promyshlennost', 2009, 7:75.
- 4 Gavrilova N.N., Barkova M.V., Hilikova N.L. O kefire i ego pol'ze. Setevoj nauchnyj zhurnal OreIGAU, 2014, 3(2): 3-4. (<https://cyberleninka.ru/article/n/o-kefire-i-ego-polze>)
- 5 Kalmakova T.S., Belik S.N., Chistjakov V.A., Morgul' E.V., Chistjakova I.B. Harakteristika kefira kak cennogo probioticheskogo produkta i ego biologicheskikh svojstv. Medicinskij vestnik Juga Rossii, 2014, 3: 36-42. (<https://cyberleninka.ru/article/n/harakteristika-kefira-kak-tsennogo-probioticheskogo-produktai-ego-biologicheskikh-svoystv>)
- 6 Haritonov V.D., Rozhkova I.V., Semehina V.F. Pochemu kefirnyj napitok ne mozhet nazyvat'sja kefirom. Molochnaja promyshlennost', 2011, 11:44.
- 7 Karnauhova I.V., Shirjaeva O.Ju. Kachestvennyj sostav i svojstva moloka zaanenskoj porody koz. Izvestija OGAU, 2016 61(5): 164-167. (<https://cyberleninka.ru/article/n/kachestvennyj-sostav-i-svoystva-moloka-zaanenskoj-porody-koz>)
- 8 GOST 31454-2012 Kefir. Tehnicheskie uslovija. M.: Standartinform, 2019. – 8 s.

- 9 GOST 3624-92. Moloko i molochnye produkty. Titrimetricheskie metody opredeniya kislotnosti. M.:Izd-vo standartov, 2001. – 10 s.
- 10 GOST 3629-47. Molochnye produkty. Metod opredeleniya spirta (alkogolja). M.: Standartinform, 2009. - 4 s.
- 11 GOST 10444.11-89. Produkty pishheve. Metody opredeleniya molochnokislyh mikroorganizmov. M.: Izd-vo standartov, 1990. – 18 s.
- 12 GOST 33566-2015 Moloko i molochnaja produkcija. Opredelenie drozhzhej i plesnevyyh gribov. M.: Standartinform, 2016. – 16 s.
- 13 GOST 30347-2016 Moloko i molochnaja produkcija. Metody opredeleniya *Staphylococcus aureus*. M.: Standartinform, 2016. – 16 s.
- 14 GOST 30519-97 Produkty pishheve. Metod vyjavleniya bakterij roda *Salmonella*. Minsk: Mezhgosudarstvennyj sovet po standartizacii, metrologii i sertifikacii, 2001. – 13 s.
- 15 GOST 31747-2012. Metody vyjavleniya i opredeleniya kolichestva bakterij grupy kishechnyyh paloček (kooiformnyh bakterij). M.: Standartinform, 2013. – 20 s.
- 16 GOST 32940-2014. Moloko koz'e syroe. Tehnicheskie uslovija. M.: Standartinform, 2019. – 9 s.
- 17 GOST 31449-2013. Moloko korov'e syroe. Tehnicheskie uslovija. M.: Standartinform, 2019. – 9 s.

МРНТИ: 65.63.33

А.Н. ЖҰМАБАЙ^{1*}, А.Д. СЕРИКБАЕВА², К.А. МЫРЗАБЕК², М.М. МУСУЛЬМАНОВА³¹Алматинский технологический университет, Алматы, Казахстан²Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан³Кыргызский государственный технический университет им. И. Раззакова, Бишкек, Кыргызстан

*e-mail: ai94ka@mail.ru

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЫРОГО ВЕРБЛЮЖЬЕГО МОЛОКА, СУХОГО ВЕРБЛЮЖЬЕГО МОЛОКА И ШУБАТА ФЕРМЕРСКОГО ХОЗЯЙСТВА АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.10

Аннотация

Важнейшая роль в обеспечении качества и безопасности готовой молочной продукции определяется в первую очередь качеством исходного сырья – молока. Огромный риск для здоровья человека представляют попадающие в молочное сырьё ксенобиотики биологического происхождения – бактериальные токсины, вызывающие не только острые пищевые интоксикации, но и хронические заболевания, а также особо опасные микотоксины (метаболиты плесневых грибов), оказывающие не только токсический эффект в очень малой дозе, но и обладающие канцерогенной, мутагенной и тератогенной активностью. Микробиологический контроль предназначен для проверки соответствия сырья и готовой продукции требованиям безопасности в эпидемиологическом отношении, а также своевременного обнаружения источника бактериального загрязнения, что позволит свести к минимуму связанные с ним риски. В сыром верблюжьем молоке, сухом верблюжьем молоке и шубате в соответствии с гигиеническими нормативами определены следующие группы микроорганизмов: а) санитарно-показательные (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – КМАФАнМ и бактерий группы кишечной палочки – БГКП); б) условно-патогенные (*E. coli*); в) патогенные, в том числе сальмонеллы. В шубате дополнительно определено содержание молочнокислых бактерий (лактобактерий), как показатель биологической ценности продукта. Испытания проводились стандартными методами в научно-исследовательской лаборатории по оценке качества и безопасности продовольственных продуктов при Алматинском технологическом университете. Установлено, что КМАФАнМ в сухом верблюжьем молоке составляет $2,3 \cdot 10^5$ КОЕ/см³ (г), в сыром верблюжьем молоке – $2,4 \cdot 10^5$ КОЕ/см³ (г), что не превышает нормативные данные. Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, *Enterococcus* и *Pseudomonas aeruginosa*, в 25 г (см³) всех исследованных продуктов не обнаружены. Содержание молочнокислых микроорганизмов в шубате достигает $4,4 \cdot 10^7$ КОЕ/г (см³), что более чем в 4 раза выше нормируемых данных. Полученные результаты свидетельствуют о соответствии вышеуказанных показателей требованиям нормативных документов.

Ключевые слова: сырое верблюжье молоко, сухое верблюжье молоко, шубат, микробиологические показатели, микрофлора.

Одной из самых актуальных и сложных проблем современного общества является снабжение населения качественными и безопасными продуктами питания. Всё большее число людей проявляет повышенный интерес к полезным для здоровья продуктам. Питание должно не только удовлетворять физиологические потребности организма человека в биологических полноценных и безопасных продуктах питания, но и решать профилактические и лечебные задачи.

В настоящее время наиболее остро ощущается необходимость создания и внедрения отечественных молочных продуктов, обогащенных всеми необходимыми для организма человека питательными веществами за счет рационального использования местного сырья.

Наиболее востребованными в Центральноазиатском регионе являются верблюжье и кобылье молоко и продукты их переработки.

Самый распространенный тип верблюда в Казахстане (около 80 %) – нар, гибрид первого поколения одногорбого и двугорбого верблюдов, который наследует от бактрианов устойчивость к холоду, а от дромедаров – способность производить обильное количество молока, из которого делают шубат. Количество наров в Казахстане растет из-за роста спроса на шубат. Динамика изменения поголовья верблюдов в Казахстане показана на рисунке 1. [1].

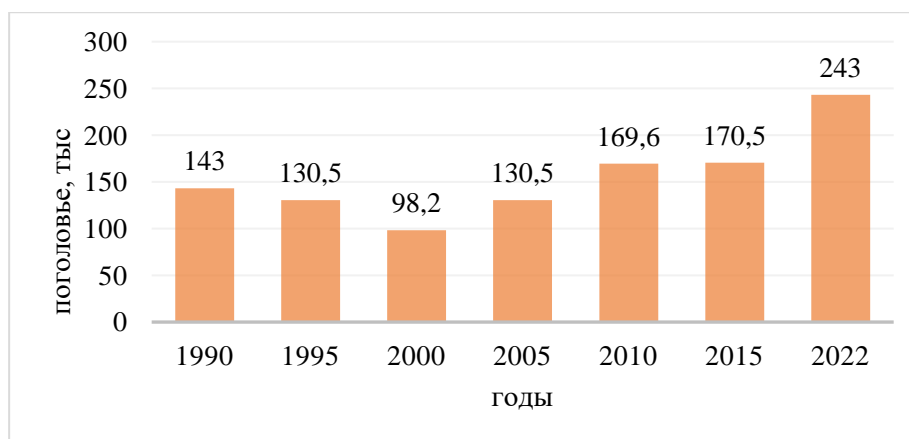


Рисунок 1 – Поголовье верблюдов в Казахстане в 1990-2022 годы

Рисунок 1 демонстрирует постепенное, но стабильное увеличение численности верблюдов в последние годы после некоторого спада в начале 2000-х.

Период лактации верблюдицы более длительный в сравнении с любым другим видом домашнего скота – 12-18 месяцев. Ежедневный надой колеблется от 3 до 10 кг молока [2, 3].

Верблюжье молоко является важной частью рациона питания южных и западных областей Казахстана [4]. Его потребление можно сравнить с потреблением коровьего молока в некоторых других странах.

Качество молочного сырья и продуктов из него определяется комплексом органолептических, физико-химических и микробиологических показателей в соответствии с требованиями действующей нормативной документации.

Наиболее важными характеристиками молочных продуктов является их безопасность и микробиологическая устойчивость. Количественные микробиологические показатели указывают на содержание определенных микроорганизмов в 1 г или 1 см³ продукта. Контроль безопасности продуктов осуществляется по альтернативному методу, когда за норму принимается отсутствие санитарно-показательных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в определенной массе или определенном объеме продукта [5, 6].

При санитарной оценке молочных продуктов используются косвенные методы для определения уровня загрязнения продукта выделениями человека (уровень фекального загрязнения). Чем выше этот уровень, тем больше вероятность того, что патогены – возбудители кишечных инфекций – попадут в исследуемый объект. Такие методы включают количественный метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) и качественный метод определения санитарно-показательных микроорганизмов – бактерий группы кишечной палочки (БГКП) [7].

Современные требования к безопасности молока и молочных продуктов, в том числе в биологическом отношении, отражены в Техническом регламенте Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) от 9 октября 2013 года №

67 [8] и в Техническом регламенте Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) от 9 декабря 2011 г. № 880 [9].

Цель исследования: оценка микробиологической безопасности и пользы верблюжьего молока и продуктов из него через количественное определение молочнокислых микроорганизмов (лактобактерий), санитарно-показательных микроорганизмов (КМАФАнМ, БГКП), а также патогенных бактерий (*Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись сырое верблюжье молоко, сухое верблюжье молоко и шубат, вырабатываемые в фермерском хозяйстве Алматинской области.

Микробиологические анализы проводились в научно-исследовательской лаборатории по оценке качества и безопасности продовольственных продуктов Алматинского технологического университета.

Подготовка проб к анализу осуществлялась в соответствии с ГОСТ 32901-2014 [10].

Стандартными методами определены следующие биологические показатели безопасности:

➤ количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) – посевом подготовленного образца исследуемого продукта в агаризованные питательные среды с последующим выращиванием и подсчетом количества выросших колоний микроорганизмов [11];

➤ количество бактерий вида *Escherichia coli* – методом, основанным на способности бактерий группы кишечных палочек сбрасывать в питательной среде лактозу с образованием газа и кислоты при температуре 37°C в течение 24 ч [12];

➤ количество бактерий рода *Salmonella* – путем выращивания микроорганизмов на первом этапе на стандартной питательной среде BPW с последующим пересевом на две селективные агаризованные среды (ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) и среда Эндо). Идентифицируют искомые бактерии с помощью биохимических и серологических тестов [13];

➤ количество бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* – методом, основанном на высеве определенного количества продукта (его разведений) на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды [14];

➤ количество энтерококков – эту группу микроорганизмов выявляют в глюкозо-триптонном бульоне с дрожжевым экстрактом с pH 7,2 [15];

➤ количество молочнокислых микроорганизмов (лактобактерий) в шубате – глубинным посевом разведений исследуемого продукта на селективную среду MRS с последующим выращиванием микроорганизмов в термостате в течение 48 ч при температуре 37°C [16].

Для выявления и количественного определения искомым микроорганизмов были использованы следующие питательные среды:

➤ мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы – МПА (мясо-пептонный агар);

➤ бактерии группы кишечной палочки – среда Кесслер;

➤ сальмонеллы – стандартная среда BPW (Buffered Peptone Water, агар с предварительно взвешенной забуференной пептонной водой), ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) и среда Эндо;

➤ бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* – агаризованная селективно-диагностическая среда;

➤ энтерококки – среда глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом;

➤ молочнокислые бактерии (лактобактерии) – стандартная среда MRS.

Результаты и обсуждение

В этом аспекте нами проведён микробиологический анализ верблюжьего молока и продуктов из него с точки зрения наличия санитарно-показательной и патогенной микрофлоры, а также присутствия в ферментированном молоке физиологически важных пробиотических микроорганизмов. Полученные данные в сравнении с нормативными показателями приведены в таблицах 1-3, соответственно для сырого верблюжьего молока, сухого верблюжьего молока и шубата – казахского национального ферментированного верблюжьего молока.

Таблица 1 – Микробиологические показатели сырого верблюжьего молока

| Микробиологические показатели | Норма по НД | Результаты для сырого верблюжьего молока |
|--|-------------------|--|
| КМАФАнМ, КОЕ/см ³ (г), не более | 5*10 ⁵ | 2,4*10 ⁵ |
| БГКП в 0,1 см ³ (г) продукта | не нормируются | не обнаружены |
| Патогенные микроорганизмы (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>), в т.ч. сальмонеллы, в 25 см ³ (г) продукта | не допускаются | не обнаружены |

Таблица 2 – Микробиологические показатели сухого верблюжьего молока

| Микробиологические показатели | Норма по НД (для сухого коровьего молока) | Результаты для сухого верблюжьего молока |
|--|---|--|
| КМАФАнМ, КОЕ/см ³ (г), не более | 5*10 ⁴ | 2,3*10 ⁴ |
| БГКП в 0,1 см ³ (г) продукта | не допускаются | не обнаружены |
| Патогенные микроорганизмы (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>), в т.ч. сальмонеллы, в 25 см ³ (г) продукта | не допускаются | не обнаружены |

Таблица 3 – Микробиологические показатели шубата

| Микробиологические показатели | Норма по НД | Результаты для шубата |
|--|-------------------|-----------------------|
| БГКП в 0,01 см ³ (г) продукта | не допускаются | не обнаружены |
| Патогенные микроорганизмы (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>), в т.ч. сальмонеллы, в 25 см ³ (г) продукта | не допускаются | не обнаружены |
| Молочнокислые микроорганизмы, КОЕ/см ³ (г), не менее | 1*10 ⁷ | 4,4*10 ⁷ |

Полученные нами данные содержания мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см³ сырого и 1 г сухого верблюжьего молока (таблицы 1 и 2) доказывают, что исследуемые объекты не представляют опасности в микробиологическом отношении, т.к. КМАФАнМ практически в два раза меньше нормируемых показателей.

В 2020 г. 28 стран ЕС/ЕЭЗ сообщили о 4 824 подтвержденных случаях инфицирования шигатоксин-продуцирующей кишечной палочкой (STEC). Общий показатель заболеваемости составил 1,6 случая на 100 000 населения [17]. Поэтому пищевые инфекции, вызываемые шига-токсинпродуцирующими штаммами *Escherichia coli* (STEC), – актуальная проблема общественного здравоохранения многих стран мира, включая высокоразвитые: США, Канаду, страны Европейского союза, Японию и др. [18]. Казахстан, скорее всего, также стоит в ряду этих стран и употребление верблюжьего молока и продуктов из него может представлять угрозу здоровью населения. В связи с этим, нами проведен анализ исследуемых объектов на наличие БГКП. Результаты анализа (таблицы 1-3) подтвердили микробиологическую безопасность сырого верблюжьего молока и продуктов из него, т.к. искомые микроорганизмы в 0,01 см³ (г) не обнаружены.

Для выявления и количественного определения бактерий вида *P. aeruginosa* в верблюжьем молоке и приготовленных из него продуктов нами использован метод, основанный на высеве 0,1 г (см³) продукта (его разведений) на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды (агар для выявления псевдомонад), инкубировании посевов при температуре 37°C в течение 24 ч., подсчете типичных колоний. На агаре с триклозаном псевдомонады обычно образуют синие, сине-зеленые, желто-зеленые или зеленые колонии. Колоний с такими признаками нами не обнаружено. Проведенный анализ на наличие псевдомонад в 25 г (см³) исследованных продуктов свидетельствует об отсутствии этого патогена (таблицы 1-3).

Содержание сальмонелл в этом виде молочного сырья и продуктов из него определено нами выращиванием микроорганизмов на стандартной питательной среде BPW с последующим пересевом на две питательные селективные агаризованные среды: ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) и среду Эндо. Посевы на агаризованных средах инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. Типичные колонии бактерий рода *Salmonella*, вырастающие на XLD-агаре, имеют черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета (цвет индикатора). На среде Эндо образуются круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные колонии, характерные для сальмонелл. В нашем исследовании не обнаружены признаки роста салмонелл (таблицы 1-3), что свидетельствует о микробиологической безопасности сырого и сухого верблюжьего молока и шубата.

Известным в Казахстане ферментированным молочным продуктом, приготовленным из верблюжьего молока, является шубат. Физиологическая функциональность таких продуктов определяется присутствием в них достаточно высокого количества живых лактобактерий. Для доказательства пробиотических свойств шубата нами определено содержание в нём молочнокислых бактерий глубинным посевом разведений исследуемого продукта на селективную среду *MRS* с последующим выращиванием микроорганизмов в термостате в течение 48 ч при температуре 37 °C. На рисунке 2 приведены фотографии чашки Петри с выросшими колониями лактобактерий и микроскопического препарата этих микроорганизмов.

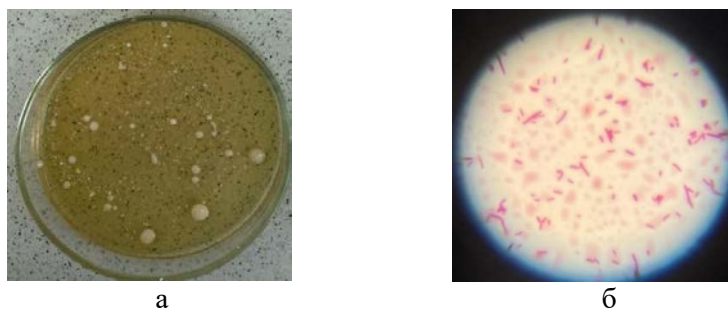


Рисунок 2 – Колонии лактобактерий ферментированного верблюжьего молока (шубата), выросшие на твердой питательной среде *MRS* (а), и их микроскопический препарат (x100) (б)

Подсчет выросших колоний показал, что в 1 г шубата содержание лактобактерий более чем в 4 раза превышает нормативные данные (таблица 3), что позволяет отнести шубат к функциональным продуктам питания или пробиотикам.

Заключение

Анализ полученных данных свидетельствуют о достаточно высокой микробиологической надежности (безопасности) всех исследованных продуктов, так как содержание КМАФАнМ и патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл, не превышает норм, установленных в Техническом регламенте Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013). Содержание лактобактерий, большая

часть которых проявляет выраженные пробиотические свойства, достигает десятков млн клеток в 1 см³ шубата, свидетельствуя о физиологической функциональности продукта.

Проведенный микробиологический анализ позволяет пополнить базу данных, доказывающих безопасность и пользу верблюжьего молока и продуктов из него. Разведение верблюдов молочного направления с соответствующим увеличением производства этого вида сырья и его промышленной переработки в безопасные и высококачественные молочные продукты может существенно повысить уровень здоровья населения.

Литература:

1 Баймуканов Д.А., Юлдашбаев Ю.А., Исхан К.Ж., Демин В.А. Концепция развития продуктивного и племенного верблюдоводства Республики Казахстан на 2021-2030 годы. *Аграрная наука*, 2020, (7-8):52-60 (doi.org/10.32634/0869-8155-2020-340-7-52-60).

2 Adnan Khaliq, Muhammad Farhan Jahangir Chughtai, Muhammad Nadeem, Ayesha Aslam, Atif Liaqat, Tariq Mehmmod, Samreen Ahsan. Camel Milk: Massive Paragon of Nutritional and Therapeutic Potentials: A Review. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*, 2019, 7(9): 12-26 (doi.org/10.20431/2349-0365.0709002).

3 Vinod Bhatshwar, D.C. Rai, Hitesh Muwal, Hanuman Lal Nehra and Maya Jat. Camel Milk: The Natural Gift for Medicinal Uses for Humans - A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci*, 2021, 10(02): 2397-2407 (doi.org/10.20546/ijemas.2021.1002.285).

4 Meldebekova, A., G. Konuspayeva, E. Diacono and B. Faye. Heavy Metals and Trace Elements Content in Camel Milk and Shubat from Kazakhstan. *Impact of Pollution on Animal Products*, 2008, 117-123.

5 Уварова В. М., Мазаев А. Н., Шель И. А., Попова М. А., Шкаева Н. А. Микробиологический контроль молочной продукции. *Молодой ученый*, 2014, 12: 110-112.

6 Aman I.M., Al-Hawary I.I., Elewa S.M., El-Kassas W.M., El-Magd M.A. Microbiological evaluation of some Egyptian fermented dairy products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2021, 2(72): 2889-2896 (doi.org/10.12681/jhvms.27528).

7 Mirza Aliyev, Kushvar Mamedova. Determination of total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), total aerobic psychrophilic bacteria (TAB), Lactococcus spp., Lactobacillus spp., Staphylococcus-Micrococcus, coliform, yeast and mold in motal cheese samples, Azerbaijan. *Agricultural & Veterinary Sciences*, 2019, 3(3): 126-133.

8 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) Принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. № 67.

9 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) от 9 декабря 2011 г. № 880.

10 ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа

11 ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

12 ГОСТ 30726-2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*

13 ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*

14 ГОСТ Р 54755-2011 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*

15 ГОСТ 28566-90 (СТ СЭВ 6646-89) Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков

16 ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов

17 European Centre for Disease Prevention and Control. *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) infection - Annual Epidemiological Report for 2020*, 12 Sep 2022.

18 Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Э.А. и др. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году. *Вестник РАМН*. 2015, 1: 70–81.

А.Н. ЖҰМАБАЙ^{1*}, А.Д. СЕРИКБАЕВА², К.А. МЫРЗАБЕК², М.М. МУСУЛЬМАНОВА³

¹ Алматы технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

² Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

³ И. Раззаков атындағы Қырғыз мемлекеттік техникалық университеті, Бишкек, Қырғызстан

*e-mail: ai94ka@mail.ru

АЛМАТЫ ОБЛЫСЫНДАҒЫ ШАРУАШЫЛЫҚТЫҢ ШИКІ ТҮЙЕ СҮТІ, ҚҰРҒАҚ ТҮЙЕ СҮТІ ЖӘНЕ ШҰБАТ ҮШІН МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ ТАЛДАУ

Түйін

Дайын сүт өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігін қамтамасыз етудегі ең маңызды рөл ең алдымен шикізаттың сапасымен сүтпен анықталады. Сүт шикізатына түсетін биологиялық текті ксенобиотиктер - өткір тағамдық интоксикацияны ғана емес, созылмалы ауруларды да тудыратын бактериялық токсиндер, сондай-ақ ерекше қауіпті микотоксиндер (зең саңырауқұлақтарының метаболиттері) адам денсаулығына үлкен қауіп төндіреді. Өте аз дозада ғана уытты әсер етеді, сонымен қатар канцерогендік, мутагендік және тератогендік белсенділікке ие. Микробиологиялық бақылау шикізат пен дайын өнімнің эпидемиологиялық қауіпсіздік талаптарына сәйкестігін тексеруге, сондай-ақ онымен байланысты тәуекелдерді барынша азайтуға мүмкіндік беретін бактериялық ластану көзін уақтылы анықтауға арналған. Шикі түйе сүтінде, құрғақ түйе сүтінде және шұбатта гигиеналық нормаларға сәйкес микроорганизмдердің келесі топтары анықталады: а) санитарлық-индикативті (мезофильді аэробты және факультативті анаэробты микроорганизмдердің саны - КМАФАнМ және ішек таяқшасы тобындағы бактериялар -ІТТБ); б) шартты түрде патогенді (*E. coli*); в) патогенді, соның ішінде сальмонеллез. Шұбатта өнімнің биологиялық құндылығының көрсеткіші ретінде сүт қышқылы бактерияларының (лактобактериялар) мөлшері қосымша анықталды. Сынақтар стандартты әдістермен Алматы технологиялық университетінің тамақ өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігін бағалаудың ғылыми-зерттеу зертханасында жүргізілді. Құрғақ түйе сүтінде КМАФАнМ $2,3 \cdot 10^5$ КТБ/см³ (г), шикі түйе сүтінде – $2,4 \cdot 10^5$ КТБ/см³ (г) құрайтыны анықталды, бұл нормативтік деректерден аспайды. Патогендік микроорганизмдер, соның ішінде *Salmonella*, *Enterococcus* және *Pseudomonas aeruginosa*, барлық зерттелген өнімдердің 25 г (см³) құрамында табылған жоқ. Шұбаттағы сүт қышқылы микроорганизмдерінің мөлшері $4,4 \cdot 10^7$ КТБ/г (см³) жетеді, бұл нормаланған мәліметтерден 4 еседен астам жоғары. Алынған нәтижелер жоғарыда аталған көрсеткіштердің нормативтік құжаттардың талаптарына сәйкестігін куәландырады.

Кілтті сөздер: шикі түйе сүті, құрғақ түйе сүті, шұбат, микробиологиялық көрсеткіштер, микрофлора.

IRSTI: 65.63.33

A.N. ZHUMABAY^{1*}, A.D. SERIKBAYEVA², K.A. MYRZABEK², M.M. MUSULMANOVA³

¹ Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan

² Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

³ I. Razzakov Kyrgyz State Technical University, Bishkek, Kyrgyzstan

*e-mail: ai94ka@mail.ru

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF RAW CAMEL MILK, DRY CAMEL MILK AND SHUBAT FROM A FARM IN ALMATY REGION

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.10

Abstract

The most important role in ensuring the quality and safety of finished dairy products is determined primarily by the quality of the feedstock – milk. A huge risk to human health is posed by xenobiotics of biological origin in raw milk - bacterial toxins that cause not only acute food intoxication, but also chronic diseases, as well as particularly dangerous mycotoxins (metabolites of mold fungi), which not only have a

toxic effect in a very small dose, but also have carcinogenic, mutagenic, and teratogenic activity. Microbiological control is designed to verify that raw materials and finished products meet epidemiological safety requirements and that the source of bacterial contamination is detected in good time, thus minimizing the risks associated with it. In raw camel milk, dried camel milk and shubat the following groups of microorganisms are determined in accordance with hygienic standards: a) indicator (quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms – QMAFAnM and bacteria of *E. coli* group); b) opportunistic (*E. coli*); c) pathogens, including *Salmonella*. The content of lactic acid bacteria (lactobacilli) was additionally determined in the shubat as an indicator of the biological value of the product. The tests were carried out using standard methods at the Research laboratory for assessing the quality and safety of food products at the Almaty Technological University. It was defined that QMAFAnM in dried camel milk is $2,3 \cdot 10^5$ CFU/cm³ (g), in raw camel milk is $2,4 \cdot 10^5$ CFU/cm³ (g), which does not exceed the normative data. Pathogenic microorganisms, including *Salmonella*, *Enterococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*, were not detected in 25 g (cm³) of all examined products. The content of lactic acid microorganisms in shubat reaches $4,4 \cdot 10^7$ CFU/g (cm³), which is more than 4 times higher than the normative data. The results indicate compliance of the above indicators with the requirements of regulatory documents.

Keywords: raw camel milk, camel milk powder, shubat, microbiological indicators, microflora.

One of the most pressing and challenging problems in modern society is the supply of quality and safe food. More and more people are showing increased interest in healthy foods. Nutrition should not only meet the physiological needs of the human body in a biologically full and safe food, but also solve the preventive and therapeutic tasks.

Currently, the most pressing need is to create and introduce domestic dairy products enriched with all the nutrients required for the human body through the rational use of local raw materials. Camel and mare's milk and processed products are in the highest demand in the Central Asian region.

The most common type of camel in Kazakhstan (about 80%) is the nar, a first-generation hybrid of one-humped and two-humped camels, which inherits from the Bactrian the resistance to cold, and from the Dromedary the ability to produce abundant milk from which shubat is made. Kazakhstan is the leader in the world in selective breeding of camels. The number of nar in Kazakhstan is increasing due to the growing demand for shubat. The dynamics of camel population in Kazakhstan is shown in figure 1 [1].

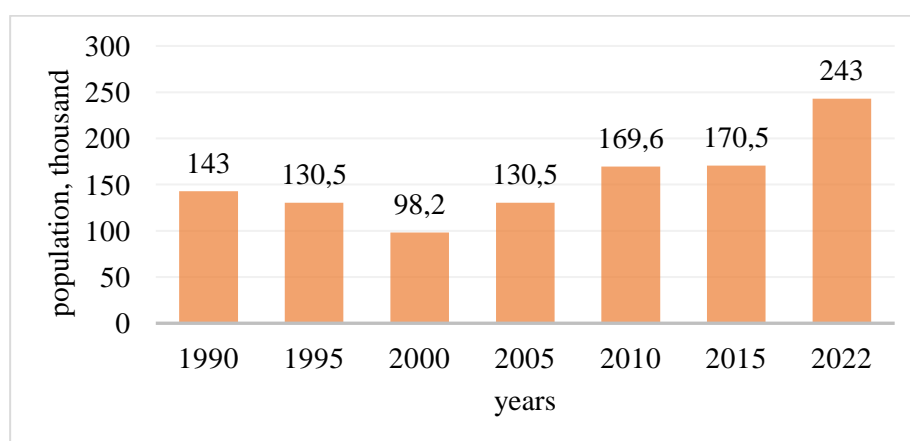


Figure 1 – Camel population in Kazakhstan in 1990-2022

The figure shows a gradual but steady increase in camel numbers in recent years after a slight decline in the early 2000s.

The lactation period of camel is longer compared to any other livestock species, 12-18 months. Daily milk production varies from 3 to 10 kg of milk [2, 3].

Camel milk is an important part of the diet of the southern and western regions of Kazakhstan [4]. Its consumption can be compared to that of cow's milk in some other countries.

The quality of raw milk and dairy products is determined by a set of organoleptic, physico-chemical, and microbiological indicators in accordance with the requirements of current regulatory documentation.

The most important characteristics of dairy products are their safety and microbiological stability. Quantitative microbiological indicators show the content of certain microorganisms in 1 g or 1 cm³ of the product. Product safety is controlled by an alternative method, where the absence of indicator, opportunistic, and pathogenic microorganisms in a certain mass or a certain volume of the product is taken as a standard [5,6].

In the sanitary evaluation of dairy products, indirect methods are used to determine the level of contamination of the product by human excreta (fecal contamination level). The higher this level, the more likely it is that pathogens (intestinal pathogens) will enter the test object. Such methods include a quantitative method to determine the quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (QMAFAnM) and a qualitative method to determine indicator microorganisms – *Escherichia coli* bacteria (*E. coli*) [7].

Modern requirements for the safety of milk and dairy products, including biological safety, are reflected in the Technical Regulation of the Customs Union "On milk and dairy products safety" (TR CU 033/2013) of 9 October 2013 No 67 [8] and in the Technical Regulation of the Customs Union "On food safety" (TR CU 021/2011) of 9 December 2011 No 880 [9].

Purpose of the study: evaluation of the microbiological safety and usefulness of camel milk and products from it through quantitative determination of lactic acid microorganisms (lactobacilli), indicator microorganisms (QMAFAnM, *E. coli* bacteria group), as well as pathogenic bacteria (*Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Materials and methods of research

The objects of research were raw camel milk, dried camel milk and shubat produced in a farm in Almaty region.

Microbiological analyses were carried out in the Research laboratory for food quality and safety assessment of the Almaty Technological University.

Preparation of samples for analysis was carried out in accordance with GOST 32901-2014 [10].

The following biological safety indicators were determined by standard methods:

➤ the quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (QMAFAnM) – by inoculation of prepared sample of the test product into agarized nutrient media, followed by growing and counting the number of grown microorganism colonies [11];

➤ the number of *Escherichia coli* bacteria – by a method based on the ability of *E. coli* bacteria to ferment lactose in a nutrient medium, producing gas and acid at 37°C for 24 hours [12];

➤ the number of bacteria of the *Salmonella* genus – by growing the microorganisms on standard BPW nutrient medium at the first stage, followed by transfer to two selective agarised media (xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD-agar) and Endo medium). The bacteria are identified by biochemical and serological tests [13];

➤ the number of bacteria of the *Pseudomonas aeruginosa* species – by method based on the inoculation of a certain amount of product (its dilutions) on the surface of an agarised selective diagnostic medium [14];

➤ the number of *enterococci* – this group of microorganisms is detected in glucose triptone broth with yeast extract at pH 7.2 [15];

➤ the number of lactic acid microorganisms (lactobacilli) in shubat – by in-depth culture of the test product on MRS selective medium, followed by cultivation of the microorganisms in a thermostat for 48 h at 37°C [16].

The following nutrient media were used to identify and quantify the microorganisms:

➤ mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms – MPA (meat-peptone agar);

- *Escherichia coli* bacteria – Kessler medium;
- *Salmonella* species – standard BPW (Buffered Peptone Water), xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD agar) and Endo medium;
- bacteria of the *Pseudomonas aeruginosa* species – agarised selective diagnostic medium;
- Enterococci – glucose-tryptone broth medium with yeast extract;
- lactic acid bacteria (*Lactobacillus*) – standard MRS medium.

Results and discussion

In this aspect, we carried out microbiological analysis of camel milk and its products in terms of the presence of indicator and pathogenic microflora, as well as the presence of physiologically important probiotic microorganisms in fermented milk. The obtained data in comparison with the normative values are shown in Tables 1-3 respectively for raw camel milk, dried camel milk and shubat – Kazakh national fermented camel milk.

Table 1 – Microbiological parameters of raw camel milk

| Microbiological indicators | Norm according to ND | Raw camel milk results |
|---|----------------------|------------------------|
| QMAFAnM, CFU/cm ³ (g), no more | 5*10 ⁵ | 2.4*10 ⁵ |
| <i>E. coli</i> bacteria group in 0.1cm ³ (g) of the product | not standardized | not detected |
| Pathogenic microorganisms (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>), including salmonella, in 25 cm ³ (g) of the product | not allowed | not detected |

Table 2 – Microbiological parameters of camel milk powder

| Microbiological indicators | Norm according to ND (for powdered cow's milk) | Powdered camel milk results |
|---|--|-----------------------------|
| QMAFAnM, CFU/cm ³ (d), no more | 5*10 ⁴ | 2.3*10 ⁴ |
| <i>E. coli</i> bacteria group in 0.1cm ³ (g) of the product | not allowed | not detected |
| Pathogenic microorganisms (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>), including salmonella, in 25 cm ³ (g) of the product | not allowed | not detected |

Table 3 – Microbiological indicators of shubat

| Microbiological indicators | Norm according to ND | Shubat results |
|---|----------------------|---------------------|
| <i>E. coli</i> bacteria group in 0.1cm ³ (g) of the product | not allowed | not detected |
| Pathogenic microorganisms (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>), including salmonella, in 25 cm ³ (g) of the product | not allowed | not detected |
| Lactic acid bacteria, CFU/cm ³ (g), not less | 1*10 ⁷ | 4.4*10 ⁷ |

The data we obtained on the content of mesophilic aerobic and facultatively anaerobic microorganisms in 1 cm³ of raw and 1 g of dried camel milk (Tables 1 and 2) prove that the studied objects are not dangerous in microbiological respect, as QMAFAnM is almost half the normative indicators.

Three years ago (in 2020) 28 EU/EEA countries reported 4,824 confirmed cases of shigatoxin-producing *E. coli* (STEC) infection. The overall incidence rate was 1.6 cases per 100 000 population [17]. Therefore, foodborne infections caused by shigatoxin-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) are a pressing public health problem in many countries of the world, including the highly developed countries of the USA, Canada, the European Union, Japan, etc. [18]. Kazakhstan is also likely to be among these countries, and the use of camel milk and its products may pose a threat to public health. In this regard, we analyzed the objects under study for

the presence of *E. coli* bacteria group. The results of the analysis (Tables 1-3) confirmed the microbiological safety of raw camel milk and its products, as the specified microorganisms in 0.01 cm³ (g) were not detected.

To detect and quantify *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in camel milk and products prepared from it, we used a method based on inoculation 0.1 g (cm³) of product (its dilutions) on the surface of agarized selective diagnostic medium (agar for detection of pseudomonads), incubation of inoculum at 37 °C for 24 h, counting typical colonies. Pseudomonads usually form blue, blue-green, yellow-green, or green colonies on triclosan agar. We did not find any colonies with such features. An analysis for the presence of pseudomonads in 25 g (cm³) of the examined products indicated the absence of this pathogen (tables 1-3).

We determined *Salmonella* content in this type of raw milk and its products by first growing the microorganisms on standard BPW nutrient media and then transferring them to two selective agarized media: xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD-agar) and Endo medium. The cultures on the agarized media were incubated at 37 °C for 24 h. Typical colonies of *Salmonella* bacteria growing on XLD-agar have a black center and a slightly transparent reddish zone (indicator colour). Round, colourless or slightly pinkish, transparent colonies characteristic of *Salmonella* bacteria are formed on Endo medium. In our study, no signs of *Salmonella* growth were found (Tables 1-3), indicating the microbiological safety of raw and dried camel milk and shubat.

Enterococci are also absent in the products we studied (see Tables 1-3).

A well-known fermented dairy product made from camel milk in Kazakhstan is shubat. The physiological functionality of such products is determined by the presence of a sufficiently high number of alive lactobacilli in them. To prove probiotic properties of shubat we determined the content of lactic acid bacteria in it by in-depth inoculation of the studied product on MRS selective medium, followed by growing of microorganisms in the thermostat for 48 hours at 37 °C. Figure 2 shows photographs of a Petri dish with grown lactobacillus colonies and a microscopic preparation of these microorganisms.

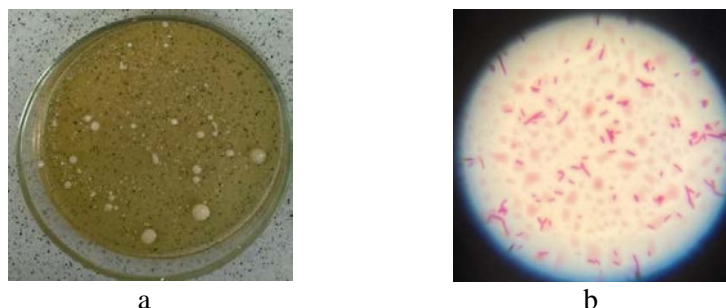


Figure 2 – Lactobacillus colonies of fermented camel milk (shubat) grown on solid MRS nutrient medium (a) and their microscopic preparation (x100) (b)

A count of the colonies grown showed that 1 g of shubat had a lactobacillus content more than 4 times higher than the normative data (Table 3), which allows shubat to be classified as a functional food or probiotic.

Conclusion

The analysis of obtained data shows rather high microbiological reliability (safety) of all investigated products, as the content of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms and pathogenic microorganisms, including *Salmonella*, does not exceed standards established in the Technical Regulations of the Customs Union "On safety of milk and dairy products" (TR CU 033/2013). The content of lactobacilli, most of which exhibit pronounced probiotic properties, reaches tens of millions of cells in 1 cm³ of shubat, indicating the physiological functionality of the product.

The microbiological analysis carried out adds to the database proving the safety and usefulness of camel milk and products made from it. Breeding dairy camels with a corresponding

increase in the production of this type of raw material and its industrial processing into safe and high-quality dairy products can significantly improve public health.

References:

- 1 Bajmukanov D.A., Yuldashbaev Yu.A., Iskhan K.Zh., Demin V.A. Konceptiya razvitiya produktivnogo i plemennogo verblyudovodstva Respubliki Kazakhstan na 2021-2030 gody. *Agrarnaya nauka*, 2020, (7-8):52-60 (doi.org/10.32634/0869-8155-2020-340-7-52-60).
- Pogolov'e verblyudov uvelichilos' v Kazahstane (<https://24.kz/ru/news/economy/item/463253-pogolove-verblyudov-uvelichilos-v-kazahstane>) Date of the application – 20.02.2023.
- 2 Adnan Khaliq, Muhammad Farhan Jahangir Chughtai, Muhammad Nadeem, Ayesha Aslam, Atif Liaqat, Tariq Mehmmud, Samreen Ahsan. Camel Milk: Massive Paragon of Nutritional and Therapeutic Potentials: A Review. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*, 2019, 7(9): 12-26 (doi.org/10.20431/2349-0365.0709002).
- 3 Vinod Bhatshwar, D.C. Rai, Hitesh Muwal, Hanuman Lal Nehra and Maya Jat. Camel Milk: The Natural Gift for Medicinal Uses for Humans - A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci*, 2021, 10(02): 2397-2407 (doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1002.285).
- 4 Meldebekova, A., G. Konuspayeva, E. Diacono and B. Faye. Heavy Metals and Trace Elements Content in Camel Milk and Shubat from Kazakhstan. *Impact of Pollution on Animal Products*, 2008, 117-123.
- 5 Uvarova V. M., Mazaev A. N., Shel' I. A., Popova M. A., Shkaeva N. A. Mikrobiologicheskij kontrol' molochnoj produkcii. *Molodoj uchenyj*, 2014, 12: 110-112.
- 6 Aman I.M., Al-Hawary I.I., Elewa S.M., El-Kassas W.M., El-Magd M.A. Microbiological evaluation of some Egyptian fermented dairy products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2021, 2 (72): 2889-2896 (doi.org/10.12681/jhvms.27528).
- 7 Mirza Aliyev, Kushvar Mamedova. Determination of total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), total aerobic psychrophilic bacteria (TAB), Lactococcus spp., Lactobacillus spp., Staphylococcus-Micrococcus, coliform, yeast and mold in motal cheese samples, Azerbaijan. *Agricultural & Veterinary Sciences*, 2019, 3(3): 126-133.
- 8 Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza «O bezopasnosti moloka i molochnoj produkcii» (TR TS 033/2013) Prinyat Resheniem Soveta Evrazijskoj ekonomicheskoy komissii ot 9 oktyabrya 2013 g. № 67.
- 9 Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza «O bezopasnosti pishchevoj produkcii» (TR TS 021/2011) ot 9 dekabrya 2011 g. № 880.
- 10 GOST 32901-2014 Moloko i molochnye produkty. Metody mikrobiologicheskogo analiza
- 11 GOST 10444.15-94 Produkty pishchevye. Metody opredeleniya kolichestva mezofil'nyh aerobnyh i fakul'tativno-anaerobnyh mikroorganizmov
- 12 GOST 30726-2001 Produkty pishchevye. Metody vyyavleniya i opredeleniya kolichestva bakterij vida *Escherichia coli*
- 13 GOST 31659-2012 (ISO 6579:2002) Produkty pishchevye. Metod vyyavleniya bakterij roda *Salmonella*
- 14 GOST R 54755-2011 Produkty pishchevye. Metody vyyavleniya i opredeleniya kolichestva bakterij vida *Pseudomonas aeruginosa*
- 15 GOST 28566-90 (ST SEV 6646-89) Produkty pishchevye. Metod vyyavleniya i opredeleniya kolichestva enterokokkov
- 16 GOST 10444.11-89 Produkty pishchevye. Metody opredeleniya molochnokislyh mikroorganizmov
- 17 European Centre for Disease Prevention and Control. *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) infection - Annual Epidemiological Report for 2020*, 12 Sep 2022.
- 18 Onishchenko G.G., Dyatlov I.A., Svetoch E.A. i dr. Molekulyarno-geneticheskaya harakteristika shiga-toksinproduciyushchih *Escherichia coli*, vydelennyh pri vspyshke pishchevoj infekcii v Sankt-Peterburge v 2013 godu. *Vestnik RAMN*. 2015, 1: 70–81.

МРНТИ: 68.03.07

Г.Т. ДЖАКИБАЕВА*, А.К. САДАНОВ, Э.Т. ИСМАИЛОВА, Б.Б. БАЙМАХАНОВА,
А.Е. МОЛЖИГИТОВА, Г.Б. БАЙМАХАНОВА, О.Н. ШЕМШУРА, М.Б. АЛИМЖАНОВА,
Д.А. ТЛЕУБЕКОВА, А.Е. ЕЛУБАЕВА

Научно-исследовательский центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан
e-mail: j.gulnar60@mail.ru

ОЦЕНКА ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ КУЛЬТУР ДРОЖЖЕЙ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА *ERWINIA AMYLOVORA*

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.11

Аннотация

В статье представлены результаты скрининга коллекционных культур дрожжей на антагонистическую активность против возбудителя бактериального ожога *Erwinia amylovora*. Из 36 исследованных штаммов дрожжей 4 культуры обладали ингибирующей активностью. К ним относятся: *Torulopsis kefir var kumis* №114 3, *Kluuveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 комплекс №20. Зоны подавления роста патогена у них составляли 22, 23,5, 22,5 и 26 мм, соответственно. Наибольшая антагонистическая активность была у штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 комплекс №20. Анализ компонентного состава 4 дрожжевых культур (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluuveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 комплекс №20) показал, что у культур *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 комплекс №20 и *Torulopsis sphaerica* №117 выявлено 13 химических соединений, из которых основное соединение - фенолэтиловый спирт. Его процентное содержание составляет 43,1%. У культуры *Torulopsis kefir var.kumis* №114 3 обнаружено 12 химических веществ, из которых основное соединение - изоамиловый спирт - 15,7%. А у культуры *Kluuveromyces marxianus* 19 10 соединений, основное из которых этилацетат – 12,24%. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные дрожжевые культуры представляют интерес для дальнейшего изучения их как агентов биоконтроля возбудителя бактериального ожога *E. amylovora*.

Ключевые слова: дрожжи, *Erwinia amylovora*, антагонистическая активность, компонентный состав.

Бактериальный ожог является одной из наиболее вредоносных болезней плодовых культур, возбудителем которой является бактерия *E. amylovora*. В настоящее время данное заболевание зарегистрировано более чем в 50 странах. Для Казахстана это заболевание является карантинным, которое может привести к значительной потере урожая и гибели большого количества растений. Учитывая, что бактериальный ожог является актуальной проблемой для многих стран, в которых в течение десятилетий ведется борьба с ним, необходимо учитывать международный опыт борьбы с болезнью.

В настоящее время во всех странах, где выявлен бактериальный ожог, ведется постоянный мониторинг и контроль за проявлением и распространением

Стратегия борьбы с бактериальным ожогом во многих странах предусматривает интегрированную систему контроля, включающую санитарно-гигиенические мероприятия, препараты на основе меди и агенты биологической борьбы [1-3]. В мировой практике против бактериального ожога широко используются химические методы борьбы (биофунгициды, антибиотики, в частности стрептомицин, иммуномодуляторы) [4, 5].

Биологический метод является одним из путей для снижения вредоносности возбудителя бактериального ожога, а одним из способов - использование дрожжей.

Использование антагонистических свойств бактерий для ингибирования патогенных микроорганизмов изучались на протяжении многих лет, при этом недостаточно внимания было уделено исследованиям таких свойств у дрожжей [6].

В источниках литературы описывается использование дрожжей в качестве ингибиторов бактерий и грибов. Имеются также сведения, что дрожжи могут являться многообещающими заменителями химических фунгицидов в борьбе с возбудителем *Erwinia amylovora*.

Применение дрожжей-антагонистов не наносит вреда окружающей среде и безопасно для человека. За последние несколько десятилетий были тщательно изучены механизмы биоконтроля культур дрожжей - антагонистов, такие как конкуренция за питание и пространство, микопаразитизм и индукция устойчивости хозяина. Кроме того, для повышения эффективности биоконтроля была разработана комбинация антагонистических дрожжей с другими агентами или обработками [7-9].

В Германии исследователи предлагают в качестве агентов биоконтроля живые культуры дрожжей [10].

Целью наших исследований было дать оценку антагонистической активности коллекционных штаммов дрожжей против возбудителя бактериального ожога.

Материалы и методы исследований

Объектами исследования служили 36 коллекционных культур дрожжей родов: *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotorula*, *Kluveromyces*. В качестве тест-культуры использовали возбудителя бактериального ожога *Erwinia amylovora*, выделенного из пораженных плодов яблони сорта Golden Delishes, произрастающего в Панфиловском районе Алматинской области. Антагонистическую активность дрожжей определяли методом лунок [11, 12]. Дрожжи выращивали в пробирках на скошенной твердой питательной среде Сабуро при температуре 28°C в течение 2 суток. Состав среды Сабуро: пептон – 10 г/л, глюкоза – 40 г/л, агар – 20 г/л. Для ферментации культур в колбочки объемом 100 мл с жидкой средой Сабуро 50 мл вносили выращенные на твердой скошенной среде культуры дрожжей и ставили на качалку на 2 суток с 180 обр/мин при температуре 30°C. Антагонистическую активность определяли следующим образом: на поверхность сахарозо-пептонного агара (СПА) 0,1 мл тест-культуры рассеивали с помощью шпателя Дригальского, затем делали лунки с помощью блокорежа диаметром 10 мм. В лунки вносили по 0,3 мл культуральной жидкости дрожжей и культивировали при 28°C в течение 1-2 суток. Об антагонистической активности судили по диаметру зон отсутствия роста патогена, образующихся вокруг лунок. Опыт проводился в трех повторностях. Контролем служила чистая питательная среда СПА.

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок.

Результаты и обсуждение

Исследовалась антагонистическая активность 36 коллекционных культур дрожжей в отношении *E. amylovora*. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Зоны ингибирования роста возбудителя бактериального ожога *Erwinia amylovora* различными видами дрожжей

| № | Наименование культур дрожжей | Зоны подавления роста, мм |
|---|--|---------------------------|
| 1 | 2 | 3 |
| 1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Апорт 199 | 19±1,0 |
| 2 | <i>Candida krusei</i> № 40 | 0 |
| 3 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Егерь 1 | 0 |

Продолжение таблицы 1

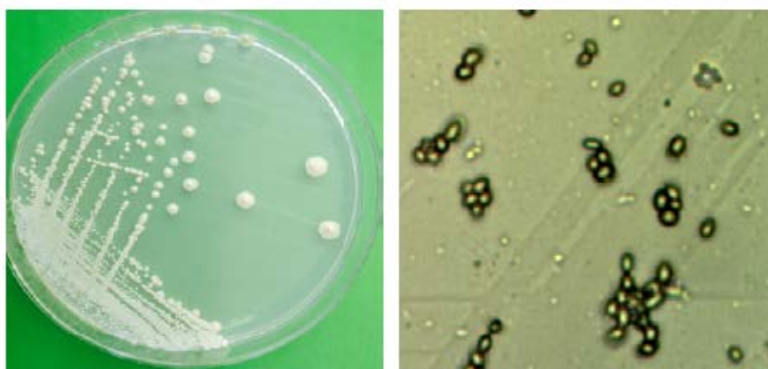
| 1 | 2 | 3 |
|----|---|------------|
| 4 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 комплекс №24Д | 17,66±0,57 |
| 5 | <i>Torulopsis kefir var.kumis</i> № 114 3 | 22,33±0,57 |
| 6 | <i>Saccharomyces lactis</i> 19 | 19,66±0,57 |
| 7 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Раса Сочи Б | 0 |
| 8 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 17±1,0 |
| 9 | <i>Torulopsis candida</i> (складчатая R-форма) | 0 |
| 10 | <i>Rhodotorula glutinis var glutinis</i> (P) | 0 |
| 11 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 комплекс №18 | 18±1,0 |
| 12 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> № Раса 14 | 18,33±1,15 |
| 13 | <i>Torulopsis candida</i> (гладкая S форма) | 0 |
| 14 | <i>Candida scotti</i> № Тул – 1 | 20±0 |
| 15 | <i>Kluuveromyces marxianus</i> 4МА | 19,66±0,57 |
| 16 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Сливовая 21 | 20±0 |
| 17 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Прикумская 123/3 | 0 |
| 18 | <i>Kluuveromyces marxianus</i> 19 | 23,33±0,57 |
| 19 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Мускат (68) 16 | 18,33±0,57 |
| 20 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Рислинг №23 | 17,66±0,57 |
| 21 | <i>Saccharomyces lactis</i> 14с | 20,33±1,52 |
| 22 | <i>Torulopsis sphaerica</i> №117 | 22,33±0,57 |
| 23 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Раса Киргизская | 20,33±1,52 |
| 24 | <i>Candida tropicalis</i> № К – 41 | 14,66±1,52 |
| 25 | <i>Kluuveromyces sp.</i> №4 АТ | 0 |
| 26 | <i>Candida tropicalis</i> №36 | 0 |
| 27 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) № III-7 | 0 |
| 28 | <i>Torulopsis sphaerica</i> № 109К | 0 |
| 29 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 комплекс №20 | 25,66±2,08 |
| 30 | <i>Kluuveromyces sp.</i> №16 М | 22,33±1,52 |
| 31 | <i>Candida sp.</i> № В-2 | 17,66±0,57 |
| 32 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Урюк | 19,33±1,15 |
| 33 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 комплекс №19 | 18,66±1,15 |
| 34 | <i>Torulopsis candida</i> | 20,66±1,15 |
| 35 | <i>Rhodotorula glutinis var glutinis</i> (H) | 0 |
| 36 | <i>Rhodotorula glutinis var glutinis</i> №21 | 0 |
| 37 | Контроль (среда СПА) | 0 |

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что не все дрожжи подавляют рост тест-культуры *E. amylovora*. Из 36 испытанных культур дрожжей 13 культур не обладали ингибирующей активностью. Наибольшая активность отмечена у 4-х культур (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluuveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 комплекс №20). Зоны подавления роста тест-культуры составили от 22,33±0,57 до 25,66±2,08 мм. Самые низкие показатели антибактериальной активности по отношению к тест-культуре проявили культуры дрожжей *Candida tropicalis* №К-41 и *Saccharomyces pombe*. Зоны подавления роста тест-культуры составили 14,66±1,52 - 17±1,0 мм (таблица 1).

Анализ компонентного состава 4 дрожжевых культур (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluuveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 комплекс №20) показал, что у культур *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 комплекс №20 и *Torulopsis sphaerica* №117 выявлено 13 химических соединений, из которых основное соединение фенилэтиловый спирт. Его процентное содержание составляет 43,1%. У культуры *Torulopsis kefir var.kumis* №114 3 12 химических веществ, из которых основное соединение изоамиловый спирт - 15,7%. А у культуры *Kluuveromyces marxianus* 19 в составе 10

соединений, основное соединение этилацетат, содержание которого – 12,24%. Возможно, эти химические вещества являются ингибиторами роста возбудителя бактериального ожога *E. amylovora*. В будущем исследования будут направлены на выявление ингибирующего действия отдельно взятых основных веществ.

Дальнейшие исследования проведены с культурой *Saccharomyces cerevisiae (vini) 2* комплекс №20, выделенной из дрожжевого осадка винного материала, показавшей наиболее высокие зоны подавления роста 25,66±2,08 мм. Изучали его фенотипические признаки и молекулярно-генетическую характеристику (рисунок 1).



а) рост колоний на питательной среде б) вид под микроскопом

Рисунок 1 – Макро- и микросъемка штамма *Saccharomyces cerevisiae (vini) 2* комплекс №20

Молекулярно-генетический анализ, проведенный в лаборатории молекулярно-генетических исследований ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии» подтвердил, что культура *Saccharomyces cerevisiae (vini) 2* комплекс №20, идентифицированная по морфолого-культуральным признакам, является *Saccharomyces cerevisiae (vini)*. Степень гомологии - 100% (рисунок 2).

GGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCGTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATT
 CCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGT TATAGGACAATTA AACCGTTTCAATACAACACTGT
 GGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTT TGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACAC
 AAACAATTTTATSTATTATTAATTTTTGT CAAAAACAAGAATTTTCGTAAC TGGAAATTTTAAAATA
 TTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
 AATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGG
 GGGCATGCCTGTTTGAGCGTCAATTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAG
 TTA ACTTGA AATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAG
 GTATAATGCAAGTACGGTCGTTT TAGGTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTATACTGAGCGTATTG
 GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTC

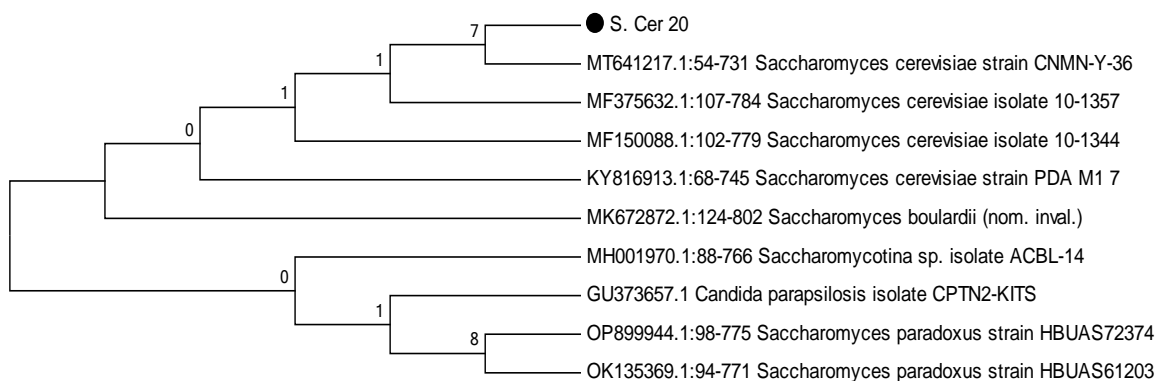


Рисунок 2 - Результаты молекулярно-генетических исследований культуры *Saccharomyces cerevisiae (vini) 2* комплекс №20

По результатам исследований можно сделать выводы, что антагонистической активностью против *E.amylovora* обладали 4 дрожжевые культуры (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluuveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117). Наиболее высокий эффект выявлен у *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 комплекс №20. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные дрожжевые культуры представляют интерес для дальнейшего их изучения как перспективных агентов биоконтроля в отношении возбудителя бактериального ожога *E. amylovora*.

Финансирование:

Работа выполнена в рамках Научно-технической программы BR8574022 «Микробные препараты против возбудителя бактериального ожога плодовых культур» Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Литература:

- 1 Thomson S.V. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight // Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. – Wallingford, UK: CABI, 2000, 9-36.
- 2 Steiner P. W. et al. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight// Fire blight: the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*, 2000, 339-358.
- 3 Саданов А.К., Сулейменова Ж.Б., Исмаилова Э.Т., Шемшура О.Н., Баймаханова Б.Б., Баймаханова Г.Б., Бисько Н.А., Молжигитова А.Е., Тлеубекова Д.А. Бактериальный ожог плодовых культур. Микробиология және вирусология, 2023, 1: 1-6.(doi:53729/MV-AS.2023.01.02).
- 4 Шарма Р, Сингх Д, Сингх Р. Биологический контроль после уборочных заболеваний фруктов и овощей микробными антагонистами: Обзор. Биологический контроль, 2009, 50: 205-221.(doi:10.1016/j.biocontrol. 2009.05.001).
- 5 Массарт С, Мартинес-Медина М., Джиджакли М.Х. Биологический контроль в эпоху микробиома: проблемы и возможности. Биологический контроль, 2015, 89:98-108. (doi:10/1016/j.biocontrol, 2015. 06.003).
- 6 Bhupendra Koul, Manpriya Chopra, Supriya Lamba. Microorganisms as biocontrol agents for sustainable agriculture. Microbial products for sustainable ecosystem services, 2022, 45-68.(doi:10.106/B 978-0-323-89938-3.00003-7).
- 7 Izabela Michalak, Jasmina Aliman, Alisa Hadzialulic, Vedrana Komlen. Smart agrochemicals for sustainable agriculture. 2022, 185-224.(doi:1016/И978-0-12-817036-6.00006-6).
- 8 Akhila Pole, Anisha Srivastava et al. Role of microbial biotechnology for strain improvement for agricultural sustainability. Developments in applied microbiology and biotechnology. 2022, 285-317.(doi:1016/978-0-323-91595-3.00001-x).
- 9 Xiaokang Zhang, Boqiang Li, Zhanquan Zhang. Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. *J.Fungi(Basel)*, 2020, 6(3), 158: 1-2.
- 10 Шарма Р, Сингх Д, Сингх Р. Биологический контроль после уборочных заболеваний фруктов и овощей микробными антагонистами: Обзор. Биологический контроль, 2009, 50: 205-221.(doi:10.1016/j.biocontrol. 2009.05.001).
- 11 Массарт С, Мартинес-Медина М., Джиджакли М.Х. Биологический контроль в эпоху микробиома: проблемы и возможности. Биологический контроль, 2015, 89: 98-108. (doi:10/1016/j.biocontrol.2015.06.003).
- 12 А.П.Дорош, Н.Н.Грегирчак. Исследование терморезистентности и антагонистических свойств дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // «Живые и биокосные системы», 2015, 1.
- 13 A. Seibold et al. Yeasts as antagonists against fireblight. // EPPO Bull, 2004, 34: 3. 389–390.
- 14 Аникиев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. - Москва, 1977, 142.
- 15 Синюшина М.Н., Самсонова М.Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. Москва, 1974, 185.

Г.Т. ЖӘКІБАЕВА*, А.К. САДАНОВ, Э.Т. ИСМАИЛОВА, Б.Б. БАЙМАХАНОВА,
А.Е. МОЛЖІГІТОВА, Г.Б. БАЙМАХАНОВА, О.Н. ШЕМШУРА, М.Б. АЛИМЖАНОВА,
Д.А. ТІЛЕУБЕКОВА, А.Е. ЕЛУБАЕВА

Микробиология және вирусология ғылыми-зерттеу орталығы, Алматы, Қазақстан

e-mail: j.gulnar60@mail.ru

ERWINIA AMYLOVORA БАКТЕРИЯЛЫҚ КҮЙІК ҚОЗДЫРҒЫШЫНА ҚАРСЫ АШЫТҚЫ КОЛЛЕКЦИЯЛЫҚ ДАҚЫЛДАРЫНЫҢ ИНГИБИТОРЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІН БАҒАЛАУ

Түйін

Мақалада коллекция *Erwinia amylovora* бактериялық күйік қоздырғышына қарсы антагонистік белсенділікке арналған ашытқы жинайтын дақылдарды скрининг нәтижелері берілген. Зерттелген 36 ашытқы штаммының тек 4 дақылында ингибиторлық белсенділік болды. Бұл *Torulopsis kefir var kumis* №114 3, *Kluyveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 кешені №20. Оларда патогеннің өсуін тежейтін аймақтар сәйкесінше (22, 23,5, 22,5 және 26 мм) болды. Ең үлкен антагонистік белсенділік ашытқы штаммында болды *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 кешені №20. 4 ашытқы дақылдарының компоненттік құрамын талдау (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluyveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 кешені №20) *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 кешені №20 және *Torulopsis sphaerica* №117 анықталғанын көрсетті 13 химиялық қосылыс, оның негізгі қосылысы Phenylethyl alcohol. Олардың пайыздық мөлшері сәйкесінше 43,1% құрайды. *Torulopsis kefir var* мәдениеті бар *kumis* №114 3 12 химиялық қосылыс, оның негізгі қосылысы 1-Butanol, 3-methyl - 15,7%. *Kluyveromyces marxianus* мәдениетінде 19 10 қосылыс бар, Ethyl Acetate негізгі қосылысы – 12,24%.

Нәтижелер зерттелген ашытқы дақылдары оларды *E. amylovora* өрт күйігінің қоздырғышына қатысты биобакылау агенттері ретінде одан әрі зерттеуге қызығушылық танытатынын көрсетеді.

Кілтті сөздер: ашытқы, *Erwinia amylovora*, антагонистік белсенділік, компоненттік құрамы.

IRSTI: 68.03.07

G.T. DZHAQIBAYEVA*, A.K. SADANOV, E.T. ISMAILOVA, B.B. BAYMAKHANOVA,
A.E. MOLZHIGITOVA, G.B. BAYMAKHANOVA, O.N. SHEMSHURA,
M.B. ALIMZHANOVA, D.A. TLEUBEKOVA, A.E. YELUBAEVA

Scientific Research Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

e-mail: j.gulnar60@mail.ru

EVALUATION OF THE INHIBITORY ACTIVITY OF COLLECTION YEAST CULTURES AGAINST THE CAUSATIVE AGENT OF BACTERIAL BURN ERWINIA AMYLOVORA

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.11

Abstract

The article presents the results of screening of collection yeast cultures for antagonistic activity against the causative agent of bacterial burn *Erwinia amylovora*. Of the 36 yeast strains studied, only 4 cultures had inhibitory activity. These are *Torulopsis kefir var kumis* №114 3, *Kluyveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20. Their pathogen growth suppression zones were (22, 23.5, 22.5 and 26 mm), respectively. The greatest antagonistic activity was in the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20. The analysis of the component composition of 4 yeast cultures (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluyveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20) showed that 13 chemical compounds were detected in cultures of *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20 and *Torulopsis sphaerica* №117, of which the main compound is Phenylethyl alcohol. Their percentage is 43.1%,

respectively. The culture of *Torulopsis kefyri* var. *kumis* №114 has 12 chemical compounds, of which the main compound is 1-Butanol, 3-methyl - 15.7%. And the *Kluyveromyces marxianus* culture has 19 10 compounds, the main compound Ethyl Acetate is 12.24%.

The data obtained indicate that the studied yeast cultures are of interest for further study of them as agents of biocontrol against the causative agent of bacterial burn *E. amylovora*.

Keywords: yeast, *Erwinia amylovora*, antagonistic activity, component composition.

Bacterial burn is one of the most harmful diseases of fruit crops, the causative agent of which is the bacterium *E. amylovora*. Currently, this disease has been registered in more than 50 countries. For Kazakhstan, this disease is quarantine, which can lead to a significant loss of harvest and the death of a large number of plants. Given that bacterial burn is an urgent problem for many countries that have been fighting it for decades, it is necessary to take into account the international experience of fighting the disease. Currently, in all countries where bacterial burn has been detected, constant monitoring and control of the manifestation and spread of bacterial burn is carried out.

The strategy of combating bacterial burn in many countries provides for an integrated control system, including sanitary and hygienic measures, copper-based preparations and biological control agents [1-3]. In world practice, chemical methods of control (biofungicides, antibiotics, in particular streptomycin, immunomodulators) are widely used against bacterial burns [4,5]. The biological method is one of the ways to reduce the harmfulness of the pathogen of the LHC. Burns. One of the methods may be the use of yeast. The use of antagonistic properties of some bacteria to inhibit others has been studied for many years, while little attention has been paid to the study of such properties in yeast [6].

Literary sources often describe the use of yeast as inhibitors of bacteria and fungi.. Yeast (also known as biocontrol yeast) are promising substitutes for chemical fungicides in the fight against the pathogen *Erwinia amylovora*. The use of yeast antagonists is harmless to the environment and safe for humans. Over the past few decades, the mechanisms of biocontrol of antagonistic yeasts, such as competition for nutrition and space, mycoparasitism and induction of host resistance, have been thoroughly studied. In addition, a combination of antagonistic yeast with other agents or treatments has been developed to increase the effectiveness of biocontrol [7-9]. In Germany, researchers offer live cultures as biocontrol agents [10].

The aim of our research was to evaluate the antagonistic activity of collectible yeast strains against the causative agent of bacterial burn.

Materials and methods of research

The objects of the study were 36 collection cultures of yeast genera: *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*. As a test culture, the causative agent of bacterial burn *Erwinia amylovora* was used, isolated from the affected fruits of the Golden Delishes apple tree growing in the Panfilovskiy district of the Almaty region. The antagonistic activity of yeast was determined by the method of wells [11,12]. Yeast was grown in test tubes on oblique media of Saburo solid nutrient medium at a temperature of 28°C for 2 days. The composition of the Saburo medium: peptone – 10 g / l, glucose – 40 g / l, agar – 20 g / l. For fermentation of cultures, yeast cultures grown on jambs were introduced into cones with a volume of 100 ml. with a liquid Saburo medium of 50 ml and placed on a rocking chair for 2 days with 180 rpm, at a temperature of 30°C. Antagonistic activity was determined as follows on the surface of the nutrient medium sucrose-peptone agar (SPA) 0.1 ml of the test culture was sifted with a Drygalsky spatula, then wells were made using a block cutter with a diameter of 10 mm. 0.3 ml of yeast culture fluid was introduced into the wells and cultured at 28°C for 1-2 days. Antagonistic activity was judged by the diameter of the pathogen growth-free zones formed around the wells. The experiment was carried out in three repetitions. The control was the clean environment of the SPA. Standard methods of finding average values and their average errors were used for mathematical processing of the results.

Results and discussion

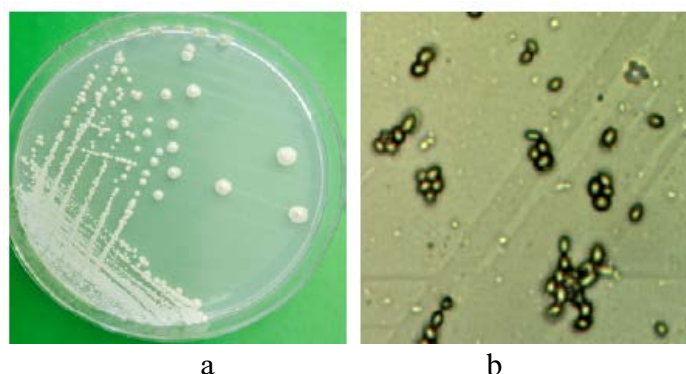
The antagonistic activity of 36 collection yeast cultures against *E. amylovora* was studied. The data obtained are presented in Table 1.

Table 1 – Zones of inhibition of the growth of the causative agent of bacterial burn *Erwinia amylovora* by various types of yeast.

| № | Name of yeast cultures | Growth suppression zones, mm |
|----|---|------------------------------|
| 1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Aport199 | 19±1,0 |
| 2 | <i>Candida krusei</i> №40 | 0 |
| 3 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Jaeger 1 | 0 |
| 4 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №24Д | 17,66±0,57 |
| 5 | <i>Torulopsis kefir var.kumis</i> №114 3 | 22,33±0,57 |
| 6 | <i>Saccharomyces lactis</i> 19 | 19,66±0,57 |
| 7 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Race Sochi Б | 0 |
| 8 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 17±1,0 |
| 9 | <i>Torulopsis candida</i> (folded R-shape) | 0 |
| 10 | <i>Rhodotorula glutinis var glutinis</i> (P) | 0 |
| 11 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №18 | 18±1,0 |
| 12 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> №14 | 18,33±1,15 |
| 13 | <i>Torulopsis candida</i> (smooth S- shape) | 0 |
| 14 | <i>Candida scotti</i> №Тул – 1 | 20±0 |
| 15 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> 4MA | 19,66±0,57 |
| 16 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Plum 21 | 20±0 |
| 17 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Prikum 123/3 | 0 |
| 18 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> 19 | 23,33±0,57 |
| 19 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Muscat (68) 16 | 18,33±0,57 |
| 20 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Riesling №23 | 17,66±0,57 |
| 21 | <i>Saccharomyces lactis</i> 14c | 20,33±1,52 |
| 22 | <i>Torulopsis sphaerica</i> №117 | 22,33±0,57 |
| 23 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kyrgyz Race | 20,33±1,52 |
| 24 | <i>Candida tropicalis</i> №K -41 | 14,66±1,52 |
| 25 | <i>Kluyveromyces</i> sp. №4 AT | 0 |
| 26 | <i>Candida tropicalis</i> №36 | 0 |
| 27 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) №III-7 | 0 |
| 28 | <i>Torulopsis sphaerica</i> №109K | 0 |
| 29 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №20 | 25,66±2,08 |
| 30 | <i>Kluyveromyces</i> sp. №16 M | 22,33±1,52 |
| 31 | <i>Candida</i> sp. №B-2 | 17,66±0,57 |
| 32 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Apricot | 19,33±1,15 |
| 33 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №19 | 18,66±1,15 |
| 34 | <i>Torulopsis candida</i> | 20,66±1,15 |
| 35 | <i>Rhodotorula glutinis var glutinis</i> (H) | 0 |
| 36 | <i>Rhodotorula glutinis var glutinis</i> №21 | 0 |
| 37 | Control (medium SPA) | 0 |

The conducted studies indicate that not all yeasts inhibit the growth of the *E. amylovora* test culture. Of the 36 yeast cultures tested, 13 cultures did not have inhibitory activity, only 4 cultures (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluyveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 complex №20). The growth suppression zones of the test culture were - 22.33±0.57–25.66±2.08 mm. The lowest indicators of antibacterial activity in relation to the test culture were shown by yeast cultures *Candida tropicalis* №K-41 and *Saccharomyces*

pombe. The growth suppression zones of the test culture were - 14.66 ± 1.52 - 17 ± 1.0 mm (Table 1). We stopped at the culture of *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20, isolated from the yeast sediment of wine material, which showed the highest growth suppression zones. Its phenotypic features and molecular genetic characteristics were studied (Figure 1).



a) colony growth on nutrient medium; b) yeast microscopy

Figure 1 – Macro and micrograph of *Saccharomyces cerevisiae strain (vini)* 2 complex №20

In order to clarify the specific identity of the selected antagonist, which was identified by morphological and cultural characteristics, we conducted a molecular genetic analysis in the laboratory of molecular genetic research of LLP "SPC Microbiology and Virology". Only the strain *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20, which had the greatest antagonistic activity, was analyzed.

The results of molecular genetic examination confirmed that the culture of *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20 identified by morphological and cultural characteristics is *Saccharomyces cerevisiae (vini)*. The degree of homology is 100% (Figure. 2).

GGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGGGTTCGTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATT
 CCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACTGT
 GGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACAC
 AAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAAATA
 TTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
 AATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGG
 GGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAG
 TTA ACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAG
 GTATAATGCAAGTACGGTTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTG
 GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAAATGTTCTTAAAGTTTGACCTC

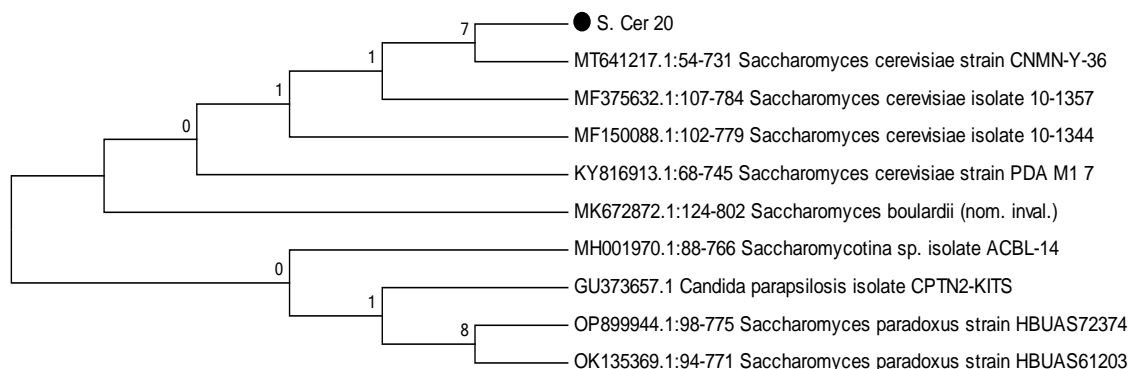


Figure 2- Results of molecular genetic studies of *Saccharomyces cerevisiae (vini)* culture 2 complex №20

The analysis of the component composition of 4 yeast cultures (*Torulopsis kefir var.kumis* №114 3, *Kluyveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, *Saccharomyces cerevisiae (vini)* 2 complex №20) showed that 13 chemical compounds were detected in cultures of

Saccharomyces cerevisiae (vini) 2 complex №20 and *Torulopsis sphaerica* №117 of which the main compound is Phenylethyl alcohol. Their percentage is 43.1%, respectively. The culture of *Torulopsis kefyr var.kumis* №114 has 12 chemical compounds, of which the main compound is 1-Butanol, 3-methyl - 15.7%. And the *Kluyveromyces marxianus* culture has 19 10 compounds, the main compound Ethyl Acetate is 12.24%. It is possible that these chemicals are inhibitors of the growth of the causative agent of bacterial burn *E. amylovora*. The purpose of further research will be to test the inhibitory effect of individual basic substances.

According to the research results, it can be concluded that 4 yeast cultures had antagonistic activity against *E. amylovora* (*Torulopsis kefyr var.kumis* №114 3, *Kluyveromyces marxianus* 19, *Torulopsis sphaerica* №117, the highest effect was found in *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 complex №20). The data obtained indicate that the studied yeast cultures are of interest for further study of them as agents of biocontrol against the causative agent of bacterial burn *E. amylovora*.

Funding

The work was carried out within the framework of the Scientific and Technical program BR 8574022 "Microbial preparations against the causative agent of bacterial burn of fruit crops" of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Thomson S.V. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight // Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. – Wallingford, UK: CABI, 2000, 9-36.
- 2 Steiner P. W. et al. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight// Fire blight: the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*, 2000, 339-358.
- 3 Sadanov A.K., Suleimenova Zh.B., Ismailova E.T., Shemshura O.N., Bajmahanova B.B., Bajmahanova G.B., Bis'ko N.A., Molzhigitova A.E., Tleubekova D.A. Bakterial'nyj ozhog plodovoy kul'tur. Mikrobiologiya zhəne virusologiya, 2023, 1: 1-6. (doi:53729/MV-AS.2023.01.02).
- 4 Sharma R, Singh D, Singh R. Biologicheskij kontrol' posle uborochnyh zabolevanij fruktov i ovoshchej mikrobnymi antagonistami: *Obzor. Biologicheskij kontrol'*, 2009, 50: 205-221. (doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.001).
- 5 Massart S, Martines-Medina M., Dzhidzhakli M.H. Biologicheskij kontrol' v epohu mikrobioma: problemy i vozmozhnosti. *Biologicheskij kontrol'*, 2015, 89: 98-108. (doi:10/1016/j.biocontrol.2015.06.003).
- 6 Bhupendra Koul, Manpriya Chopra, Supriya Lamba. Microorganisms as biocontrol agents for sustainable agriculture. Microbial products for sustainable ecosystem services, 2022, 45-68. (doi:10.106/B978-0-323-89938-3.00003-7).
- 7 Izabela Michalak, Jasmina Aliman, Alisa Hadzialulic, Vedrana Komlen. Smart agrochemicals for sustainable agriculture. 2022, 185-224. (doi:1016/I978-0-12-817036-6.00006-6).
- 8 Akhila Pole, Anisha Srivastava et al. Role of microbial biotechnology for strain improvement for agricultural sustainability. Developments in applied microbiology and biotechnology. 2022. 285-317. (doi:1016/978-0-323-91595-3.00001-x).
- 9 Xiaokang Zhang, Boqiang Li, Zhanquan Zhang. Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. *J.Fungi*(Basel), 2020, 6(3), 158, 1-2.
- 10 Sharma R, Singh D, Singh R. Biologicheskij kontrol' posle uborochnyh zabolevanij fruktov i ovoshchej mikrobnymi antagonistami: *Obzor. Biologicheskij kontrol'*, 2009, 50: 205-221. (doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.001).
- 11 Massart S, Martines-Medina M., Dzhidzhakli M.H. Biologicheskij kontrol' v epohu mikrobioma: problemy i vozmozhnosti. *Biologicheskij kontrol'*, 2015, 89: 98-108. (doi:10/1016/j.biocontrol.2015.06.003.9).
- 12 Dorosh A.P., Gregirchak N.N. Issledovanie termorezistentnosti i antagonisticheskikh svojstv drozhzhej *Saccharomyces cerevisiae* // «Zhivye i biokosnye sistemy», 2015, 11.
- 13 A. Seibold et al. Yeasts as antagonists against fireblight. *EPPO Bull*, 2004, 34: 3. 389–390.
- 14 Anikiev V.V., Lukomskaya K.A. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatijam po mikrobiologii.- Moskva, 1977, 142.
- 15 Sinyushina M.N., Samsonova M.N. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatijam po medicinskoj mikrobiologii. Moskva, 1974, 185.

МРНТИ: 68.41.35, 68.41.53

З.А. ЛАТЫПОВА*, Б.Ж. ИСАКУЛОВА, З.К. БУЙЕНБАЕВА,
А.Б. ЕСЕНАЛИЕВА, Р.А. КЕРИМБАЕВА, Ж.С. ТУРСЫНОВА,
О.Н. НУРЛЫБАЕВ

Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы, Казахстан

*e-mail: zalinal@list.ru

ДИАГНОСТИКА ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА СЕРОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.12

Аннотация

В данной статье представлены результаты исследований проб сывороток крови крупного рогатого скота (КРС) в реакции непрямой гемагглютинации на пастереллез КРС, а также данных ветеринарной отчетности Комитета ветеринарного контроля и надзора Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан за 2021 г. Определена эпизоотическая ситуация за 2021 г. по данной инфекции. Установлено 6 очагов пастереллеза КРС в 4-х областях республики (Актюбинская, Акмолинская, Алматинская и Восточно-Казахстанская), в которых определено от 1-го до 2-х эпизоотических очагов (далее ЭО). Из 1435 исследованных проб сывороток крови КРС положительный результат был отмечен в 192 случаях, что составило 13,38%.

Ключевые слова: *Pasteurella multocida*, пастереллез КРС, серологическая диагностика, РНГА, титр.

Пастереллез - как зооантропонозная болезнь представляет большую проблему, как для ветеринарии, так и для медицины. В связи с этим, необходимо строгое соблюдение мер профилактики, а в случае вспышки - быстрейшая ее ликвидация [1,6,9].

Pasteurella multocida — зоонозный патоген, способный вызывать респираторные расстройства у разных животных. У крупного рогатого скота *P. multocida* является одним из основных микроорганизмов, вызывающих комплекс респираторных заболеваний крупного рогатого скота с огромными экономическими потерями [2,3].

Респираторная болезнь крупного рогатого скота представляет собой мультифакториальный комплекс болезней крупного рогатого скота [4,5]. *P. multocida* является одним из наиболее важных бактериальных патогенов, связанных с болезнями дыхательных путей крупного рогатого скота [6,7,8]. Большой круг восприимчивых животных, исключительная приспособляемость возбудителя к обитанию в организме разнообразных видов живых существ в значительной степени способствуют широкому распространению пастереллеза [3,10].

Болезнь может сопровождаться высокой (до 100%) летальностью, снижением продуктивности, длительным носительством патогенных форм микроба. Кроме того, пастереллоносительство у этих животных может обуславливать появление болезни среди других видов млекопитающих и возникновение новых эпизоотических очагов [8,11,12].

Материалы и методы исследования

Изучение эпизоотологической характеристики территории страны по пастереллезу КРС осуществляли путем анализа данных ветеринарной отчетности КВКН МСХ РК за 2021 год.

Для определения текущей эпизоотической ситуации по пастереллезу КРС в республике, в 2021 году был осуществлен выезд сотрудников КазНИВИ и его филиалов в эпизоотологические единицы (ЭЕ) (к/х, ф/х, ТОО, СПХ, поселки и т.д.) 12 областей РК (Алматинская, Восточно-Казахстанская, Кызылординская, Павлодарская, Туркестанская, Жамбылская, Актюбинская, Западно-Казахстанская, Акмолинская, Карагандинская,

Северо-Казахстанская, Костанайская области) с различным эпизоотологическим статусом с целью отбора биоматериала (сыворотки крови, истечения из носа) для исследования в лабораторных условиях Казахского НИВИ и оценки эпизоотического состояния этих хозяйствующих субъектов по пастереллезу КРС. Всего было отобрано 1435 проб сыворотки крови для серологического исследования в РНГА.

Наличие в сыворотке крови животных антител к возбудителю пастереллеза определяли в РНГА используя эритроцитарный антигенный пастереллезный диагностикум.

В работе был использован готовый диагностический набор «Диагностикум эритроцитарный пастереллезный антигенный, сухой», производитель РПП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева», МЗ РК (серия 010422 Б/К №210, годен до 20.04.2024 г.). Диагностический титр антител 1:100.

Компоненты диагностического набора:

1. Твин-80 в разведении 1:100000
2. Исследуемая сыворотка
3. Сыворотка пастереллезная агглютинирующая жидкая 1:10 (положительный контроль)
4. Диагностикум эритроцитарный пастереллезный антигенный, сухой 2,5%

Результаты и обсуждение

За 2021 год на территории РК всего зарегистрировано 6 очагов пастереллезной инфекции в 4 областях (Актюбинская, Акмолинская, Алматинская и Восточно-Казахстанская), в которых установлено от 1 до 2 ЭО. Данные области были отнесены к зоне средней степени распространения инфекции. К благополучным зонам отнесены 10 областей республики (Карагандинская, Жамбылская, Южно-Казахстанская, Кызылординская, Костанайская, Северо-Казахстанская, Павлодарская, Западно-Казахстанская, Атырауская, Мангистауская). Территория РК с высокой степенью распространения пастереллеза КРС в 2021 г. не установлена. Результаты районирования территории РК по распространению пастереллеза КРС приведены на рисунке 1.

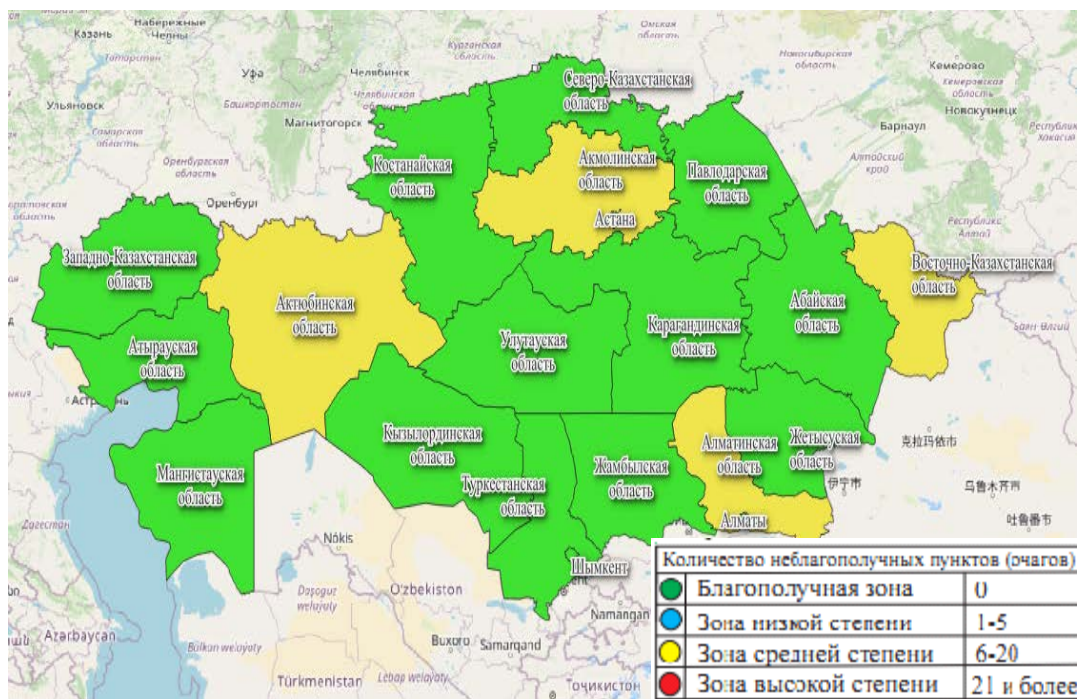


Рисунок 1 – Районирование территории РК на зоны по степени распространения пастереллезной инфекции среди КРС (по данным КВКН за 2021 г)

Для исследования на пастереллез КРС нами был взят биоматериал, согласно расчету выборки животных из эпизоотологических единиц (ЭЕ), подлежащих исследованию, в количестве 1435 сывороток крови для серологических исследований.

Весь материал, доставленный в лабораторию бактериологии ТОО «КазНИВИ», был подвергнут исследованию серологическим тестом (сыворотка крови по РНГА).

Серологическую диагностику проводили реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА), основанной на выявлении комплекса антиген-антитело. Для ее проведения использовали следующие компоненты: исследуемая сыворотка, Твин-80, физиологический раствор, пастереллезная агглютинирующая сыворотка, пастереллезный эритроцитарный диагностикум.

При слипании и равномерном покрытии дна лунки сенсibilизированными эритроцитами реакцию считали положительной. При несоответствии антител антигену комплекс не образовывался, визуально эритроциты располагаются на дне лунки в виде пуговки- реакция отрицательная.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты исследования сыворотки крови КРС на пастереллез методом РНГА (за 2021 год)

| № | Области | Вакцинация | Кол-во образцов | РНГА (%) |
|----|------------------------|------------------|-----------------|------------|
| 1 | Алматинская | Не вакцинированы | 146 | 13 (8,9%) |
| 2 | Туркестанская | Не вакцинированы | 120 | 22 (18,3%) |
| 3 | Карагандинская | Не вакцинированы | 119 | 24 (20,1%) |
| 4 | Кызылординская | Не вакцинированы | 118 | 27 (22,8%) |
| 5 | Восточно-Казахстанская | Не вакцинированы | 120 | 12 (10%) |
| 6 | Жамбылская | Не вакцинированы | 102 | 10 (9,8%) |
| 7 | Западно-Казахстанская | Не вакцинированы | 116 | 22 (18,9%) |
| 8 | Северо-Казахстанская | Не вакцинированы | 116 | 8 (6,9%) |
| 9 | Павлодарская | Не вакцинированы | 120 | 19 (15,8%) |
| 10 | Костанайская | Не вакцинированы | 118 | 5 (4,2%) |
| 11 | Актюбинская | Не вакцинированы | 120 | 15 (12,5%) |
| 12 | Акмолинская | Не вакцинированы | 120 | 15 (12,5%) |

Полученные данные собственных исследований, в сравнении с официальными, показали, что фактически заболеваемость крупного рогатого скота пастереллезом гораздо выше. Ареал пастереллеза среди крупного рогатого скота охватывает все исследованные 12 областей Казахстана, но степень неблагополучия варьирует в более широких пределах.

Наиболее неблагополучными по заболеваемости пастереллезом среди крупного рогатого скота являются Кызылординская, Карагандинская, Западно-Казахстанская, Туркестанская области, где показатели превышают аналогичные показатели по остальным регионам РК. За анализируемый период из 1435 исследованных проб по РНГА положительный результат был отмечен в 192 случаях, что составило 13,38%.

Заключение

В 2021 году на территориях РК было выявлено 6 очагов пастереллезной инфекции в 4-х областях (Актюбинская, Акмолинская, Алматинская и Восточно-Казахстанская), в каждой из которых установлено от 1 до 2 ЭО. Данные области были отнесены к зонам со средней степенью распространения инфекции. По результатам собственных серологических исследований к неблагополучным по заболеванию областям относятся Кызылординская, Карагандинская, Западно-Казахстанская, Туркестанская области.

Изучение данных о пастереллезе крупного рогатого скота за 2021 г. позволяет утверждать, что эта болезнь получила широкое распространение и является серьезным препятствием развитию скотоводства. Большое значение в распространении болезни

имеют животные – пастереллоносители, особенно в хозяйствах, где регистрируются повторные вспышки инфекции. Для пастереллеза характерны стационарность, что обусловлено пастереллоносительством среди неблагополучных групп животных и повторными вспышками заболевания при смешанном содержании животных пастереллоносителей со здоровыми группами.

Финансирование

Работа выполнена в рамках ПЦФ МСХ РК (2021-2023 гг.) по проекту «Изучить эпизоотологическую характеристику территории страны по пастереллезу КРС и разработать ветеринарно-санитарные мероприятия по повышению их эффективности».

Литература:

- 1 Su, A., Tong, J., Fu, Y. et al. Infection of bovine well-differentiated airway epithelial cells by *Pasteurella multocida*: actions and counteractions in the bacteria–host interactions. *Vet Res* 51, 140 (2020) (doi.org/10.1186/s13567-020-00861-2).
- 2 Латыпова З., Намет А., Исакулова Б., Буйенбаева З., Керимбаева Р. Зонирование территории республики Казахстан по степени распространения заболевания пастереллезом среди крупного рогатого скота. *Микробиология және вирусология*, 2022, 3: 55–63 (doi.org/10.53729/MV-AS.2022.03.04).
- 3 Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: From zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol*, 2013, Rev 26(3):631–655 (doi.org/10.1128/CMR.00024-13).
- 4 Snowden G.D., Van Vleck L.D., Cundiff L.V., Bennett G.L. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors, 2008, *J Anim Sci* 84(8):1999– (doi.org/10.2527/jas.2006-046).
- 5 Caswell J.L. Failure of respiratory defenses in the pathogenesis of bacterial pneumonia of cattle, 2014, *Vet Pathol* 51(2):393–409 (doi.org/10.1177/030098581350282).
- 6 Kirkimbaeva Zh.S., Biyashev B.K., Chuzhebaeva G.D., Ermaganbetova S.E., Kuzembekova G.B. The study of the specificity and sensitivity of the PCR system in the detection of DNA of the causative agent of pasteurellosis in sick animals. The journal «Researches, Results» KazNAU. Almaty, 2015: 56-60.
- 7 Srikumaran S., Kelling CL., Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Anim Health*, 2008, Res Rev 8(2):215–229 (doi.org/10.1017/s1466252307001326).
- 8 Mc Daneld T.G., Kuehn L.A., Keele J.W. Evaluating the microbiome of two sampling locations in the nasal cavity of cattle with bovine respiratory disease complex (brdc), 2008, *J Anim Sci* 96(4):1281–1287 (doi.org/10.1093/jas/sky032).
- 9 Бияшев К.Б., Макбуз А.Ж., Сарыбаева Д.А., Булегенова М.Д., Алтенов А.Е., Распространение респираторных болезней молодняка сельскохозяйственных животных в Алматинской области. Алматы, 2021, С. 9-13.
- 10 Gershwin L.J., Van Eenennaam A.L., Anderson M.L., Mc Eligot H.A., Shao M.X., Toaff-Rosenstein R., Taylor J.F., Neibergs H.L., Womack J. Bovine Respiratory Disease Complex Coordinated Agricultural Project Research T, 2015, Single pathogen challenge with agents of the bovine respiratory disease complex. *PLoS One* 10(11) (doi.org/10.1371/journal.pone.0142479).
- 11 Harper M., Boyce J.D., Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur, 2016, *FEMS Microbiol Lett* 265 (1):1–10 (doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00442).
- 12 Dabo S.M., Taylor J.D., Confer A.W., 2007, *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8(2):129–150 (doi.org/10.1017/S1466252307001399).

З.А. ЛАТЫПОВА*, Б.Ж. ИСАКУЛОВА, З.К. БУЙЕНБАЕВА,
А.Б. ЕСЕНАЛИЕВА, Р.А. КЕРИМБАЕВА, Ж.С. ТУРСЫНОВА,
О.Н. НУРЛЫБАЕВ

Қазақ ғылыми зерттеу ветеринария институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: zalinal@list.ru

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ПАСТЕРЕЛЛЕЗІН СЕРОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІС БОЙЫНША БАЛАУ

Түйін

Бұл мақалада ірі қара мал пастереллезіне тікелей емес гемагглютинация реакциясында ірі қара малының қан сарысулары үлгілерін зерттеу нәтижелері, сондай-ақ Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрлігі Ветеринариялық бақылау және қадағалау комитетінің 2021 жылға арналған ветеринариялық есебінің деректері берілген. Аталған инфекция бойынша 2021 жылға эпизоотиялық жағдай анықталды. Республиканың 4 облысында (Ақтөбе, Ақмола, Алматы және Шығыс Қазақстан) ірі қара мал пастереллезінің 6 ошағы анықталды, оларда 1-ден 2-ге дейін эпизоотикалық ошақ (ары қарай ЭО) анықталды. Ірі қара малдың қан сарысуының зерттелген 1435 сынамасынан 192 жағдайда оң нәтиже байқалып, 13,38% құрады.

Кілтті сөздер: *Pasteurella multocida*, ИҚМ пастереллезі, серологиялық балау, ТЕГАР, титр.

IRSTI: 68.41.35, 68.41.53

Z.A. LATYPOVA*, B.Zh. ISSAKULOVA, Z.K. BUIENBAYEVA,
A.B. YESSENALIYEVA, R.A. KERIMBAYEVA, J.S. TURSINOVA,
O.N. NURLYBAEV

Kazakh Research Veterinary Institute, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: zalinal@list.ru

DIAGNOSIS OF PATEURELLOSIS IN CATTLE BY SEROLOGICAL METHOD

doi:10.53729/MV-AS.2023. 02.12

Abstract

This article presents the results of studies of blood serum samples of cattle in the reaction of indirect hemagglutination to pasteurellosis of cattle and reporting of the Veterinary Control and Supervision Committee of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan for 2021 and based on our own research. The epizootic situation for 2021 for this infection has been determined. 6 foci of pasteurellosis of cattle were established in 4 regions of the republic (Aktobe, Akmola, Almaty and East Kazakhstan), in which from 1 to 2 epizootic foci (further in EU) were determined. Of the 1435 studied samples of blood serum of cattle, a positive result was noted in 192 cases, which amounted to 13.38%.

Keywords: *Pasteurella multocida*, pasteurellosis of cattle, serological diagnosis, indirect haemagglutination reaction, titer.

Pasteurellosis is a zoonanthroponotic disease is a big problem for both veterinary medicine and medicine. Due to this, strict adherence to preventive measures is necessary, and in the event of an outbreak, its fastest elimination [1,6,9].

Pasteurella multocida is a zoonotic pathogen that can cause respiratory distress in a variety of animals. In cattle *P. multocida* is one of the main microorganisms causing a complex of respiratory diseases in cattle with huge economic losses [2,3].

Respiratory disease of cattle is a multifactorial complex of diseases in cattle [4,5]. *Pasteurella multocida* is one of the most important bacterial pathogens associated with respiratory diseases in cattle [6,7,8]. A large range of susceptible animals, the exceptional adaptability of the

pathogen to living in the body of various species of living beings largely contribute to the widespread spread of pasteurellosis [3,10].

The disease can be accompanied by high (up to 100%) mortality, decreased productivity, and long-term carriage of pathogenic forms of the microbe. In addition, pasteurellosis in these animals can cause the appearance of the disease among other mammalian species and the emergence of new epizootic foci [8,11,12].

Materials and methods of research

The study of the epizootological characteristics of the country's territory for pasteurellosis of cattle was carried out by analyzing the data of the veterinary reporting of the Veterinary Control and Supervision Committee of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan for 2021.

To determine the current epizootic situation for cattle pasteurellosis in the republic, in 2021, employees of KazSRVI and its branches were sent to the EU (farm, LLP, own farm, villages, etc.) of 12 regions of the Republic of Kazakhstan (Almaty, East Kazakhstan, Kyzylorda, Pavlodar, Turkestan, Zhambyl, Aktobe, West Kazakhstan, Akmola, Karaganda, North Kazakhstan, Kostanay region) with different epizootological status in order to select biomaterial (blood serum, nasal discharge) for research in the laboratory of the Kazakh NIVI and assess the epizootic state of these economic entities for cattle pasteurellosis. A total of 1435 blood serum samples were taken for serological testing at the indirect haemagglutination reaction.

The presence in the blood serum of animal antibodies to the causative agent of pasteurellosis was determined in the indirect haemagglutination reaction using an erythrocyte antigenic pasteurellosis diagnosticum.

We used a ready-made diagnostic kit "Diagnosticum erythrocyte pasteurellous antigenic, dry", manufacturer of RSE on REM "National Scientific Center for Especially Dangerous Infections named after M. Aikimbaev", Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (series 010422 B / C No. 210, valid until 04/20/2024). Diagnostic antibody titer 1:100.

Diagnostic kit components:

1. Twin-80 in breeding 1:100000
2. Test serum
3. Serum *Pasteurella* agglutinating liquid 1:10 (positive control)
4. Diagnosticum erythrocyte pasteurellous antigenic, dry 2.5%.

Results and discussion

In 2021, a total of 6 foci of pasteurellosis infection were registered on the territory of the Republic of Kazakhstan in 4 regions (Aktobe, Akmola, Almaty and East Kazakhstan), in which from 1 to 2 EU's were found. These areas were classified as a zone of medium spread of infection. 10 regions of the republic are classified as safe zones (Karaganda, Zhambyl, South Kazakhstan, Kyzylorda, Kostanay, North Kazakhstan, Pavlodar, West Kazakhstan, Atyrau, Mangystau). The territory of the Republic of Kazakhstan with a high degree of spread of cattle pasteurellosis in 2021 has not been established. The results of the zoning of the territory of the Republic of Kazakhstan on the spread of pasteurellosis of cattle are shown in figure 1.

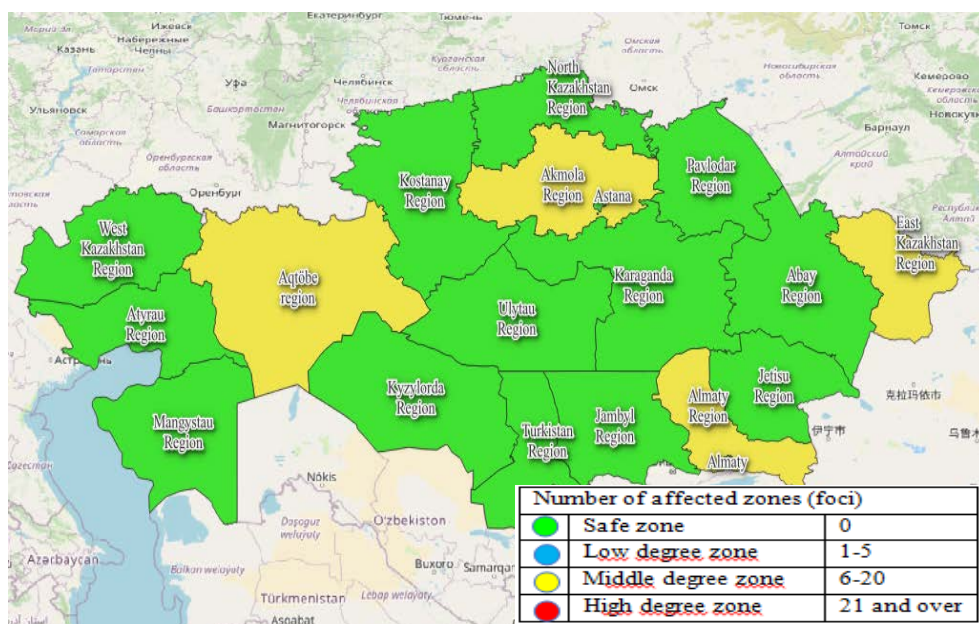


Figure 1 - Zoning of the territory of the Republic of Kazakhstan into zones according to the degree of spread of pasteurilosis infection among cattle. (According to the Veterinary Control and Supervision Committee of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan for 2021 year)

For the study of cattle pasteurilosis, we took a biomaterial, according to the calculation of a sample of animals from epizootological units (EU) to be studied, in the amount of 1435 blood sera for serological studies.

All material delivered to the bacteriology laboratory of LLP KazSRVI was subjected to a serological test (blood serum according to indirect haemagglutination reaction).

Serological diagnostics was carried out by the indirect hemagglutination reaction (IHAR), based on the detection of an antigen-antibody complex.

For its implementation, the following components were used: the test serum, TWEEN-80, physiological saline, pasteurilous agglutinating serum, pasteurilous erythrocyte diagnosticum.

When sticking and evenly covering the bottom of the well with sensitized erythrocytes, the reaction was considered positive. If the antibodies did not correspond to the antigen, the complex was not formed, visually, the erythrocytes are located at the bottom of the well in the form of a button - the reaction is negative.

Results studies are presented in table 1.

Table 1 - The results of the study of cattle blood serum for pasteurilosis by the IHAR method (for 2021 year)

| № | Areas | Vaccination | Number of samples | IHAR (%) |
|---|-----------------|----------------|-------------------|------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | Almaty | not vaccinated | 146 | 13 (8.9%) |
| 2 | Turkestan | not vaccinated | 120 | 22 (18.3%) |
| 3 | Karaganda | not vaccinated | 119 | 24 (20.1%) |
| 4 | Kyzylorda | not vaccinated | 118 | 27 (22.8%) |
| 5 | East Kazakhstan | not vaccinated | 120 | 12 (10%) |
| 6 | Zhambyl | not vaccinated | 102 | 10 (9.8%) |
| 7 | West Kazakhstan | not vaccinated | 116 | 22 (18.9%) |

Table 1 continued

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|------------------|----------------|-----|------------|
| 8 | North Kazakhstan | not vaccinated | 116 | 8 (6.9%) |
| 9 | Pavlodar | not vaccinated | 120 | 19 (15.8%) |
| 10 | Kostanay | not vaccinated | 118 | 5 (4.2%) |
| 11 | Aktobe | not vaccinated | 120 | 15 (12.5%) |
| 12 | Akmola | not vaccinated | 120 | 15 (12.5%) |

The data obtained from our own studies, in comparison with the official ones, showed that the actual incidence of pasteurellosis in cattle is much higher. The range of pasteurellosis among cattle covers all the studied 12 regions of Kazakhstan, but the degree of trouble varies widely.

The most unfavorable in terms of the incidence of pasteurellosis among cattle are Kyzylorda, Karaganda, West Kazakhstan, Turkestan regions, where the figures exceed those in other regions of the Republic of Kazakhstan.

During the analyzed period, out of 1435 samples studied by IHAR, a positive result was noted in 192 cases, which amounted to 13.38%.

The study of data on cattle pasteurellosis over the past 2021 year suggests that this disease has become widespread and is a serious obstacle to the development of cattle breeding.

Conclusion

In 2021, 6 foci of pasteurellosis infection were identified in the territories of the Republic of Kazakhstan in 4 regions (Aktobe, Akmola, Almaty and East Kazakhstan), in each of which from 1 to 2 EOs were established. These areas were classified as zones with an average degree of infection. According to the results of our own serological studies, the Kyzylorda, Karaganda, West Kazakhstan, Turkestan regions are classified as unfavorable for the disease.

The study of data on cattle pasteurellosis for 2021 suggests that this disease is widespread and is a serious obstacle to the development of livestock. Animals carrying *Pasteurella* are of great importance in the spread of the disease, especially in farms where repeated outbreaks of infection are recorded. Pasteurellosis is characterized by stationarity, which is due to Pasteurellosis among disadvantaged groups of animals and repeated outbreaks of the disease when the content of pasteurell-bearing animals is mixed with healthy groups.

Funding

The work was carried out within the framework of the PCF of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (2021-2023) under the project "To study the epizootological characteristics of the country's territory for cattle pasteurellosis and develop veterinary and sanitary measures to improve their effectiveness".

References:

- 1 Su, A., Tong, J., Fu, Y. et al. Infection of bovine well-differentiated airway epithelial cells by *Pasteurella multocida*: actions and counteractions in the bacteria–host interactions. *Vet Res* 51, 140 (2020) (doi.org/10.1186/s13567-020-00861-2).
- 2 Latypova Z., Namet A., Isakulova B., Bujenbaeva Z., Kerimbaeva R. Zonirovanie territorii respublikii Kazahstan po stepeni rasprostraneniya zabollevaniya pasterellezom sredi krupnogo rogatogo skota. *Mikrobiologija zhane virusologija*, 2022, 3: 55–63 (doi.org/10.53729/MV-AS.2022.03.04).
- 3 Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: From zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol*, 2013, Rev 26(3):631–655 (doi.org/10.1128/CMR.00024-13).
- 4 Snowden G.D., Van Vleck L.D., Cundiff L.V., Bennett G.L. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors, 2008, *J Anim Sci* 84(8):1999– (doi.org/10.2527/jas.2006-046).
- 5 Caswell J.L. Failure of respiratory defenses in the pathogenesis of bacterial pneumonia of cattle, 2014, *Vet Pathol* 51(2):393–409 (doi.org/10.1177/030098581350282).

6 Kirkimbaeva Zh.S., Biyashev B.K., Chuzhebaeva G.D., Ermaganbetova S.E., Kuzembekova G.B. The study of the specificity and sensitivity of the PCR system in the detection of DNA of the causative agent of pasteurellosis in sick animals. The journal «Researches, Results» KazNAU. Almaty, 2015: 56-60.

7 Srikumaran S., Kelling CL., Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. Anim Health, 2008, Res Rev 8(2):215–229 (doi.org/10.1017/s1466252307001326).

8 Mc Daneld T.G., Kuehn L.A., Keele J.W. Evaluating the microbiome of two sampling locations in the nasal cavity of cattle with bovine respiratory disease complex (brdc), 2008, J Anim Sci 96(4):1281–1287 (doi.org/10.1093/jas/sky032).

9 Bijashev K.B., Makbuz A.Zh., Sarybaeva D.A., Bulegenova M.D., Altenov A.E., Rasprostranenie respiratornyh boleznej molodnjaka sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh v Almatinskoj oblasti. Almaty, 2021, S. 9-13.

10 Gershwin L.J., Van Eenennaam A.L., Anderson M.L., Mc Eligot H.A., Shao M.X., Toaff-Rosenstein R., Taylor J.F., Neibergs H.L., Womack J. Bovine Respiratory Disease Complex Coordinated Agricultural Project Research T, 2015, Single pathogen challenge with agents of the bovine respiratory disease complex. PLoS One 10(11) (doi.org/10.1371/journal.pone.0142479).

11 Harper M., Boyce J.D., Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur, 2016, FEMS Microbiol Lett 265 (1):1–10 (doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00442).

12 Dabo S.M., Taylor J.D., Confer A.W., 2007, *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 8(2):129–150 (doi.org/10.1017/S1466252307001399).

MPHTI:65.33.29

Л.Б. УМИРАЛИЕВА¹, А.Б. АБУОВА^{1,2*}, Р.Х. КАНДРОКОВ³, М.С. ИСАБЕКОВА¹,
М. ХАЛМУХАМЕДОВА¹

¹Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Алматы, Казахстан

²Международный инженерно – технологический университет, Алматы, Казахстан

³Российский биотехнологический университет, Москва, Россия

*e-mail: a_burkhatovna@mail.ru

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ ИЗ МУКИ ТРИТИКАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗАКВАСКИ НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.13

Аннотация

Пшенично-ржаной гибрид - тритикале, обладая богатым аминокислотным составом и пониженным содержанием глютена в составе муки, на сегодняшний день является перспективной зерновой культурой для использования в хлебопекарном производстве. Однако традиционные рецептуры, которые применяются для выпечки пшеничного и ржаного хлеба, не подходят для тритикалевого, требуя нового подхода к технологии приготовления. Для улучшения свойств теста и готовой выпечки использована закваска на основе консорциума молочнокислых бактерий. В состав консорциума вошли три штамма лактобактерий: *Limosilactobacillus fermentum* ЗШ1, *Limosilactobacillus pontis* 9КЗ, *Lactocaseibacillus paracasei* 126. На основе консорциума были разработаны несколько видов закваски, содержащих тритикалеву и пшеничную муку, воду и консорциум. Были определены кислотность, антагонистическая и ферментативная активность закваски. Осуществлена пробная выпечка хлеба с разным содержанием закваски, в ходе которой было определено, что добавление закваски в количестве 10% в технологическом процессе выработки тритикалевого хлеба позволяет сократить продолжительность расстойки на 12 минут, улучшает качество готового продукта и увеличивает сроки хранения готовых изделий до 5-6 суток, а также повышает устойчивость хлеба к «картофельной болезни» и плесневению за счет высокой антагонистической активности пробиотических микроорганизмов закваски.

Ключевые слова: тритикале, молочнокислые бактерии, пробиотическая закваска.

Известно, что имеющая приоритет в использовании пшеница недостаточно устойчива к ряду заболеваний, страдает от экстремальных экологических условий, имеет пониженное содержание ряда незаменимых аминокислот, в первую очередь, лизина. Преимуществом ржи являются высокие продуктивность и устойчивость к неблагоприятным условиям, в то же время она отличается низкими хлебопекарными свойствами. В связи с этим, представляет интерес зерновая культура тритикале, представляющая собой гибрид пшеницы и ржи. Широкое и быстрое распространение тритикале произошло благодаря высокой урожайности, неприхотливости в возделывании (устойчивости к болезням, позволяющей исключить предпосевное протравливание семян, высокой зимостойкости), повышенному содержанию лизина и универсальности в использовании [1-5].

Вместе с тем, отсутствие практической реализации технологии хлеба из тритикале, низкая удовлетворенность потребителей ассортиментом хлебобулочных изделий, выявляемая в процессе социологических опросов, а также необходимость актуализации подходов к оценке потребительских свойств обогащенных изделий, обосновывают целесообразность проведения исследований в этом направлении.

Большой интерес представляет применение в технологии мучных кондитерских изделий вместо муки пшеничной высшего сорта тритикалевой муки, которая, во-первых, отличается более высоким содержанием жизненно важной аминокислоты лизина в 1 г

белка, большим содержанием рибофлавина, тиамина, некоторых макро- и микроэлементов, во-вторых, обладает лучшими технологическими свойствами для данных видов изделий, так как содержит меньше клейковины слабой по качеству [6-10].

На основании комплексных исследований показателей безопасности, хлебопекарных свойств и состава зерна тритикале теоретически обоснована и научно подтверждена целесообразность его применения в технологии производства хлеба. Разработанная закваска на основе консорциума молочнокислых бактерий (МКБ) *Limosilactobacillus fermentum* ЗШ1, *Limosilactobacillus pontis* 9К3, *Lactocaseibacillus paracasei* 126, антагонистически активного в отношении бактерий *Bacillus subtilis*, может быть использована в приготовлении тритикалевого хлеба для защиты его от микробиологической порчи [11-13].

Научная новизна также заключается в научном обосновании рецептуры и технологии производства комбикормов с применением пророщенного зерна тритикале и использованием экструзионной технологии с целью повышения качества и увеличения срока хранения.

Материалы и методы исследования

Основными объектами разработки служили закваска и хлеб.

Экспериментальные исследования проводили с помощью ниже приведенных современных методов, позволяющих на основе комплекса показателей получить характеристику сырья и продукции.

Для получения закваски использовали муку тритикале и пшеничную муку высшего сорта. В качестве закваски на основе МКБ использовали отобранный ранее «Консорциум 2», состоящий из *Limosilactobacillus fermentum* ЗШ1, *Limosilactobacillus pontis* 9К3 и *Lactocaseibacillus paracasei* 126 в соотношении 1:1:1. Консорциум МКБ вносили в питательную среду в количестве 10%, культивировали при температуре $35 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 48 часов.

Оценку биотехнологических свойств консорциума (рН культуральной жидкости, кислотообразующей активности, антагонизма) проводили при культивировании микроорганизмов на среде МРС.

Для исследования антагонистической активности молочнокислых бактерий использовали метод диффузии в агар. На поверхность плотного агара МПА в чашках Петри засекали газонем 0,1 мл тест-культуры для определения антибиотической активности *Bacillus subtilis* АТСС 6633 (1×10^6 КОЕ/мл). После засева тест-культуры стерильным блокорезом вырезали в среде лунки, диаметром 10 мм, по 2 лунки на каждый исследуемый штамм МКБ. В каждую лунку вносили исследуемый штамм в жидкой среде МРС.

Титруемую кислотность определяли методом Тернера. Для этого отмеряли 10 мл образца и добавляли 20 мл дистиллированной воды и 3 капли 1%-ого раствора фенолфталеина. Полученную смесь перемешивали и титровали раствором 0,1н едкого натра до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. Результат анализа получали путем расчета количества щелочи, ушедшей на титрование, умноженного на 10.

Распространенным методом косвенного определения активности МКБ является применение индикаторов-красителей, восстановленные формы которых под действием ферментов микроорганизмов изменяют окраску. Мы определяли ферментативную активность МКБ по скорости перехода голубой окраски метиленовой сини (0,01% р-р) в бесцветную. В односуточных чистых культурах МКБ начало обесцвечивания метиленовой сини отмечалось через 23-27 мин, полное обесцвечивание наступало через 50-70 мин. Это свидетельствует о высокой ферментативной активности культур.

На основе тритикалевой и пшеничной муки создали три варианта закваски для сравнения:

Тритикалевая мука + вода + консорциум

Тритикалевая мука и пшеничная мук (1:1) + вода + консорциум

Пшеничная мука + вода + консорциум

Соотношение муки с водой 1:2 и 10% засев консорциума

Лабораторные образцы хлеба готовили со следующим количеством вносимой закваски:

Образец 1 – контроль по рецептуре без закваски;

Образец 2 – с закваской в количестве 5%;

Образец 3 – с закваской в количестве 8%;

Образец 4 – с закваской в количестве 10%;

Образец 5 - с закваской в количестве 12%.

В качестве контроля использовали образцы хлеба из тритикалевой муки без закваски. Анализ качества хлеба проводили через 14–16 ч после выпечки по общепринятым методикам.

Результаты и обсуждение

В целях отработки оптимальных биотехнологических режимов получения консорциума были проведены исследования по подбору питательной среды, определению оптимального времени культивирования, обеспечивающих высокий титр клеток МКБ и максимальное проявление ими антагонистических свойств.

В процессе 48 часов культивирования консорциума проводилась оценка биотехнологических свойств - рН культуральной жидкости, кислотообразующей активности, антагонизма МКБ в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 и титра клеток (таблица 1).

Таблица 1 - Характеристика промышленно-ценных свойств консорциума

| | |
|--------------------------------------|------------|
| рН | 4,05 |
| Титруемая кислотность по Тернеру, °Т | 125 °Т |
| Титр клеток, КОЕ/мл | 10^{-10} |
| Антагонистическая активность, мм | 20,3 ±0,3 |

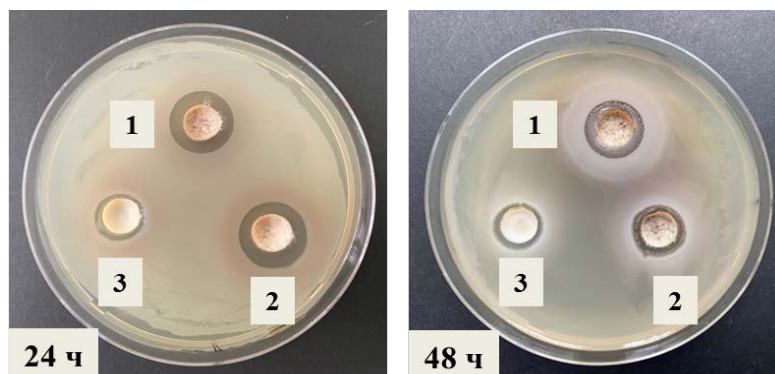
Определяли все показатели через 24 и 48 часов (таблица 2).

Таблица 2 - Характеристика промышленно-ценных свойств закваски

| Показатели | Варианты | | | | | |
|---|---------------|-----------|------------|----------------|-----------|-----------|
| | Через 24 часа | | | Через 48 часов | | |
| | т | пш | т/пш | т | пш | т/пш |
| рН | 3,75 | 3,73 | 3,67 | 3,68 | 3,51 | 3,57 |
| Титруемая кислотность по Тернеру, °Т | 235 | 111 | 155 | 250 | 119 | 175 |
| Титр клеток, КОЕ/мл | 10^{11} | 10^{11} | 10^{-11} | 10^{10} | 10^{10} | 10^{10} |
| Антагонистическая активность в отношении <i>Bacillus subtilis</i> , мм | 17,0±0,1 | 14,0±0,2 | 19,0±0,1 | 17,0±0,1 | 13,0±0,1 | 15,0±0,1 |
| Ферментативная активность, мин | 42 | 65 | 56 | 43 | 72 | 57 |
| Примечание – тритикалевая мука, пшеничная мука, тритикалевая/пшеничная мука | | | | | | |

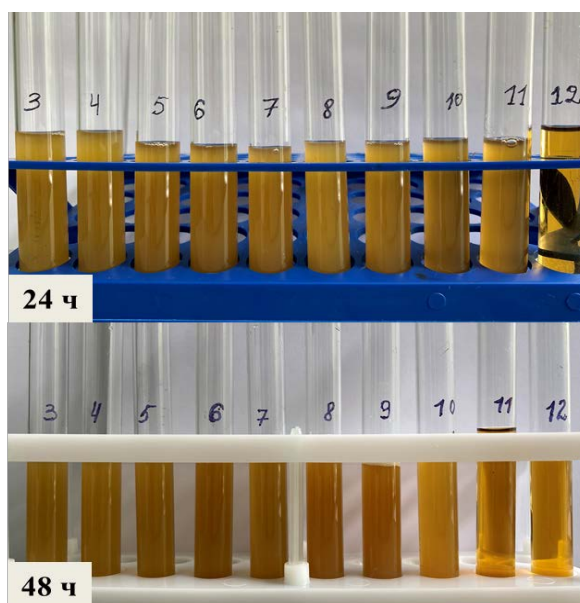
Наибольший антагонизм МКБ к 24 часам культивирования проявлялся при использовании закваски из муки тритикале в смеси с пшеничной мукой (диаметр зоны подавления роста *Bacillus subtilis* 19 мм) и из тритикалевой муки (17 мм). К 48 часам культивирования консорциума на среде, с использованием только тритикалевой муки, его антагонистическая активность сохраняется, а на смеси пшеничной муки и тритикале снижается до 15 мм (рисунок 1А). Наиболее интенсивному кислотонакоплению способствует закваска на тритикалевой муке. Использование закваски при культивировании в течение 24 часов позволяет достичь титра 10^{11} КОЕ/мл. Через 48 часов титр снизился до 10^{10} КОЕ/мл (рисунок 1Б).

А



А - антагонистическая активность заквасок в отношении тест-культуры *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1-мука тритикале; 2-мука тритикале+пшеничная мука; 3- пшеничная мука)

Б

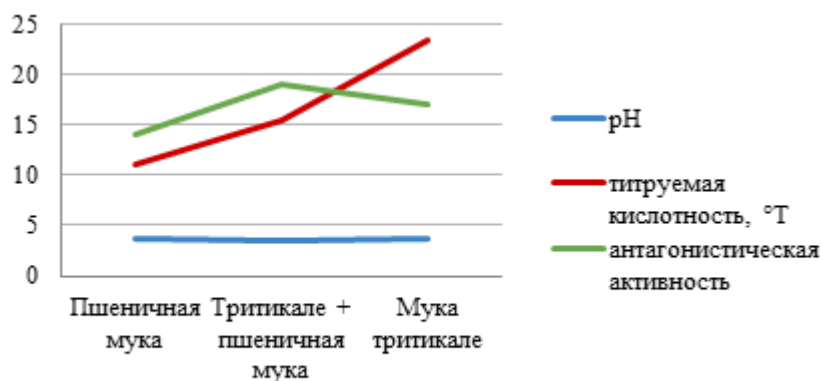


Б - титр МКБ, 24ч - 10^{11} КОЕ/мл; 48ч - 10^{10} КОЕ/мл;

Рисунок 1 - Физиологическая активность консорциума молочнокислых бактерий

Характеристика промышленно-ценных свойств вариантов закваски и динамика ферментативной активности консорциума МКБ в процессе культивирования на различных вариантах закваски показаны на рисунках 2 и 3.

А



Б

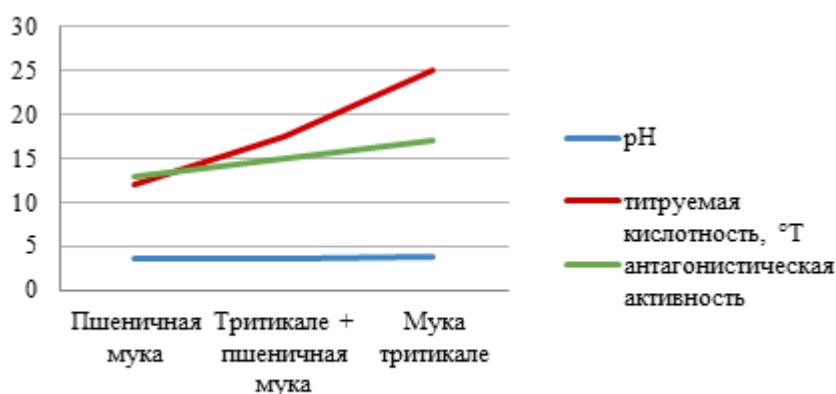


Рисунок 2 - Характеристика промышленно-ценных свойств вариантов закваски (А- через 24 часа; Б- через 48 часов;)

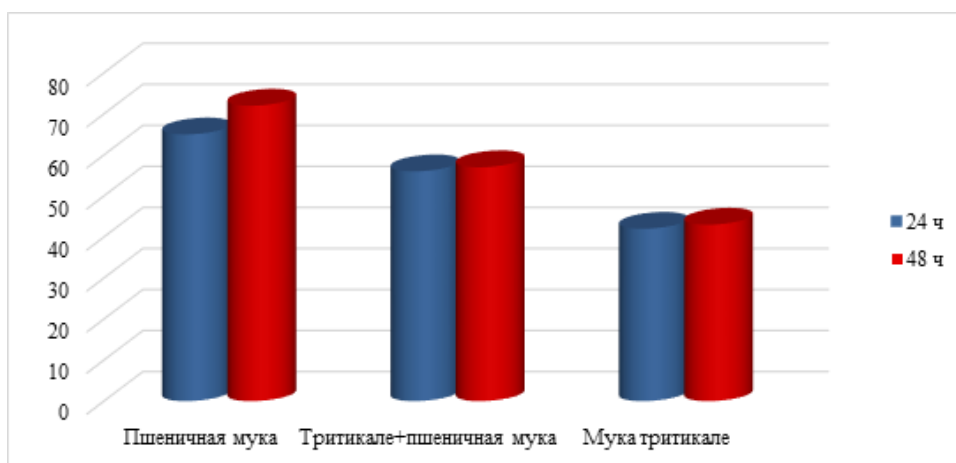


Рисунок 3 – Динамика ферментативной активности консорциума МКБ в процессе культивирования на различных вариантах закваски (ось абсцисс – варианты закваски; ось ординат – ферментативная активность, мин)

Нами показано, что к 24 часам и после 48 часов культивирования МКБ минимальное время начала обесцвечивания метиленовой сини отмечается на среде с тритикалевой мукой, полное обесцвечивание в данном варианте наступало через 42-43 мин. Это свидетельствует о высокой ферментативной активности консорциума.

Таким образом, оптимальными режимами культивирования консорциума для сохранения высокого титра клеток МКБ и максимального проявления ими антагонистических свойств является закваска на тритикалевой муке, продолжительность культивирования 48 часов, титр МКБ – 10^{10} КОЕ/мл, антагонистическая активность в отношении *B. subtilis* – 17 мм, при рН -3,68 и титруемой кислотности - 250 °Т.

Получен патент на полезную модель №7146 от 27.05.2022 г. «Консорциум микроорганизмов *Limosilactobacillus fermentum* 3Ш1, *Limosilactobacillus pontis* 9К3, *Lactocaseibacillus paracasei* 126, предназначенный для приготовления заквасок для ржаного и пшеничного хлеба, антагонистически активный в отношении бактерий *Bacillus subtilis*».

Закваска на основе консорциума молочнокислых бактерий *L. fermentum* 3Ш1, *L. pontis* 9К3, *L. paracasei* 126, антагонистически активного в отношении бактерий *B. subtilis* может быть использована в приготовлении тритикалевого хлеба для защиты его от микробиологической порчи. Получен патент на полезную модель «Способ приготовления пробиотической закваски для приготовления хлеба».

Технологическая схема активации и использования закваски состоит из следующих этапов:

1. Приготовление пробиотической закваски из чистых культур (разводочный цикл)
2. Приготовление питательной среды.
3. Выбраживание закваски.
4. Освежение закваски и расход на производство.

На основании проведенных исследований была разработана технология хлебобулочных изделий из зерна тритикале с использованием пробиотической закваски.

В рецептуре в опытных образцах хлеба будет внесена в разных количествах закваска, полученная на основе консорциума из 3-х штаммов молочнокислых бактерий для предотвращения «картофельной болезни» хлеба. Для выбора оптимального количественного внесения закваски приготовлены образцы хлеба с различным ее содержанием.

В приготовленных образцах определяли органолептические, физико-химические показатели качества и микробиологическую устойчивость к картофельной болезни. В таблице 3 приведены показатели качества полуфабрикатов и хлеба с добавлением различных количеств закваски.

Таблица 3 – Зависимость качества полуфабрикатов и хлеба, полученных безопасным способом, от количества вносимой закваски

| Наименование показателя | Контроль (без закваски) | С закваской в количестве, % | | | |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|
| | | 5 | 8 | 10 | 12 |
| Качество теста: | | | | | |
| Продолжительность брожения, мин | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| Температура, °С | 30±2 | 30±2 | 30±2 | 30±2 | 30±2 |
| Влажность, % | 47,5 | 47,3 | 47,4 | 47,4 | 47,5 |
| Кислотность, град | 3,8 | 4,8 | 6,8 | 7,2 | 10,4 |
| Продолжительность расстойки, мин | 60 | 55 | 52 | 48 | 46 |
| Качество готового хлеба: | | | | | |
| Объем хлеба, см ³ /100г | 230,5 | 240 | 250,4 | 260,4 | 265,8 |
| Влажность, % | 46,2 | 46,0 | 46,4 | 46,5 | 46,4 |
| Пористость, % | 66,8 | 67,3 | 67,9 | 68,2 | 68,6 |
| Кислотность, град | 3,6 | 4,0 | 5,2 | 5,8 | 8,0 |

Продолжение таблицы 3

| Органолептическая оценка хлеба | | | | | |
|--|--|--|---|--|---|
| Форма | Правильная, без трещин и подрывов | | | | |
| Корка | Коричневый | | | Светло-коричневый | |
| Пористость | Равномерная, мелкая толстостенная | Равномерная, мелкая, толстостенная | Равномерная, мелкая, толстостенная | Равномерная, более мелкая, толстостенная | Равномерная, мелкая, толстостенная |
| Состояние мякиша | Не липкий, хорошо пропеченный | Не липкий, хорошо пропеченный, эластичный | | | |
| Вкус и запах | Свойственный, без постороннего привкуса, пресный | Свойственный, без постороннего привкуса, пресный | Свойственный, приятный, хлебный привкус | Свойственный приятный привкус и аромат | Ярко выраженный кислый аромат и кислый вкус |
| Микробиологическая устойчивость к заболеванию «картофельной болезни» | Заболел через 48 часов | Не заболели в течение 120 часов | | | |

В соответствии с результатами, представленными в таблице 3, при внесении молочнокислой закваски в количестве от 5 до 12 % к массе муки наблюдалось сокращение продолжительности расстойки до 14 минут, увеличение удельного объема хлеба, пористости на 2,2 % и повышение титруемой кислотности на 6,4 °Т. Однако увеличение дозировки молочнокислой закваски до 12% отрицательно влияло на вкусовые качества и аромат изделий. Отсутствие в тритикалевом тесте клейковинного каркаса и пептизация значительной части белков обуславливают специфические реологические свойства тритикалевого теста. Оно не прилипает к рукам, консистенция глинообразная. При разжевывании мякиша ощущается кислый привкус и запах хлеба с использованием 12 % закваски. Также окраска корок изделий получается более бледной из-за повышения кислотности.

Проведенные исследования свидетельствуют о положительном влиянии внесения молочнокислой закваски на качество хлеба из тритикалевой муки.

Заключение

На основании проведенных исследований была разработана технология и режим приготовления тритикалевого хлеба с добавлением закваски на основе молочнокислых бактерий.

Использование закваски молочнокислых бактерий в количестве 10% в технологическом процессе выработки тритикалевого хлеба позволяет сократить продолжительность расстойки на 12 минут, улучшает качество (в готовом продукте увеличиваются удельный объем, масса и пористость, улучшается аромат и вкус) и увеличивает сроки хранения готовых изделий до 5-6 суток, а также повышает устойчивость хлеба к «картофельной болезни» и плесневению за счет высокой антагонистической активности пробиотических микроорганизмов закваски.

Финансирование

Исследования проведены в рамках выполнения проекта «Разработка технологии хлебобулочных, мучных кондитерских изделий и комбикормов на основе новых отечественных сортов тритикале» в рамках научно-технической программы BR10764977 «Разработка современных технологий производства БАДов, ферментов, заквасок, крахмала, масел и др. в целях обеспечения развития пищевой промышленности» бюджетной программы 267 «Повышение доступности знаний и научных исследований» подпрограмма 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий» Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан на 2021-2023 годы.

Литература:

1 Вьюрков В.В., Абуова А.Б., Глепов А.С., Ертаева Н.Т. (2016). Хлебопекарные свойства муки из зерна тритикале и озимой ржи. Инновационные технологии производства пищевых продуктов. Материалы международной научно-практической конференции (с.40-46). Саратов: ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ имени Н.И. Вавилова».

2 Исабекова М.С., Умиралиева Л.Б., Касымбек Р. (2019). Сравнительное изучение физико-химических показателей казахстанских сортов тритикале Таза и Кожа. Пища. Экология. Качество. Сборник материалов XVI международной научно-практической конференции. ТОМ 1. (с. 336). Барнаул.

3 Карчевская О.В., Дремучева Г.Ф. и Грабовец А.И. (2013). Научные основы и технологические аспекты применения зерна тритикале в производстве хлебобулочных изделий. Хлебопечение России, 5, 28-29.

4 Рекомендация по новым сортам тритикале. Сост.: С.Б. Кененбаев, Б.А. Айнабекова, Р.А. Уразалиев, К.Р. Уразалиев, А.Т. Сарбаев (2015). Караганда: ТОО «LITERA», 16с.

5 Онгарбаева Н.О., Жанабаева К.К., Рукшан Л.В. (2018). Представляем тритикале казахстанской селекции. Иновации. Образование. Энергоэффективность: Материалы XII Международной научно-практической конференции (146-149). Могилев.

6 Тертычная Т.Н. Исследование мукомольных свойств современных сортов тритикале [Текст] / Т.Н. Тертычная // Хранение и переработка зерна, 2010, №1 (127). – С. 36-37.

7 Вьюрков В.В., Абуова А.Б., Баймуканов Е.Н., Джапаров Р.Ш. (2017). Урожайность традиционных и перспективных озимых культур на темно-каштановых почвах Приуралья. Наука и Образование, 2 (47), 3-10.

8 Гриценко, С.А. (2003). *Разработка технологии хлеба функционального назначения на основе муки тритикале* [кандидатская диссертация, Кубанский государственный технологический университет]. Краснодар. Фонд научных исследований Кубанского государственного технологического университета.

9 Кандроков Р.Х., Панкратов Г.Н., Рындин А.А., Конарев П.М. (2021). Мукомольные свойства озимых сортов тритикале. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2, 38-39.

10 Gyori Z. (2018). Fingingson the Making of Triticale and Wheat-Based Low Calorie Flour. *EC Nutrition. P. 113-125.*

11 Yusupova G.G., Berdyshnikova O.N. Methods of flour quality control according to the rheological properties of the dough // Bakery production. -2011. -No. 2.- P.48-53.

12 Исабекова М.С., Умиралиева Л.Б., Абуова А.Б., Ибрайхан А.Т. Консорциум микроорганизмов *Limosilaktobacillus fermentum* ЗШ1, *Limosilaktobacillus pontis* 9К3, *Lactiacseibacillus paracasei* 126, предназначенный для приготовления заквасок для ржаного и пшеничного хлеба, антагонистически активный в отношении бактерий *Vacillus subtilis*. Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности (ПК). № 7146. Заявл. 18.04.2022. Оpubл. 27.05.2022, Бюл. № 21.

13 Умиралиева Л.Б., Исабекова М.С., Ибрайхан А.Т., Абуова А.Б. Способ приготовления пробиотической закваски для приготовления хлеба. Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности (ПК). № 7710. Заявл. 01.09.2022.

Л.Б. УМИРАЛИЕВА¹, А.Б. АБУОВА^{1,2*}, Р.Х. КАНДРОКОВ³, М.С. ИСАБЕКОВА¹,
М. ХАЛМУХАМЕДОВА¹

¹Қазақ қайта өңдеу және тамақ өнеркәсібі ғылыми зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

²Халықаралық инженерлік-технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

³Ресей биотехнологиялық университеті, Мәскеу, Ресей

*e-mail: a_burkhatovna@mail.ru

СҮТ ҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАРЫНА НЕГІЗДЕЛГЕН АШЫТҚЫНЫ ҚОЛДАНА ОТЫРЫП ТРИТИКАЛЕ ҰНЫНАН ЖАСАЛҒАН НАН ӨНІМДЕРІН ӨНРІДУ ТЕХНОЛОГИЯСЫ

Түйін

Бидай-қара бидай гибриді – тритикале, аминқышқылдық құрамы бай және ұнның құрамында глютені аз, бүгінгі күні нан өнімдерін өндіруде қолданылатын перспективалы дәнді дақыл болып табылады. Дегенмен, бидай мен қара бидай нанын пісіру үшін қолданылатын дәстүрлі рецепттер тритикале үшін жарамсыз, пісіру технологиясына жаңа көзқарасты талап етеді. Қамырдың және дайын өнімнің қасиеттерін жақсарту үшін сүт қышқылы бактерияларының консорциумына негізделген ашытқыны пайдалану туралы шешім қабылданды. Консорциумға лактобактериялардың үш штаммы кірді: *Limosilactobacillus fermentum* 3Ш1, *Limosilactobacillus pontis* 9К3, *Lactocaseibacillus paracasei* 126. Консорциум негізінде тритикале және бидай ұнынан, су және консорциум қосылған ашытқының бірнеше түрі әзірленді. Ашытқының қышқылдығы, антагонистік және ферментативті белсенділігі өлшенді. Құрамында әртүрлі мөлшердегі ашытқымен тәжірибелік нан пісіру жүргізілді, оның барысында тритикале нанының технологиялық процесінде ашытқының 10% мөлшерінде қосылуы нанның көтерілу уақытын 12 минутқа қысқартуға мүмкіндік беретіні, нанның сапасын жақсартатыны дайын өнімді және дайын өнімнің сақтау мерзімін 5-6 күнге дейін арттыратыны, сонымен қатар ашытқының пробиотикалық микроорганизмдерінің жоғары антагонистік белсенділігіне байланысты нанның «картоп ауруына» және зеңге төзімділігін арттыратыны анықталды.

Кілтті сөздер: тритикале, лактобактериялар, пробиотикалық ашытқы.

IRSTI: 65.33.29

L.B. UMIRALIYEVA¹, A.B. ABUOVA^{1,2*}, R.Kh. KANDROKOV³, M.S. ISABEKOVA¹,
M. HALMUHAMEDOVA¹

¹Kazakh Research Institute of Processing and Food Industry, Almaty, Kazakhstan

²International Engineering and Technology University, Almaty, Kazakhstan

³Russian Biotechnological University, Moscow, Russia

*e-mail: a_burkhatovna@mail.ru

TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF BAKERY PRODUCTS MADE OF TRITICALE FLOUR USING A STARTER CULTURE BASED ON LACTIC ACID BACTERIA

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.13

Abstract

Wheat-rye hybrid triticale, having a rich amino acid composition and a reduced gluten content in flour, is currently a promising grain crop for use in bakery production. However, traditional recipes that are used for baking wheat and rye bread are not suitable for triticale, requiring a new approach to cooking technology. To improve the properties of the dough and the finished baking, a starter culture based on a consortium of lactic acid bacteria was used. The consortium includes three strains of lactobacilli: *Limosilactobacillus fermentum* 3H1, *Limosilactobacillus pontis* 9K3, *Lactocaseibacillus paracasei* 126. Based on the consortium, several types of starter cultures containing triticale and wheat flour, water, and

the consortium were developed. The acidity, antagonistic and enzymatic activity of the starter were measured. A trial baking of bread with different sourdough content was carried out, during which it was determined that the addition of sourdough in an amount of 10% in the technological process of producing triticale bread reduces the duration of proofing by 12 minutes, improves the quality of the finished product and increases the shelf life of finished products up to 5-6 days, and also increases the resistance of bread to "potato disease" and mold formation due to the high antagonistic activity of probiotic microorganisms of the starter culture.

Keywords: triticale, lactobacilli, probiotic starter culture.

It is known that wheat, which has priority in use, is insufficiently resistant to a number of diseases, suffers from extreme environmental conditions, has a reduced content of a number of essential amino acids, primarily lysine. The advantage of rye is high productivity and resistance to adverse conditions, at the same time it has low baking properties. In this regard, the triticale grain crop, which is a hybrid of wheat and rye, is of interest. The wide and rapid spread of triticale occurred due to high yields, unpretentiousness in cultivation (resistance to diseases, allowing to exclude pre-sowing seed treatment, high winter hardiness), increased lysine content and versatility in use. [1-5].

At the same time, the lack of practical implementation of triticale bread technology, low consumer satisfaction with the assortment of bakery products revealed in the process of sociological surveys, as well as the need to update approaches to assessing the consumer properties of enriched products, justify the expediency of conducting research in this direction.

Of great interest is the use in the technology of flour confectionery products instead of wheat flour of the highest grade tritical flour, which, firstly, has a higher content of the vital amino acid lysine in 1 g of protein, a high content of riboflavin, thiamine, some macro- and microelements, and secondly, has better technological properties for these types of products, since it contains less gluten of weak quality [6-10].

Based on comprehensive studies of safety indicators, baking properties and composition of triticale grain, the feasibility of its use in bread technology has been theoretically substantiated and scientifically confirmed. The developed starter culture based on the consortium of lactic acid bacteria *Limosilactobacillus fermentum* 3H1, *Limosilactobacillus pontis* 9K3, *Lacticaseibacillus paracasei* 126, intended antagonistically active against bacteria *Bacillus subtilis* can be used in the preparation of triticale bread to protect it from microbiological spoilage [11-13].

The scientific novelty also lies in the scientific substantiation of the formula and technology for the production of compound feeds using sprouted triticale grain and the use of extrusion technology in order to improve quality and increase shelf life.

Materials and methods of research

The main objects of development were sourdough and bread.

Experimental studies were carried out using the following modern methods, which make it possible to obtain characteristics of raw materials and products based on a set of indicators.

Triticale flour and wheat flour of the highest grade were used to obtain the starter culture. The selected "Consortium 2", which includes *Limosilactobacillus fermentum* 3H1, *Limosilactobacillus pontis* 9K3, *Lacticaseibacillus paracasei* 126 in a culture ratio of 1:1:1. The consortium of lactic acid bacteria was introduced into the nutrient medium in an amount of 10%, cultured at a temperature of $35 \pm 2^\circ\text{C}$ within 48 hours.

To study the antagonistic activity of cultures of lactic acid bacteria, the method of diffusion into agar was used. 0.1 ml of a test culture was sown on the surface of a dense MPA agar in Petri dishes to determine the antibiotic activity of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1×10^6 CFU/ml). After seeding the test culture with a sterile spout, wells with a diameter of 10 mm were cut out in the medium, 2 wells for each studied strain of lactic acid bacteria. The studied strain was introduced into each well on the MRC medium.

Titrated acidity was determined by the Turner method. To do this, measure 10 ml of the sample and add 20 ml of distilled water and 3 drops of 1% phenolphthalein solution. The resulting mixture is mixed and titrated with a solution of 0.1 n caustic soda until a faint pink staining appears, which does not disappear for 1 min. The result of the analysis is obtained by calculating the amount of alkali used for titration multiplied by 10.

A common method for indirectly determining the activity of lactic acid bacteria is the use of dye indicators, the reduced forms of which change color under the action of microorganisms' enzymes. We determined the enzymatic activity of lactic acid bacteria by the rate of transition of the blue color of methylene blue (0.01% p-r) to colorless. In single-day pure cultures of lactic acid bacteria, the beginning of discoloration of methylene blue was noted after 23-27 minutes, complete discoloration occurred after 50-70 minutes. This indicates a high enzymatic activity of cultures.

On the basis of tritralic and wheat flour, three variants of sourdough were created for comparison:

Tritical flour + water + sourdough

Tritical flour and wheat flour (1:1) + water + starter culture

Wheat flour + water + sourdough

The ratio of flour to water is 1:2 and 10% sowing of starter culture

Laboratory samples of bread were prepared with the following amount of starter culture:

Sample 1 – control according to the recipe without leaven;

Sample 2 – with sourdough in the amount of 5%;

Sample 3 – with starter culture in the amount of 8%;

Sample 4 – with starter culture in the amount of 10%;

Sample 5 - with a starter culture in the amount of 12%.

As a control, samples of tritcale flour bread without sourdough were used. The analysis of the quality of bread was carried out 14-16 hours after baking according to generally accepted methods.

Results and discussion

In order to work out the optimal technological modes of obtaining the consortium, studies were conducted on the selection of a nutrient medium, determining the optimal cultivation time, ensuring a high titer of lactic acid bacteria cells and the maximum manifestation of antagonistic properties by them.

During 48 hours of consortium cultivation, the biotechnological properties (on the medium of MRC) were evaluated - the pH of the culture fluid, acid-forming activity, antagonism of ICD to *B. subtilis* ATCC 6633 and the titer of cells (Table 1).

Table 1 - Characteristics of the consortium's industrially valuable properties

| | |
|--|-------------------|
| pH | 4,05 |
| Titrated acidity according to Turner, °T | 125 °T |
| Cell titer, CFU/ml | 10 ⁻¹⁰ |
| Antagonistic activity, mm | 20,3 ±0,3 |

All indicators were determined after 24 and 48 hours (Table 2).

Table 2 - Characteristics of the industrially valuable properties of the starter

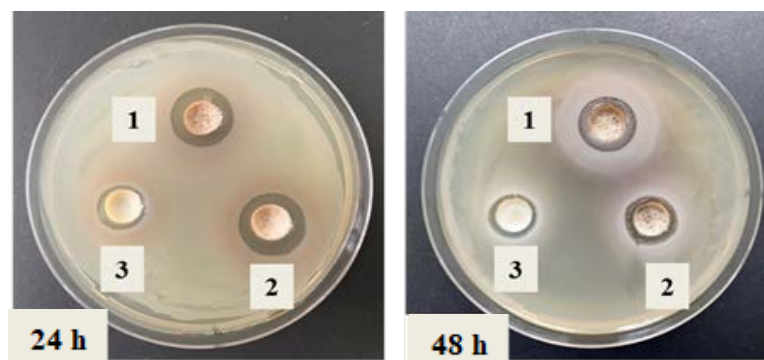
| Indicators | Variants | | | | | |
|-----------------------------|----------------|------|------|----------------|------|------|
| | After 24 hours | | | After 48 hours | | |
| | t | wh | t/wh | t | wh | t/wh |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| pH | 3,75 | 3,73 | 3,67 | 3,68 | 3,51 | 3,57 |
| Titrated Turner acidity, °T | 235 | 111 | 155 | 250 | 119 | 175 |

Table 2 countinued

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Cell titer, CFU/ml | 10 ⁻¹¹ | 10 ⁻¹¹ | 10 ⁻¹¹ | 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻¹⁰ |
| Antagonistic activity against <i>Bacillus subtilis</i> , mm | 17±0,1 | 14±0,2 | 19±0,1 | 17±0,1 | 13±0,1 | 15±0,1 |
| Enzymatic activity, min | 42 | 65 | 56 | 43 | 72 | 57 |
| Note – Tritical flour, wheat flour, tritical/wheat flour | | | | | | |

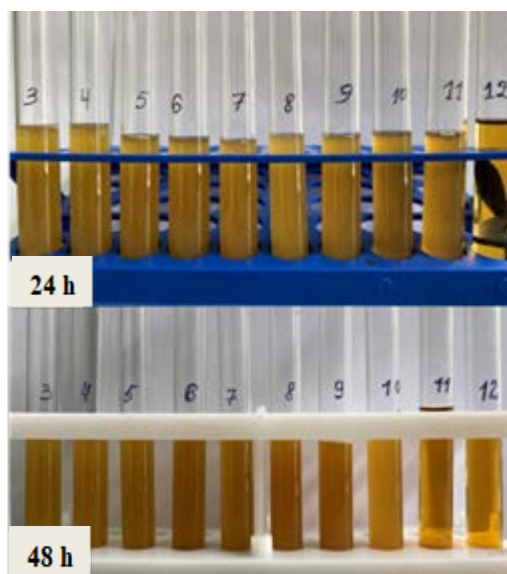
The greatest antagonism of ICD to 24 hours of cultivation is manifested when using a starter culture of triticale flour in a mixture of wheat flour - 19 mm (diameter of the growth suppression zone of *Bacillus subtilis*) and triticale flour - 17 mm. By 48 hours of consortium cultivation on a medium using only triticale flour, its antagonistic activity remains - 17 mm, and on a medium where triticale flour + wheat flour decreases to 15 mm (Figure 1A). The most intensive acid accumulation is promoted by a starter culture on triticalic flour. When using the starter culture during cultivation for 24 hours, it allows to reach a titer of 10¹¹ CFU/ ml, and after 48 hours the titer decreased to 10¹⁰ CFU/ml (Figure 1B).

A



A - antagonistic activity of starter cultures against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 test culture (1- tritical flour; 2-tritical flour + wheat flour; 3- wheat flour)

B

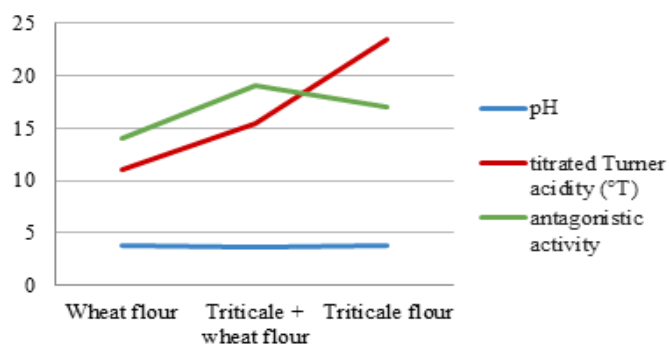


B - LAB titer, 24h - 10¹¹ CFU/ml; 48h - 10¹⁰ CFU/ml;

Figure 1 - Physiological activity of a consortium of lactic acid bacteria

The characteristics of the industrially valuable properties of the starter culture variants and the dynamics of the enzymatic activity of the ICD consortium during cultivation on various starter cultures are shown in Figures 2 and 3.

A



B

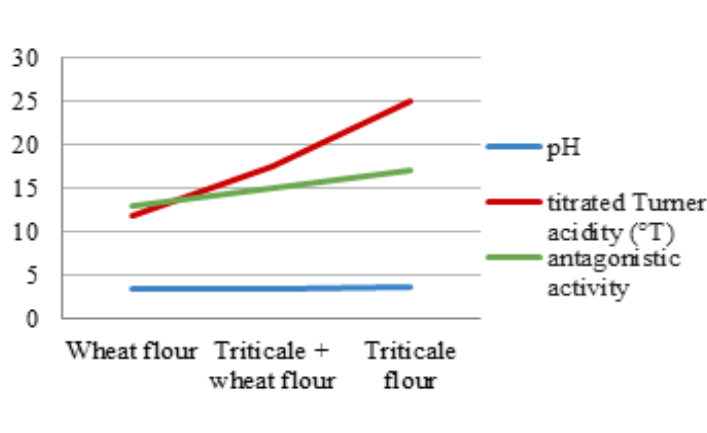
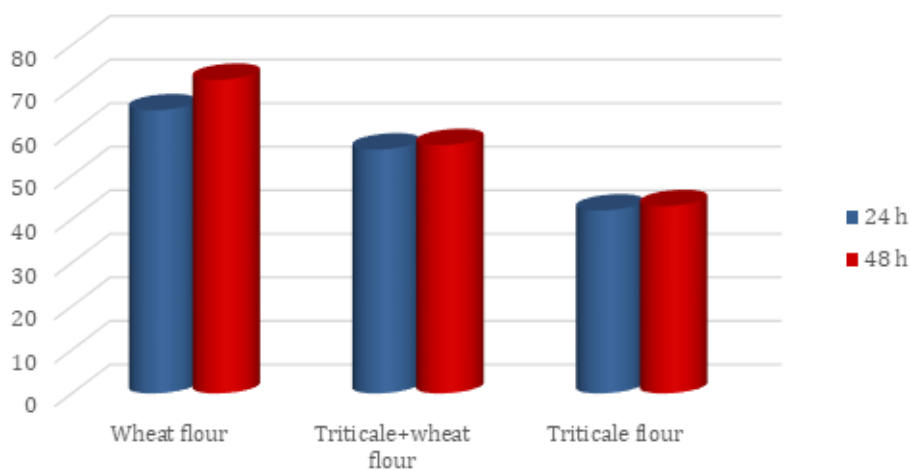


Figure 2 - Characteristics of industrially valuable properties of the starter variants



Abscissa axis – starter variants; ordinate axis – enzymatic activity, min

Figure 3 – Dynamics of the enzymatic activity of the LAB consortium in the process of cultivation on various starter cultures

We have shown that by 24 hours and after 48 hours of lactic acid bacteria cultivation, the minimum time for the beginning of discoloration of methylene blue is noted on a medium where triticum flour, complete discoloration occurred after 42-43 minutes. This indicates a high enzymatic activity of the consortium.

Thus, the most optimal modes of cultivation of the consortium for maintaining a high titer of lactic acid bacteria cells and the maximum manifestation of antagonistic properties by them is a starter culture with triticum flour, the duration of cultivation is 48 hours, the ICD titer is 1010 CFU/ml, antagonistic activity against *B. subtilis* is 17 mm, at pH -3.68 and titrated acidity is 250°T.

Received a patent for utility model No. 7146 dated 05/27/2022 "Consortium of microorganisms *L. fermentum* 3H1, *L. pontis* 9K3, *L. paracasei* 126, designed for the preparation of starter cultures for rye and wheat bread, antagonistically active against bacteria *B. subtilis*".

Starter culture based on a consortium of lactic acid bacteria *L. fermentum* 3H1, *L. pontis* 9K3, *L. paracasei* 126, antagonistically active against bacteria *B. subtilis* can be used in the preparation of triticum bread to protect it from microbiological spoilage. A patent has been obtained for a utility model "A method for preparing probiotic starter culture for making bread". The technological scheme of activation and use of the starter culture consists of the following stages:

1. Preparation of probiotic starter culture from pure cultures (breeding cycle)
2. Preparation of the nutrient medium.
3. Fermentation of the starter culture.
4. Leaven refreshment and production costs.

Based on the conducted research, the technology of bakery products from triticum grain using probiotic starter culture was developed.

In the recipe, the starter culture obtained by a consortium of 3 strains of lactic acid bacteria will be introduced in different quantities in experimental bread samples to prevent the "potato disease" of bread. To select the optimal amount of the introduced starter, bread samples with different percentages were prepared.

Organoleptic, physico-chemical quality indicators and microbiological resistance to potato disease were determined in the prepared samples. Table 3 shows the quality of semi-finished products and bread with the addition of various amounts of sourdough.

Table 3 – The quality of semi-finished products and bread with the use of sourdough in different quantities in a non-paired way

| Name of the indicator | Control (without starter culture) | With sourdough in quantity, % | | | |
|-------------------------------------|---|-------------------------------|-------|-------|-------|
| | | 5 | 8 | 10 | 12 |
| Test quality: | | | | | |
| Duration of fermentation, min | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| Temperature, °C | 30±2 | 30±2 | 30±2 | 30±2 | 30±2 |
| Humidity, % | 47,5 | 47,3 | 47,4 | 47,4 | 47,5 |
| Acidity, deg | 3,8 | 4,8 | 6,8 | 7,2 | 10,4 |
| Duration of proofing, min | 60 | 55 | 52 | 48 | 46 |
| The quality of the finished bread: | | | | | |
| Bread volume, cm ³ /100g | 230,5 | 240 | 250,4 | 260,4 | 265,8 |
| Humidity, % | 46,2 | 46,0 | 46,4 | 46,5 | 46,4 |
| Sponginess, % | 66,8 | 67,3 | 67,9 | 68,2 | 68,6 |
| Acidity, deg | 3,6 | 4,0 | 5,2 | 5,8 | 8,0 |

Table 2 continued

| Organoleptic evaluation of bread | | | | | |
|--|---|---|--|---|--------------------------------------|
| Form | Correct, without cracks and explosions | | | | |
| Crust | Brown | | | Light brown | |
| Sponginess | Uniform, fine thick-walled | Uniform, fine thick-walled | Uniform, fine thick-walled | Uniform, smaller, thick-walled | Uniform, fine thick-walled |
| Crumb condition | Not sticky, well baked | Not sticky, well-baked, elastic | | | |
| Taste and smell | Characteristic, without extraneous taste, bland | Characteristic, without extraneous taste, bland | Characteristic, pleasant, bread flavor | Characteristic pleasant taste and aroma | Pronounced sour aroma and sour taste |
| Microbiological resistance to the "potato disease" | Got sick after 48 hours | Didn't get sick for 120 hours | | | |

In accordance with the results presented in Table 3, when lactic acid starter culture was applied in an amount from 5 to 12% by weight of flour, a reduction in the duration of proofing to 14 minutes was observed, an increase in the specific volume of bread, porosity by 2.2% and titrated acidity by 6.4 OH. However, an increase in the dosage of lactic acid starter to 12% negatively affects the taste and aroma of the products. The absence of a gluten framework in the tritical test and the peptization of a significant part of the proteins determine the specific rheological properties of the tritical test. It does not stick to the hands, the consistency is wedge-shaped. When chewing the crumb, a sour taste and smell are felt with 12% of the starter culture. Also, the color of the crusts of the products turns out to be paler due to an increase in acidity.

The conducted studies show a positive effect of the introduction of lactic acid starter culture on the quality of triticale flour bread.

Conclusion

Based on the conducted research, the technology and mode of preparation of triticale bread with the addition of lactic acid sourdough was developed.

The use of lactic acid bacteria starter culture in an amount of 10% in the technological process of producing triticale bread reduces the duration of proofing by 12 minutes, improves quality (specific volume, mass and porosity increase in the finished product, aroma and taste improve) and increases the shelf life of finished products up to 5-6 days, and also increases the resistance of bread to "potato disease" and mold formation due to the high antagonistic activity of probiotic microorganisms of the starter culture.

Funding

The research was carried out within the framework of the project "Development of technology of bakery, flour confectionery and compound feeds based on new domestic triticale varieties" within the framework of the scientific and technical program BR10764977 "Development of modern technologies for the production of dietary supplements, enzymes, starter cultures, starch, oils, etc. in order to ensure the development of the food industry" budget program 267 "Increasing the availability of knowledge and scientific research" subprogram 101 "Program-targeted financing of scientific research and activities" of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan for 2021-2023.

References:

- 1 V'yurkov V.V., Abuova A.B., Tlepov A.S., Ertaeva N.T. (2016). Hlebopekarnye svoystva muki iz zerna tritikale i ozimoy rzhi. Innovacionnye tekhnologii proizvodstva pishchevyh produktov. Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii (p.40-46). Saratov: FGBOU VO «Saratovskij GAU imeni N.I. Vavilova».
- 2 Isabekova M.S., Umiraliyeva L.B., Kasymbek R. (2019). Sravnitel'noe izuchenie fiziko-himicheskikh pokazatelej kazhstanskikh sortov tritikale Taza i Kozha. Pishcha. Ekologiya. Kachestvo. Sbornik materialov HVI mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii. TOM 1. (p. 336). Barnaul.
- 3 Karchevskaya O.V., Dremucheva G.F. i Grabovec A.I. (2013). Nauchnye osnovy i tekhnologicheskie aspekty primeneniya zerna tritikale v proizvodstve hlebobulochnyh izdelij. Hlebopechenie Rossii, 5, 28-29.
- 4 Rekomendaciya po novym sortam tritikale. Sost.: S.B. Kenenbaev, B.A. Ajnabekova, R.A. Urazaliev, K.R. Urazaliev, A.T. Sarbaev (2015). Karaganda: TOO «LITERA», 16p.
- 5 Ongarbaeva N.O., Zhanabaeva K.K., Rukshan L.V. (2018). Predstavlyаем tritikale kazhstanskoy selekcii. Innovacii. Obrazovanie. Energoeffektivnost': Materialy XII Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii (146-149). Mogilev.
- 6 Tertychnaya T.N. Issledovanie mukomol'nyh svoystv sovremennyh sortov tritikale [Tekst] / T.N. Tertychnaya // Hranenie i pererabotka zerna, 2010, №1 (127). – P. 36-37.
- 7 V'yurkov V.V., Abuova A.B., Bajmukanov E.N., Dzhaparov R.SH. (2017). Urozhajnost' traditsionnyh i perspektivnyh ozimyh kul'tur na temno-kashtanovyh pochvah Priural'ya. Nauka i Obrazovanie, 2 (47), 3-10.
- 8 Gricenko, S.A. (2003). Razrabotka tekhnologii hleba funkcional'nogo naznacheniya na osnove muki tritikale [kandidatskaya dissertaciya, Kubanskij gosudarstvennyj tekhnologicheskij universitet]. Krasnodar. Fond nauchnyh issledovanij Kubanskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta.
- 9 Kandrov R.H., Pankratov G.N., Ryndin A.A., Konarev P.M. (2021). Mukomol'nye svoystva ozimyh sortov tritikale. Hranenie i pererabotka sel'hozsyr'ya, 2, 38-39.
- 10 Gyori Z. (2018). Fingingson the Making of Triticale and Wheat-Based Low Calorie Flour. EC Nutrition. P. 113-125.
- 11 Yusupova G.G., Berdyshnikova O.N. Methods of flour quality control according to the rheological properties of the dough // Bakery production. -2011. -No. 2.- P.48-53.
- 12 Isabekova M.S., Umiraliyeva L.B., Abuova A.B., Ibraikhan A.T. The consortium of microorganisms *Limosilaktobacillus fermentum* 3SH1, *Limosilaktobacillus pontis* 9K3, *Lactocaseibacillus paracasei* 126, intended for the preparation of starter cultures for rye and wheat bread, antagonistically active in the relationship of bacteria *Bacillus subtilis*. Kazakh Research Institute of Processing and Food Industry (RK). No. 7146. Appl. 04.18.2022. Publ. 27.05.2022, Byul. No. 21.
- 13 Umiraliyeva L.B., Isabekova M.S., Ibraikhan A.T., Abuova A.B. Method of preparation of probiotic starter culture for bread preparation. Kazakh Research Institute of Processing and Food Industry (RK). No. 7710. Appl. 01.09.2022.

MPHTI: 34.27.17

А.С. ЛАТИФ¹, А.А. САПАРБЕКОВА^{1*}, З.Р. АХМЕДОВА², Г. КАЛДЫБЕКОВА¹,
Г.О. КАНТУРЕЕВА¹

¹Южно-Казахстанский университет им. М. Ауезова, Шымкент, Казахстан

²Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Ташкент, Узбекистан

*e-mail:almira.saparbekova@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОЙ АДГЕЗИИ К РАСТВОРИТЕЛЯМ И УСТОЙЧИВОСТИ АБОРИГЕННЫХ ШТАММОВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* К РАЗНЫМ ЗНАЧЕНИЯМ pH

doi: 10.53729/MV-AS.2023. 02.14

Аннотация

Из 180 штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выделенных из различных растительных субстратов, по предварительно изученным технологическим параметрам, такие как скорость сбраживания и органолептическим показателям ферментированных фруктовых соков отобрано 15 штаммов. Отобранные штаммы изучены на способность к выживанию при низких значениях pH и обладающих высокой микробной адгезией к органическим растворителям.

Семь штаммов дрожжей (BB-5, BB-32, VSs-2, Az- 12, AI-06, GI-8, Ab-13) показали наиболее высокий процент по микробной адгезии к органическим растворителям. Самая высокая толерантность к низким значениям pH=3 с индексом роста > 90% обнаружена у 4 штаммов, идентифицированных как *Saccharomyces cerevisiae* AI-06 (из винограда), *Saccharomyces cerevisiae* GI -8 (из сока сахарного сарго), *Saccharomyces cerevisiae* BB-5 (из сока вишни) и *Saccharomyces cerevisiae* Az- 12 (из гранатового сока). Эти штаммы демонстрируют лучшие характеристики, а один из протестированных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* Az- 12 потенциально может использоваться для производства пищевых добавок, функциональных пищевых напитков, а также в качестве пробиотика для терапевтических целей.

Ключевые слова: пробиотики, ферментация, фруктовые соки, микробная адгезия, индекс роста.

В настоящее время население Казахстана, как и во всем мире, заинтересовано в правильном питании, в потреблении полезных продуктов, в том числе и содержащих пробиотики, в связи с чем исследования, сосредоточенные на поиске новых пробиотических микроорганизмов, становятся актуальными. Для приготовления ферментированных функциональных продуктов используют чистые жизнеспособные штаммы микроорганизмов, идентифицированные и охарактеризованные как пробиотические культуры [1].

Ферментированные пробиотические продукты можно употреблять в качестве источника питания, а также для поддержания здоровой микробиоты кишечника [2]. Функциональные фруктовые или овощные напитки содержат субстраты, необходимые для приготовления продукта с внесением культур или консорциума штаммов, используемых для проведения ферментации, поэтому эти напитки можно рассматривать как здоровую рецептуру синбиотических продуктов [3, 4]. В результате растет спрос на немолочные пробиотические продукты, которые удовлетворяют потребности людей с диетическими ограничениями в отношении молочных продуктов. Согласно текущему отчету о состоянии рынка от 20 июля 2022 г., глобальный рынок молочных альтернатив оценивается в 27,3 млрд долларов США в 2022 году и, согласно прогнозам, достигнет 44,8 млрд долларов США к 2027 году, что означает среднегодовой темп роста в 10,4% в финансовом выражении [5].

Молочные заменители используются в продуктах питания и напитках, не содержащих лактозу, поэтому такие продукты могут быть рекомендованы людям с непереносимостью этого углевода.

В настоящее время, благодаря этим преимуществам, пробиотики становятся все более востребованными, и обычно их принимают перорально, в виде лекарственных препаратов или с продуктами питания [6]. Для включения в категорию пробиотиков микроорганизмы должны быть отобраны на основе определенных критериев, таких как рост при температуре тела (37 °C), устойчивость к антибиотикам [7,8], выживаемость в неблагоприятной среде кишечника человека (например, пищеварительные ферменты, низкий pH), адгезия к эпителиальным клеткам кишечника и высокая гидрофобность поверхности [9]. Дрожжи широко распространены в пищевой промышленности, где используются в качестве закваски для производства ферментированных пищевых продуктов и напитков, таких как хлеб, вино и пиво [10]. На сегодня пробиотическая способность дрожжей недостаточно изучена. *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*— единственные дрожжи, признанные и фактически применяемые как пробиотики [11].

Многие исследователи сосредоточились на штаммах дрожжей как *Saccharomyces*, так и не-*Saccharomyces* [12, 13] как хорошей альтернативе пробиотическим бактериям, поскольку они могут оказывать новое профилактическое или терапевтическое действие на хозяина, будучи частью микробиоты кишечника [14]. Стимуляция иммунной системы, деградация и устранение бактериальных токсинов из-за протеазной активности дрожжей или препятствования прикреплению бактерий к эпителиальным клеткам желудочно-кишечного тракта являются одними из потенциальных механизмов, используемых дрожжами для защиты человека от патогенных микроорганизмов [15].

Учитывая отсутствие знаний о пробиотических свойствах местных дрожжей, целью данного исследования была изучение местных штаммов *S. cerevisiae*. Для выделения штаммов с полезным для здоровья потенциалом проведен предварительный скрининг 180 аборигенных штаммов *S. cerevisiae*, выделенных из различного растительного сырья, из которых отобраны 15 штаммов для выявления пробиотической способности по устойчивости к условиям желудочно-кишечного тракта (pH, температура) и гидрофобности.

Объекты и методы исследования

В данной работе изучено 15 аборигенных штаммов *S. cerevisiae* (отобранных из 180), выделенных из растительного сырья, в том числе из винограда, вишни, абрикоса, граната, яблук, хорошо растущих и плодоносящих в Туркестанской области.

Перед каждым экспериментом штаммы дрожжей выращивали в YPD (производитель Titan, Biotech LTD, India). Культуры инкубировали в аэробных условиях при 37±2°C и 26±2°C (как положительный контроль) в течение 48 часов. Все эксперименты проводились в трех повторностях.

Гидрофобность поверхности клеток дрожжей.

Гидрофобность поверхности клеток достаточно переменный признак и привязана не только к методике измерения, но и к условиям роста, аэрации и возрасту клеток. Высоко гидрофобные микроорганизмы хорошо адгезируются на масляных каплях после смешивания.

Гидрофобность определяли, как способность штаммов дрожжей прилипать к углеводородам и выражали как относительную микробную адгезию к растворителям (МАкР) в соответствии с протоколом, описанным Chelliah R. [16] с некоторыми изменениями. МАкР определяли по оптической плотности (ОП) с использованием спектрофотометра Varian Cary-50, имеющий оптический диапазон 190–1100 нм. Основной задачей технического решения является совершенствование способа оценки концентрации свободных и связанных микробных клеток в суспензии, направленного на увеличение

скорости анализа, снижение его трудоемкости и себестоимости, а также уровня погрешности.

Культуры дрожжей в стационарной фазе (инкубированные в бульоне YPD в течение 48 ч) концентрировали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин, дважды промывали калий-фосфатным буфером (КФБ) 0,1 М, рН 7,4 и снова суспендировали в 3 мл того же буферного раствора. Оптическую плотность (ОП) суспензии при 600 нм доводили с помощью КФБ (рН 7,4) до значения 1,0 (A_0).

К 1 мл этой суспензии ($5,2 \times 10^6$ клеток/мл) добавляли 0,2 мл толуола и перемешивали в течение 2 мин. После 1 ч инкубации при $30 \pm 2^\circ\text{C}$ водную фазу удаляли из верхнего слоя растворителя, содержащего клетки, и снова определяли ОП при 600 нм (A_1).

МАкР рассчитывался как:

$$\text{МАкР} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

A_0 - ОП (оптическая плотность при 600 нм) суспензии после обработки буферным раствором;

A_1 - ОП (оптическая плотность при 600 нм) суспензии после обработки толуолом;

Устойчивость штамма к разным значениям рН.

Этот эксперимент проводился путем инкубации приблизительно $5,2 \times 10^6$ клеток/мл каждого штамма в среде YPD, доведенного до различных значений рН (2,5, 3,0, 3,5, 4,0 и 7,2), при $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Для подкисления использовался 6N раствор HCl. Рост дрожжей оценивали через 24 часа инкубации по поглощению при 600 нм. Анализы выполнены в трех повторностях, данные обработаны как индекс роста (ИР) в соответствии с Bevilacqua A. [17]. Этот метод определения концентрации микробных клеток в суспензии по ОП увеличивает скорость анализа во много раз по сравнению с применяемыми сегодня способами и не требует наличия для его выполнения специализированного дорогостоящего оборудования.

$$\text{ИР} = (A_{\text{bss}} / A_{\text{bsc}}) \times 100\%,$$

где: A_{bss} — поглощение образцов при различных рН, тогда как

A_{bsc} — поглощение положительного контроля.

Значения индекса роста были классифицированы следующим образом:

ИР < 50 %: Ингибирование дрожжей

50 % < ИР < 75 %: Частичное ингибирование

ИР > 75 %: Рост подобен контролю.

Результаты и обсуждение

Основной целью данной работы был селективный отбор дрожжей с высокой микробной адгезией к органическим растворителям и устойчивые к кислой среде для предварительной оценки их пробиотических способностей.

Размеры исследуемых одиночных клеток варьировали по ширине в среднем от 4,5 мкм до 9 мкм и по длине - от 5,0 до 10 мкм. Форма - преимущественно округлые, овальные, удлинённые. Температура является важным физическим параметром для оценки пробиотической способности микроорганизма. В этом исследовании эксперименты проводились при 37°C , близкой к температуре человеческого тела, и все 15 выделенных штаммов могли расти при 37°C . Эти результаты согласуются с предыдущими сведениями о способности пробиотических штаммов дрожжей расти при температуре тела человека и подтверждают, что местные штаммы дрожжей могут быть интересным источником для отбора новых потенциальных пробиотических штаммов.

Гидрофобность определяли как взаимодействие между микробными клетками и клетками-хозяевами, опосредованное белками клеточной поверхности и липотейхоевыми кислотами [13]. Как следствие, это один из основных критериев отбора штаммов с

потенциальной пробиотической активностью, поскольку микробный штамм, входящий в категорию пробиотиков, должен обладать способностью прикрепляться к слизистой оболочке кишечника для колонизации и модуляции иммунной системы против патогенов. [18]. Гидрофобную способность выражали как микробную адгезию к растворителям МАкР, используя толуол в качестве растворителя.

Гидрофобная способность дрожжей показана в таблице 1.

Таблица 1 - Гидрофобная способность и устойчивость штаммов дрожжей при различных рН

| № | Микроорганизм (Источник) | МАкР (%) | ИР (%), рН 3,0 | ИР (%), рН 2,5 |
|----|-------------------------------|----------|----------------|----------------|
| 1 | <i>S. cerevisiae</i> ZPt-14 | 12,25 | 50-75 | <50 |
| 2 | <i>S. cerevisiae</i> VIs-1/14 | 27,34 | >75 | 50-75 |
| 3 | <i>S. cerevisiae</i> A1-06 | 85,23 | >75 | >75 |
| 4 | <i>S. cerevisiae</i> Spt-18 | 45,32 | 50-75 | <50 |
| 5 | <i>S. cerevisiae</i> VSs-2 | 78,48 | >75 | >75 |
| 6 | <i>S. cerevisiae</i> KRs-7 | 69,75 | 50-75 | <50 |
| 7 | <i>S. cerevisiae</i> Gl-8 | 86,78 | >75 | >75 |
| 8 | <i>S. cerevisiae</i> BB-5 | 85,43 | >75 | >75 |
| 9 | <i>S. cerevisiae</i> BB-32 | 78,65 | >75 | 50-75 |
| 10 | <i>S. cerevisiae</i> VVs-72 | 65,78 | >75 | 50-75 |
| 11 | <i>S. cerevisiae</i> Az- 12 | 92,75 | >75 | >75 |
| 12 | <i>S. cerevisiae</i> Nur-22 | 65,87 | >75 | 50-75 |
| 13 | <i>S. cerevisiae</i> Ab-13 | 78,35 | 50-75 | <50 |
| 14 | <i>S. cerevisiae</i> Vs-1 | 67,85 | >75 | >75 |
| 15 | <i>S. cerevisiae</i> VGz-4 | 74,45 | >75 | 50-75 |

Результаты показали, что только три штамма (ZPt-14, VIs-1/14, Spt-18) проявили менее 50% МАкР (слабая гидрофобная активность), в то время как большинство штаммов (8) показали МАкР в диапазоне от 50 % до 85%. Четыре штамма (BB-5, Az- 12, A1-06, Gl-8) показали самый высокий процент МАкР - более 85 %. Наибольшая гидрофобная активность выявлена у штамма *S. cerevisiae* Az- 12 и составляла 92,75%.

Пробиотики должны выдерживать суровые условия при прохождении через кишечный тракт [11]. С целью оценки способности тестируемых дрожжей выживать при рН желудочно-кишечного тракта определялась устойчивость штаммов дрожжей при различных значениях рН (2,5, 3,0, 3,5, 5,0 и 7,2). Все штаммы демонстрировали хороший рост (ИР > 75%) при рН 3,5, 5,0 и 7,2, тогда как самые низкие значения рН (2,5 и 3,0) сильно влияли на рост отдельных штаммов дрожжей.

Нужно отметить, что большинство испытанных штаммов дрожжей выдерживали низкие значения рН; так, все штаммы хорошо росли при рН=5, однако при рН 2,5 четыре штамма (ZPt-14, Spt-18, KRs-7, Ab-13) ингибировались (ИР < 50%), 5 штаммов (VIs-1/14, BB-32, VVs-72, Nur-22, VGz-4) проявляли частичное ингибирование (50% < ИР < 75%), тогда как только 6 штаммов (A1-06, VSs-2, Gl-8, BB-5, Az- 12, Vs-1) проявляли достаточно хорошую устойчивость к низким значениям рН (ИР > 75%).

Самая высокая толерантность к низким значениям рН=3 с ИР > 90% была обнаружена у 4-х штаммов - *S. cerevisiae* A1-06, *S. cerevisiae* BB-5, *S. cerevisiae* Az- 12 и *S. cerevisiae* Gl-8.

Штаммы *S. cerevisiae* Az-12, *S. cerevisiae* BB-32 и *S. cerevisiae* ZPt-14 исследовали под микроскопом с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-6490LM с системой энергодисперсионного рентгеновского микроанализа Energy INCA 350 и системой HKL Basic (рисунок 1).

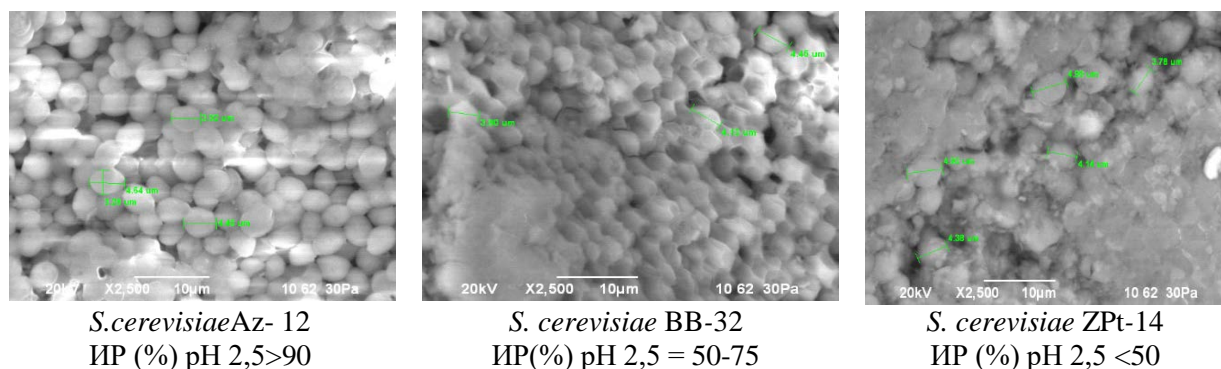


Рисунок 1 - Устойчивость дрожжей к кислым условиям

Так, воздействие кислоты с $pH=2,5$ резко снизило рост дрожжевых клеток у штамма *S. cerevisiae* ZPt-14 (ИР (%) $pH 2,5 < 50$). Здесь наблюдается значительное снижение жизнеспособных клеток за счет частичного или полного повреждения и лизирования клеточных стенок. *S. cerevisiae* BB-32 был менее подвержен воздействию кислоты ИР (%) $pH 2,5 = 50-75$.

Высокую устойчивость к кислым условиям проявил штамм *S. cerevisiae* Az-12, который в дальнейшем может быть рекомендован для производства функциональных ферментированных пищевых продуктов.

Устойчивость к кислым условиям неудивительна, поскольку штаммы, изучаемые в этой работе, были выделены из среды с низким pH , такой как, фруктовые соки.

Заключение

Местные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, протестированные в этом исследовании, выделенные из различного растительного сырья, продемонстрировали достаточно высокий уровень пробиотических признаков, доказывая, что местные дрожжи представляют собой интересный источник для селекции новых пробиотических штаммов. Все 15 штаммов *S. cerevisiae*, ранее протестированные на параметры, представляющие технологический интерес, могут быть использованы в качестве заквасочных культур для производства ферментированных напитков. Данные штаммы были отобраны как наиболее перспективные, так как они способны быстро сбраживать соки. Ведущим фактором являлись органолептические показатели готового ферментированного продукта: естественный фруктовый запах и сладкий, слегка кисловатый вкус, без появления помутнений. *S. cerevisiae* Al - 06, *S. cerevisiae* BB-5, *S. cerevisiae* Az - 12 и *S. cerevisiae* Gl-8 показали многообещающую пробиотическую активность, так индекс роста при $pH=2,5$ у данных культур >90 ; кроме того семь штаммов (BB-5, BB-32, VSs-2, Az-12, Al-06, Gl-8, Ab-13) показали самый высокий процент МАКР. В частности, штамм *S. cerevisiae* Az-12 выделенный из гранатового сока можно считать штаммом, демонстрирующим наилучшее сочетание пробиотических и полезных свойств.

Литература:

- 1 Dahiya D., Nigam P.S. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Fermented Foods as Potential Biotics in Nutrition Improving Health via Microbiome-Gut-Brain Axis. *Fermentation*, 2022, 8 (7): 303.
- 2 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C. and Sanders M.E. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11: 506-514.
- 3 Dahiya D., Nigam P.S. Functional Foods with Prebiotics Can Sustain Wellness and Alleviate Certain Ailments like Gut-Inflammation and Colon-Cancer. *Microorganisms*, 2022, 10(3): 665.
- 4 Markowiak P., Slizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 2017, 9(9): 1021.

5 Markets and Markets Dairy Alternative (Milk) Market by Type (Soy, Almond, Rice), Formulation (Plain, Flavored, Sweetened, Unsweetened), Channel (Supermarket, HealthStore, Pharmacy, Convenience Store) & Geography—Global Trends & Forecast to 2018. Available online: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/dairy-alternative-plant-milk-beverages-market677.html> (accessed on 3 March 2020).

6 Rodríguez P.F.-P.; Arévalo-Villena M., Rosa I.Z., Pérez A.B. Selection of potential non-Sacharomyces probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Research International*, 2018, 112: 143-151.

7 McFarland L.V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 60: 85–90.

8 Boulangé C., Neves A., Chilloux J., Nicholson J., Dumas M. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*, 2016, 8: 42.

9 Fijan, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Environmental Research and Public Health*, 2014, 11: 4745–4767.

10 Oniszczuk A., Oniszczuk T., Gancarz M., Szymańska J. Role of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics in the cardiovascular diseases. *Molecules*, 2021, 26: 1172.

11 Amara A.A., Shibl A. Role of Probiotics in Health Improvement, Infection Control and Disease Treatment and Management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2015, 23: 107–114

12 Perricone M., Bevilacqua A., Corbo M.R., Sinigaglia M. Technological Characterization and Probiotic Traits of Yeasts Isolated from Altamura Sourdough to Select Promising Microorganisms as Functional Starter Cultures for Cereal-Based Products. *Food Microbiology*, 2014, 38: 26-35.

13 Arévalo-Villena M., Fernández-Pacheco P., Castillo N., Bevilacqua A., Briones A. Probiotic capability in *Saccharomyces* yeasts: Set-up of a screening method. *LWT- Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. und] Technologie*, 2018, 89: 657–665.

14 Cordonnier C., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Denis S., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Dynamic In Vitro Models of the Human Gastrointestinal Tract as Relevant Tools to Assess the Survival of Probiotic Strains and Their Interactions with Gut Microbiota. *Microorganisms*, 2015, 3(4): 725-745.

15 Neffe-Skocińska K., Rzepkowska A., Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska Chelliah D. Chapter 3 -Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. *Alternative and Replacement Foods*, 2018: 65-94.

16 Chelliah R., Ramakrishnan S.R., Prabhu P.R.; Antony U. Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*. 2016, 33: 385–401.

17 Bevilacqua A., Perricone M., Cannarsi M., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di Cerignola table olives. *Int. J. Food Sci.* 2009, 44: 2198–2207.

18 Lichtenstein L., Avni-Biron I., Ben-Bassat O. Probiotics and Prebiotics in Crohn's Disease Therapies. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology*, 2016, 30: 81–88.

А.С. ЛАТИФ¹, А.А. САПАРБЕКОВА^{1*}, З.Р. АХМЕДОВА², Г. КАЛДЫБЕКОВА¹,
Г.О. КАНТУРЕЕВА¹

¹М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Шымкент, Қазақстан

²Микробиология институты ғылым Академиясы Өзбекстан Республикасы,
Ташкент, Өзбекстан

*e-mail: almira.saparbekova@mail.ru

SACCHAROMYCES CEREVISIAE АБОРИГЕНДІ ШТАМДАРДЫҢ ӘРТҮРЛІ рН МӘНДЕРІНЕ ТӨЗІМДІЛІГІН ЖӘНЕ ЕРІТКІШТЕРГЕ ДЕГЕН МИКРОБТЫ АДГЕЗИЯСЫН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Әртүрлі өсімдік субстратынан бөлініп алынған, *Saccharomyces cerevisiae* ашытқысының 180 штамы, ашыту жылдамдығы және ферменттелген жеміс шырындарының органолептикалық көрсеткіштері секілді, алдын-ала технологиялық параметрлері зерттелген, 15 штамм іріктеліп алынды. Іріктеліп алынған штамдар рН-тың төмен мәндерінде өміршеңдігінің қабілетілігі және органикалық еріткіштерге деген микробтық адгезиясының жоғары болу қабілетілігі тексерілді.

(BB-5, BB-32, VSs-2, Az- 12, Al-06, Gl-8, Ab-13) жеті штамм органикалық еріткіштерге деген микробтық адгезиясы бойынша ең жоғары пайыз көрсетті. рН=3 төмен мәніне төзімділігі аса жоғары, өсу индексі > 90% жоғары 4 штамда анықталды, дәлірек айтсақ *S. cerevisiae* Al-06, *S. cerevisiae* BB-5, *S. cerevisiae* Az- 12 және *S. cerevisiae* Gl-8.

Нәтижесінде 4 штамм іріктеп алынды, олар ашытқының келесідей штамдары болып анықталды, *Saccharomyces cerevisiae* Al-06 (жүзімнен бөлініп алынды), *Saccharomyces cerevisiae* Gl-8 (қант соргосының шырынынан бөлініп алынды), *Saccharomyces cerevisiae* BB-5 (шие шырынынан бөлініп алынды) және *Saccharomyces cerevisiae*–Az- 12 (анар шырынынан бөлініп алынды). Бұл штамдар өте жақсы сипаттамаға ие болды, ал тестен өткен штамның біреуі *Saccharomyces cerevisiae*–Az- 12, пробиотик ретінде әртүрлі қолданыстарда, тағам қоспасы ретінде, функционалды тағам сусындарын өндіру үшін немесе терапиялық қолданыс үшін пробиотик ретінде қолдануға болады.

Кілтті сөздер: пробиотиктер, ферментация, жеміс шырындары, микробты адгезия, өсу индексі.

IRSTI: 34.27.17

A.S. LATIF¹, A.A. SAPARBEKOVA^{1*}, Z.R. AKHMEDOVA², G. KALDYBEKOVA¹,
G.O. KANTUREEVA¹

¹M. Auezov South Kazakhstan University, Shymkent, Kazakhstan

²Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Tashkent, Uzbekistan

*e-mail: almira.saparbekova@mail.ru

STUDY OF MICROBIAL ADHESION TO SOLVENTS AND RESISTANCE OF ABORIGINAL STRAINS SACCHAROMYCES CEREVISIAE TO DIFFERENT PH VALUES

doi: 10.53729/MV-AS.2023. 02.14

Abstract

From 180 strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated from various plant substrates, 15 strains were selected according to previously studied technological parameters such as digestion rate and organoleptic characteristics of fermented fruit juices. The selected strains were tested for their ability to survive at low pH values and having high microbial adhesion to organic solvents.

Seven strains (BB-5, BB-32, VSs-2, Az-12, AI-06, GI-8, Ab-13) showed a higher percentage of microbial adhesion to organic solvents. The highest tolerance to low pH=3 with a growth index >90% was found in 4 strains identified as *Saccharomyces cerevisiae* AI-06 (from grapes), *Saccharomyces cerevisiae* GI-8 (from sugar sargo juice), *Saccharomyces cerevisiae* BB-5 (from cherry juice) and *Saccharomyces cerevisiae* Az-12 (from pomegranate juice). These strains show the best characteristics, and one of the tested strains of *Saccharomyces cerevisiae* Az-12 has the potential to be used for the production of nutritional supplements, functional food drinks, and also as a probiotic for therapeutic purposes.

Keywords: probiotics, fermentation, fruit juices, microbial adhesion, growth index.

At present, the population of Kazakhstan, as well as all over the world, is interested in good nutrition, in the consumption of healthy foods, including those containing probiotics. In connection with this aspect research focused on finding new probiotic microorganisms is becoming relevant. To prepare fermented functional foods pure viable strains of microorganisms identified and characterized as probiotic cultures are used [1].

Fermented probiotic products can be consumed as a source of nutrition as well as to maintain a healthy gut microbiota [2]. Functional fruit or vegetable drinks contain the substrates needed to prepare the product with the addition of cultures or a consortium of strains used to carry out fermentation, so these drinks can be considered as a healthy synbiotic product formulation. [3, 4].

As a result, there is a growing demand for non-dairy probiotic products that meet the needs of people with dietary restrictions on dairy products. According to the current market report on July 20, 2022, the global market for dairy alternatives is estimated at \$27.3 billion in 2022 and is projected to reach \$44.8 billion by 2027, implying a CAGR of 10.4% in financial terms [5]. Dairy substitutes are used in lactose-free foods and drinks, so such products may be recommended for people with lactose intolerance.

Nowadays, due to these benefits, probiotics are becoming more and more popular, and they are usually taken orally, in the form of drugs or with food [6]. To be included in the probiotic category, microorganisms must be selected based on certain criteria, such as growth at body temperature (37°C), resistance to antibiotics [7,8], survival in unfavorable human gut environments (e.g., digestive enzymes, low pH), adhesion to gut epithelial cells and high surface hydrophobicity [9]. Yeast is widespread in the food industry, where it is used as a starter for the production of fermented food and beverages, such as bread, wine, and beer [10]. To date, the probiotic ability of yeast has not been sufficiently studied. *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*-the only yeast recognized and actually marketed as probiotics [11].

Many researchers have focused on yeast strains of both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* [12, 13] as a good alternative to probiotic bacteria, since they can exert new preventive or therapeutic effects on the host by being part of the gut microbiota [14]. Stimulation of the immune system, degradation and elimination of bacterial toxins due to the protease activity of yeast or inhibition of bacterial attachment to gastrointestinal epithelial cells are among the potential mechanisms used by yeast to protect humans against pathogens [15].

Given the lack of knowledge about the probiotic properties of indigenous yeasts, the purpose of this study was to characterize the indigenous strains of *S. cerevisiae*. In order to isolate strains with a probiotic and health-beneficial potential, a preliminary screening of 180 indigenous strains of *S. cerevisiae* isolated from various plant materials was carried out, from which 15 strains were selected to study the probiotic ability in terms of resistance to the conditions of the gastrointestinal tract (pH, temperature) and hydrophobicity.

Objects and methods of research

In this work, 15 indigenous strains of *S.cerevisiae* (selected from 180) isolated from plant material, including grapes, cherries, apricots, pomegranates, and apples well growing and fruiting in Turkestan region were studied.

Before each experiment, yeast strains were grown in YPD (manufacturer Titan, Biotech LTD, India). The cultures were incubated under aerobic conditions at 37 ± 2 °C and 26 ± 2 °C (as a positive control) for 48 hours. All experiments were performed in three replicates.

Hydrophobicity of yeast cell surface.

The hydrophobicity of the cell surface is a rather variable trait and is tied not only to the measurement technique, but also to the growth conditions, aeration, and age of the cells. Highly hydrophobic microorganisms adhere well to oil droplets after mixing.

Hydrophobicity was defined as the ability of yeast strains to adhere to hydrocarbons and expressed as relative microbial adhesion to solvents (MA_TS) according to the protocol described by Chelliah et al [16] with some modifications. MA_TS was determined by optical density (OD) using a Varian Cary-50 spectrophotometer having an optical range of 190 - 1100 nm. The main objective of the technical solution is to improve the method of estimating the concentration of free and bound microbial cells in the suspension, aimed at increasing the speed of analysis, reducing its labor intensity and cost, as well as the level of error.

Yeast cultures in the stationary phase (inoculated in YPD broth for 48 h) were concentrated by centrifugation at 5000 rpm for 10 min, washed twice with 0.1 M potassium-phosphate buffer (PPB), pH 7.4, and resuspended in 3 ml of the same buffer solution. The optical density (OD) of the suspension at 600 nm was adjusted to 1.0 (A_0) using PPB (pH 7.4).

To 1 ml of this suspension (5.2×10^6 cells/ml), 0.2 ml of toluene was added and stirred for 2 min. After 1 h of incubation at 30 ± 2 °C, the aqueous phase was removed from the top layer of the solvent containing the cells, and the OD was determined again at 600 nm (A_1).

The MA_TS was calculated as:

$$MA_{\text{KP}} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100\%$$

A_0 - OD (optical density at 600 nm) of the suspension after treatment with buffer solution

A_1 - OD (optical density at 600 nm) of the suspension after toluene treatment

Strain resistance to different pH values.

This experiment was performed by incubating approximately 5.2×10^6 cells/ml of each strain in YPD medium, adjusted to different pH values (2.5, 3.0, 3.5, 4.0, and 7.2), at 37 ± 2 °C. 6N HCl solution was used for acidification. Yeast growth was evaluated after 24 hours incubations by absorbance at 600 nm. Assays were performed in three replicates, and the data were treated as growth index (GI) according to Bevilacqua et al. [17]. This method for determining the concentration of microbial cells in a suspension according to OD increases the speed of analysis many times over in comparison with the methods used today and does not require specialized expensive equipment for its implementation.

$$GI = (Ab_{ss}/Ab_{sc}) \times 100\%$$

where Ab_{ss} - absorption of samples at different pH, whereas

Ab_{sc} - the absorption of positive control.

Growth index values were classified as follows:

GI < 50 %: Inhibition of yeast

50 % < GI < 75 %: Partial inhibition

GI > 75%: Growth similar to control.

Results and discussion

The main goal of this work was the selective selection of yeasts with high microbial adhesion to organic solvents and acid resistance for a preliminary assessment of their probiotic abilities.

The sizes of the single cultures studied ranged in width on average from 4.5 μm to 9 μm and in length up to 10 μm. Temperature is an important physical parameter for assessing the probiotic ability of a microorganism. In this study, experiments were conducted at 37°C, a typical human

body temperature, and all 15 strains were able to grow at 37°C. These results are consistent with previous findings reporting the ability of yeast strains to grow to human body temperature and confirm that local native yeast strains may be an interesting source for selecting new potential probiotic strains. Hydrophobicity was defined as the interaction between microbial cells and host cells mediated by cell surface proteins and lipoteichoic acids [13]. As a consequence, this is one of the main criteria for selecting strains with potential probiotic activity, since a microbial strain included in the category of probiotics must have the ability to attach to the intestinal mucosa to colonize and modulate the immune system against pathogens. [18]. Hydrophobic ability was expressed as microbial adhesion to MAtS solvents, using toluene as a solvent.

Hydrophobic capacity and stability of yeast strains at different pH is shown in the Table 1.

Table 1- Hydrophobic capacity and stability of yeast strains at different pH

| № | Microorganism, source | MAtS (%) | GI (%), pH 3,0 | GI (%), pH 2,5 |
|----|-------------------------------|----------|-------------------|-------------------|
| 1 | <i>S. cerevisiae</i> ZPt-14 | 12,25 | 50-75 | <50 |
| 2 | <i>S. cerevisiae</i> VIs-1/14 | 27,34 | >75 | 50-75 |
| 3 | <i>S. cerevisiae</i> AI-06 | 85,23 | >75 | >75 |
| 4 | <i>S. cerevisiae</i> Spt-18 | 45,32 | 50-75 | <50 |
| 6 | <i>S. cerevisiae</i> KR-7 | 69,75 | 50-75 | <50 |
| 7 | <i>S. cerevisiae</i> GI-8 | 86,78 | >75 | >75 |
| 8 | <i>S. cerevisiae</i> BB-5 | 85,43 | >75 | >75 |
| 9 | <i>S. cerevisiae</i> BB-32 | 78,65 | >75 | 50-75 |
| 10 | <i>S. cerevisiae</i> VVs-72 | 65,78 | >75 | 50-75 |
| 11 | <i>S. cerevisiae</i> Az- 12 | 92,75 | >75 | >75 |
| 12 | <i>S. cerevisiae</i> Nur-22 | 65,87 | >75 | 50-75 |
| 13 | <i>S. cerevisiae</i> Ab-13 | 78,35 | 50-75 | <50 |
| 14 | <i>S. cerevisiae</i> Vs-1 | 67,85 | >75 | >75 |
| 15 | <i>S. cerevisiae</i> VGz-4 | 74,45 | >75 | 50-75 |

The results showed that only three strains (ZPt-14, VIs-1/14, Spt-18), showed less than 50% MAtS (weak hydrophobic activity), while most strains (8) showed MAtS ranging from 50% to 85%. Four strains (BB-5, Az- 12, AI-06, GI-8) showed the highest percentage of MAtS greater than 85%. The highest hydrophobic activity of *S. cerevisiae* strain Az- 12 was 92.75%

Probiotics must withstand harsh conditions as they pass through the intestinal tract [11]. The resistance of the yeast strains was determined at different pH values (2.5, 3.0, 3.5, 5.0, and 7.2) to assess the ability of the yeast tested to survive the pH of the gastrointestinal tract. All strains showed good growth (GI > 75%) at pH 3.5, 5.0, and 7.2, whereas the lowest pH values (2.5 and 3.0) strongly affected the growth of individual yeast strains.

It should be noted that most yeasts tolerated low pH values, so all strains grew well at pH=5. The highest tolerance to low pH=3 values with GI > 90% was found in 4 strains, namely *S. cerevisiae* AI-06, *S. cerevisiae* BB-5, *S. cerevisiae* Az- 12 and *S. cerevisiae* GI-8.

S. cerevisiae Az-12, *S. cerevisiae* BB-32 and *S. cerevisiae* ZPt-14 strains were examined under the microscope using JSM-6490LM scanning electron microscope with Energy INCA 350 energy dispersive X-ray microanalysis system and HKL Basic system (Figure 1).

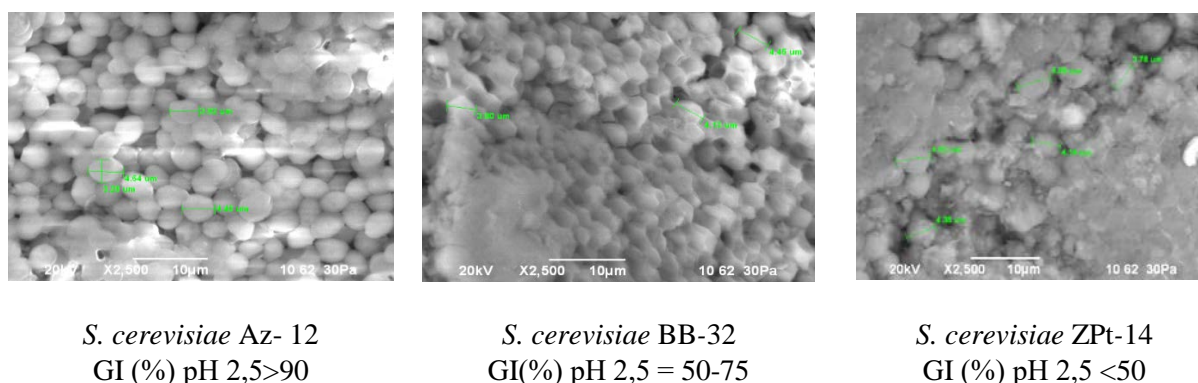


Figure 1 - Resistance of yeast to acidic conditions

Thus, acid exposure at pH=2.5 sharply reduced yeast cell growth in *S. cerevisiae* strain ZPt-14 (GI (%), pH 2.5 <50). A significant decrease in viable cells was observed here, due to partial or complete damage and lysis of cell walls. *S. cerevisiae* BB-32 was less affected by acid GI (%), pH 2.5 = 50-75. *S. cerevisiae* Az-12 strain showed high resistance to acidic conditions, which in the future can be recommended for the production of functional fermented food products. The resistance to acidic conditions is not surprising, since the strains studied in this work were isolated from low pH environments, such as, fruit juices.

Conclusions

The indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* tested in this study, isolated from various plant materials, demonstrated a fairly high level of probiotic traits, proving that indigenous yeasts represent an interesting source for the selection of new probiotic strains. All 15 *S. cerevisiae* strains previously tested for parameters of technological interest can be used as starter cultures for the production of fermented beverages. These strains were selected as the most promising because they are able to ferment juices quickly. The leading factor was the organoleptic characteristics of the finished fermented product: a natural fruity smell and a sweet, slightly sour taste, without the appearance of turbidity. *S. cerevisiae* Al-06, *S. cerevisiae* BB-5, *S. cerevisiae* Az-12, and *S. cerevisiae* Gl-8 showed promising probiotic activity, as the growth index at pH=2.5 in these cultures was >90; besides, seven strains (BB-5, BB-32, VSs-2, Az-12, Al-06, Gl-8, Ab-13) showed the highest percentage of MAtS. In particular, *S. cerevisiae* strain Az-12 isolated from pomegranate juice can be considered as the strain showing the best combination of probiotic and beneficial properties.

References:

- 1 Dahiya D., Nigam P.S. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Fermented Foods as Potential Bioticsin Nutrition Improving Health via Microbiome-Gut-Brain Axis. *Fermentation*, 2022, 8 (7): 303.
- 2 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C. and Sanders M.E. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11: 506-514.
- 3 Dahiya D., Nigam P.S. Functional Foods with Prebiotics Can Sustain Wellness and Alleviate Certain Ailments like Gut-Inflammation and Colon-Cancer. *Microorganisms*, 2022, 10(3): 665.
- 4 Markowiak P., Slizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 2017, 9(9): 1021.
- 5 Markets and Markets Dairy Alternative (Milk) Market by Type (Soy, Almond, Rice), Formulation (Plain, Flavored, Sweetened, Unsweetened), Channel (Supermarket, HealthStore, Pharmacy, Convenience Store) & Geography—Global Trends & Forecast to 2018. Available online: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/dairy-alternative-plant-milk-beverages-market677.html> (accessed on 3 March 2020).

6 Rodríguez P.F.-P.; Arévalo-Villena M., Rosa I.Z., Pérez A.B. Selection of potential non-Sacharomyces probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Research International*, 2018, 112: 143-151.

7 McFarland L.V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 60: 85–90.

8 Boulangé C., Neves A., Chilloux J., Nicholson J., Dumas M. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*, 2016, 8: 42.

9 Fijan, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Environmental Reserch and Public Health*, 2014, 11: 4745–4767.

10 Oniszczuk A., Oniszczuk T., Gancarz M., Szymańska J. Role of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics in the cardiovascular diseases. *Molecules*, 2021, 26: 1172.

11 Amara A.A., Shibl A. Role of Probiotics in Health Improvement, Infection Control and Disease Treatment and Management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2015, 23: 107–114

12 Perricone M., Bevilacqua A., Corbo M.R., Sinigaglia M. Technological Characterization and Probiotic Traits of Yeasts Isolated from Altamura Sourdough to Select Promising Microorganisms as Functional Starter Cultures for Cereal-Based Products. *Food Microbiology*, 2014, 38: 26-35.

13 Arévalo-Villena M., Fernández-Pacheco P., Castillo N., Bevilacqua A., Briones A. Probiotic capability in Saccharomyces yeasts: Set-up of a screening method. *LWT- Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. und] Technologie*, 2018, 89: 657–665.

14 Cordonnier C., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Denis S., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Dynamic In Vitro Models of the Human Gastrointestinal Tract as Relevant Tools to Assess the Survival of Probiotic Strains and Their Interactions with Gut Microbiota. *Microorganisms*, 2015, 3(4): 725-745.

15 Neffe-Skocińska K., Rzepkowska A., Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska Chelliah D. Chapter 3 -Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. *Alternative and Replacement Foods*, 2018: 65-94.

16 Chelliah R., Ramakrishnan S.R., Prabhu P.R.; Antony U. Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*. 2016, 33: 385–401.

17 Bevilacqua A., Perricone M., Cannarsi M., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di Cerignola table olives. *Int. J. Food Sci.* 2009, 44: 2198–2207.

18 Lichtenstein L., Avni-Biron I., Ben-Bassat O. Probiotics and Prebiotics in Crohn's Disease Therapies. *Best Practice Reserch Clinical Gastroenterology*, 2016, 30: 81–88.

МРНТИ: 34.27.01

Ж.З. УМИРАЛИЕВА*, А.А. ДЖАЙМУРЗИНА

Казахский НИИ защиты и карантина растений им. Ж. Жиёмбаева, Алматы, Казахстан

e-mail: zh.umiralieva@gmail.com

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА
БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA* К АНТИБИОТИКАМ****doi:10.53729/MV-AS.2023.02.15****Аннотация**

Бактериальный ожог – одно из наиболее опасных заболеваний семечковых плодовых культур. Он является карантинным заболеванием для многих стран мира, так и для Казахстана. В настоящее время многочисленные очаги зарегистрированы на юге и юго-востоке республики, что представляет серьезную угрозу для плодового хозяйства республики.

Одним из радикальных методов борьбы, как с карантинным заболеванием, является выкорчевка деревьев, что приведет к большим экономическим издержкам и может оказаться не эффективным.

В США и странах Европы для борьбы с бактериальным ожогом долгое время применялся антибиотик стрептомицин. Он был незаменим для борьбы с данным заболеванием более 60 лет без сообщений о неблагоприятном воздействии на человека и окружающую среду. В США и Израиле, где стрептомицин долгое время был основным средством борьбы с бактериальным ожогом, у *Erwinia amylovora* выработалась устойчивость к этому антибиотику. В Европе, где данный антибиотик запрещен в растениеводстве, он применяется в тех случаях, когда прогнозируется высокий риск заболевания.

Целью наших исследований являлось оценить чувствительность бактерии *E. amylovora* к стрептомицину и другим антибиотикам в лабораторных условиях.

Результаты исследования показали, что испытанные антибиотики по бактерицидным свойствам превосходили стрептомицин. Высокие бактерицидные свойства проявили офлоксацин и цефазолин, что свидетельствует о возможности их использования против опасного карантинного заболевания бактериального ожога при риске возникновения эпифитотии, приводящей к гибели плодовых деревьев. Для этого нужны углубленные и всесторонние исследования.

Ключевые слова: бактериальный ожог плодовых, *Erwinia amylovora*, бактерицидные свойства, антибиотики, метод лунок.

Бактериальный ожог одно из наиболее опасных заболеваний семечковых плодовых культур. В настоящее время он зарегистрирован в более чем 50 странах мира [1]. В Казахстане возбудитель бактериального ожога включен в Перечень карантинных вредных организмов, ограниченно распространенных на территории Республики Казахстан [2]. Возбудителем болезни является энтеробактерия *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Она более 30 лет присутствует в Бельгии, Израиле и других Европейских странах и ежегодно приносит большие экономические потери плодовиодству [3,4]. Вредоносность этого заболевания заключается в быстром распространении, больших потерях урожая, затратах на выкорчевку погибших и пораженных деревьев, а также на восстановление новых садов.

В настоящее время многочисленные очаги бактериального ожога зарегистрированы на юге и юго-востоке Казахстана [5,6], что представляет серьезную угрозу для плодовиодства республики. Особенно восприимчивы к бактериальному ожогу груша и яблоня сорта Апорт. Болезнь вызывает быструю их гибель. В настоящее время выкорчеваны целые плантации груши, что существенно сократило площадь грушевых садов.

Одним из радикальных методов борьбы с бактериальным ожогом, как карантинным заболеванием, является выкорчевка деревьев, что приведет к большим экономическим издержкам и может оказаться не эффективным.

Анализ литературы показывает, что эффективных средств борьбы с бактериальным ожогом до настоящего времени не разработано. Даже при выполнении комплексной программы химического контроля в сочетании с санитарией практически невозможно устранить бактериальный ожог. Необходимы новые и более эффективные подходы [7].

По мнению американских ученых разработка и реализация стратегии управления бактериальным ожогом должна проводиться в фазу цветения. В этот период эффективно использовать профилактический контроль антибиотиками, в частности стрептомицином [8]. Антибиотик стрептомицин применяется для борьбы с бактериальным ожогом с 1950 года и был основным средством борьбы с этим опасным заболеванием. Он был незаменим для борьбы с бактериальным ожогом более 60 лет без сообщений о неблагоприятном воздействии на здоровье человека и вредного воздействия на окружающую среду. Исследования по изучению стойкости антибиотиков в окружающей среде показали, что они активны на поверхности растений менее недели и быстро инактивируются в почве [9].

В США и Израиле, где стрептомицин долгое время был основным средством борьбы с бактериальным ожогом, у *E. amylovora* выработалась устойчивость к этому антибиотику [10]. Чтобы уменьшить возможность возникновения устойчивости к антибиотику у популяции *E. amylovora*, он применяется в случаях, когда прогнозируется высокий риск заболевания [9]. Стрептомицин, хотя запрещен в ЕС, в настоящее время используется в экстренных случаях, например в Германии и Австрии [10].

Целью наших исследований являлось оценить бактерицидные свойства стрептомицина и других антибиотиков на тест-объекте бактерии *E. amylovora*, возбудителя бактериального ожога плодовых культур.

Материалы и методы исследования

Изучение бактерицидной активности антибиотиков проводили на базе ИЦФЛА (Испытательный центр фитосанитарного лабораторного анализа) в лаборатории фитопатологии с использованием в качестве тест-объекта местного штамма бактерии *E. amylovora*, выделенного из пораженных бактериальным ожогом растений, произрастающих в районах Алматинской области. Испытывали антибиотики: тетрациклин, офлоксацин, ампициллин, цефазолин и стрептомицин в разных концентрациях. Оценку чувствительности антибиотиков проводили методом лунок, согласно методическим указаниям [11]. В лабораторных условиях в ламинарном боксе в стерильные чашки Петри разливали по 20 мл питательной среды (картофельный агар), затем засеивали суточной культурой тест объекта, концентрация суспензии 10^9 по стандарту мутности. На поверхность питательной среды, засеянной бактерией *E. amylovora*, по середине чашки Петри делали лунки диаметром 10 мм, в которые помещали испытуемый препарат соответствующей концентрации. В качестве контроля использовали воду. Чашки Петри выдерживали в течение часа при комнатной температуре, затем помещали в термостат при температуре 26°C, оптимальной для роста фитопатогенных бактерий. Через двое суток культивирования бактерий отмечали зоны подавления их роста вокруг лунок. Учет проводили, измеряя диаметр зоны ингибирования в мм.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки чувствительности бактерии *E. amylovora* к антибиотикам стрептомицину, тетрациклину, офлоксацину, ампициллину и цефазолину представлены на рисунках 1 и 2.

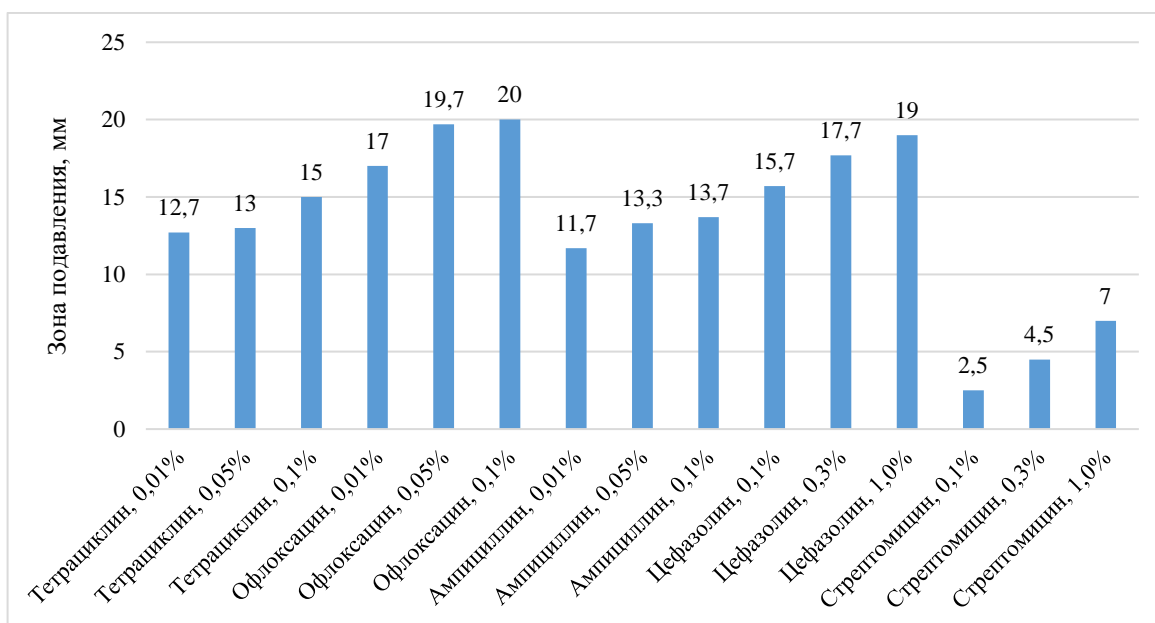


Рисунок 1 – Зоны подавления роста бактерии *E. amylovora* различными дозами антибиотиков, мм (лабораторный опыт)

Учеты зон подавления роста бактерии *E. amylovora* показали, что все они обладают бактерицидными свойствами и их эффективность зависит от концентрации препарата. Чем выше концентрация, тем более чувствителен к ним тест-объект.

Все испытанные антибиотики отличались по эффективности. Наименьшую эффективность проявил стрептомицин. В этом варианте зона подавления роста бактерий составляла 2,5 мм – 7 мм в зависимости от концентрации. Существенно не отличались по бактерицидным свойствам тетрациклин и ампициллин, где сдерживание роста бактерий в пределах 11,7 мм – 15 мм. Более чувствительна бактерия *E. amylovora* была к офлоксацину и цефазолину, где зона подавления роста тест-объекта достигала 20 мм и 19 мм соответственно, при этом наибольшую эффективность проявил офлоксацин в концентрации 0,05% и 0,1%.

Таким образом, результаты исследований показали, что все испытанные антибиотики были более эффективны, чем стрептомицин, лучшие показатели в вариантах офлоксацин и цефазолин (рисунок 2).

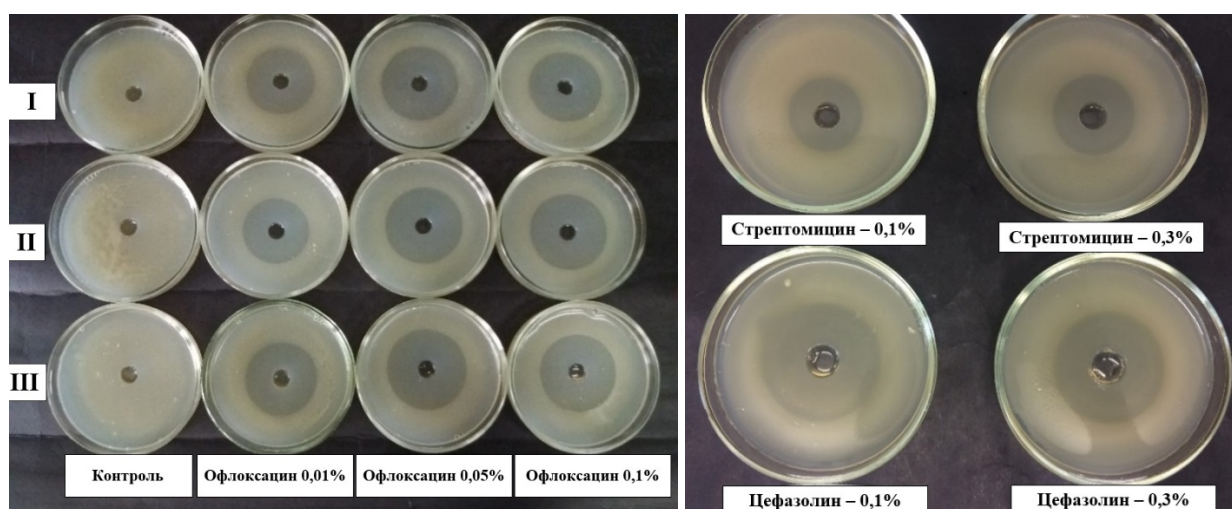


Рисунок 2 – Бактерицидные свойства антибиотиков при разных концентрациях (лабораторный опыт)

Результаты лабораторных исследований показали высокую эффективность антибиотиков офлоксацина и цефазолина против бактерии *E. amylovora*, возбудителя бактериального ожога, что свидетельствует о возможности использования их против данного заболевания.

Возбудитель бактериального ожога первоначально размножается на цветке и каждый цветок является потенциальным местом для заражения, поэтому для его предупреждения необходимо эффективное средство [12]. Использование в этот период медьсодержащих фунгицидов, которые рекомендуются против данного заболевания в высоких концентрациях [10], могут вызвать фитотоксичность, а имеющиеся биопрепараты обладают слабыми бактерицидными свойствами.

Возможно, при риске возникновения эпифитотии болезни, приводящей к гибели плодовых деревьев, для подавления очага данного карантинного заболевания и предотвращения его дальнейшего распространения следует применять высокоэффективные антибиотики. Для этого нужны более углубленные и всесторонние исследования в этом направлении.

Заключение

Результаты проведенных лабораторных исследований показали, что антибиотики офлоксацин и цефазолин обладают высокими бактерицидными свойствами в отношении бактерии *E. amylovora*, возбудителя бактериального ожога.

Финансирование

Статья подготовлена в рамках проектов по НТП (ИРН: BR06249206) «Трансферт, адаптация и внедрение передовых технологий контроля карантинных и особо опасных вредных организмов для обеспечения фитосанитарной безопасности АПК Республики Казахстан» и (ИРН: BR10764960) «Разработка и совершенствование интегрированных систем защиты плодовых, овощных, зерновых, кормовых, бобовых и карантина растений».

Литература:

- 1 Zhao Y., Tian Y., Wang L., Geng G., Zhao W., Hu B. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(4): 815-820 ([https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62033-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62033-7))
- 2 Закон О карантине растений. Глава 2. Карантинные вредные организмы, ограниченно распространенные на территории РК, Приложение 1 к приказу Министра СХ РК от 30 марта 2015 года № 4–4/282. Об утверждении перечня карантинных объектов и чужеродных видов, по отношению к которым устанавливаются и осуществляются мероприятия по карантину растений, и перечня особо опасных вредных организмов (<https://adilet.zan.kz/rus/docs/V1500011739>)
- 3 Schoofs, H., et al. Fire blight control strategy in Belgium. *Acta Horticulturae*, 2014, 1056: 57-64 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.6>).
- 4 Shtienberg, Dani, et al. The incessant battle against fire blight in pears: 30 years of challenges and successes in managing the disease in Israel. *Plant Disease*, 2014, 99.8: 1048-1058 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.6>).
- 5 Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaimurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aitkulov A.K. Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health: Research and Practice*, 2013, 3: 44–48.
- 6 Djaimurzina, A., et al. Detection of the causative agent of fire blight – *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. in the South-East of Kazakhstan. In: *13th Int. Workshop on Fire Blight*, 2014, 1056: (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.18>).
- 7 Adaskaveg, J., Förster, H., Holtz, B. A., Hoffman, E., Gubler, D., & Erickson, E. Evaluation of bactericides for control of fire blight of pears and apples caused by *Erwinia amylovora*. In: *10th Int. Workshop on Fire Blight*, 2006, 704: 277–282 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.39>).
- 8 Sundin G.W. Management of fire blight in humid climates in the U.S.A. In: *Int. Workshop «Fire blight: with special reference to ecological aspects and control measures»* Almaty, 2016: 26-13.
- 9 Stockwell, V. O. Overview of concerns surrounding antibiotic use for control of fire blight. In: *13th Int. Workshop on Fire Blight 1056*, 2014: 39-42 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.2>).

10 Kunz, S., & Donat, C. Field results for the efficacy of fire blight control agents in the last fifteen years in Germany. In: *13th Int. Workshop on Fire Blight 1056*, 2014: 101–106 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.13>).

11 Егоров Н. С. *Основы учения об антибиотиках: учебник*. М., 2004.

12 Джаймурзина А.А., Исин М.М, Копжасаров Б.К., Умираниева Ж.З. Чувствительность фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora* и *Pseudomonas syringae* к медьсодержащим фунгицидам. *Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Бактериальные и фитоплазменные болезни сельскохозяйственных культур: научные и практические аспекты»*. Москва, 2014: 33-35.

Ж.З. УМИРАЛИЕВА*, А.А. ДЖАЙМУРЗИНА

Жазкен Жиембаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ҒЗИ, Алматы, Қазақстан
e-mail: zh.umiralieva@gmail.com

БАКТЕРИЯЛЫҚ КҮЙІК АУРУЫНЫҢ ҚОЗДЫРҒЫШЫ *ERWINIA AMYLOVORA* БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ АНТИБИОТИКТЕРГЕ СЕЗІМТАЛДЫҒЫ

Түйін

Бактериялық күйік – шекілдеуікті жеміс дақылдарының ең қауіпті ауруларының бірі. Бұл әлемнің көптеген елдерінде, оның ішінде Қазақстанда да, карантинді ауру болып табылады. Қазіргі уақытта еліміздің оңтүстігінде және оңтүстік-шығысында көптеген бактериялық күйік ауруының ошақтары тіркелген, бұл республиканың жеміс-жидек шаруашылығына елеулі қауіп төндіреді.

Карантиндік ауру ретінде бактериялық күйікпен күресудің радикалды әдістерінің бірі – ол ағаштарды тамырымен қопару болып табылады, бұл өз кезегінде үлкен экономикалық шығындарға әкеледі, әрі тиімді болмауы мүмкін.

Америкада және Еуропа елдерінде стрептомицин антибиотигі ұзақ уақыт бойы бактериялық күйікпен күресу үшін қолданылған. Ол 60 жылдан астам уақыт бойы, адамның және қоршаған ортаның жағымсыз әсерлері туралы хабарламасыз аталмыш аурумен күресу үшін қажет болды. Стрептомицин ұзақ уақыт бойы бактериялық күйікпен күресудің негізгі құралы болған АҚШ пен Израильде, *Erwinia amylovora* қоздырғышында осы антибиотикке төзімділікті дамытты. Бұл антибиотикке тыйым салынған Еуропада, аурудың жоғары қаупі болжанған кезде өсімдік шаруашылығында қолданылады.

Біздің зерттеулеріміздің мақсаты зертханалық жағдайда *E. amylovora* бактериясының стрептомицинге және басқа антибиотиктерге сезімталдығын бағалау болды.

Зерттеу нәтижелері бактерицидтік қасиеттері бойынша сыналған антибиотиктердің стрептомициннен жоғары екенін көрсетті. Жоғары бактерицидтік қасиеттерге офлоксацин мен цефазолин ие болғандығын көрсетті, бұл оларды жеміс ағаштарының жаппай жойылуына әкелетін эпифитотия қаупі бар қауіпті карантиндік бактериялық күйік ауруына қарсы қолдану мүмкіндігін көрсетеді. Ол үшін терең және жан-жақты зерттеулер қажет.

Кілтті сөздер: жеміс дақылдарының бактериялық күйігі; *Erwinia amylovora*; бактерицидтік қасиеттер; антибиотиктер; ұңғыма әдісі.

IRSTI: 34.27.01

Zh.Z. UMIRALIYEVA*, A.A. JAIMURZINA
Kazakh Research Institute of Plant Protection and Quarantine named after Zhazken
Zhyembayev, Almaty, Kazakhstan
e-mail: zh.umiralieva@gmail.com

SENSITIVITY OF THE FIRE BLIGHT PATHOGEN *ERWINIA AMYLOVORA* TO ANTIBIOTICS

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.15

Abstract

Fire blight is one of the most dangerous diseases of seed fruit crops. It is a quarantine disease for many countries, including Kazakhstan. Currently, numerous outbreaks of fire blight are registered in the south and southeast of Kazakhstan, which poses a serious threat to fruit growing in the country.

One of the radical methods of combating fire blight, as a quarantine disease, is the uprooting of trees, which will lead to large economic costs and may not be effective.

In America and European countries, the antibiotic streptomycin has been used for a long time to combat fire blight. It has been indispensable for fighting fire blight for more than 60 years without reports of adverse effects on humans and the environment. In the USA and Israel, where streptomycin has long been the main means of combating fire blight, *Erwinia amylovora* has developed resistance to this antibiotic. In Europe, where this antibiotic is banned in crop production, it is used when a high risk of disease is predicted.

The aim of our research was to evaluate the sensitivity of *E. amylovora* bacteria to streptomycin and other antibiotics in the laboratory.

The results of the study showed that the tested antibiotics are superior to streptomycin in bactericidal properties. High bactericidal properties were shown by ofloxacin and cefazolin, which indicates the possibility of their use against the dangerous quarantine disease fire blight at the risk of epiphytotic disease, leading to the death of fruit trees. This requires in-depth and comprehensive research.

Keywords: fire blight; *Erwinia amylovora*; bactericidal properties; antibiotics; hole method.

Fire blight is one of the most dangerous diseases of pome fruit crops. Currently, it is registered in more than 50 countries around the world [1]. In Kazakhstan, it is included in the List of quarantine pests that are limited in the territory of the Republic of Kazakhstan [2]. The causative agent of the disease is *Enterobacteria Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. It has been present in Belgium, Israel, and other European countries for more than 30 years and annually brings great economic losses to fruit growing [3,4]. Its harmfulness lies in its rapid spread, in large crop losses, in the costs of uprooting dead and affected trees, as well as the restoration of new gardens.

Currently, numerous foci of fire blight have been registered in the south and south-east of Kazakhstan [5, 6], which poses a serious threat to the fruit growing of the republic. Pear and apple varieties of Aport are particularly susceptible to fire blight. The disease causes their rapid death. Currently, entire pear plantations have been uprooted, which has significantly reduced the area of pear orchards.

One of the radical methods of combating fire blight, as a quarantine disease, is the uprooting of trees, which will lead to large economic costs and may not be effective.

Analysis of the literature shows that no effective means of controlling fire blight have been developed to date. Even with a comprehensive program of chemical control combined with sanitation, it is almost impossible to eliminate fire blight. New and more effective approaches are needed [7].

According to American scientists, the development and implementation of fire blight management strategy should be carried out in the flowering phase. During this period, prophylactic

control with antibiotics, particularly streptomycin, is effective [8]. The antibiotic streptomycin has been used to control fire blight since 1950 and has been the primary control of this dangerous disease. It has been indispensable for the control of fire blight for over 60 years without any reported adverse effects on human health or the environment. Studies on the persistence of antibiotics in the environment have shown that they are active on the plant surface for less than a week and are rapidly inactivated in the soil [9].

In the United States and Israel, where streptomycin has long been the main treatment for fire blight, *E. amylovora* has developed resistance to this antibiotic [10]. To reduce the possibility of antibiotic resistance in the *E. amylovora* population, it is used when a high risk of disease is predicted [9]. Streptomycin, although banned in the EU, is currently used in emergency cases, for example in Germany and Austria [10].

The purpose of our studies was to evaluate the bactericidal properties of streptomycin and other antibiotics on the test-object bacterium *E. amylovora*, the causative agent of fire blight of fruit crops.

Materials and methods

The bactericidal activity of antibiotics was studied at PLATC (Phytosanitary Laboratory Analysis Testing Center) in the laboratory of phytopathology using as a test object a local strain of *E. amylovora* bacteria isolated from plants affected by fire blight, growing in areas of Almaty region. Antibiotics were tested: tetracycline, ofloxacin, ampicillin, cefazolin, and streptomycin in different concentrations. The sensitivity of antibiotics was assessed by the method of wells, according to the guidelines [11]. Under laboratory conditions, 20 ml of nutrient medium (potato agar) was poured into sterile Petri dishes in a laminar box, then seeded with a daily culture of the test object, the concentration of the suspension was 10⁹ according to the turbidity standard. On the surface of the nutrient medium seeded with the bacterium *E. amylovora*, holes with a diameter of 10 mm were made in the middle of the Petri dish, into which the test preparation of the appropriate concentration was placed. Water was used as a control. Petri dishes were kept for an hour at room temperature, then placed in a thermostat at a temperature of 26 ° C, optimal for the growth of phytopathogenic bacteria. After two days of cultivation of bacteria, zones of suppression of their growth around the wells were noted. Accounting was carried out by measuring the diameter of the inhibition zone in mm.

Results and discussion

The results of the evaluation of the sensitivity of *E. amylovora* bacteria to the antibiotics streptomycin, tetracycline, ofloxacin, ampicillin and cefazolin are presented in Figures 1 and 2.

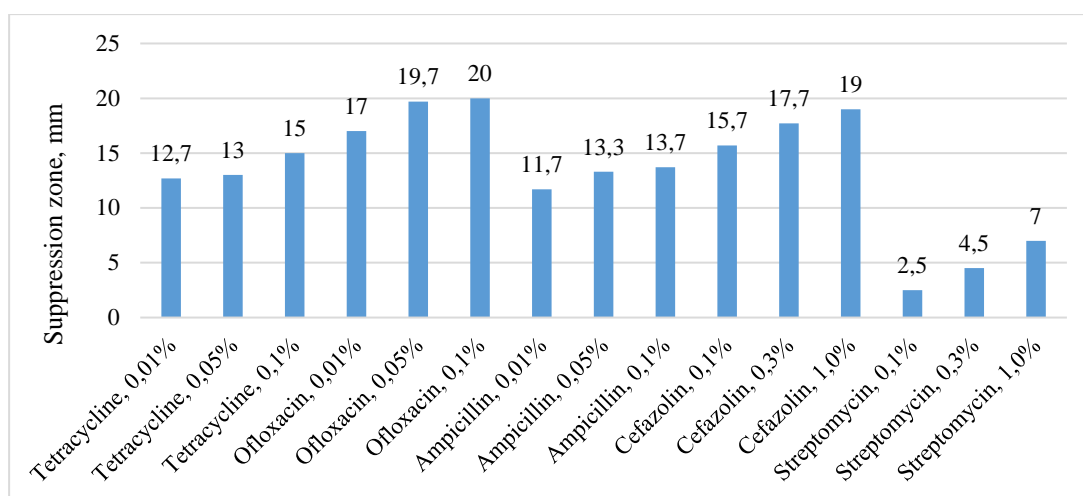


Figure 1 – Growth suppression zones of *E. amylovora* bacteria with different doses of antibiotics, mm (laboratory experience)

Studies of the growth suppression zones of *E. amylovora* bacteria showed that all of them have bactericidal properties and their efficiency depends on the concentration of the drug. The higher the concentration, the more sensitive the test object is to them.

All the antibiotics tested differed in efficacy. Streptomycin was the least effective. In this variant, the zone of bacterial growth suppression ranged from 2.5 mm to 7 mm depending on the concentration. Tetracycline and ampicillin did not differ significantly in their bactericidal properties, with bacterial growth suppression ranging from 11.7 mm to 15 mm. *E. amylovora* bacteria were more sensitive to ofloxacin and cefazolin, where the test-object growth suppression zone reached 20 mm and 19 mm, respectively with ofloxacin at a concentration of 0.05% and 0.1% being the most effective.

Thus, the results of the studies showed that all the tested antibiotics were more effective than streptomycin, the best indicators in the variants of ofloxacin, and cefazolin (Figure 2).

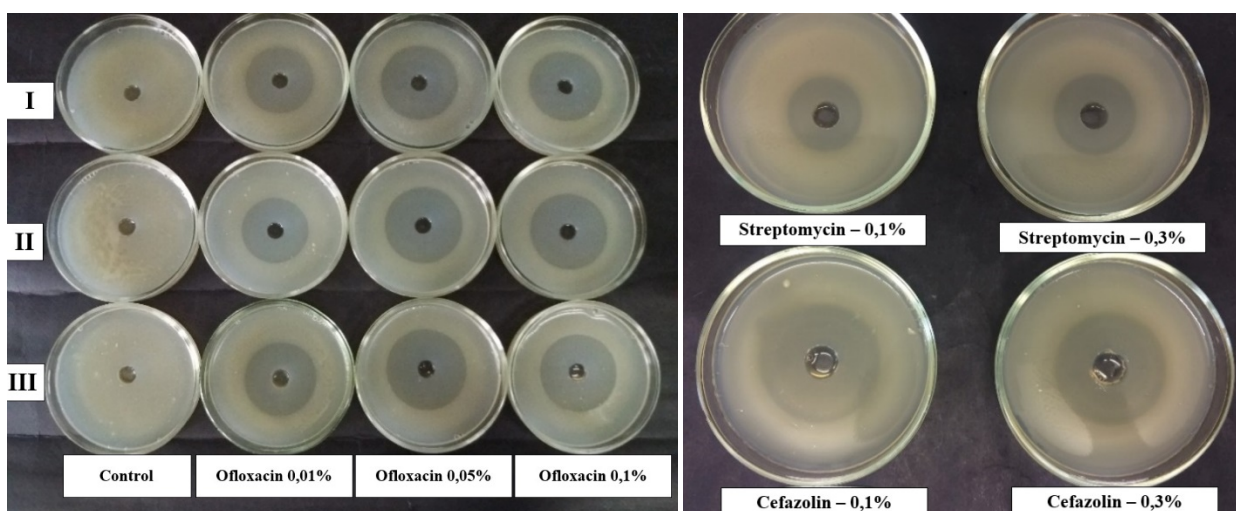


Figure 2 – Bactericidal properties of antibiotics at different concentrations (laboratory experiment)

The results of laboratory studies showed high efficacy of antibiotics ofloxacin and cefazolin against the bacterium *E. amylovora*, the causative agent of fire blight, which indicates the possibility of their use against this disease.

The causative agent of fire blight initially multiplies on the flower and each flower is a potential site of infection, so an effective remedy is needed to prevent it [12]. The use of copper-containing fungicides during this period, which are recommended against this disease in high concentrations [10], can cause phytotoxicity, and the available biopreparations have weak bactericidal properties.

Perhaps, if there is a risk of epiphytes of the disease leading to fruit-tree death, highly effective antibiotics should be used to suppress the focus of this quarantine disease and prevent its further spreading. This requires more in-depth and comprehensive research in this direction.

Conclusion

The results of the laboratory studies showed that the antibiotics ofloxacin and cefazolin have high bactericidal properties against *E. amylovora* bacteria, the causative agent of fire blight.

Funding

The article was prepared within the PTF projects (IRN: BR06249206) «Transfer, adaptation and introduction of advanced technologies for the control of quarantine and particularly dangerous organisms to ensure phytosanitary safety of the agroindustrial complex of the Republic of

Kazakhstan» and (IRN BR10764960) «Development and improvement of integrated protection systems for fruit, vegetable, grain, forage, legumes and quarantine of plant».

References:

1 Zhao Y., Tian Y., Wang L., Geng G., Zhao W., Hu B. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(4): 815-820 ([https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62033-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62033-7))

2 Закон О карантине растений. Глава 2. Карантинные вредные организмы, ограниченно распространяемые на территории РК, Приложение 1 к приказу Министра SKH RK от 30 марта 2015 года № 4–4/282. Об утверждении перечня карантинных объектов и чужеродных видов, по отношению к которым устанавливаются и осуществляются меры по карантину растений, и перечня особо опасных вредных организмов (<https://adilet.zan.kz/rus/docs/V1500011739>)

3 Schoofs, H., et al. Fire blight control strategy in Belgium. *Acta Horticulturae*, 2014, 1056: 57-64 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.6>).

4 Shtienberg, Dani, et al. The incessant battle against fire blight in pears: 30 years of challenges and successes in managing the disease in Israel. *Plant Disease*, 2014, 99.8: 1048-1058 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.6>).

5 Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaimurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aitkulov A.K. Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health: Research and Practice*, 2013, 3: 44–48.

6 Djaimurzina, A., et al. Detection of the causative agent of fire blight – *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. in the South-East of Kazakhstan. In: *13th Int. Workshop on Fire Blight*, 2014, 1056: (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.18>).

7 Adaskaveg, J., Förster, H., Holtz, B. A., Hoffman, E., Gubler, D., & Erickson, E. Evaluation of bactericides for control of fire blight of pears and apples caused by *Erwinia amylovora*. In: *10th Int. Workshop on Fire Blight*, 2006, 704: 277–282 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.39>).

8 Sundin G.W. Management of fire blight in humid climates in the U.S.A. In: *Int. Workshop «Fire blight: with special reference to ecological aspects and control measures»*, Almaty, 2016: 26-13.

9 Stockwell, V. O. Overview of concerns surrounding antibiotic use for control of fire blight. In: *13th Int. Workshop on Fire Blight 1056*, 2014: 39-42 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.2>).

10 Kunz, S., & Donat, C. Field results for the efficacy of fire blight control agents in the last fifteen years in Germany. In: *13th Int. Workshop on Fire Blight 1056*, 2014: 101–106 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.13>).

11 Egorov N. S. Osnovy ucheniya ob antibiotikah: uchebnik. M., 2004.

12 Dzhajmurzina A.A., Isin M.M., Kopzhasarov B.K., Umiraliyeva ZH.Z. Chuvstvitel'nost' fitopatogennykh bakterij *Erwinia amylovora* i *Pseudomonas syringae* k med'soderzhashchim fungicidam. Mat. Mezhd. nauch.-prakt. konf. «Bakterial'nye i fitoplazmennye bolezni sel'skohozyajstvennykh kul'tur: nauchnye i prakticheskie aspekty». Moskva, 2014: 33-35.

ПРАВИЛА
издания журнала
«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ»

Журнал публикует статьи фундаментального и прикладного характера. Материалы должны отражать результаты научных исследований и практических достижений в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии.

Оплата за публикацию статьи – 30 000 тенге.

Представленные для опубликования материалы должны удовлетворять следующим требованиям:

Содержать результаты оригинальных научных исследований по актуальным проблемам в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии, ранее не опубликованные и не предназначенные к публикации в других изданиях.

Все статьи принимаются и публикуются одновременно на двух языках (казахском и английском, или русском и английском).

Статьи принимаются в электронном виде (в формате .doc, .docx либо .rtf) через профиль автора на сайте imv-journal.kz.

При невыполнении формальных требований, статья к публикации не принимается.

Статьи, поступившие в редакцию журнала, могут быть проверены с помощью системы Антиплагиат. В случае, если результат проверки выявляет некорректно оформленные заимствования, статья может быть отклонена.

При выполнении формальных требований, статья направляется на рассмотрение членам редколлегии, имеющим ученую степень в научной области, соответствующей содержанию статьи. При этом редакция определяет соответствие статьи профилю журнала, требованиям к оформлению. При соответствии вышеуказанным требованиям направляет ее на рецензирование стороннему специалисту, обладающему высокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению, имеющему ученую степень PhD, доктора или кандидата наук.

К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в одном отделе или департаменте учреждения, где выполнена работа. Рецензент выносит решение о возможности опубликования

Окончательное решение о целесообразности публикации принимается Редакционной коллегией в соответствии с рекомендациями рецензентов.

После принятия Редакционной коллегией решения о допуске статьи к публикации ответственный редактор журнала информирует об этом автора и указывает сроки публикации.

1. Присланные материалы должны содержать:

- Материалы статьи (файлу со статьей присваивается имя по фамилии первого автора).
- Сведения об авторах (фамилия, имя, отчество, ученая степень, звание, должность, место работы, контактные телефоны, электронные адреса (e-mail), идентификационный номер (ORCID)).
- Отсканированное сопроводительное письмо.

2. Статья должна содержать:

- МРНТИ – межгосударственный рубрикатор научно-технической информации
- Фамилии авторов статьи (прописными буквами, инициалы следуют перед фамилией);
- Название организации, в которой была выполнена работа и город (строчными буквами);
- Название статьи (прописными буквами полужирным шрифтом);

- Аннотация (в начале статьи перед основным текстом);
- Ключевые слова (не более 5);
- Введение (без заголовка), в котором кратко излагается актуальность и новизна рассматриваемого вопроса;
- Основной текст (включает материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, содержащее краткое изложение основных результатов работы);
- Список литературы (оформляется с указанием фамилии и инициалов автора, полного названия книги (статьи), места издания, названия журнала (года, тома, номера, страницы).

3. Размер одной статьи не должен превышать 10 машинописных страниц (статьи обзорного характера – до 20 стр.), включая аннотацию, таблицы, рисунки, список литературы. В том же файле следует представлять резюме на трех языках (казахском, русском и английском).

4. Статья должна быть набрана на компьютере в редакторе MS Office Word, шрифтом Times New Roman 12 пт, с пробелом между строк 1 компьютерный интервал, поля – верхнее и нижнее 2 см, левое 3 см, правое 1,5 см. Количество рисунков – не более пяти. Аннотация, таблицы, рисунки, список литературы – 11 пт через 1 компьютерный интервал. Ссылки на литературные источники даются цифрами в прямых скобках по мере упоминания и должны быть идентичными на двух языках. Необходимо тщательно следить за точным соответствием обозначений в тексте и на таблицах, рисунках и др. При изложении экспериментального материала должна быть использована международная система единиц (СИ).

5. После статьи на английском языке приводится список литературы в романском алфавите (References) для SCOPUS и других БАЗ ДАННЫХ полностью отдельным блоком, повторяя список литературы к русскоязычной части, независимо от того, имеются или нет в нем иностранные источники. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите (латиница).

В References не используются разделительные знаки («//» и «-»). Название источника и выходные данные отделяются от авторов типом шрифта, чаще всего курсивом, точкой или запятой.

На сайте <http://www.translit.ru/> можно бесплатно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу, используя различные системы. Программа очень простая, ее легко использовать для готовых ссылок. К примеру, выбрав вариант системы Библиотеки Конгресса США (LC), получаем изображение всех буквенных соответствий. Вставляем в специальное поле весь текст библиографии на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

6. Статьи, не соответствующие Правилам, не публикуются и не возвращаются автору. Редакция оставляет за собой право производить сокращения и правки статей.