



ISSN 2304-585X
ISSN online 3005-222X
ИНДЕКС 76057

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

Tom/
Volume № Year

42 | 3 | 2023

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

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

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

№ 3 (42)

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТЫ
2023

ISSN 2304-585 X

ISSN online 3005-222X

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

№ 3 (42)/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

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, А.Ж. Алыбаева, А.А. Амангелді, Ж.Н. Ермекбай, И.Ю. Потороко
Дрожжевые микроорганизмы как пробиотики и источник белка.....6

В.Э. Березин, А.П. Богоявленский, П.Г. Алексюк, М.С. Алексюк, А. Азизан, И.А. Зайцева, Е.С. Омиртаева
Биологически активные соединения растительного происхождения как перспективный источник противовирусных препаратов для борьбы с гриппом и COVID-19.....26

Ж.Б. Сулейменова, Р.К. Б依ева, Г.Б. Нармуратова, Г.К. Жумагалиева, А.К. Калиева, Г.А. Аль-Маали, Г.Б. Адманова, Б. Бакытжанқызы
α-Амилаза и ее применение в разных отраслях промышленности.....52

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Е.А. Олейникова, А.Ж. Алыбаева, Ж.Н. Ермекбай, М.Б. Алимжанова, К. Ашимулы, С.Т. Даугалиева, М.И. Хаджаева, Г.К. Бейсембекова
Разработка ферментированного овощного продукта с использованием смешанной закваски, включающей молочнокислые и уксуснокислые бактерии.....68

Ф.К. Сарсекеева, А.И. Токен, А.А. Серік, Н.К. Шактай, Н.Р. Акмуханова, С.К. Сандыбаева, Д.К. Кирбаева, Р. Маммадов
Влияние антибиотиков, фунгицидов и ультрафиолетового излучения на культуры микроводорослей и цианобактерий, выделенных из почв рисовых полей.....84

А. Абуталип, Б.Д. Айтжанов, С.Г. Канатбаев, С.Т. Даугалиева, Б.Б. Кайыпбай, А.А. Абубекова, А.И. Байман, S. Peletto
Изучение уровня и динамики антител, образующихся в организме животных после вакцинации против эмкара.....103

Г.К. Абай, Р.Ж. Бержанова, У.Ч. Чоманов, Ш. Харса, А.А. Сартаева, Н.К. Динанова
Исследование протеолитических свойств лактобактерий, используемых в производстве сыра.....118

Б.Т. Байкара, Е.Т. Касымбеков, Е.Я. Хан, К.Д. Даулбаева, С.Ш. Нуралибеков, Т.Б. Сабыржан, S.R. Fereidouni, К.О. Карамендин, А.И. Кыдырманов
Молекулярно-генетическая характеристика высокопатогенного штамма вируса гриппа птиц A/Mute swan/Mangystau/9421/2022, изолированного от зимующих птиц на побережье Каспийского моря125

- У.З. Сагындыков, М.Ж. Султанова, Н. Акжанов,
Ә. Садуакас, А. Нурыш, К.О. Додаев
Исследование влияния водно-этанольного экстракта из скорлупы грецкого ореха на качество пробиотического напитка на основе молочнокислых бактерий.....149
- Г.Н. Бисенова, З.С. Сармурзина, Г.К. Абитаева,
Б.К. Мусабаева, Е.Н. Найманов, Ж.Б. Текебаева
Разработка рецептур профилактических напитков на основе молока и молочной сыворотки и определение их свойств.....158
- Д.И. Мұзарап, Ш.Т. Табыс, Н.А. Сәрсенқұлова,
М.К. Кенжебаева, М. Мамбеталиев, А.К. Наханов,
К.Д. Жугунисов, О. Эрганиш
Освежение вирулентного штамма вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в культуре клеток и проверка патогенных свойств на целевых животных.....176
- Г.Б. Баймаханова, Ә.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина,
Г.А. Спанкулова, Г.А. Момбекова, Б.Б. Баймаханова,
А.С. Балгимбаева, Д.А. Тлеубекова, М.А. Акылова,
А.Х. Серикова, Ш.Ж. Дауренбекова, Т.Д. Доолоткельдиева,
Л.П. Треножникова
Изучение антибактериальных свойств актиномицетов из экстремальных местообитаний Казахстана.....193
- Г.Д. Ултанбекова, КА. Мухатаева, А.І. Жусупова,
Ч. Д. Гелани, Н. Ибишева, А.С. Нурмаханова,
М.О. Жалгасбаева, Ә.Ә. Сагындыкова, Ж.Д. Дастан
Изучение эндофитов растений фармафлор *Salvia aethiopsis* L., *Salvia stepposa desshost* и *Salvia sclarea* L., произрастающих на территории Казахстана.....221
- Ж.А. Орынбаева, З.Б. Тунгышбаева, Н.Б. Молдагулова,
Д.К. Кулжанова, Н.В. Рудаков
Получение перспективных пробиотических штаммов методом адгезии.....236
- У.А. Абылаева, А.А. Сардар, А.К. Турсунова,
Ш.М. Турбекова, Г.Д. Абишева
Изолирование и идентификация патогенных грибов, выделенных из *Solanum lycopersicum* (томат) в условиях Алматинской области.....251

МАЗМҰНЫ

CONTENTS

ШОЛЫМА МАҚАЛАЛАР

М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, А.Ж. Алыбаева,
А.А. Амангелді, Ж.Н. Ермекбай, И.Ю. Потороко
Пробиотиктер және ақуыз көзі ретінде ашытқы
микрорганизмдері.....16

В.Э. Березин, А.П. Боговяленский, П.Г. Алексюк,
М.С. Алексюк, А. Азизан, И.А. Зайцева, Е.С. Омиртаева
Өсімдік текті биологиялық белсенді қосылыстар
тұмаумен және COVID-19-бен күресуге арналған
вирусқа қарсы препараттардың әлеуетті көзі ретінде..39

Ж.Б. Сулейменова, Р.К. Блueva, Г.Б. Нармуратова,
Г.К. Жумагалиева, А.К. Калиева, Г.А. Аль-Маали,
Г.Б. Адманова, В. Бақытжанқызы
α-Амилаза және оны өнеркәсіптің әртүрлі салаларында
колдану.....60

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

Е.А. Олейникова, А.Ж. Алыбаева, Ж.Н. Ермекбай,
М.Б. Алимжанова, К. Әшимұлы, С.Т. Д. Дәуғалиева,
М.И. Хаджаева, Г.Қ. Бейсембекова
Сүт қышқылы мен сірке қышқылы бактерияларын
қамтитын аралас ұйытқыны қолдана отырып,
ашытылған көкөніс өнімін жасау.....76

Ф.К. Сарсекеева, А.И. Төкен, А.А. Серік, Н.К. Шактай,
Н.Р. Акмуханова, С.К. Сандыбаева, Д.К. Кирбаева,
Р. Маммадов
Антибиотиктердің, фунгицидтердің және ультракүлгін
сәулелердің күріш алқаптарының топырағынан бөлініп
алынған микробалдырлар мен цианобактериялардың
дақылдарына әсері.....90

Ә. Әбутәліп, Б.Д. Айтжанов, С.Ф. Қанатбаев,
С.Т. Дәуғалиева, Б.Б. Қайыпбай, А.Ә. Әбубекова,
А.И. Байман, S. Peletto
Қарасанға қарсы иммунделген жануарлар ағзасында
вакцинациядан кейінгі пайда болатын антиденелер
деңгейі және динамикасы.....97

Г.Қ. Абай, Р.Ж. Бержанова, У.Ч. Чоманов, Ш. Харса,
А.А. Сартаяева, Н.К. Динанова
Ірімшік өндірісінде қолданылатын
лактобактериялардың протеолитикалық қасиеттерін
зерттеу.....111

Б.Т. Байқара, Е.Т. Қасымбеков, Е.Я. Хан,
К.Д. Даулбаева, С.Ш. Нуралибеков, Т.Б. Сабыржан,
S.R. Fereidouni, К.О. Карамендин, А.И. Қыдырманов
Каспий теңізі жағалауында қыстайтын құстардан
бөлінген зардаптылығы жоғары құс тұмауы вирусы
A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 штамының
молекулалы-генетикалық сипаттамасы.....133

REVIEW RESEARCH PAPERS

M.G. Saubenova, Ye.A. Oleinikova, A.Zh. Alybayeva,
A.A. Amangeldi, Zh.N. Yermekbay, I. Yu. Potoroko
Yeast microorganisms as probiotics and protein source.....17

V.E. Berezin, A.P. Bogoyavlensky, P.G. Alexyuk,
M.S. Alexyuk, A. Azizan, I.A. Zaitseva, E.S. Omirtayeva
Biologically active compounds of plant origin as a promising
source of antiviral drugs to fight against influenza and COVID-
19.....40

Zh.B. Suleimenova, R.K. Blieva, Zh.B. Narmuratova,
G.K. Zhumagalieva, A.K. Kalieva, G.A. Al-Maali,
G.B. Admanova, B. Bakytzhankyzy
α-Amylase and its applications in industry.....60

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

Y.A. Oleinikova, A.Z. Alybayeva, Z.N. Yermekbay,
M.B. Alimzhanova, K. Ashimuly, S.T. Daugaliyeva,
M.I. Khajayeva, G.K. Beisembekova
Development of a fermented vegetable product using a mixed
starter including lactic acid bacteria and acetic acid bacteria
.....76

F.K. Sarsekeyeva, A.I. Token, A.A. Serik, N.K. Shaktay,
N.R. Akmukhanova, S.K. Sandybayeva, D.K. Kirbayeva,
R. Mammadov
The effect of antibiotics, fungicides and ultraviolet radiation on
cultures of microalgae and cyanobacteria isolated from the soil of
rice fields.....91

A. Abutalip, B.D. Aitzhanov, S.G. Kanatbayev,
S.T. Daugaliyeva, B.B. Kaiypbay, A.A. Abubekova⁴,
A.I. Baiman, S. Peletto
Studying the level and dynamics of antibodies produced in
organism of animals after vaccination against
emcar.....104

G.K. Abay, R.Zh. Berzhanova, U.Ch. Chomanov, S. Harsa,
A.A. Sartayeva, N.K. Dinanova
Investigation of proteolytic properties of lactic acid bacteria used
in cheese production.....118

B.T. Baikara, Y.T. Kasymbekov, Y.Y. Khan, K.D. Daulbaeva,
S.Sh. Nuralibekov, T.B. Sabyrzhn, S.R. Fereidouni,
K.O. Karamendin, A.I. Kydyrmanov
Molecular genetic characteristics of a highly pathogenic avian
influenza strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 isolated
from birds wintering on the coast of the caspian
sea.....133

- У.З. Сағындықов, М.Ж. Султанова, Н. Ақжанов, Ә. Сәдуақас, А. Нұрыш, К.О. Додаев
Сүтқышқыл бактериялары негізіндегі пробиотикалық сусын сапасына грек жаңғағы қабығынан алынған сулы –этанолды экстракттың әсерін зерттеу.....141
- U.Z. Sagyndykov, M.Zh. Sultanova, N. Akzhanov, A. Saduakas, A. Nurysh, K.O. Dodaev
Investigation of the effect of water–ethanol extract from walnut shell on the quality of a probiotic drink based on lactic acid bacteria.....150
- Г.Н. Бисенова, З.С. Сармурзина, Г.К. Абиатаева, Б.К. Мусабаяева, Е.Н. Найманов, Ж.Б. Текебаяева
Сүт мен сарсыту негізіндегі алдын алу сусындар формуласын әзірлеу және оның қасиеттерін анықтау.....166
- G.N. Bissenova, Z.S. Sarmurzina, G.K. Abitayeva, B.K. Mussabayeva, E.N. Naimanov, J.B. Tekebayeva
Development of recipes for prophylactic milk and whey-based drinks and determination of their properties167
- Д.И. Мұзарап, Ш.Т. Табыс, Н.А. Сәрсенқұлова, М.К. Кенжебаева, М. Мамбеталиев, А.К. Наханов, К.Д. Жугунисов, О. Эрганиш
Жасуша өсіндісінде ірі қара малдың парагрипп-3 вирулентті штаммын жаңарту және сезімтал жануарларда патогендік қасиеттерін тексеру.....184
- D.I. Muzarap, Sh.T. Tabys, N.A. Sarsenkulova, M.K. Kenzhebaeva, M.Mambetaliev, A.K. Nakhanov, K.D. Zhugunissof, O. Erganiş
Refreshment of a virulent strain of bovine parainfluenza-3 virus in cell culture and determination of pathogenic properties in calves.....184
- Г.Б. Баймаханова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова, Г.А. Момбекова, Б.Б. Баймаханова, А.С. Балгимбаева, Д.А. Тлеубекова, М.А. Ақылова, А.Х. Серикова, Ш.Ж. Дауренбекова, Т.Д. Доолоткельдиева, Л.П. Треножникова
Қазақстанның экстремальді жерлерінде мекендейтін актиноциеттердің антибактериялық қасиеттерін зерттеу.....201
- G.B. Baimakhanova, E.R. Faizulina, L.G. Tatarkina, G.A. Spankulova, G.A. Mombekova, B.B. Baimakhanova, A.S. Balgimbayeva, D.A. Tleubekova, M.A. Akylova, A.H. Serikova, Sh.Zh. Daurenbekova, T.D. Doolotkeldieva, L.P. Trenozhnikova
Study of antibacterial properties of actinomycetes from extreme habitats of Kazakhstan.....202
- Г.Д. Ұлтанбекова, Қ.А. Мухатаева, А.І. Жусупова, Ч. Д. Гелани, Н. Ибишева, А.С. Нұрмаханова, М.О. Жалғасбаева, Ә.Ә. Сағындықова, Ж.Д. Дастан
Қазақстан территориясында өсетін фармафлора *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* desshost және *Salvia sclarea* L., өсімдіктерінің эндофиттерін зерттеу.....211
- G.D. Ultanbekova, K.A. Mukhataeva, A.I. Zhusupova, Ch.D. Gelani, N. Ibisheva, A.S. Nurmakhanova, M. O. Zhalgasbaeva, A.A. Sagyndykova, Zh.D. Dastan
A survey of endophytes from the Kazakhstani species of *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* desshost and *Salvia sclarea* L.,.....221
- Ж.А. Орынбаева, З.Б. Тұңғышбаева, Н.Б. Молдагулова, Д.К. Кулжанова, Н.В. Рудаков
Адгезия әдісімен перспективті пробиотикалық штамдарды алу.....231
- Zh.A. Orynbayeva, Z.B. Tungushbaeva, N.B. Moldagulova, D.K. Kulzhanova, N.V. Rudakov
Obtaining promising probiotic strains by the adhesion method237
- Ұ.А. Абылаева, А.А. Сардар, А.К. Турсунова, Ш.М. Турбекова, Г.Д. Абишева
Алматы облысы жағдайында *Solanum lycopersicum* (қызанақ) оқшауланған патогенді саңырауқұлақтарды изоляциялау және идентификациялау243
- U.A. Abylaeva, A.A. Sardar, A.K. Tursunova, Sh.M. Turbekova, G.D. Abisheva
Isolation and identification of pathogenic fungi isolated from *Solanum lycopersicum* (tomato) in the conditions of the Almaty region.....252

=====

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

=====

МРНТИ: 34.27.39

М.Г. САУБЕНОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, А.А. АМАНГЕЛДІ¹,
Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, И.Ю. ПОТОРОКО²¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан²Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия

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

ДРОЖЖЕВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ПРОБИОТИКИ И
ИСТОЧНИК БЕЛКА

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.01

Аннотация

Дефицит и снижение качества продуктов питания и кормов заставляют искать новые источники сбалансированных и малозатратных белковых продуктов. Качество продуктов питания становится все более и более важным из-за проблемы пищевых отравлений и хронических заболеваний, связанных с питанием, таких как ожирение, аллергия, сердечно-сосудистые заболевания и рак. Применение белка одноклеточных является одной из альтернатив употреблению мяса и мясных продуктов. Дрожжи используются человеком на протяжении тысяч лет для ферментации продуктов питания, являются продуцентами аминокислот, витаминов, биологически активных пептидов, ароматических и вкусовых соединений. Высокое содержание и качество белка дрожжевых микроорганизмов, продукция биоактивных пептидов, витаминов, β -глюканов, микоцинов и других соединений делают дрожжи перспективным источником белка и биологически активных веществ для пищевых, кормовых и медицинских целей. Дешевая и экологически чистая дрожжевая биомасса может быть получена на основе разнообразных сельскохозяйственных и промышленных отходов. Наряду с общепризнанными пробиотическими дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* многие другие виды дрожжей рассматриваются в настоящее время в качестве потенциально пробиотических. Это представители родов *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*. Пробиотические свойства исследованных дрожжевых микроорганизмов включают иммуномодуляцию, конкурентную элиминацию патогенов, улучшение кишечного барьера и сокращение воспаления. Дрожжевая биомасса рассматривается в настоящее время в качестве перспективного источника сбалансированного белка и эффективного средства улучшения здоровья населения.

Ключевые слова: дрожжи, белок, биологически активные соединения.

Устойчивое и рациональное производство продуктов питания является одним из подходов к решению сложных и взаимосвязанных проблем перенаселения, изменения климата, загрязнения окружающей среды и снижения устойчивости к инфекциям. Микроорганизмы, которые обычно потреблялись в составе ферментированных пищевых продуктов, а в последнее время — в качестве пробиотических пищевых добавок, могут быть перепрофилированы для удовлетворения пищевых потребностей человека, чтобы представить устойчивое решение для существующей системы производства продуктов питания [1].

Дрожжи — это одноклеточные эукариотические микроорганизмы, широко распространенные в окружающей среде, а также присутствующие во многих традиционных ферментированных пищевых продуктах и напитках как приносящие пользу, так и вызывающие порчу пищевых продуктов [2]. Дрожжи известны людям уже тысячи лет,

поскольку они использовались в традиционных процессах брожения, таких как виноделие, пивоварение и хлебопечение. Основные функциональные роли дрожжей в пищевой ферментации включают ферментативную, в основном амилолитическую активность, производство спирта и различных ценных метаболитов [3], а также пробиотические эффекты, проявляемые несколькими видами дрожжей [4, 5]. Биотехнология, включая медицинские приложения, зависит от дрожжей как биоферментатора для производства многих промышленных продуктов, в том числе фармацевтических [6].

Наиболее широко используемыми видами дрожжей в промышленности и биотехнологических исследованиях являются *Saccharomyces cerevisiae*. Они имеют статус «общепризнанного безопасного» (GRAS) микроорганизма для пищевых продуктов. *S. cerevisiae* — наиболее изученный эукариот и ценный инструмент для большинства аспектов фундаментальных исследований эукариотических организмов. В отличие от других модельных организмов, *S. cerevisiae* одновременно имеет широкое применение в различных отраслях биотехнологии. Биотехнологическая ценность *S. cerevisiae* заключается в его уникальных биологических характеристиках, т. е. в его способности к ферментации, сопровождающейся образованием спирта и углекислого газа, и в его устойчивости к неблагоприятным условиям осмолярности и низкого pH. Дрожжи применяются в биотехнологии как в монокультурах, так и в сочетании с другими полезными микроорганизмами, участвующими в этих процессах [7, 8].

Дрожжи для сбалансированного питания

В мире уже сейчас ощущается существенный дефицит продуктов питания и кормов, а также снижение их качества. Между тем, согласно прогнозу ООН, ожидается, что рост населения Земли в ближайшие 30 лет увеличится с 8 до 10 миллиардов, что свидетельствует о необходимости срочного наращивания объемов производства продуктов питания, как растительного, так и животного происхождения. В сложившихся условиях представляется нереальным расширение посевных площадей, а также увеличение производства мяса и молока из-за низкой эффективности преобразования кормов в эти продукты. Для удовлетворения растущего спроса на белок необходим поиск путей интенсификации этой отрасли народного хозяйства, в частности увеличение мощностей биотехнологического производства различного рода биологически активных добавок, призванных восполнить дефицит необходимых элементов питания для населения и корма - для сельскохозяйственных животных. Потенциальным вариантом является белок одноклеточных, который можно использовать в качестве восполнения дефицита белка, как в питании человека, так и в кормах для животных [9].

Особенно остро стоит вопрос дефицита белка, который наиболее выражен в бедных и развивающихся странах. Так, в половине африканских стран люди потребляют всего до 10 кг мяса на человека в год, тогда как во всем мире эта величина составляет около 43 кг мяса в год, в Европе - 80 кг, а в США и Австралии даже более 100 кг [10]. Следует отметить, что, как недостаток, так и избыток потребления красного мяса все больше становится проблемой общественного здравоохранения, как в том, так и другом случае. Многочисленными исследованиями установлено, что высокий уровень потребления мяса связан с повышенным риском смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [11, 12], диабета [13], неходжкинской лимфомы, рака мочевого пузыря, молочной железы, колоректального рака, рака эндометрия, пищевода, желудка, легких, носоглотки, простаты и др. [14, 15].

Поэтому одной из самых актуальных мировых проблем для растущего населения является производство легкодоступных белковых продуктов, не оказывающих негативного влияния на здоровье с оптимальным составом аминокислот и необходимого количества и качества жиров, произведенных экологически безопасным способом.

Учитывая рост населения и нехватку продовольствия, поиск альтернативных источников белка для потребления человеком является актуальной проблемой, которую необходимо решить, особенно в развивающихся странах. В этом контексте микробная

биоconversion ценных материалов в питательные микробные клетки представляет собой устойчивую альтернативу пищевой цепи. Микробный белок, также известный как белок одноклеточных, состоит из биомассы водорослей, грибов или бактерий, которые в настоящее время используются в качестве источника пищи как для людей, так и для животных. Помимо вклада, в качестве устойчивого источника белка для питания мира, производство микробного белка важно для уменьшения проблем с утилизацией отходов и производственных затрат, отвечающих целям устойчивого развития [16].

В поисках инновационных методов производства продуктов питания, являющихся источником легкоусвояемого белка со сбалансированным аминокислотным составом, было показано, что одним из лучших вариантов является дешевая и экологически чистая биомасса микроорганизмов, содержащая к тому же микроэлементы и витамины, в том числе группы В, с практически неограниченными масштабами производства, с использованием для наращивания биомассы недорогих питательных сред, в том числе различных сельскохозяйственных и промышленных отходов, что в свою очередь способствует охране окружающей среды. Особое значение при этом имеет получение белка одноклеточных из биомассы дрожжей, который можно использовать в качестве добавки к обычному рациону человека, а также сельскохозяйственных животных. Биомасса дрожжей, а также продукты их жизнедеятельности, могут быть использованы в качестве добавок в различные пищевые и кормовые продукты в качестве концентрата витаминов, усилителей вкуса, а также для улучшения их структуры [9, 17, 18] (рисунок 1).

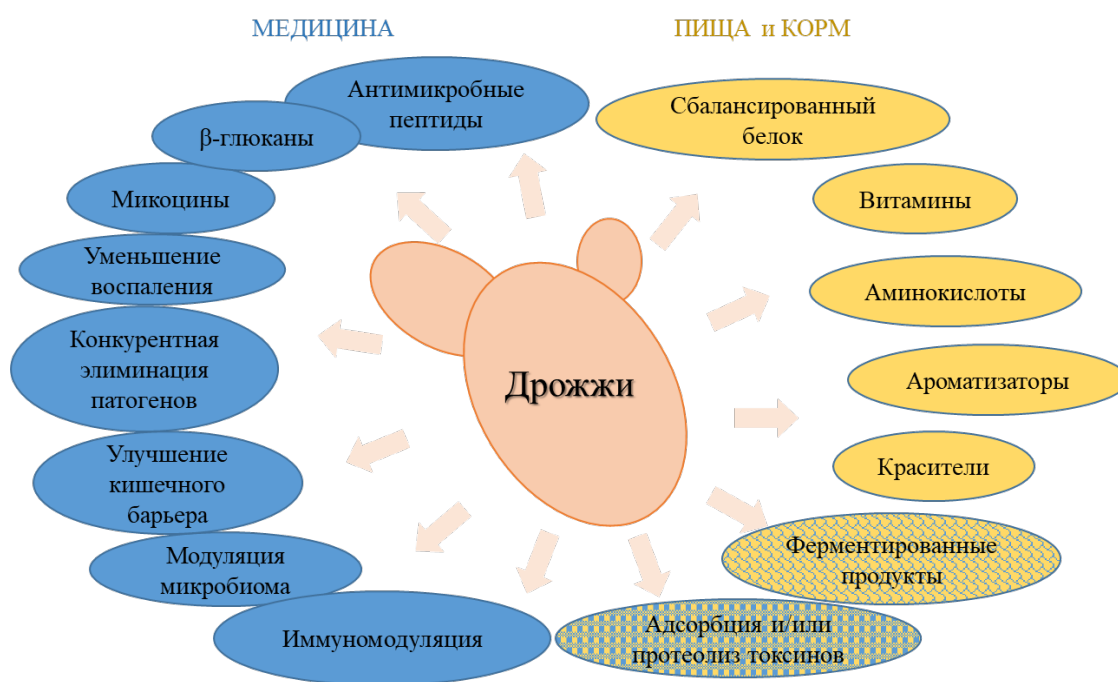


Рисунок 1 – Вклад дрожжевых микроорганизмов в пищевую промышленность и медицину

Микроорганизмы привлекли внимание как новый источник пищи из-за их низкого углеродного следа, низкой зависимости от земли, воды и сезонных колебаний в сочетании с благоприятным профилем питания, а также использования для производства цельных продуктов из их биомассы и использования их в качестве клеточных фабрик для производства высокофункциональных и питательных ингредиентов [19]. Микроорганизмы могут производить вкусные и полезные продукты с минимальным воздействием на окружающую среду. Будущие достижения в наукоемкой ферментации, синтетической биологии и использовании устойчивого сырья позволят создать новое поколение

микробных пищевых продуктов, потенциально влияющих на устойчивость и воздействие на здоровье нашей пищевой системы [20].

Питательная ценность продуктов также может быть усилена путем их ферментации дрожжами, продуцентами фолиевой кислоты, синтез которой в большой степени зависит от вида и штамма дрожжей, а также условий их культивирования [21, 22]. Показано, что некоторые штаммы дрожжей могут адсорбировать более 40% добавленного афлатоксина В1, а также снижать общее содержание цианидов, например, в ферментированных продуктах [23] (рисунок 1).

Дрожжи для медицинских целей

Кроме основной роли питания, заключающейся в росте и развитии организма, все большее значение для противодействия заболеваниям приобретают некоторые дополнительные аспекты. Качество продуктов питания становится все более и более важным из-за проблемы пищевых отравлений и хронических заболеваний, связанных с питанием, таких как ожирение, аллергия, сердечно-сосудистые заболевания и рак. Во многих работах указывается на пользу для здоровья от использования пробиотиков в питании человека за счет повышения иммунитета организма [24, 25]. Пробиотики играют решающую роль во врожденной и адаптивной иммунной модуляции, уравнивая микробиоту кишечника для борьбы с вирусными инфекциями, вторичными бактериальными инфекциями и микробным дисбактериозом. Имеются рекомендации по использованию пробиотиков в качестве функциональных пищевых продуктов или даже лекарственных средств [24, 26].

Дрожжи как пробиотики

В случае дрожжей пробиотиками пока официально признаны только *S. cerevisiae* и *S. cerevisiae var. boulardii* [27]. Этот вид обладает такими способностями, как улучшение переваривания определенных пищевых ингредиентов, антимикробная активность и даже терапевтические свойства. Его общие механизмы пробиотического действия при лечении желудочно-кишечных заболеваний охватывают многогранные аспекты, включая иммунную регуляцию, выработку антимикробных веществ, конкурентную элиминацию патогенов, поддержание целостности кишечного барьера, трофический эффект кишечника и антиоксидантную активность. Будущие перспективы в отношении лечебных эффектов *S. cerevisiae var. boulardii* (*S. boulardii*) также обсуждаются в новейшей научной литературе [28]. Его пробиотическая активность была объяснена сочетанием нескольких путей, начиная от улучшения барьерной функции кишечника, конкурентного исключения патогенов, производства антимикробных пептидов, иммуномодуляции и трофических эффектов. В обзоре Pais и соавторов [29] обобщается участие *S. boulardii* в этих механизмах и многофакторный характер, с помощью которого эти дрожжи модулируют микробиом хозяина и функцию кишечника.

В опытах на мышах было показано, что добавление *S. boulardii* при их заболевании колитом значительно предотвращало потерю веса и укорочение толстой кишки, уменьшало воспаление толстой кишки, улучшало повреждение эпителия и улучшало целостность кишечного барьера. Подавляя обилие патогенных бактерий, *S. boulardii* улучшает микробное разнообразие и устраняет дисбактериоз микробиоты. Более того, он модулировал микробный метаболит и изменял относительное содержание метаболитов, включая метаболизм аминокислот, липидов, энергии и витаминов. Эти вызванные дрожжами сдвиги в кишечной флоре и метаболитах связаны друг с другом и с профилем воспаления при колите. В совокупности *S. boulardii* оказывает защитное действие на колит у мышей, изменяя микробиом кишечника и его метаболический профиль, что указывает на его многообещающее терапевтическое направление [30].

В настоящее время дрожжи *S. boulardii* используются во всем мире в качестве популярного коммерческого пробиотика, однако основа их пробиотического действия остается не полностью ясной. *S. boulardii* считается конспецифичным с почкующимися дрожжами *S. cerevisiae*, которые обычно используются в классических пищевых продуктах.

Они имеют почти идентичную последовательность генома, что делает генетическую основу пробиотической активности *S. boulardii* загадочной. Показано, что *S. boulardii* продуцирует при +37°C необычно высокие уровни уксусной кислоты, которая сильно ингибирует рост бактерий в анализах диффузии в агар и может иметь жизненно важное значение для его уникального применения в качестве пробиотика среди дрожжей. Первое молекулярное объяснение того, почему *S. boulardii* может оказывать более выраженное пробиотическое действие чем *S. cerevisiae*, возможно, связано со штаммоспецифичными мутациями внутри одного и того же вида. Предполагается, что приобретение антибактериальной активности за счет подкисления питательной среды дает *S. boulardii* селективное преимущество в его экологической нише и для его применения в качестве пробиотика [31]. Возможно, что специфические фенотипические различия делают этот штамм более подходящим для микроокружения кишечника, например, из-за лучшей устойчивости к кислоте и повышенной температуре. Несколько исследований с использованием животных-хозяев предполагают, что *S. boulardii* можно использовать в качестве биотерапевтического средства и для людей. Клинические испытания показывают, что он может в некоторой степени облегчать симптомы инфекций желудочно-кишечного тракта, однако необходимы дальнейшие испытания, чтобы понять весь терапевтический потенциал *S. boulardii*. Улучшение пробиотической функции с помощью искусственных дрожжей является привлекательным будущим направлением, хотя инструменты модификации генома для использования в *S. boulardii* до недавнего времени были ограничены. В обзоре Sen and Mansell [32] обобщен наблюдаемый пробиотический эффект этих дрожжей и рассмотрены современные инструменты геномной инженерии, которые могут помочь улучшить их пробиотические свойства.

Применение пробиотиков в качестве адьювантной терапии при клиническом лечении рака представляется многообещающей стратегией с рядом заметных преимуществ, например, повышенной безопасностью, более высокой переносимостью и незначительными побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Анализы как *in vivo*, так и *in vitro* показали активную роль дрожжевых пробиотиков в снижении скорости пролиферации раковых клеток и индукции апоптоза за счет регулирования экспрессии связанных с раком генов и клеточных путей. Неоднократно подтвержденная противораковая активность отдельных штаммов дрожжей убедительно свидетельствует о том, что их применение вместе с современными методами лечения рака может быть эффективным [33].

Продуценты микоцинов и антимикробных пептидов

В последние годы в связи с появлением резистентности микробов к антибиотикам возникла острая необходимость поиска альтернативных противомикробных препаратов. Было показано, что синтезируемые дрожжами микоцины (киллер-токсины) имеют хороший потенциал для использования в клинике, как вещества, проявляющие антибактериальную, противогрибковую и антипротозойную активность [34]. Другое исследование, проведенное с дрожжами *Pichia pastoris*, продемонстрировало ингибирование роста *Salmonella typhimurium* и снижение бактериальной адгезии к клеткам колоректального рака человека НСТ-116 [35]. Микоцины, проявляя активность против разнообразных типов микроорганизмов, оказываются минимально токсичными для клеток человека. Это, а также тот факт, что о развитии резистентности не сообщалось, делает эти молекулы соединениями с высоким потенциалом в качестве противомикробных препаратов. Кроме того, микоцины изучаются при разработке вакцин и используются в качестве эпидемиологических маркеров. Механизмы образования киллер-токсинов в клетках дрожжей связывают как с хромосомными генами, так и с наличием в цитоплазме вирусов, содержащих двухнитевую РНК [36]. Интересно, что для проявления киллерной активности необходимо наличие вирусов двух типов: вирусов-помощников и киллеров.

Одним из новых аспектов применения пробиотических дрожжей является использование их в качестве вакцин, вводимых перорально. Это актуально не только при

заболеваниях ЖКТ, но также и для транспортировки антигенов-кандидатов в иммунную систему кишечника [37].

Со страхом перед антибиотиками и появлением микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам связан интерес к пептидам – составным частям врожденной иммунной системы любого живого организма. Антимикробные пептиды могут действовать, разрушая микробную мембрану или не влияя на ее стабильность. Посредством мембранного или метаболического нарушения они защищают организм от вторжения бактерий, вирусов, простейших и грибков. Высокая эффективность и специфичность, низкое лекарственное взаимодействие и токсичность, термостабильность, растворимость в воде и биологическое разнообразие предполагают их применение в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве, животноводстве и аквакультуре. Наночастицы можно использовать для защиты, доставки и повышения эффективности за счет биодоступности. В обзоре Dini и др. [38] обобщены сведения о природных источниках, структуре, способах действия и применения микробных пептидов в пищевой и фармацевтической промышленности.

Богатая белком природа *S. cerevisiae* привлекла внимание к этим дрожжам при поиске противомикробных пептидов. Экстракт, богатый пептидами массой менее 10 кДа и проявляющий антибактериальную активность, был получен путем автолиза дрожжевой биомассы при умеренной термической обработке с самопротеолизом эндогенными пептидазами. Расчетная IC₅₀ для пептидных пулов, полученных с помощью гель-фильтрации FPLC, указывает на улучшенную антибактериальную активность против бактерий пищевого происхождения и бактерий, представляющих клинический интерес. Следует отметить, что фракции безопасны, по крайней мере, в формате смеси для тканей человека. Пептиды биомассы *S. cerevisiae* – нетрадиционный, но обильный источник фармацевтических препаратов, могут быть перспективными адъювантами для лечения инфекционных заболеваний, плохо чувствительных к обычным антибиотикам [39].

Имеются сведения о подавлении дрожжами значимых для фитопатологии бактерий [40]. Эффект предположительно связывается с высокой продукцией отдельных сивушных масел и этилацетата.

Привлекает интерес и способность пробиотических дрожжей разрушать токсины патогенных микроорганизмов. Так, серинпротеаза *S. boulardii* массой 54 кДа ингибирует энтеротоксическую и цитотоксическую активность *Clostridium difficile* путем протеолиза токсина А и его рецепторов [41].

Дрожжи – продуценты β-глюканов

Глюкан – полисахарид клеточной стенки, выделенный из пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, демонстрирует цитотоксичность в отношении различных линий раковых клеток *in vitro*. Показано, что β-глюкан может замедлять рост клеток рака шейки матки, и дополнительное исследование позволит более полно раскрыть его противораковый потенциал [42]. Экстракты β-глюкана продемонстрировали положительный эффект в контроле пролиферации опухолевых клеток и активации иммунной системы. Иммуномодулирующее действие β-глюканов усиливает противоопухолевую защиту организма хозяина от рака. В соответствии с вышеизложенным, многие исследования показали, что лечение β-глюканом приводит к индукции апоптотической гибели раковых клеток. β-глюкан может быть потенциальным терапевтическим агентом для лечения рака. Влияние β-глюкана на иммуномодуляцию, пролиферацию, гибель раковых клеток и возможные механизмы и пути, участвующие в этих процессах, более детально рассмотрены в работе Wani и др [43].

Недавние достижения в области изучения полисахаридов клеточной стенки пивных дрожжей выявили структурные особенности и разнообразный состав глюканов, взаимодействующих с различными клеточными рецепторами и запускающих специфические биологические реакции. В работе Bastos и соавторов [44] представлена всесторонняя демонстрация структурно-биофункциональных отношений между полисахаридами дрожжей и их биологическими мишенями с акцентом на свойствах

полисахаридов, которые регулируют биомедицинскую активность. Нерастворимость β -глюканов является решающим фактором для связывания и активации рецептора Dectin-1, действующего как адъювант иммунного ответа. Напротив, растворимые низкомолекулярные β -глюканы обладают сильным ингибированием продукции активных форм кислорода, действуя как антагонисты передачи сигналов, опосредованной Dectin-1. Растворимые белково-глюкановые фрагменты также могут действовать как противоопухолевые агенты, при этом разветвленность ($\beta 1 \rightarrow 6$)-глюканов обеспечивает более высокое сродство к рецепторам. Глюканы являются основным компонентом *S. cerevisiae*, тогда как маннопротеины находятся в избытке в *Saccharomyces pastorianus*. Различные полисахариды имеют разные профили связывания с иммунными рецепторами, что важно для разработки индивидуальных биоактивных препаратов [45].

Предполагается, что сухая отработанная биомасса пивных дрожжей может быть использована в качестве дешевого источника для высококачественной экстракции β -D-глюкана. Сушка в сочетании с карбоксилметилированием придает отработанному β -D-глюкану пивных дрожжей иммуноактивность, подобную или превосходящую иммуноактивность хорошо изученного грибкового модификатора биологического ответа плеврана [46].

Новые виды потенциально пробиотических дрожжей

В последние годы возрастает интерес к выявлению новых дрожжей с потенциально пробиотическими свойствами. Новые изоляты выделяют из различных продуктов и сред, таких как фрукты и овощи, ферментированные продукты питания и напитки, промышленные молочные отходы и т. д. Они должны обладать всеми свойствами, необходимыми для пробиотиков, соответствовать требованиям безопасности и иметь хорошие производственные свойства. Выделение различных видов из различных сред позволяет открывать новые пробиотические штаммы с инновационными биохимическими свойствами, например, способностью секретировать внеклеточно лактазу, которая может придавать дополнительную способность переваривать сыворотку, используемую в качестве пищевой добавки в кормах для животных.

Помимо *S. cerevisiae var. boulardii*, в последнее время представлены также и новые дрожжи с потенциально пробиотическими свойствами из родов *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Torulaspota* и другие, выделенные из пищевых и экологических местообитаний. Недавние исследования сообщают о потенциально пробиотических дрожжах, относящихся к видам *Kluyveromyces marxianus* и *Pichia kudriavzevii* [47, 48]. Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) присвоило дрожжам *K.marxianus* статус QPS (квалифицированная презумпция безопасности).

Ochangco и др. [49] исследовали штаммы *Debaryomyces hansenii*, полученные из сыра и кишечника рыб. В ходе исследования они выбрали штамм DI 02 в качестве лучшего пробиотика из-за его выдающейся способности выдерживать желудочно-кишечные стрессы, прикрепляться к клеткам Caco-2 и муцину и вызывать более сильный противовоспалительный ответ, чем *S. cerevisiae var. boulardii* (авторы использовали отношение противовоспалительного цитокина IL-10 к провоспалительному цитокину IL-12 в качестве показателя противовоспалительных свойств). Другой штамм, DI 09, сильнее прикреплялся к клеткам Caco-2 и муцину. Два штамма (DI 10 и DI 15) индуцировали более высокое соотношение IL-10/IL-12, чем *S. cerevisiae var. boulardii*, что свидетельствует о более высоком противовоспалительном действии на дендритные клетки человека. Результаты, полученные Oliveira и соавторами [50], позволяют предположить, что некоторые дрожжи, выделенные из ферментированных столовых оливок, такие как *Pichia guilliermondii* 25A и *Candida norvegica* 7A, обладают пробиотическим потенциалом из-за их устойчивости к смоделированным условиям пищеварительного тракта на том же уровне, что и *S. cerevisiae var. boulardii*, эталонный штамм, использованный в исследовании. Из 108 идентифицированных штаммов дрожжей различного происхождения Rodríguez et al.

показали, что два штамма дрожжей, *Hanseniaspora osmophila* и *Pichia kudriavzevii*, были наиболее многообещающими штаммами на основе статистического анализа, применяемого на каждом этапе селекции [51]. Имеется информация о наличии потенциальных пробиотических дрожжей в некоторых традиционных ферментированных продуктах и напитках [52]. Кроме того, разрабатываются механизмы адаптации, лежащие в основе выживания пробиотических дрожжей в условиях желудочно-кишечного тракта и солевого стресса [53]. В исследованиях Vergara Alvarez и др. [54] из 96 штаммов вновь выделенных дрожжей 15 изолятов дрожжей, отличных от *Saccharomyces*, обладали подходящими свойствами в качестве пробиотических кандидатов. Местные штаммы проявили лучшие свойства, чем эталонный пробиотический штамм *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745, что подтверждает, что они являются многообещающими кандидатами для использования в качестве пробиотика. Из-за интенсивно развивающихся исследований пробиотических дрожжей в ближайшие годы можно ожидать много открытий и, возможно, даже эволюцию в сегменте пробиотиков, доступных на рынке [55].

Заключение

В связи с необходимостью расширения продуктовой базы, использование дрожжей в качестве источника сбалансированного и легко усвояемого белка представляется обоснованным и перспективным. Продукция дрожжами пептидов, полисахаридов, витаминов и других биологически активных соединений, а также способность отдельных видов, признанных и рекомендуемых в качестве пробиотических, оказывать разносторонние позитивные эффекты в организме человека и животных, способствует признанию этих микроорганизмов не только в качестве частичной альтернативы белку животных, но и более широкому их применению в медицине и ветеринарии. Новые данные о пробиотических свойствах дрожжей, полученные в последние годы, свидетельствуют о большом потенциале этой группы микроорганизмов и необходимости расширения исследований в этом направлении.

Литература:

- 1 Choi K.R., Yu H.E., Lee S.Y. Microbial food: microorganisms repurposed for our food *Microb Biotechnol.*, 2022, 15(1): 18-25. (doi: 10.1111/1751-7915.13911)
- 2 Riesute R., Salomskiene J., Moreno D.S., Gustiene S. Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science & Technology*. 2021, 108: 1-10. (doi: 10.1016/j.tifs.2020.11.022)
- 3 Maicas S. The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 2020, 8(8): 1142. (doi: 10.3390/microorganisms8081142)
- 4 Coulibaly W.H., Bouatenin K.M.J.-P., Boli Z.B.I.A., Alfred K.K., Bi Y.C.T., N'sa K.M.C., Cot M., Djameh C., Djè K.M. Influence of yeasts on bioactive compounds content of traditional sorghum beer (tchapalo) produced in Côte d'Ivoire. *Curr Res Food Sci*, 2020, 3: 195–200. (doi: 10.1016/j.crfs.2020.06.001)
- 5 Staniszewski A., Kordowska-Wiater M. Probiotic and potentially probiotic yeasts-Characteristics and food application. *Foods*. 2021, 10(6): 1306. (doi: 10.3390/foods10061306)
- 6 Abdulkhair, W. M. H. (Ed.). *The Yeast Role in Medical Applications*. InTech., 2018. (doi: 10.5772/intechopen.69408)
- 7 Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.-S., Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol.*, 2020, 6(1): 1-31. (doi: 10.3934/microbiol.2020001)
- 8 Абреш Х., Асембаева Э., Рябова, А., Мырзабек К., Сейдахметова, З. Исследование показателей качества продуктов смешанного брожения. *Микробиология және вирусология*, 2023, 2(41): 144–160. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.09)
- 9 Ritala A., Häkkinen S.T., Toivari M., Wiebe M.G. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Front Microbiol.*, 2017, 8: 2009. (doi: 10.3389/fmicb.2017.02009)
- 10 Ritchie H., Roser M. Meat and dairy production. *Our World in Data*, 2017. (URL: <https://ourworldindata.org/meat-production>)

- 11 Al-Shaar L, Satija A, Wang D D, Rimm E B, Smith-Warner S A, Stampfer M J., Hu F.B., Willett W.C. Red meat intake and risk of coronary heart disease among US men: prospective cohort study *BMJ*, 2020, 371:m4141. (doi: 10.1136/bmj.m4141)
- 12 Papier K., Knuppel A., Syam N., Jebb S.A., Key T.J. Meat consumption and risk of ischemic heart disease: A systematic review and meta-analysis, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(3), 426-437. (doi: 10.1080/10408398.2021.1949575)
- 13 Sanders L.M., Wilcox M.L., Maki K.C. Red meat consumption and risk factors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr*, 2023, 77, 156–165. (doi: 10.1038/s41430-022-01150-1)
- 14 Farvid M.S., Sidahmed E., Spence N.D., Angua K.M., Rosner B.A., Barnett J.B. Consumption of red meat and processed meat and cancer incidence: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol*, 2021, 36, 937–951 <https://doi.org/10.1007/s10654-021-00741-9>
- 15 Huang Y., Cao D., Chen Z., Chen B., Li J., Guo J., Dong Q., Liu L., Wei Q. Red and processed meat consumption and cancer outcomes: Umbrella review. *Food Chemistry*, 2021, 356, 129697. (doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129697)
- 16 Alves S.C., Díaz-Ruiz E., Lisboa B., Sharma M., Mussatto S.I., Thakur V.K., Kalaskar D.M., Gupta V.K., Chandel A.K. Microbial meat: A sustainable vegan protein source produced from agri-waste to feed the world. *Food Res Int.*, 2023, 166: 112596. (doi: 10.1016/j.foodres.2023.112596)
- 17 Gervasi T., Pellizzeri V., Calabrese G., Di Bella G., Cicero N., Dugo G. Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Prod. Res.*, 2018, 32: 648–653. (doi: 10.1080/14786419.2017.1332617)
- 18 Somda M.K., Nikiema M., Keita I., Mogmenga I., Kouhounde S.H.S., Dabire Y., Coulibaly W.H., Taale E., Traore A.S. Production of single cell protein (SCP) and essentials amino acids from *Candida utilis* FMJ12 by solid state fermentation using mango waste supplemented with nitrogen sources. *Afr. J. Biotechnol.*, 2018, 17: 716–723. (doi: 10.5897/AJB2017.16361)
- 19 Graham A.E., Ledesma-Amaro R. The microbial food revolution. *Nat Commun.* 2023, 14(1): 2231. (doi: 10.1038/s41467-023-37891-1)
- 20 Jahn L.J., Rekdal V.M., Sommer M.O.A. Microbial foods for improving human and planetary health. *Cell*, 2023, 186(3): 469-478. (doi: 10.1016/j.cell.2022.12.002)
- 21 Hjortmo S., Patring J., Jastrebova J., Andlid T. Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 127: 32–36. (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.001)
- 22 Greppi A., Saubade F., Botta C., Humblot C., Guyot J.-P., Cocolin L. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology*, 2017, 62: 169-177. (doi: 10.1016/j.fm.2016.09.016)
- 23 Johansen P.G., Owusu-Kwarteng J., Parkouda C., Wilfrid Padonou S., Jespersen L. Occurrence and importance of yeasts in indigenous fermented food and beverages produced in sub-Saharan Africa. *Front. Microbiol.*, 2019, 10: 1-22. (doi: 10.3389/fmicb.2019.01789)
- 24 Paulina M., Katarzyna Ś. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017, 9: 1021–1030. (doi: 10.3390/nu9091021)
- 25 Ashraf R., Shah N.P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54: 938–956. (doi: 10.1080/10408398.2011.619671)
- 26 Gill E.E., Franco O.L., Hancock R.E. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des.*, 2015, 85: 56–78. (doi: 10.1111/cbdd.12478)
- 27 Lara-Hidalgo C.E., Hernández-Sánchez H., Hernández-Rodríguez C., Dorantes-Álvarez L. Yeasts in fermented foods and their probiotic potential. *Austin J Nutr Metab.*, 2017, 4(1): 1045.
- 28 Cui B., Lin L., Wang B., Liu W., Sun C. Therapeutic potential of *Saccharomyces boulardii* in liver diseases: from passive bystander to protective performer? *Pharmacol Res.*, 2022, 175 :106022. (doi: 10.1016/j.phrs.2021.106022)
- 29 Pais P., Almeida V., Yılmaz M., Teixeira M.C. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? *J Fungi (Basel)*. 2020, 6(2): 78. (doi: 10.3390/jof6020078)
- 30 Gao H., Li Y., Xu J., Zuo X., Yue T., Xu H., Sun J., Wang M., Ye T., Yu Y., Yao Y. *Saccharomyces boulardii* protects against murine experimental colitis by reshaping the gut microbiome and its metabolic profile. *Front Microbiol.*, 2023, 14: 1204122. (doi: 10.3389/fmicb.2023.1204122)

- 31 Offei B., Vandecruys P., De Graeve S., Foulquié-Moreno M.R., Thevelein J.M. Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome Res.*, 2019, 29(9): 1478-1494. (doi: 10.1101/gr.243147.118)
- 32 Sen S., Mansell T.J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genet Biol.*, 2020, 137: 103333. (doi: 10.1016/j.fgb.2020.103333)
- 33 Sambrani R., Abdolalizadeh J., Kohan L., Jafari B. Recent advances in the application of probiotic yeasts, particularly *Saccharomyces*, as an adjuvant therapy in the management of cancer with focus on colorectal cancer. *Mol Biol Rep.*, 2021: 1-10. (doi: 10.1007/s11033-020-06110-1)
- 34 Nascimento B.L., Delabeneta M.F., Rosseto L.R.B., Junges D.S.B., Paris A.P., Persel C., Gandra R.F. Yeast mycocins: a great potential for application in health. *FEMS Yeast Research*, 20(3): foaa016. (doi: 10.1093/femsyr/foaa016)
- 35 França R.C., Conceição F.R., Mendonça M., Mendonça M., Haubert L., Sabadin G., de Oliveira P.D., Amaral M.G., da Silva W.P., Moreira Â.N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 7953–7961. (doi: 10.1007/s00253-015-6696-9)
- 36 Самбук Е.В., Музаев Д.М., Румянцев А.М., Падкина М.В. Киллер-токсины дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: синтез, механизмы действия и практическое использование. Генетические основы эволюции экосистем. 2019, 17(3): 59-73. (doi: 10.17816/ecogen17359-73)
- 37 Austriaco N. Yeast oral vaccines against infectious diseases. *Front Microbiol.* 2023. 14: 1150412. (doi: 10.3389/fmicb.2023.1150412)
- 38 Dini I., De Biasi M.-G., Mancusi A. An overview of the potentialities of antimicrobial peptides derived from natural sources. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(11): 1483. (doi: 10.3390/antibiotics11111483)
- 39 da Silva Santos M.F., Freitas C.S., da Costa G.C.V., Ribeiro Pereira P., Paschoalin V.M.F. Identification of antibacterial peptide candidates encrypted in stress-related and metabolic *Saccharomyces cerevisiae* proteins. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(2): 163. (doi: 10.3390/ph15020163)
- 40 Джакибаева Г., Саданов А., Исмаилова Э., Баймаханова Б., Молжигитова А., Баймаханова Г., Шемшюра О., Тлеубекова Д., Елубаева А. Оценка ингибирующей активности коллекционных культур дрожжей против возбудителя бактериального ожога *Erwinia amylovora*. *Микробиология және вирусология*, 2023. 2(41), 173–182. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.11)
- 41 Рябцева С.А., Сазанова С.Н., Дубинина А.А. *Saccharomyces boulardii*, как потенциальный пробиотик для инновационных пищевых продуктов. *Современная наука и инновации*, 2019, 2(26): 138-150. (doi: 10.33236/2307-910X-2019-2-26-138-150)
- 42 Upadhyay T.K., Trivedi R., Khan F., Al-Keridis L.A., Pandey P., Sharangi A.B., Alshammari N., Abdullah N.M., Yadav D.K., Saeed M. In vitro elucidation of antioxidant, antiproliferative, and apoptotic potential of yeast-derived β -1,3-glucan particles against cervical cancer cells. *Front Oncol.*, 2022, 12: 942075. (doi: 10.3389/fonc.2022.942075)
- 43 Wani S.M., Gani A., Mir S.A., Masoodi F.A., Khanday F.A. β -Glucan: A dual regulator of apoptosis and cell proliferation. *Int J Biol Macromol.*, 2021, 182: 1229-1237. (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.065)
- 44 Bastos R., Oliveira P.G., Gaspar V.M., Mano J.F., Coimbra M.A., Coelho E. Brewer's yeast polysaccharides - A review of their exquisite structural features and biomedical applications. *Carbohydr Polym.*, 2022, 277: 118826.9 doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118826)
- 45 Reis S.F., Messias S., Bastos R., Martins V.J., Correia V.G., Pinheiro B.A., Silva L.M., Palma A.S., Coimbra M.A., Coelho E. Structural differences on cell wall polysaccharides of brewer's spent *Saccharomyces* and microarray binding profiles with immune receptors. *Carbohydr Polym.*, 2023, 301(Pt B): 120325. (doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120325)
- 46 Liepins J., Kovačova E., Shvirksts K., Grube M., Rapoport A., Kogan G. Drying enhances immunoactivity of spent brewer's yeast cell wall β -D-glucans. *J Biotechnol.*, 2015, 206: 12-16. (doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.024)
- 47 Arévalo-Villena M., Fernandez-Pacheco P., Castillo N., Bevilacqua A., Briones Pérez A. Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *LWT*, 2018, 89: 657–665. (doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.047)
- 48 Homayouni-Rad A., Azizi A., Oroojzadeh P., Pourjafar H. *Kluyveromyces marxianus* as a probiotic yeast: A mini-review. *Current Nutrition & Food Science*, 2020, 16(8): 1163-1169. (doi: 10.2174/1573401316666200217113230)

49 Ochangco H.S., Gamero A., Smith I.M., Christensen J.E., Jespersen L., Arneborg N. In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2016, 32(9): 141. (doi: 10.1007/s11274-016-2109-1)

50 Oliveira T., Ramalhosa E., Nunes L., Pereira J.A., Colla E., Pereira E.L. Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2017, 44: 167–172. (doi: 10.1016/j.ifset.2017.06.003)

51 Fernandez-Pacheco Rodríguez P., Arévalo-Villena M., Rosa I.Z., Briones Pérez A. Selection of potential non-*Sacharomyces* probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Res. Int.* 2018, 112: 143–151. (doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.008)

52 Tamang J.P., Lama S. Probiotic properties of yeasts in traditional fermented foods and beverages. *J Appl Microbiol.*, 2022, 132(5): 3533-3542. (doi: 10.1111/jam.15467)

53 Alkalbani N.S., Osaili T.M., Al-Nabulsi A.A., Olaimat A.N., Liu S.-Q., Shah N.P., Apostolopoulos V., Ayyash M.M. Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(4): 365. (doi: 10.3390/jof8040365)

54 Vergara Alvarez S.C., Leiva Alaniz M.J., Mestre Furlani M.V., Vazquez F., Agresti P.M., Nally M.C., Maturano Y.P. Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genet Biol.*, 2023, 164: 103767. (doi: 10.1016/j.fgb.2022.103767)

55 Staniszewski A., Kordowska-Wiater M. Probiotic and potentially probiotic yeasts-characteristics and food application. *Foods*, 2021, 10(6): 1306. (doi: 10.3390/foods10061306)

М.Г. САУБЕНОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, А.А. АМАНГЕЛДІ¹,
Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, И.Ю. ПОТОРОКО²

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

²Оңтүстік-Орал мемлекеттік университеті, Челябинск, Ресей

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

ПРОБИОТИКТЕР ЖӘНЕ АҚУЫЗ КӨЗІ РЕТІНДЕ АШЫТҚЫ МИКРООРГАНИЗМДЕРІ

Түйін

Азық-түлік пен жемшөптің тапшылығы мен сапасының төмендеуі теңгерімді және арзан ақуыз өнімдерінің жаңа көздерін іздеуді қажет етеді. Тамақтан улану және семіздік, аллергия, жүрек-қан тамырлары аурулары және онкологиялық аурулар сияқты тамақтанумен байланысты созылмалы аурулар проблемасына байланысты азық-түлік сапасы маңызды бола түсуде.

Бір жасушалы ақуыз ет және ет өнімдерін тұтынуға баламалардың бірі болып табылады. Ашытқыларды адам мыңдаған жылдар бойы тамақ өнімдерін ашыту үшін қолданды, олар аминқышқылдарының, витаминдердің, биологиялық белсенді пептидтердің, хош иісті және дәмдік қосылыстардың өндірушілері болып табылады. Ашытқы микроорганизмдері ақуызының жоғары құрамы мен сапасы, биоактивті пептидтердің, витаминдердің, β-глюкандардың, микоциндердің және басқа қосылыстардың өндірілуі ашытқыны тағамдық, жемдік және медициналық мақсаттағы протеин мен биологиялық белсенді заттардың перспективалық көзіне айналдырады. Өртүрлі ауылшаруашылық және өнеркәсіп қалдықтарынан арзан және экологиялық таза ашытқы биомассасын алуға болады. Жалпы танылған пробиотикалық ашытқымен қатар *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, көптеген басқа ашытқылар қазіргі уақытта әлеуетті пробиотиктер ретінде қарастырылуда. Бұл *Debaryomyces*, *Hanseniopsis*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Torulasporea*, *Kluveromyces* тұқымдасының өкілдері. Зерттелетін ашытқы микроорганизмдерінің пробиотикалық қасиеттеріне иммуномодуляция, қоздырғыштарды бәсекелестік жою, ішек құрылысын жақсарту және қабынуды азайту жатады. Ашытқы биомассасы қазіргі уақытта теңдестірілген ақуыздың перспективалы көзі және халықтың денсаулығын жақсартудың тиімді құралы ретінде қарастырылады.

Кілтті сөздер: ашытқы, ақуыз, биологиялық белсенді қосылыстар.

IRSTI: 34.27.39

M.G. SAUBENOVA¹, Ye.A. OLEINIKOVA^{1*}, A.Zh. ALYBAYEVA¹, A.A. AMANGELDI¹,
Zh.N. YERMEKBAY¹, I.Yu. POTOROKO²

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

²South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

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

YEAST MICROORGANISMS AS PROBIOTICS AND PROTEIN SOURCE

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.01

Abstract

The shortage and decrease in the quality of food and feed make it necessary to look for new sources of balanced and low-cost protein products. Food quality is becoming more and more important due to the problem of food poisoning and chronic diet-related diseases such as obesity, allergies, cardiovascular disease and cancer. Single cell protein is one of the alternatives to eating meat and meat products. Yeast has been used by humans for thousands of years for the fermentation of food products, they are producers of amino acids, vitamins, biologically active peptides, aromatic and flavor compounds. The high content and quality of the protein of yeast microorganisms, the production of bioactive peptides, vitamins, β -glucans, mycocins and other compounds make yeast a promising source of protein and biologically active substances for food, feed, and medical purposes. Cheap and environmentally friendly yeast biomass can be obtained from a variety of agricultural and industrial waste. Along with the generally recognized probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, many other yeasts are currently being considered as potential probiotics. These are representatives of the genera *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Torulaspora*, and *Kluyveromyces*. The probiotic properties of the studied yeast microorganisms include immunomodulation, competitive elimination of pathogens, improvement of the intestinal barrier, and reduction of inflammation. Yeast biomass is currently considered as a promising source of balanced protein and an effective means of improving public health.

Keywords: yeast, protein, biologically active compounds.

Sustainable and rational food production is one approach to addressing the complex and interrelated problems of overpopulation, climate change, pollution and reduced resistance to infections. Microorganisms commonly consumed as part of fermented foods and more recently as probiotic food supplements can be repurposed to meet human nutritional requirements to represent a sustainable solution for the current food production system [1].

Yeasts are single-celled eukaryotic microorganisms that are widely distributed in the environment and are also present in many traditional fermented foods and beverages, both beneficial and food spoilage [2]. Yeast has been known to people for thousands of years as it has been used in traditional fermentation processes such as wine, beer and bread. The main functional roles of yeast in food fermentation include enzymatic, mainly amylolytic activity, production of alcohol and various valuable metabolites [3], as well as probiotic effects exhibited by several yeast species [4, 5]. Biotechnology, including medical applications, depends on yeast as a biofermenter for the production of many industrial products, including pharmaceuticals [6].

The most widely used yeast species in industry and biotechnological research is *Saccharomyces cerevisiae*. They have the status of "generally recognized as safe" (GRAS) microorganism for food. *S. cerevisiae* is the best studied eukaryote and a valuable tool for most aspects of basic eukaryotic research. Unlike other model organisms, *S. cerevisiae* simultaneously has a wide application in various fields of biotechnology. The biotechnological utility of *S. cerevisiae* lies in its unique biological characteristics, i.e. its ability to ferment with the formation of alcohol and carbon dioxide, and its resistance to adverse conditions of osmolarity and low pH. Yeasts are used in biotechnology both in monocultures and in combination with other beneficial microorganisms involved in these processes [7, 8].

Yeast for a balanced diet

The world is already experiencing a significant shortage of food and feed, as well as a decrease in their quality. Meanwhile, according to the UN forecast, it is expected that the growth of the world's population in the next 30 years will increase from 8 to 10 billion, which indicates the need for an urgent increase in food production, both of plant and animal origin. Under the current conditions, it seems unrealistic to expand the area under crops, as well as increase the production of meat and milk due to the low efficiency of converting feed into these products. To meet the growing demand for protein, it is necessary to find ways to intensify this branch of the national economy, in particular, to increase the capacity of biotechnological production of various kinds of biologically active additives, designed to fill the shortage of essential nutrients for the population and feed for farm animals. A potential option is a unicellular protein that can be used as a replacement for protein deficiency, both in human nutrition and in animal feed [9].

Especially acute is the issue of protein deficiency, which is most pronounced in poor and developing countries. Thus, in half of the African countries, people consume only up to 10 kg of meat per person per year, while worldwide this value is about 43 kg of meat per year, in Europe - 80 kg, and in the USA and Australia even more than 100 kg [10]. It should be noted that both under and over consumption of red meat is increasingly becoming a public health problem in both cases. Numerous studies have found that a high level of meat consumption is associated with an increased risk of mortality from cardiovascular diseases [11, 12], diabetes [13], non-Hodgkin's lymphoma, bladder cancer, breast cancer, colorectal cancer, endometrial cancer, esophagus, stomach, lungs, nasopharynx, prostate, etc [14, 15].

Therefore, one of the world's most pressing problems for a growing population is the production of easily accessible protein products that do not adversely affect health with an optimal composition of amino acids and a good quantity and quality of fats produced in an environmentally friendly way.

Given population growth and food shortages, finding alternative sources of protein for human consumption is a pressing issue that needs to be addressed, especially in developing countries. In this context, microbial bioconversion of valuable materials into nutrient microbial cells represents a sustainable alternative to the food chain. Microbial protein, also known as unicellular protein, consists of the biomass of algae, fungi or bacteria that are currently used as a food source for both humans and animals. In addition to contributing as a sustainable source of protein to feed the world, microbial protein production is important to reduce waste disposal problems and production costs in line with sustainable development goals [16].

In search of innovative methods for the production of food products that are a source of easily digestible protein with a balanced amino acid composition, it was shown that one of the best options is a cheap and environmentally friendly biomass of microorganisms, which also contains microelements and vitamins, including group B, with a practically unlimited scale. production, using inexpensive media for biomass growth, including various agricultural and industrial waste, which in turn contributes to environmental protection. Of particular importance is the production of unicellular protein from yeast biomass, which can be used as an additive to the normal diet of humans, as well as farm animals. Yeast biomass, as well as their metabolic products, can be used as additives in various food and feed products as a concentrate of vitamins, flavor enhancers, and also to improve their structure [9, 17, 18] (Figure 1).

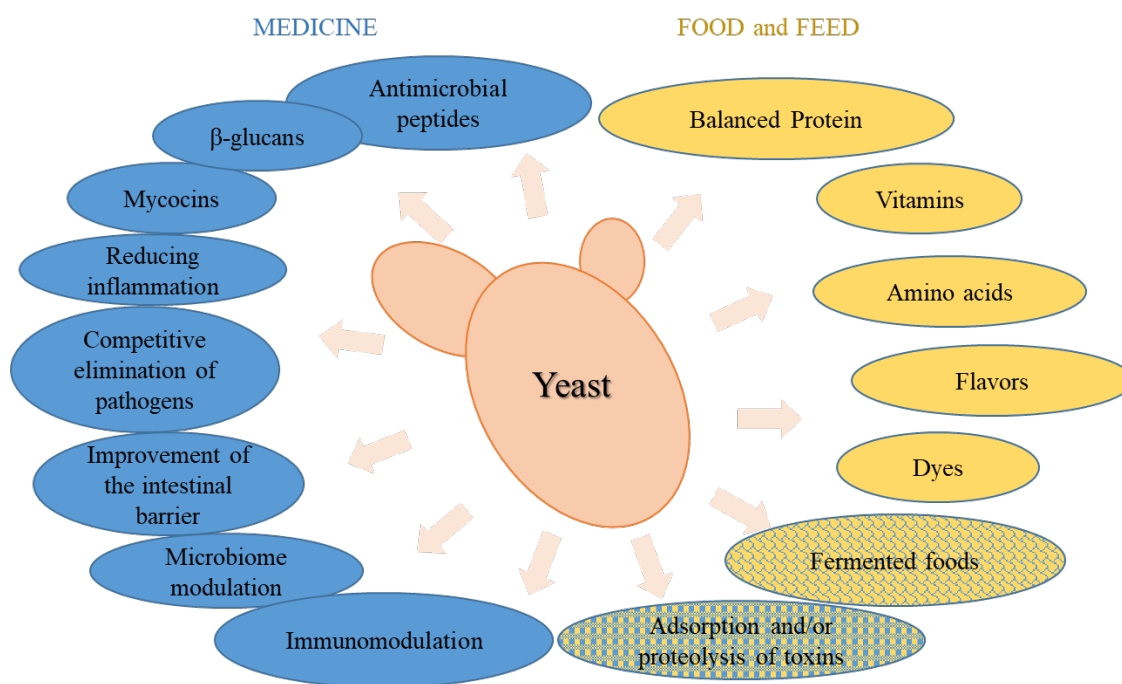


Figure 1 - The contribution of yeast microorganisms to the food industry and medicine

Microorganisms have attracted attention as a new food source due to their low carbon footprint, low reliance on land, water and seasonal fluctuations, combined with a favorable nutritional profile, as well as being used to produce whole foods from their biomass and using them as cell factories for manufacturing highly functional and nutritious ingredients [19]. Microorganisms can produce tasty and healthy microbial products with minimal environmental impact. Future advances in knowledge-intensive fermentation, synthetic biology, and the use of sustainable raw materials will enable the creation of a new generation of microbial food products, potentially influencing the sustainability, resilience, and health impacts of our food system [20].

The nutritional value of products can also be enhanced by their fermentation by yeast, folic acid producers, the synthesis of which largely depends on the type and strain of yeast, as well as the conditions of their cultivation [21, 22]. It has been shown that some yeast strains can adsorb more than 40% of the added aflatoxin B1, as well as reduce the total cyanide content, for example, in fermented products [23] (Figure 1).

Yeast for medical purposes

In addition to the main role of nutrition in the growth and development of the body, some additional aspects are becoming increasingly important in counteracting diseases. Food quality is becoming more and more important due to the problem of food poisoning and chronic diet-related diseases such as obesity, allergies, cardiovascular disease and cancer. Many studies indicate the health benefits of using probiotics in human nutrition by increasing the body's immunity [24, 25]. Probiotics play a critical role in innate and adaptive immune modulation by balancing the gut microbiota to fight viral infections, secondary bacterial infections, and microbial dysbiosis. There are recommendations for the use of probiotics as functional foods or even medicines [24, 26].

Yeast as a probiotic

In the case of yeast, only *S. cerevisiae* and *S. cerevisiae var. boulardii* are officially recognized as probiotics [27]. This species has abilities such as improved digestion of certain food ingredients, antimicrobial activity, and even therapeutic properties. Its general mechanisms of probiotic action in the treatment of gastrointestinal diseases cover many facets, including immune regulation, antimicrobial production, competitive elimination of pathogens, maintenance of intestinal barrier integrity, gut trophic effects, and antioxidant activity. Future perspectives regarding the curative effects of *S. cerevisiae var. boulardii* (*S. boulardii*) are also used and

discussed based on a new and attractive therapeutic concept in the latest scientific literature [28]. Its probiotic activity has been attributed to a combination of several pathways ranging from improved gut barrier function, competitive exclusion of pathogens, production of antimicrobial peptides, immunomodulation and trophic effects. A review by Pais et al [29] summarizes the involvement of *S. boulardii* in these mechanisms and the multifactorial nature by which this yeast modulates the host microbiome and gut function.

In mice, supplementation with *S. boulardii* for their colitis was shown to significantly prevent weight loss and colon shortening, reduce colon inflammation, improve epithelial damage, and improve intestinal barrier integrity in mice with colitis. By suppressing the abundance of pathogenic bacteria, *S. boulardii* improves microbial diversity and eliminates microbiota dysbiosis. Moreover, it modulated the microbial metabolome and altered the relative content of metabolites, including amino acid, lipid, energy, and vitamin metabolism. These yeast-induced shifts in gut flora and metabolites are related to each other and to the inflammation profile in colitis. Collectively, *S. boulardii* exerts a protective effect on colitis in mice by altering the gut microbiome and its metabolic profile, indicating its promising therapeutic direction [30].

The yeast *S. boulardii* is currently used worldwide as a popular commercial probiotic, but the basis of its probiotic action remains unclear. It is considered conspecific with the budding yeast *S. cerevisiae*, which is commonly used in classical foods. They share an almost identical genome sequence, making the genetic basis for the probiotic activity of *S. boulardii* puzzling. *S. boulardii* has been shown to produce unusually high levels of acetic acid at 37°C, which strongly inhibits bacterial growth in agar diffusion assays and may be vital to its unique use as a probiotic among yeasts. The first molecular explanation for why *S. boulardii* may have a more pronounced probiotic effect than *S. cerevisiae* may be due to strain-specific mutations within the same species. It is assumed that the acquisition of antibacterial activity due to environmental acidification gives *S. boulardii* a selective advantage in its ecological niche and for its use as a probiotic [31]. It is possible that specific phenotypic differences make this strain more suitable for the gut microenvironment, for example due to better acid and heat tolerance. Several animal host studies suggest that *S. boulardii* can be used as a biotherapeutic agent in humans as well. Clinical trials show that it may relieve symptoms of gastrointestinal infections to some extent, but further trials are needed to understand the full therapeutic potential of *S. boulardii*. Improving probiotic function with artificial yeast is an attractive future avenue, although genome modification tools for use in *S. boulardii* have been limited until recently. A review by Sen and Mansell [32] summarized the observed probiotic effect of these yeasts and considered current genomic engineering tools that could help improve their probiotic properties.

The use of probiotics as an adjuvant therapy in the clinical treatment of cancer appears to be a promising strategy with several notable benefits, such as increased safety, better tolerability, and few gastrointestinal (GI) side effects. Both in vivo and in vitro assays have shown an active role for yeast probiotics in reducing the rate of cancer cell proliferation and inducing apoptosis by regulating the expression of cancer-associated genes and cellular pathways. The repeatedly confirmed anticancer activity of individual yeast strains strongly suggests that their use together with modern cancer treatment methods can be effective [33].

Producers of mycocins and antimicrobial peptides

In recent years, due to the emergence of microbial resistance to antibiotics, there has been an urgent need to find alternative antimicrobials. It was shown that mycocins (killer toxins) synthesized by yeast have a good potential for clinical use as substances exhibiting antibacterial, antifungal, and antiprotozoal activity [34]. Another study performed with the yeast *Pichia pastoris* demonstrated growth inhibition of *Salmonella typhimurium* and reduced bacterial adhesion to HCT-116 human colorectal cancer cells [35]. Mycocins, showing activity against various types of microorganisms, are minimally toxic to human cells. This, and the fact that resistance development has not been reported, makes these molecules compounds with high potential as antimicrobials. In addition, mycocins are being studied in the development of vaccines and are used as epidemiological markers. The mechanisms of the formation of killer toxins in yeast cells are

associated with both chromosomal genes and the presence of viruses containing double-stranded RNA in the cytoplasm [36]. Interestingly, for the manifestation of killer activity, the presence of two types of viruses is necessary: helper viruses and killers.

One of the new uses of probiotic yeast is its use as an orally administered vaccine. This is relevant not only for gastrointestinal diseases, but also for the transport of candidate antigens into the intestinal immune system [37].

With the fear of antibiotics and the emergence of antibiotic-resistant microorganisms, there is an interest in peptides - components of the innate immune system of any living organism. Antimicrobial peptides can act by destroying the microbial membrane or without affecting its stability. Through membrane or metabolic disruption, they protect the body from invading bacteria, viruses, protozoa, and fungi. High efficacy and specificity, low drug interactions and toxicity, thermal stability, water solubility and biodiversity suggest their use in the food industry, medicine, agriculture, animal husbandry and aquaculture. Nanocarriers can be used for protection, delivery, and performance enhancement through bioavailability. A review by Dini et al. [38] summarizes the natural sources, structure, mode of action, and application of microbial peptides in the food and pharmaceutical industries.

The protein-rich nature of *S. cerevisiae* has drawn attention to this yeast in the search for antimicrobial peptides. Here, an extract rich in peptides weighing less than 10 kDa and exhibiting antibacterial activity was obtained by autolysis of yeast biomass under moderate heat treatment with self-proteolysis by endogenous peptidases. The calculated IC₅₀ for peptide pools obtained by FPLC gel filtration indicates improved antibacterial activity against foodborne bacteria and bacteria of clinical interest. It should be noted that the fractions are safe, at least in mixture format, for human tissues. *S. cerevisiae* biomass peptides, an unconventional but abundant source of pharmaceuticals, may be promising adjuvants for the treatment of infectious diseases that are poorly sensitive to conventional antibiotics [39].

There is evidence of suppression by yeast of bacteria important for phytopathology [40]. The effect is presumably associated with the high production of individual fusel oils and ethyl acetate.

Of interest is the ability of probiotic yeast to destroy the toxins of pathogenic microorganisms. For example, the 54 kDa *S. boulardii* serine protease inhibits the enterotoxic and cytotoxic activity of *Clostridium difficile* by proteolyzing toxin A and its receptors [41].

Yeast is a producer of β -glucans

Glucan, a cell wall polysaccharide isolated from baker's yeast *S. cerevisiae*, exhibits cytotoxicity against various cancer cell lines in vitro. It has been shown that β -glucan can slow down the growth of cervical cancer cells, and additional research will reveal its anticancer potential more fully [42]. Extracts of β -glucan, a yeast cell wall polysaccharide, have shown positive effects in controlling tumor cell proliferation and activating the immune system. The immunomodulatory effect of β -glucans enhances the antitumor defense of the host organism against cancer. In accordance with the above, many studies have shown that treatment with β -glucan leads to the induction of apoptotic death of cancer cells. β -glucan may be a potential therapeutic agent for cancer treatment. The effect of β -glucan on immunomodulation, proliferation, and death of cancer cells and the possible mechanisms and pathways involved in these processes are discussed in more detail by Wani et al. [43].

Recent advances in the study of brewer's yeast cell wall polysaccharides have revealed the structural features and diverse composition of glucans that interact with various cellular receptors and trigger specific biological reactions. Bastos et al. [44] presented a comprehensive demonstration of the structural-biofunctional relationships between yeast polysaccharides and their biological targets, with an emphasis on the properties of polysaccharides that regulate biomedical activity. The insolubility of β -glucans is a critical factor for the binding and activation of the Dectin-1 receptor, which acts as an adjuvant to the immune response. In contrast, soluble small molecular weight β -glucans have strong inhibition of reactive oxygen species production, acting as antagonists of Dectin-1 mediated signaling. Soluble protein-glucan fragments can also act as antitumor agents, while the branching of (β 1 \rightarrow 6)-glucans provides a higher affinity for

receptors. Glucans are a major component of *S. cerevisiae*, while mannoproteins are abundant in *Saccharomyces pastorianus*. Different polysaccharides have different binding profiles with immune receptors, which is important for the development of individual bioactive drugs [45].

It is assumed that dry spent brewer's yeast biomass can be used as a cheap source for high-quality extraction of β -D-glucan. Drying in combination with carboxymethylation confers spent brewer's yeast β -D-glucan immunoactivity similar to or superior to that of the well-studied fungal biological response modifier pleura [46].

New species of potentially probiotic yeast

In recent years, there has been increasing interest in identifying new yeasts with potentially probiotic properties. New isolates are isolated from various foods and media such as fruits and vegetables, fermented foods and drinks, industrial dairy waste, etc. They must have all the properties required for probiotics, meet safety requirements and have good processing properties. Isolation of different species from different media allows the discovery of new probiotic strains with innovative biochemical properties, such as the ability to extracellularly secrete lactase, which may confer additional ability to digest whey used as a dietary supplement in animal feed.

In addition to *S. cerevisiae var. boulardii*, new yeasts with potentially probiotic properties from the genera *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Torulaspota* and others, isolated from food and ecological habitats, have also recently been introduced. Recent studies report potential probiotic yeasts belonging to the species *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* [47, 48]. The European Food Safety Authority (EFSA) has awarded the yeast *K. marxianus* the status of QPS (Qualified Presumption of Safety).

Ochangco et al. [49] studied strains of *Debaryomyces hansenii* obtained from cheese and fish intestines. During the study, they selected the DI 02 strain as the best probiotic due to its outstanding ability to withstand gastrointestinal stress, attach to Caco-2 cells and mucin, and elicit a stronger anti-inflammatory response than *S. cerevisiae var. boulardii* (the authors used the ratio of the anti-inflammatory cytokine IL-10 to the pro-inflammatory cytokine IL-12 as an indicator of anti-inflammatory properties). Another strain, DI 09, attached more strongly to Caco-2 cells and mucin. Two strains (DI 10 and DI 15) induced a higher IL-10/IL-12 ratio than *S. cerevisiae var. boulardii*, which indicates a higher anti-inflammatory effect on human dendritic cells. The results reported by Oliveira et al [50] suggest that some yeasts isolated from fermented table olives, such as *Pichia guilliermondii* 25A and *Candida norvegica* 7A, have probiotic potential due to their resistance to simulated digestive tract conditions at the same level as *S. cerevisiae var. boulardii*, the reference strain used in the study. Of the 108 identified yeast strains of various origins, Rodríguez et al. showed that two yeast strains, *Hanseniaspora osmophila* and *Pichia kudriavzevii*, were the most promising strains based on the statistical analysis applied at each breeding step [51]. There is information about the presence of potential probiotic yeast in some traditional fermented foods and drinks [52]. In addition, adaptation mechanisms are being developed that underlie the survival of probiotic yeast in the conditions of the gastrointestinal tract and salt stress [53]. In a study by Vergara Alvarez et al. [54], out of 96 newly isolated yeast strains, 15 yeast isolates other than *Saccharomyces* had suitable properties as probiotic candidates. The local strains performed better than the reference probiotic strain *S. cerevisiae var. boulardii* CNCM I-745 confirming that they are promising candidates for use as a probiotic. Due to the intensively developing research on probiotic yeast, many discoveries and perhaps even evolution in the segment of probiotics available on the market can be expected in the coming years [55].

Conclusion

Due to the need to expand the food base, the use of yeast as a source of balanced and easily digestible protein seems reasonable and promising. The production of peptides, polysaccharides, vitamins and other biologically active compounds by yeast, as well as the ability of certain species recognized and recommended as probiotics, to have diverse positive effects in the human and animal body, contributes to the recognition of these microorganisms as a partial alternative to ruminant protein and their wider range. application in medicine.

References:

- 1 Choi K.R., Yu H.E., Lee S.Y. Microbial food: microorganisms repurposed for our food *Microb Biotechnol.*, 2022, 15(1): 18-25. (doi: 10.1111/1751-7915.13911)
- 2 Riesute R., Salomskiene J., Moreno D.S., Gustiene S. Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science & Technology*. 2021, 108: 1-10. (doi: 10.1016/j.tifs.2020.11.022)
- 3 Maicas S. The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 2020, 8(8): 1142. (doi: 10.3390/microorganisms8081142)
- 4 Coulibaly W.H., Bouatenin K.M.J.-P., Boli Z.B.I.A., Alfred K.K., Bi Y.C.T., N'sa K.M.C., Cot M., Djameh C., Djè K.M. Influence of yeasts on bioactive compounds content of traditional sorghum beer (tchapalo) produced in Côte d'Ivoire. *Curr Res Food Sci*, 2020, 3: 195–200. (doi: 10.1016/j.crfs.2020.06.001)
- 5 Staniszewski A., Kordowska-Wiater M. Probiotic and potentially probiotic yeasts-Characteristics and food application. *Foods*. 2021, 10(6): 1306. (doi: 10.3390/foods10061306)
- 6 Abdulkhair, W. M. H. (Ed.). *The Yeast Role in Medical Applications*. InTech., 2018. (doi: 10.5772/intechopen.69408)
- 7 Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.-S., Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol.*, 2020, 6(1): 1-31. (doi: 10.3934/microbiol.2020001)
- 8 Abdresh H., Asembaeva Je., Rjabova, A., Myrzabek K., Sejdahmetova, Z. Issledovanie pokazatelej kachestva produktov smeshannogo brozhenija. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, 2023, 2(41): 144–160. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.09)
- 9 Ritala A., Häkkinen S.T., Toivari M., Wiebe M.G. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Front Microbiol.*, 2017, 8: 2009. (doi: 10.3389/fmicb.2017.02009)
- 10 Ritchie H., Roser M. Meat and dairy production. *Our World in Data*, 2017. (URL: <https://ourworldindata.org/meat-production>)
- 11 Al-Shaar L, Satija A, Wang D D, Rimm E B, Smith-Warner S A, Stampfer M J., Hu F.B., Willett W.C. Red meat intake and risk of coronary heart disease among US men: prospective cohort study *BMJ*, 2020, 371:m4141. (doi: 10.1136/bmj.m4141)
- 12 Papier K., Knuppel A., Syam N., Jebb S.A., Key T.J. Meat consumption and risk of ischemic heart disease: A systematic review and meta-analysis, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(3), 426-437. (doi: 10.1080/10408398.2021.1949575)
- 13 Sanders L.M., Wilcox M.L., Maki K.C. Red meat consumption and risk factors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr*, 2023, 77, 156–165. (doi: 10.1038/s41430-022-01150-1)
- 14 Farvid M.S., Sidahmed E., Spence N.D., Angua K.M., Rosner B.A., Barnett J.B. Consumption of red meat and processed meat and cancer incidence: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol*, 2021, 36, 937–951 <https://doi.org/10.1007/s10654-021-00741-9>
- 15 Huang Y., Cao D., Chen Z., Chen B., Li J., Guo J., Dong Q., Liu L., Wei Q. Red and processed meat consumption and cancer outcomes: Umbrella review. *Food Chemistry*, 2021, 356, 129697. (doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129697)
- 16 Alves S.C., Díaz-Ruiz E., Lisboa B., Sharma M., Mussatto S.I., Thakur V.K., Kalaskar D.M., Gupta V.K., Chandel A.K. Microbial meat: A sustainable vegan protein source produced from agri-waste to feed the world. *Food Res Int.*, 2023, 166: 112596. (doi: 10.1016/j.foodres.2023.112596)
- 17 Gervasi T., Pellizzeri V., Calabrese G., Di Bella G., Cicero N., Dugo G. Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Prod. Res.*, 2018, 32: 648–653. (doi: 10.1080/14786419.2017.1332617)
- 18 Somda M.K., Nikiema M., Keita I., Mogmenga I., Kouhoude S.H.S., Dabire Y., Coulibaly W.H., Taale E., Traore A.S. Production of single cell protein (SCP) and essentials amino acids from *Candida utilis* FMJ12 by solid state fermentation using mango waste supplemented with nitrogen sources. *Afr. J. Biotechnol.*, 2018, 17: 716–723. (doi: 10.5897/AJB2017.16361)
- 19 Graham A.E., Ledesma-Amaro R. The microbial food revolution. *Nat Commun*. 2023, 14(1): 2231. (doi: 10.1038/s41467-023-37891-1)
- 20 Jahn L.J., Rekdal V.M., Sommer M.O.A. Microbial foods for improving human and planetary health. *Cell*, 2023, 186(3): 469-478. (doi: 10.1016/j.cell.2022.12.002)

- 21 Hjortmo S., Patring J., Jastrebova J., Andlid T. Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 127: 32–36. (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.001)
- 22 Greppi A., Saubade F., Botta C., Humblot C., Guyot J.-P., Cocolin L. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology*, 2017, 62: 169-177. (doi: 10.1016/j.fm.2016.09.016)
- 23 Johansen P.G., Owusu-Kwarteng J., Parkouda C., Wilfrid Padonou S., Jespersen L. Occurrence and importance of yeasts in indigenous fermented food and beverages produced in pub-Saharan Africa. *Front. Microbiol.*, 2019, 10: 1-22. (doi: 10.3389/fmicb.2019.01789)
- 24 Paulina M., Katarzyna Ś. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017, 9: 1021–1030. (doi: 10.3390/nu9091021)
- 25 Ashraf R., Shah N.P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54: 938–956. (doi: 10.1080/10408398.2011.619671)
- 26 Gill E.E., Franco O.L., Hancock R.E. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des.*, 2015, 85: 56–78. (doi: 10.1111/cbdd.12478)
- 27 Lara-Hidalgo C.E., Hernández-Sánchez H., Hernández-Rodríguez C., Dorantes-Álvarez L. Yeasts in fermented foods and their probiotic potential. *Austin J Nutr Metab.*, 2017, 4(1): 1045.
- 28 Cui B., Lin L., Wang B., Liu W., Sun C. Therapeutic potential of *Saccharomyces boulardii* in liver diseases: from passive bystander to protective performer? *Pharmacol Res.*, 2022, 175 :106022. (doi: 10.1016/j.phrs.2021.106022)
- 29 Pais P., Almeida V., Yılmaz M., Teixeira M.C. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? *J Fungi (Basel)*. 2020, 6(2): 78. (doi: 10.3390/jof6020078)
- 30 Gao H., Li Y., Xu J., Zuo X., Yue T., Xu H., Sun J., Wang M., Ye T., Yu Y., Yao Y. *Saccharomyces boulardii* protects against murine experimental colitis by reshaping the gut microbiome and its metabolic profile. *Front Microbiol.*, 2023, 14: 1204122. (doi: 10.3389/fmicb.2023.1204122)
- 31 Offei B., Vandecruys P., De Graeve S., Foulquié-Moreno M.R., Thevelein J.M. Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome Res.*, 2019, 29(9): 1478-1494. (doi: 10.1101/gr.243147.118)
- 32 Sen S., Mansell T.J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genet Biol.*, 2020, 137: 103333. (doi: 10.1016/j.fgb.2020.103333)
- 33 Sambrani R., Abdolalizadeh J., Kohan L., Jafari B. Recent advances in the application of probiotic yeasts, particularly *Saccharomyces*, as an adjuvant therapy in the management of cancer with focus on colorectal cancer. *Mol Biol Rep.*, 2021: 1-10. (doi: 10.1007/s11033-020-06110-1)
- 34 Nascimento B.L., Delabeneta M.F., Rosseto L.R.B., Junges D.S.B., Paris A.P., Persel C., Gandra R.F. Yeast mycocins: a great potential for application in health. *FEMS Yeast Research*, 20(3): foaa016. (doi: 10.1093/femsyr/foaa016)
- 35 França R.C., Conceição F.R., Mendonça M., Mendonça M., Haubert L., Sabadin G., de Oliveira P.D., Amaral M.G., da Silva W.P., Moreira Â.N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 7953–7961. (doi: 10.1007/s00253-015-6696-9)
- 36 Sambuk E.V., Muzaev D.M., Rumjancev A.M., Padkina M.V. Killer-toksiny drozhzhej *Saccharomyces cerevisiae*: sintez, mehanizmy dejstvija i prakticheskoe ispol'zovanie. *Geneticheskie osnovy jevoljucii jekosistem*. 2019, 17(3): 59-73. (doi: 10.17816/ecogen17359-73)
- 37 Austriaco N. Yeast oral vaccines against infectious diseases. *Front Microbiol.*. 2023. 14: 1150412. (doi: 10.3389/fmicb.2023.1150412)
- 38 Dini I., De Biasi M.-G., Mancusi A. An overview of the potentialities of antimicrobial peptides derived from natural sources. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(11): 1483. (doi: 10.3390/antibiotics11111483)
- 39 da Silva Santos M.F., Freitas C.S., da Costa G.C.V., Ribeiro Pereira P., Paschoalin V.M.F. Identification of antibacterial peptide candidates encrypted in stress-related and metabolic *Saccharomyces cerevisiae* proteins. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(2): 163. (doi: 10.3390/ph15020163)
- 40 Dzhakibaeva G., Sadanov A., Ismailova Je., Bajmahanova B., Molzhigitova A., Bajmahanova G., Shemshura O., Tleubekova D., Elubaeva A. Ocenka ingibirujushhej aktivnosti kollekcionnyh kul'tur drozhzhej protiv vobuditelja bakterial'nogo ozhoga *Erwinia amylovora*. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, 2023. 2(41), 173–182. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.02.11)

- 41 Rjabceva S.A., Sazanova S.N., Dubinina A.A. *Saccharomyces boulardii*, kak potencial'nyj probiotik dlja innovacionnyh pishhevyyh produktov. *Sovremennaja nauka i innovacii*, 2019, 2(26): 138-150. (doi: 10.33236/2307-910X-2019-2-26-138-150)
- 42 Upadhyay T.K., Trivedi R., Khan F., Al-Keridis L.A., Pandey P., Sharangi A.B., Alshammari N., Abdullah N.M., Yadav D.K., Saeed M. In vitro elucidation of antioxidant, antiproliferative, and apoptotic potential of yeast-derived β -1,3-glucan particles against cervical cancer cells. *Front Oncol.*, 2022, 12: 942075. (doi: 10.3389/fonc.2022.942075)
- 43 Wani S.M., Gani A., Mir S.A., Masoodi F.A., Khanday F.A. β -Glucan: A dual regulator of apoptosis and cell proliferation. *Int J Biol Macromol.*, 2021, 182: 1229-1237. (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.065)
- 44 Bastos R., Oliveira P.G., Gaspar V.M., Mano J.F., Coimbra M.A., Coelho E. Brewer's yeast polysaccharides - A review of their exquisite structural features and biomedical applications. *Carbohydr Polym.*, 2022, 277: 118826.9 doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118826)
- 45 Reis S.F., Messias S., Bastos R., Martins V.J., Correia V.G., Pinheiro B.A., Silva L.M., Palma A.S., Coimbra M.A., Coelho E. Structural differences on cell wall polysaccharides of brewer's spent *Saccharomyces* and microarray binding profiles with immune receptors. *Carbohydr Polym.*, 2023, 301(Pt B): 120325. (doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120325)
- 46 Liepins J., Kovačova E., Shvirksts K., Grube M., Rapoport A., Kogan G. Drying enhances immunoactivity of spent brewer's yeast cell wall β -D-glucans. *J Biotechnol.*, 2015, 206: 12-16. (doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.024)
- 47 Arévalo-Villena M., Fernandez-Pacheco P., Castillo N., Bevilacqua A., Briones Pérez A. Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *LWT*, 2018, 89: 657-665. (doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.047)
- 48 Homayouni-Rad A., Azizi A., Oroojzadeh P., Pourjafar H. *Kluyveromyces marxianus* as a probiotic yeast: A mini-review. *Current Nutrition & Food Science*, 2020, 16(8): 1163-1169. (doi: 10.2174/1573401316666200217113230)
- 49 Ochangco H.S., Gamero A., Smith I.M., Christensen J.E., Jespersen L., Arneborg N. In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2016, 32(9): 141. (doi: 10.1007/s11274-016-2109-1)
- 50 Oliveira T., Ramalhosa E., Nunes L., Pereira J.A., Colla E., Pereira E.L. Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2017, 44: 167-172. (doi: 10.1016/j.ifset.2017.06.003)
- 51 Fernandez-Pacheco Rodríguez P., Arévalo-Villena M., Rosa I.Z., Briones Pérez A. Selection of potential non-*Sacharomyces* probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Res. Int.* 2018, 112: 143-151. (doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.008)
- 52 Tamang J.P., Lama S. Probiotic properties of yeasts in traditional fermented foods and beverages. *J Appl Microbiol.*, 2022, 132(5): 3533-3542. (doi: 10.1111/jam.15467)
- 53 Alkalbani N.S., Osaili T.M., Al-Nabulsi A.A., Olaimat A.N., Liu S.-Q., Shah N.P., Apostolopoulos V., Ayyash M.M. Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(4): 365. (doi: 10.3390/jof8040365)
- 54 Vergara Alvarez S.C., Leiva Alaniz M.J., Mestre Furlani M.V., Vazquez F., Agresti P.M., Nally M.C., Maturano Y.P. Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genet Biol.*, 2023, 164: 103767. (doi: 10.1016/j.fgb.2022.103767)
- 55 Staniszewski A., Kordowska-Wiater M. Probiotic and potentially probiotic yeasts-characteristics and food application. *Foods*, 2021, 10(6): 1306. (doi: 10.3390/foods10061306)

MPHTI: 34.25.37; 34.25.19; 34.25.39

В.Э.БЕРЕЗИН¹, А.П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ¹, П.Г. АЛЕКСЮК¹,
М.С. АЛЕКСЮК¹, А. АЗИЗАН², И.А. ЗАЙЦЕВА¹, Е.С. ОМИРТАЕВА^{1*}

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

²Университет Туро, Невада, США

*e-mail: omirel@mail.ru

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ГРИППОМ И COVID-19

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.02

Аннотация

Грипп и COVID-19 входят в число наиболее распространенных инфекционных заболеваний, наносящих большой вред здоровью человека и значительный ущерб экономике. Ассортимент лекарственных препаратов для борьбы с гриппом и COVID-19 в настоящее время весьма ограничен, а их эффективность зачастую недостаточна, что значительно снижает возможности антивирусной терапии. Недостаток специфических противовирусных препаратов, способных подавлять развитие вирусной инфекции, не только осложняет лечение заболевших, но и уменьшает шансы на выживание у пациентов с тяжелой формой заболевания и в целом снижает эффективность борьбы с этими массовыми респираторными вирусными инфекциями. Поэтому разработка новых противовирусных препаратов, эффективных в отношении гриппа и COVID-19, является весьма актуальной проблемой, имеющей большое научное, медицинское и социально-экономическое значение. В обзоре приводятся научные данные по разработке противовирусных препаратов на основе биологически активных соединений растительного происхождения для создания эффективных лекарственных средств терапии и профилактики гриппа и COVID-19. Описаны основные стадии вирусного цикла, как мишени для противовирусной терапии. Показано, что прерывание вирусной инфекции с использованием растительных соединений возможно на разных стадиях репродукции вируса. Рассмотрены различные классы биологически активных соединений растений в качестве потенциального источника для создания антивирусных препаратов.

Ключевые слова: вирусы гриппа, коронавирусы, растительные экстракты.

В настоящее время известно более двухсот вирусов, принадлежащих к 25 различным семействам, которые вызывают серьезные инфекции у человека и могут служить источником возникновения крупномасштабных эпидемий и пандемий [1, 2]. Наибольшую опасность из них представляют респираторные вирусы, передающиеся через воздушную среду, вследствие массовости инфицирования и сложностью контроля за их распространением. К последним относятся вирусы гриппа и недавно появившийся коронавирус Sars-Cov2, вызвавший пандемию COVID-19 [3-7].

Эффективность борьбы с вирусными инфекциями определяется комплексом факторов, важнейшими из которых являются ранняя диагностика возбудителя, наличие надежных средств вакцинопрофилактики, обеспеченность эффективными лекарственными противовирусными препаратами, возможность быстрой организации карантинных мероприятий в случае появления опасных и быстро распространяющихся вирусов. Насколько важно использование комплекса перечисленных подходов для подавления вирусных инфекций показывает опыт борьбы с эпидемиями гриппа и COVID-19.

На первом, пред-эпидемическом этапе, наибольшее значение имеют карантинные мероприятия в сочетании с применением современных методов диагностики возбудителя, основанных на молекулярном анализе [8, 9]. Такие методы (ПЦР, РТ-ПЦР, секвенирование) позволяют быстро и надежно идентифицировать вирус, что в свою очередь дает возможность оперативно подобрать соответствующий вакцинный препарат, а в случае его

отсутствия, приступить к разработке нового. Вакцинопрофилактика является первым эшелонем борьбы с распространением вирусных инфекций, особенно имеющих массовый характер. Выработка индивидуального иммунного барьера и создание достаточной иммунной прослойки у населения (популяционный иммунитет) позволяет остановить, или по крайней мере ограничить распространение вирусной инфекции [10-13].

Вместе с тем, во время эпидемического подъема заболеваемости ведущую роль начинают играть этиотропные противовирусные препараты, обладающие непосредственным блокирующим воздействием на вирусы. В результате нарушения тех или иных механизмов развития вирусной инфекции такие препараты способны полностью подавить вирус, как причину возникновения заболевания, или ослабить его действие [14-16]. Противовирусные препараты становятся основным средством защиты организма, в том случае, если инфицирование все же произошло. К числу требований, предъявляемых к данным лекарственным средствам, являются: эффективное подавление вирусной инфекции, широкий спектр противовирусной активности, низкая токсичность, хорошая способность к проникновению в зараженные ткани и клетки, отсутствие отрицательного воздействия на иммунитет, доступность препарата.

Наличие эффективных диагностических, вакцинных и лекарственных противовирусных препаратов для борьбы с опасными и быстро распространяющимися вирусными инфекциями является жизненно важной необходимостью. Этот вопрос напрямую связан с проблемой обеспечения биобезопасности страны. Ведь в случае возникновения крупномасштабных эпидемий и пандемий возможность снабжения санитарно-эпидемиологической службы и населения необходимыми диагностическими, вакцинными и лекарственными препаратами может оказаться под вопросом. Как показывает опыт, при возникновении пандемии гриппа, или, как в последнем случае, пандемии COVID-19, даже многие промышленно развитые страны, обладающие собственным фармацевтическим производством, были не в состоянии полностью удовлетворить потребности своей страны в вакцинных и лечебных препаратах, поскольку массовость заражения требует использования экстраординарных количеств лекарственных средств. Те же страны, которые не располагают собственной фармацевтической промышленностью, обречены на полную зависимость от других промышленно-развитых стран и не могут оперативно оказать необходимую медицинскую помощь населению.

Грипп и COVID-19 являются одними из наиболее распространенных инфекционных заболеваний современности, наносящих не только значительный вред здоровью человека, но и вызывающих чрезвычайно большой экономический ущерб. Также очень велико социальное значение этих инфекций. Даже обычный сезонный вирус гриппа и связанные с ним осложнения служат причиной смерти более 200 тысяч человек в год [17]. В случае же возникновения высокопатогенных пандемических штаммов гриппа, число погибших может исчисляться миллионами и десятками миллионов. Так, печально известный «испанский» грипп H1N1, свирепствовавший в начале 20 века, унес жизни более 50 миллионов человек, а «гонконгский» грипп H3N2, пандемия которого наблюдалась в конце 70-х годов, явился причиной гибели более 5 миллионов человек [18,19]. В современный период наибольшую угрозу представляют новые пандемические варианты вируса гриппа, которые могут возникнуть в результате рекомбинации генов вирусов гриппа человека, животных и птиц, а также возврат старых высокопатогенных вариантов гриппа, к которым у населения уже отсутствует иммунитет [20, 21]. Что касается коронавирусов, то появившийся в конце в 2019 г. вирус SARS-CoV-2 и вызвавший пандемию COVID-19, за два года поразил около 700 млн. человек и стал причиной гибели почти 7 млн человек [22-26]. При этом науке известны и более агрессивные формы коронавирусов, обладающие еще большей патогенностью [27].

Ассортимент специфических лекарственных средств для борьбы с вирусами гриппа и коронавирусами в настоящее время весьма немногочислен, а их эффективность зачастую недостаточна, что значительно снижает возможности противовирусной терапии. Так,

ассортимент противогриппозных препаратов, в основном ограничен такими лекарственными средствами, как ремантадин, осельтамивир и недавно появившимися на рынке препаратами балоксавир и фавипиравир. Вместе с тем высокая изменчивость вирусов гриппа быстро приводит к появлению лекарственно-устойчивых вирусных штаммов, что отрицательно влияет на эффективность противовирусной терапии. Большинство современных эпидемических штаммов вируса гриппа А стали устойчивыми к ремантадину и осельтамивиру [28,29]. Появились сообщения о возникновении устойчивых штаммов вируса гриппа и к балоксавиру, который используется в медицинской практике всего три года [30,31].

Эффективные противовирусные препараты для этиотропной терапии коронавирусной инфекции пока не разработаны. Предпринимались попытки использовать для лечения COVID-19 созданные ранее противогриппозные препараты (фавипиравир, балаксавир), противомаларийный препарат гидроксихлорохин, анти-ВИЧ препарат лопинавир, анти-Эбола препарат ремдесивир, но все они оказались малоэффективными [32-39]. Поэтому для лекарственной терапии COVID-19 в настоящее время преимущественно применяются симптоматические жаропонижающие, противовоспалительные и анти тромбозные средства, направленные на облегчение состояния больного, но не блокирующие развитие вирусной инфекции.

Недостаток или отсутствие эффективных этиотропных противовирусных препаратов для борьбы с гриппом и COVID-19 уменьшает шансы на выживание у пациентов с тяжелой формой заболевания и в целом снижает эффективность борьбы с этими массовыми респираторными вирусными инфекциями. Поэтому, разработка новых противовирусных препаратов широкого спектра действия, способных блокировать репродукцию как вирусов гриппа, так и коронавирусов, является весьма актуальной проблемой, имеющей большое научное, медицинское и социальное-экономическое значение.

Разработка новых противовирусных препаратов основывается на двух базовых принципах: 1) поиске биологически активных соединений природного происхождения, обладающих способностью подавлять вирусную инфекцию, 2) моделировании и химическом синтезе молекул, способных блокировать разные стадии вирусной инфекции. Зачастую оба направления тесно связаны, поскольку химический синтез противовирусных соединений во многом основан на понимании строения и функций природных биологически активных соединений и позволяет имитировать природные структуры, либо создавать их модифицированные аналоги.

Создание противовирусных препаратов на основе биологически активных соединений природного происхождения приобретает все большую популярность как среди ученых-вирусологов, так и среди фармацевтических компаний - производителей противовирусных лекарственных средств. В растениях, тканях животных и в клетках микроорганизмов содержатся тысячи разнообразных биологически активных соединений, что дает возможность подобрать вещества с необходимыми свойствами. Кроме того, препараты на основе природных соединений, как правило, обладают более широким спектром действия по сравнению с синтетическими.

Одним из наиболее перспективных источников для создания противовирусных препаратов являются биологически активные соединения растительного происхождения, способные блокировать разные стадии вирусной инфекции и эффективно подавлять размножение вирусов. Растения содержат богатый набор разнообразных соединений, способных непосредственно или опосредованно воздействовать на различные стадии инфекционного процесса. Это – алкалоиды, гликозиды, терпены, флавоноиды, фенилпропаноиды, кумарины и т.д. [40-41]. Благодаря разнообразным и часто комплексным механизмам воздействия на различные стадии репродукции вирусов, подобные соединения весьма привлекательны для создания новых противовирусных препаратов. Кроме того, по отношению к биологически активным соединениям растительного происхождения зачастую в меньшей степени наблюдается возникновение

лекарственной устойчивости. А ведь именно образование лекарственно-устойчивых вирусных штаммов является одной из основных причин снижения эффективности лекарственной терапии, особенно в отношении быстро мутирующих вирусов. Поэтому, изучение природных соединений растительного происхождения в качестве источника для разработки противовирусных средств, и создание на их основе новых лекарственных препаратов для борьбы с гриппом и коронавирусными инфекциями, в частности с COVID-19, является весьма перспективным направлением, представляющим большой научный и практический интерес [42-52].

Основные критически важные этапы репродукции вирусов гриппа и вируса SARS-Cov-2, воздействие на которые может блокировать вирусную инфекцию, хорошо известны. Это - стадия прикрепления вируса к рецепторам клетки-хозяина и проникновения вируса в клетку, стадии репликации вирусной нуклеиновой кислоты, синтеза и процессинга структурных и неструктурных вирусных белков, стадии сборки, созревания и выхода вирусных частиц из клетки [53-56]. Соответственно, при разработке противовирусных препаратов осуществляется поиск соединений, способных блокировать одну или несколько стадий инфекционного процесса [57-58].

Взаимодействие вируса с клеткой начинается с процесса прикрепления вирусных частиц к поверхности клетки-хозяина. Связывание вируса с клеткой происходит за счет двух основных механизмов: неспецифической адсорбции вирусных частиц на поверхности клетки или благодаря специфическому взаимодействию вирусных рецепторов с клеточными рецепторами. В первом случае адсорбция осуществляется путем электростатического взаимодействия или на основе гидрофобно-гидрофильных взаимодействий. При специфическом взаимодействии происходит связывание поверхностного рецептора вируса гриппа (гемагглютанина) или поверхностного рецептора коронавируса (S-белка) с клеточными рецепторами [53,56]. Поэтому лекарственную терапию на этой стадии инфекции также можно разделить на специфическую и неспецифическую.

Поскольку неспецифический этап блокирования адсорбции вируса в первую очередь связан с электростатическими взаимодействиями между вирусом и клеткой, то применение полианионных соединений, таких как полисульфаты, полисульфонаты, поликарбоксилаты, полигидроксиметалаты, полинуклеотиды и отрицательно заряженные альбумины или пептиды, эффективно ингибирует адсорбцию вирусов [59-61]. Важной группой неспецифических ингибиторов также являются интерфероны и их индукторы. Интерфероны запускают множественные вторичные процессы, которые могут подавлять практически все стадии репликации вируса путем связывания с клеточными рецепторами [62].

К специфическим факторам блокирования адсорбции вируса, помимо вирусспецифических антител, можно отнести многочисленные вариации аналогов рецепторов, позволяющие «отводить» вирусную частицу с поверхности клеток. Установлено, что многие растительные агглютинирующие лектины способны с высокой эффективностью взаимодействовать с гемагглютинином вируса гриппа и блокировать стадию прикрепления вируса к клеточным рецепторам. При этом наиболее активными являются маннозо-связывающие лектины, хотя и другие лектины, имеющие сродство к иным сахарным остаткам, также проявляют противовирусную активность [63]. Не менее интересной группой химических соединений, способных блокировать адсорбцию вирусов, являются терпеноиды, которые в силу своих структурных особенностей, связываясь с холестерином мембраны, способны изменять пространственную структуру мембраны клетки и вируса. Показано, что наличие у подобных соединений трех сахарных остатков 3-O- β -хакотриозила увеличивает их противовирусную активность [44, 64-66].

Другой группой препаратов, способных блокировать репликацию вирусов гриппа и коронавирусов, являются алкалоиды и полифенольные соединения, не только изменяющие заряд поверхности клетки, но и препятствующие специфической сорбции вируса на

рецепторы, а также разрушающие оболочку вируса, что ведет к неспособности связывания с рецепторами клетки и повышает чувствительность вирусного нуклеокапсида к протеазам и эндонуклеазам [47,67-68]. Например, хорошо известный флавоноид кверцетин, встречающихся во многих растениях, способен блокировать проникновение вируса гриппа в клетку [69]. Блокировка взаимодействия S-белка - наружного рецептора коронавируса - с ангиотензинпревращающим ферментом ACE2 является одним из возможных механизмов, способных предотвратить проникновение коронавирусов, в том числе вируса SARS-CoV2 в клетку-мишень [56,70]. Такая блокировка может быть осуществлена различными биологически активными соединениями растительного происхождения - терпеноидами, флавоноидами, антрохинонами, галловой кислотой, кверцитином, глицирризиновой кислотой и рядом других соединений, содержащихся в экстрактах некоторых лекарственных растений. Так, антрахинон эмодин, содержащийся во многих, в том числе лекарственных растениях, обладает способностью блокировать взаимодействие спайк-протеина с ACE-2 ферментом, что также препятствует проникновению коронавируса SARS в клетку [71]. Сесквитерпеновый лактон артемизинин, выделенный из лекарственного растения *Artemisia annua*, дезактивировал вирус SARS-CoV-2, ингибируя S-белок [72]. Аналогичным действием обладали куркумин, тимохинон, галловая кислота, танниновая кислота, афлавин-3,3'-дигаллат и некоторые флавоноиды, содержащиеся во многих съедобных и лекарственных растениях [73-75]. Эти соединения или их сочетания могут быть использованы при лечении COVID.

Транскрипция вирусного генома и сборка вирионов являются самыми сложными этапами репродукции вируса. Этот этап успешно блокируется ингибиторами пост-трансляционных модификаций вирусных белков, связанных с протеазными превращениями полипептидных цепей [34, 48]. К числу биологически активных соединений, способных ингибировать протеазную активность относятся полифенолы. Полифенольные соединения обладают способностью ингибировать протеазную активность ряда вирусных ферментов, критически необходимых для созревания вирусных белков, что приводит к нарушению процессов сборки вирусных частиц [52,76]. Анализируя растительные препараты, способные подавлять протеазную активность белков вирусов гриппа и коронавирусов, можно сделать вывод о широком разнообразии соединений, механизм действия которых основан на блокировании областей, критичных для активности аспарагиновой протеазы. К числу растительных соединений, способных блокировать протеазную активность ключевых вирусных ферментов, относятся терпены, ксантоны, фенилпропаноиды и флавоноиды [50-52, 58]. Например, известный растительный флавоноид кверцетин проявляет противовирусные свойства, влияя на несколько этапов цикла репродукции коронавирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2, в том числе на этап созревания вирусных полипротеинов, ингибируя протеолитическую активность 3-химотрипсиноподобной протеазы, ответственной за протеолитическое расщепление вирусных полипротеинов [77,78]. Сходным действием обладают эллаговая кислота, урсоловая кислота, эпигаллокатехина галлат, куркумин [77,79-82].

Еще одной мишенью для подавления репродукции вирусов является этап выхода вируса из клетки. Так, в отношении вируса гриппа критически важное значение для успешной репродукции имеет активность наружного вирусного гликопротеида нейраминидазы. Благодаря ферментативной активности нейраминидазы происходит отщепление остатков сиаловой кислоты от клеточных рецепторов, что дает возможность вновь сформировавшимся вирусным частицам отделиться от клеточной мембраны и инфицировать новые клетки. Угнетение ферментативной активности нейраминидазы приводит к прерыванию вирусной инфекции. Именно на этом принципе основано действие ряда противовирусных препаратов, эффективных в отношении вируса гриппа, в том числе известного противогриппозного препарата Осельтамивир (Тамифлю) [83-85]. В некоторых растениях обнаружен ряд соединений, способных эффективно блокировать действие нейраминидазы и подавлять размножение вируса гриппа. Было установлено, что

обогащенный продельфинидином экстракт корней растения *Pelargonium sidoides* и богатый танинами экстракт коры растения *Hamamelis virginiana* способны блокировать активность нейраминидазы вируса гриппа и подавлять вирусную инфекцию [86-87]. Известны и другие растительные соединения, обладающие сходным действием. Так, подавление активности вирусной нейраминидазы наблюдалось при применении обогащённой танином фракции экстракта корня и корневища растения *Rhodiola rosea* [88].

В наших исследованиях также было показано выраженное антивирусное действие многих биологически активных соединений растительного происхождения. Выявлена высокая антивирусная активность ряда эфирных масел [89], сапонинсодержащих растительных экстрактов и очищенных терпенов [90], кумаринов [91], фенольных кислот [92]. Проведено исследование взаимосвязи структуры флавоноидов, полифенольных и терпеновых соединений с их антивирусными свойствами [93-96]. Выявлена высокая антивирусная активность ряда полифенольных соединений, выделенных из растений флоры Казахстана. Показана высокая антивирусная активность ряда ксантонов, а также кверцетина и некоторых его производных [97-102]. Установлено, что определенные тритерпены и сесквитерпены, содержащиеся во многих растениях флоры Казахстана, способны эффективно подавлять вирусы гриппа человека, животных и птиц, а также обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами [90, 103-105].

Таким образом, имеется большое разнообразие соединений растительной природы, способных воздействовать на репликацию вирусов гриппа и коронавирусов. Растения являются уникальным источником для получения высокоактивных противовирусных препаратов и разработки на их основе средств для этиотропной терапии вирусных инфекций. Растения и растительные экстракты в течение тысячелетий успешно использовались человечеством для лечения самых разных заболеваний. В настоящее время биологически активные соединения растительного происхождения применяются для борьбы с многими вирусными инфекциями, в том числе для терапии гриппа и коронавирусных инфекций [50-52, 82, 106-108]. На современном этапе из экстрактов растений, обладающих противовирусной активностью, извлекаются очищенные соединения, способные блокировать репродукцию вирусов, их структура анализируется с применением методов физико-химического анализа, выявляется зависимость между структурой соединения и их антивирусными свойствами. Впоследствии такие соединения могут быть получены из природных источников или синтезированы химическим путем для масштабного фармацевтического производства. Примером может служить противогриппозный препарат осельтамивир (Тамифлю), первоначально обнаруженный в растении анис звёздчатый (*Illicium verum*), затем выделенный из этого растения в очищенном виде и впоследствии синтезированный химическим путем для целей фармацевтического производства [109,110].

При изучении природных соединений растительного происхождения в качестве потенциальных источников для создания новых антивирусных препаратов используется несколько основных подходов. На первой стадии анализа все более популярным становится метод молекулярного докинга, позволяющий с помощью компьютерного моделирования оценить возможность стерических взаимодействий того или иного биологически активного соединения с мишенью – клеточным или вирусным рецептором, ключевыми ферментами, участвующими в репродукции вируса и т.д. Использование метода молекулярного докинга дает возможность проанализировать большое число разнообразных биологически активных молекул в качестве возможного антивирусного компонента и отобрать наиболее перспективные из них. На данной стадии анализа также могут быть смоделированы возможные механизмы действия, что важно для последующего понимания путей взаимодействия изучаемого соединения с вирусом или клеткой. Компьютерный анализ позволяет существенно упростить и удешевить стадию первичного скрининга препаратов, однако не может заменить их экспериментальное исследование. В соответствии с проведенным компьютерным анализом впоследствии проводится отбор перспективных

растительных источников, содержащих соединения, потенциально обладающие антивирусным действием, для их экспериментального изучения [75, 108, 111–115].

На втором этапе проводятся скрининговые исследования растений, имеющих высокое содержание соединений, потенциально обладающих антивирусной активностью (флавоноиды, терпеноиды, кумарины, фенольные кислоты, эфирные масла и др.) Далее осуществляется детальный анализ отобранных растительных материалов с целью выделения очищенных биологически активных соединений, обладающих необходимыми антивирусными свойствами. Для получения очищенных биологически активных соединений из растительных тканей применяются методы дифференциальной экстракции с использованием различных растворителей, а также методы хроматографического разделения, среди которых наибольшей популярностью пользуется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющий осуществлять фракционирование сложных смесей с высоким разрешением. Далее проводится изучение спектра антивирусной активности полученных соединений, анализ механизмов их действия, изучение структуры отобранных соединений. Знание детальной структуры выделенного биологически активного соединения, обладающего антивирусным действием, впоследствии может быть использовано для направленного химического синтеза данного соединения. Изучение состава и структуры полученных биологически активных соединений осуществляется с применением современных физико-химических методов исследования: масс-спектрометрии, ядерно-магнитного резонанса, атомно-адсорбционной спектроскопии и т.д. [116-121].

Заключение

Наличие эффективных и доступных противовирусных препаратов является одним из основных условий для успешной борьбы с эпидемиями и пандемиями вирусной природы. Наряду с вакцинами, призванными обеспечить первый барьер на пути распространения вируса, лекарственные противовирусные препараты необходимы как для терапии, так и для профилактики вирусных инфекций, особенно в тех случаях, когда вакцинация в силу тех или иных причин оказывается недоступной или недостаточно эффективной.

К числу наиболее опасных и распространенных вирусов относятся вирусы гриппа и коронавирусы, которые за последние 100 лет стали источником как минимум семи пандемий, поразивших несколько миллиардов человек и унесших жизни более 130 млн человек. Респираторный механизм передачи этих вирусов чрезвычайно осложняет их контроль, особенно в современном обществе, где высокая плотность населения и развитая транспортная инфраструктура способствуют быстрому распространению инфекции. Для медикаментозной терапии больных необходимо применение эффективных противовирусных препаратов, способных блокировать развитие вирусной инфекции. В настоящее время ассортимент специфических препаратов для борьбы с вирусами гриппа и коронавирусами очень мал, а их эффективность зачастую недостаточна, что существенно ограничивает возможности противовирусной терапии.

Биологически активные соединения растительного происхождения являются одним из наиболее перспективных источников для создания новых противовирусных препаратов, эффективных в отношении различных вирусов, включая вирусы гриппа и коронавирусы. Растения содержат богатый набор разнообразных соединений, способных непосредственно или опосредованно воздействовать на различные стадии инфекционного процесса. Это – алкалоиды, гликозиды, терпены, флавоноиды, фенилпропаноиды, кумарины, органические кислоты, эфиры и т. д. Благодаря способности воздействовать на разные стадии вирусной инфекции, такие соединения могут обладать комплексным действием и эффективно подавлять не только размножение вируса внутри клетки, но и его распространение в организме, что позволяет в короткие сроки блокировать инфекцию. Поэтому подобные соединения весьма привлекательны в качестве источника для создания новых лекарственных противовирусных препаратов. Кроме того, по отношению к биологически

активным соединениям растительного происхождения зачастую в меньшей степени наблюдается возникновение лекарственной устойчивости. А ведь именно образование лекарственно-устойчивых вирусных штаммов является одной из основных причин снижения эффективности лекарственной терапии, особенно в отношении быстро мутирующих вирусов, таких как вирусы гриппа и коронавирусы.

Таким образом, изучение природных соединений растительного происхождения в качестве богатого источника для разработки противовирусных препаратов и создание на их основе новых лекарственных средств для борьбы с гриппом и COVID-19 является весьма перспективным направлением, представляющим большой научный и практический интерес. Это направление приобретает все большую популярность как среди ученых-вирусологов, так и среди фармацевтических компаний - производителей противовирусных лекарственных препаратов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках и за счет финансовой поддержки целевой Научно-технической программы Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан №BR10965178 «Разработка оригинальных отечественных препаратов с противовирусной активностью, эффективных в отношении COVID-19 и гриппа»

Литература:

- 1 Evans A.S., Kaslow R.A. eds. *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*. 4th edn. Plenum Medical Book Company; New York: 1997.
- 2 Murphy F.A. *Epidemiology of viral diseases. Encyclopedia of Virology*, 1999, 482–487 (doi: 10.1006/rwvi.1999.0085)
- 3 Boncristiani H.F. Respiratory Viruses. *PMC NCBI, Encyclopedia of Microbiology*, 2009, 500–518, PMID: PMC7149556 (doi: 10.1016/B978-012373944-5.00314-X)
- 4 Webster RG. Influenza: An Emerging Disease. *Emerg Infect Dis.*, 1998, 4: 436–441.
- 5 Shereen M.A., Khan S., Kazmi A., Bashir N. Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 2020, 24: 91-98 (doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005)
- 6 Bonilla-Aldana D.K., Holguin-Rivera Y., Cortes-Bonilla I., Cardona-Trujillo M.C., Rodriguez-Morales A.J. Coronavirus infections reported by ProMED, February 2000–January 2020. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2020, 35: 101575 (doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101575)
- 7 Yang Y., Peng F., Wang R., Guan K., Chang C. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *Journal of Autoimmunity*, 2020, 109: 102434 (doi: 10.1016/j.jaut.2020.102434)
- 8 Vos L.M., Bruning A.H.L., Reitsma J.B., et al. Rapid molecular tests for influenza, respiratory syncytial virus, and other respiratory viruses: a systematic review of diagnostic accuracy and clinical impact studies. *Clin Infect Dis.*, 2019, 69(7): 1243-1253 (doi: 10.1093/cid/ciz056)
- 9 Zimmerman P.A., King C.L., Ghannoum M., Bonomo R.A., Procop G.W. Molecular Diagnosis of SARS-CoV-2: Assessing and Interpreting Nucleic Acid and Antigen Tests. *Pathog Immun.*, 2021, 6(1): 135–156 (doi: 10.20411/pai.v6i1.422)
- 10 Chan L., Alizadeh K., Fazel F., Kakish J.E., Karimi N. et al. Review of Influenza Virus Vaccines: The Qualitative Nature of Immune Responses to Infection and Vaccination Is a Critical Consideration. *Vaccines*, 2021, 9(9): 979-997 (doi: 10.3390/vaccines9090979)
- 11 Nypaver C., Dehlinger C., Carter C. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. *J.MidwiferyWomensHealth*, 2021, 66(1): 45-53 (doi: 10.1111/jmwh.13203)
- 12 Zhang Z., Shen Q., Chang H. Vaccines for COVID-19: A Systematic Review of Immunogenicity, Current Development, and Future Prospects. *Front. Immunol.*, 2022, 13 (doi: 10.3389/fimmu.2022.843928)
- 13 Khandker S.S., Godman B., Jawad M.I., Meghla B.A., Tisha T.A. et. al. A Systematic Review on COVID-19 Vaccine Strategies, Their Effectiveness, and Issues. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1387 (doi: 10.3390/vaccines9121387)
- 14 Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.E. Levels of Antiviral Therapy. *J. Human Virology & Retrovirology*, 2016, 3(3):1-6 (doi: 10.15406/jhvr.2016.03.00093)

- 15 Kausar S., Khan F.S., Mujeeb M.I., Rehman U., Akram M. et.al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2021, 35: 20587384211002621 (doi: 10.1177/20587384211002621)
- 16 Jen H.H., Chang, W.J. Lin T.Y., Hsu C.Y., Amy Ming-Fang Yen A.M.-F., Lai C.C., Chen T. H.-H. Evaluating Clinical Efficacy of Antiviral Therapy for COVID-19: A Surrogate Endpoint Approach. *Infectious Diseases and Therapy*, 2021, 10: 815–825 (doi: 10.1007/s40121-021-00431-9)
- 17 Chowell G., Echevarría-Zuno S., Viboud C., Simonsen L., Tamerius J., Miller V.A., Borja-Aburto V.H. Characterizing the epidemiology of the 2009 influenza A/H1N1 pandemic in Mexico. *PLoS Med.*, 2011, 8(5): e1000436. (doi: 10.1371/journal.pmed.1000436)
- 18 Khanna M., Saxena L., Gupta A., Roopali K. “Influenza Pandemics of 1918 and 2009” . *Future Virology*. 2013, 8 (4): 335-342.
- 19 Taubenberger J.K., Reid A.H., Janczewski T.A., Fanning T.G. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.Sci.*, 2001, 356: 829–1839.
- 20 Smith G. J. D., Vijaykrishna D., Bahl J. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009, 459(7250): 1122–1125.
- 21 Nelson M., Gramer M., Vincent A. and Holmes E.C. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *Journal of General Virology*, 2012, 93(10): 2195–2203.
- 22 Wang L.S., Wang Y.R., Ye D.W., Liu Q.Q. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Inter. J. of Antimicrobial Agents*. 2020, (doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105948)
- 23 Wu Y.C., Chen C.C., Chan Y.J. The outbreak of COVID-19: An overview. *J Chin Med Assoc*. 2020, 83(3): 217-220 (doi: 10.1097/JCMA.0000000000000270)
- 24 Majumdar A., Malviya N., Alok S. An overview on COVID-19 outbreak: Epidemic to pandemic. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2020, 11(5):1958-1968 (doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).1958-68)
- 25 Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19: 141–154 (doi: 10.1038/s41579-020-00459-7)
- 26 Covid-19 coronavirus pandemic. *Worldometer*. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
27. Li H., Hu C.Y., Wu N.P., Yao H.P., Li L.J. Molecular characteristics, functions, and related pathogenicity of MERS-CoV proteins. *Engineering*, 2019, 5(5): 940-947 (doi: 10.1016/j.eng.2018.11.035)
28. Hussain M., Galvin H.D., Haw T.Y., Nutsford A.N., Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist.*, 2017, 10:121–134 (doi: 10.2147/IDR.S105473)
- 29 Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2020, 39(7): 1201–1208 (doi: 10.1007/s10096-020-03840-9)
- 30 Noshi T., Kitano M., Taniguchi K., Yamamoto A., Omoto Sh., Baba K., Hashimoto T., Ishida K., Kushima Y., Hattori K., Kawai M., Yoshida R., Kobayashi M., Yoshinaga T., Sato A., Okamatsu M., Sakoda Y., Kida H., Shishido T., Naito A. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.*, 2018, 160: 109–117 (doi: 10.1016/j.antiviral.2018.10.008)
- 31 Gubareva L.V., Fry A.M. Baloxavir and Treatment-Emergent Resistance: Public Health Insights and Next Steps. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020, 221(3): 337–339 (doi: 10.1093/infdis/jiz245)
- 32 Eastman R.T., Roth J.S., Brimacombe K.R., Simeonov A., Shen M., Patnaik S., Hall M.D. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent. Sci.*, 2020, 6(5): 672–683 (doi: 10.1021/acscentsci.0c00489)
- 33 Wang Y., Zhang D., Du G., et.al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Lancet*, 2020, 395: 1569–1578 (doi: 10.1016/S0140-6736(20)31022-9)
- 34 Furuta Y., Komono T., Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad-spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 2017, 93(7): 449-463 (doi:10.2183/pjab.93.027)
- 35 Delang L., Abdelnabi R., Neyts J. Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral. Res.*, 2018, 153: 85-94. (doi: 10.1016/j.antiviral.2018.03.003)
- 36 Chandwani A., Shuter J. Lopinavir/ritonavir in the treatment of HIV-1 infection: a review. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2008, 4(5): 1023-1033 (doi: 10.2147/trcm.s3285)

- 37 Cortegiani A., Ingoglia G., Ippolito M., Giarratano A., Einav S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *Journal of Critical Care.*, 2020, 57: 279–283 (doi: 10.1016/j.jcrc.2020.03.005)
- 38 Costedoat-Chalumeau N., Dunogué B., Leroux G. et al. A Critical Review of the Effects of Hydroxychloroquine and Chloroquine on the Eye. *Clinic Rev. Allerg. Immunol.*, 2015, 49: 317–326 (doi.org/10.1007/s12016-015-8469-8)
- 39 Tang D., Li J., Zhang R., Kang R., Klionsky D.J. Chloroquine in fighting COVID-19: good, bad, or both? *Autophagy.* 2020; 16(12): 2273–2275 (doi: 10.1080/15548627.2020.1796014)
- 40 Berdimuratova G.D., Muzychkina R.A., Korulkin D.Yu., Abilov Zh.A., Tulegenova A.U. *Biologically active substances of plants. Isolation, division, analysis*, 2006, Almaty: Atamura, 438 p.
- 41 Zhao Y., Wu Y., Wang M. Bioactive Substances of Plant Origin. *Handbook of Food Chemistry*, Cheung, P., Mehta, B. (eds), 2015, Springer: 967–1008 (doi: 10.1007/978-3-642-36605-5_13)
- 42 Worthley D. L., Bardy P. G., Mullighan C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal. Medicine Journal*, 2005, 35 (9): 548-555 (doi: 10.1111/j.1445-5994.2005.00908.x)
- 43 Ludwig S., Ehrhardt C., Hrinčius E.R., Korte V., Mazur I., Droebner K., Poetter A., Dreschers S., Schmolke M., Planz O. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.*, 2007, 76: 38-47.
- 44 Li Y., Jiang R., Ooi L. S. M., But P. P. H. Ooi V.E.C. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant Schefflera heptaphylla. *Phytotherapy Research*, 2007, 5: 466-470 (doi: 10.1002/ptr.1962)
- 45 Sawai R., Kuroda K., Shibata T., Gomyou R., Osawa K., Shimizu K. Anti- influenza virus activity of Chaenomeles sinensis. *J. Ethnopharmacol.*, 2008, 118: 108-112 (doi: 10.1016/j.jep.2008.03.013)
- 46 Hudson J.B. The use of herbal extracts in the control of influenza. *J. Med. Plants. Res.*, 2009, 3: 1189-1194.
- 47 Musarra-Pizzo M., Ginestra G., Smeriglio A. et al. The Antimicrobial and Antiviral activity of polyphenols from almond (*Prunus dulcis* L.) skin. *Nutrients.* 2019, 11(10): 2355 (doi: 10.3390/nu11102355)
- 48 Chang K.O., Kim Y., Lovell S., Rathnayake A.D., Groutas W.C. Antiviral Drug Discovery: Norovirus Proteases and Development of Inhibitors. *Viruses*, 2019, 11(2): 197 (doi: 10.3390/v11020197)
- 49 Subedi L., Tchen S., Prasad Gaire B., Hu B. and Hu K. Adjunctive nutraceutical therapies for COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22: 1963 (doi: 10.3390/ijms22041963)
- 50 Berezin V., Bogoyavlenskiy A., Alexyuk M., Alexyuk P. Plant metabolites as antiviral preparations against coronaviruses. *J. Medicinal Food*, 2021, 24(10): 1028-1038 (doi: 10.1089/jmf.2020.0190)
- 51 Ali S., Alam V., Khatoun F., Fatima U., Elsbali A.E., Mohd Adnan M., Islam A., Hassan I., Snoussi M., De Feo V. Natural products can be used in therapeutic management of COVID-19: Probable mechanistic insights. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 147: 112658 (doi: 10.1016/j.biopha.2022.112658)
- 52 Dushenkov V., Dushenkov A. Botanicals as prospective agents against SARS-COV-2 virus. *Paemi Sino.*, 2022, 24(1): 113–122 (doi: 10.25005/2074-0581-2022-24-1-113-122)
- 53 Dou D., Revol R., Östbye H., Wang H., Daniels R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front. Immunol. Sec. Microbial Immunology*, 2018, 9: 1581 (doi: 10.3389/fimmu.2018.01581)
- 54 Loregian A., Mercorelli B., Nannetti G., Compagnin C., Palù G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 2014, 71: 3659–3683.
- 55 Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Bonilla H., Jagannathan P., Shafer R.W. SARS-CoV-2 antiviral therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 2021, 34(4): 109–121 (doi: 10.1128/CMR.00109-21)
- 56 Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(1): 3–20 (doi: 10.1038/s41580-021-00418-x)
- 57 Kausar S., Said Khan F.S., Malik A. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2021, 35: 20587384211002621 (doi: 10.1177/20587384211002621)
- 58 Kumari R., Sharma S.D., Kumar A., Ende Z., Mishina M., Wang Y., Falls Z., Samudrala R., Pohl J., Knight P.R. Antiviral Approaches against Influenza Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 2023, 36(1): e0004022 (doi: 10.1128/cmr.00040-22)

- 59 Bergstrom D.E., Lin X., Wood T.D., Witvrouw M., Ikeda S., et al. Polysulfonates derived from metal thiolate complexes as inhibitors of HIV-1 and various other enveloped viruses in vitro. *Antivir Chem Chemother.*, 2002, 13(3): 185–195 (doi: 10.1177/095632020201300305)
- 60 Sepúlveda-Crespo D., Gómez R., De La Mata F.J., Jiménez J.L., Muñoz-Fernández M.A. Polyanionic carbosilane dendrimer-conjugated antiviral drugs as efficient microbicides: Recent trends and developments in HIV treatment/therapy. *Nanomedicine*, 2015, 11(6): 1481–1498 (doi: 10.1016/j.nano.2015.03.008)
- 61 Tan S., Lu L., Li L., Liu J., Oksovet Y. et al. Polyanionic candidate microbicides accelerate the formation of semen-derived amyloid fibrils to enhance HIV-1 infection. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59777 (doi: 10.1371/journal.pone.0059777)
- 62 Loginova S.Y., Kovalchuk A.V., Borisevich S.V., Syromiatnikova S.I., Boriseviche G.V. et al. Antiviral activity of an interferon inducer amixin in experimental West Nile Fever. *Vopr Virusol.*, 2004, 49(2): 8–11.
- 63 Worthley D. L., Bardy P. G., Mullighan C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal*, 2005, 35 (9): 548-555 (doi: 10.1111/j.1445-5994.2005.00908.x)
- 64 Xiao S., Si L., Tian Z., Fan Z., Meng K. et al. Pentacyclic triterpenes grafted on CD cores to interfere with influenza virus entry: A dramatic multivalent effect. *Biomaterials*, 2016, 78:74–85 (doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.034)
- 65 Darshani P., Sarma S.S., Srivastava A.K., Baishya R., Kumar D. Anti-viral triterpenes: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2022, 21: 1761–1842 (doi: 10.1007/s11101-022-09808-1)
- 66 Li H., Cheng C., Shi S., Wu Y., Gao Y. et al. Identification, optimization, and biological evaluation of 3-O- β -chacotriosyl ursolic acid derivatives as novel SARS-CoV-2 entry inhibitors by targeting the prefusion state of spike protein. *Eur J Med Chem*. 2022, 238: 114426 (doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114426)
- 67 Majnooni M.B., Fakhri S., Bahrami G., Naseri M., Farzaei M.H., Echeverría J. Alkaloids as Potential Phytochemicals against SARS-CoV-2: Approaches to the Associated Pivotal Mechanisms. *Evid. Based Complement Alternat. Med*. 2021, 2021: 6632623 (doi: 10.1155/2021/6632623)
- 68 Kim D.E., Min J.S., Jang M.S., Lee J.Y., Shin Y.S. et al. Natural bis-benzylisoquinoline alkaloids tetrandrine, fangchinoline and cepharanthine inhibit human coronavirus OC43 infection of MRC5 human lung cells. *Biomolecules*. 2019, 9(11): 696 (doi: 10.3390/biom9110696)
- 69 Li W.R., Li X., He J., Jiang S., Liu S., Yang J. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. *Viruses*, 2016, 8(1): 6 (doi: org/10.3390/v8010006)
- 70 Shang J., Wan Y., Luo C., Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *PNAS*. 2020, 117 (21): 11727-11734 (doi: 10.1073/pnas.2003138117)
- 71 Ho T.Y., Wu S.L., Chen J.C. et al. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res.*, 2007, 74(2): 92–101 (doi: 10.1016/j.antiviral.2006.04.014.)
- 72 Rolta R., Salaria D., Sharma P., Sharma B., Kumar V., Rathi B., et al. Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* inhibit spike protein of SARS-CoV-2 binding to ACE2 receptor: In silico approach. *Current Pharmacology Reports*, 2021, 7(4): 135–149 (doi: 10.1007/s40495-021-00259-4)
- 73 Goc A., Sumera W., Rath M., Niedzwiecki A. Phenolic compounds disrupt spike-mediated receptor-binding and entry of SARS-CoV-2 pseudo-virions. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0253489 (doi:10.1371/journal.pone.0253489)
- 74 Xu H., Liu B., Xiao Z., Zhou M., Ge L., Jia F. et al. Computational and experimental studies reveal that thymoquinone blocks the entry of coronaviruses into in vitro cells. *Infectious Diseases and Therapy*, 2021, 10(1): 483–94 (doi: 10.1007/s40121-021-00400-2)
- 75 Bogoyavlenskiy A., Alexyuk M., Alexyuk P., Berezin V., Almalki F.A. et al. Computer analysis of the inhibition of ACE2 by flavonoids and identification of their potential antiviral pharmacophore Site. *Molecules*, 2023, 28(9): 3766 (doi: 10.3390/molecules28093766)
- 76 Ryu Y.B., Jeong H.J., Kim J.H., Kim M.Y., Park J.Y. et al. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL(pro) inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18: 7040–7047 (doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.035)
- 77 Colunga Biancatelli R.M.L., Berrill M., Catravas J.D., Marik P.E. Quercetin and vitamin C: An experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1451(doi: 10.3389/fimmu.2020.01451)

78 Chen L., Li J., Luo C., Liu H., Xu W. et al. Binding interaction of quercetin-3-beta-galactoside and its synthetic derivatives with SARS-CoV 3CL(pro): Structure-activity relationship studies reveal salient pharmacophore features. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14(24): 8295–8306 (doi: 10.1016/j.bmc.2006.09.014)

79 Goc A., Niedzwiecki A., Ivanov V., Ivanova S., Rath M. Inhibitory effects of specific combination of natural compounds against SARS-CoV-2 and its Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa, and Mu variants. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2022, 11(4): 87–94 (doi: 10.1556/1886.2021.00022)

80 Zhang D.H., Wu K.L., Zhang X., Deng S.Q., Peng B. In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. *Journal of Integrative Medicine*, 2020, 18(2): 152–158 (doi: 10.1016/j.joim.2020.02.005)

81 Mishra P., Sohrab S., Mishra S.K. A review on the phytochemical and pharmacological properties of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 7(1): 1–11 (doi: 10.1186/s43094-021-00219-1)

82 Garcia S. Pandemics and traditional plant-based remedies. A historical-botanical review in the era of COVID-19. *Front Plant Sci.*, 2020, 11: 571042 (doi: 10.3389/fpls.2020.571042)

83 Gubareva L., Mohan T. Antivirals targeting the neuraminidase. In: *Additional Perspectives on Influenza: The Cutting Edge* Neumann G. and Yoshihiro Kawaoka Y. (ed.), 2020, Cold Spring Harbor Laboratory Press (doi: 10.1101/cshperspect.a038455)

84 Bantia S., Parker C.D., Ananth S.L., Horn L.L., Andries K. et al. Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of oseltamivir and zanamivir. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45(4): 1162–1167 (doi: 10.1128/AAC.45.4.1162-1167.2001)

85 Lloren K.K., Kwon J.J., Choi W.S., Jeong J.H., Ahn S.J. et al. In vitro and in vivo characterization of novel neuraminidase substitutions in influenza A(H1N1)pdm09 virus identified using laninamivir-mediated in vitro selection. *J. Virol.*, 2019, 93(6): e01825–18 (doi: 10.1128/JVI.01825-18)

86 Theisen L.L., Muller C.P. EPs®7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 2012, 94(2): 147–56 (doi: 10.1016/j.antiviral.2012.03.006)

87 Theisen L.L., Erdelmeier C.A., Spoden G.A., Boukhallouk F., Sausy A., Florin L. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: Characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. *PLoS One*, 2014, 9(1): e88062 (doi: 10.1371/journal.pone.0088062)

88 Döring K., Langeder J., Duwe S., Tahir A., Grienke U., Rollinger J.M. et al. Insights into the direct anti-influenza virus mode of action of *Rhodiola rosea*. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153895 (doi: 10.1016/j.phymed.2021.153895)

89 Turmagambetova A., Sokolova N., Zaitceva I., Alexyuk M., Bogoyavlenskiy A., Berezin V. Essential oils as antiviral preparations. *Journal of Biotechnology*, 2015, 208: S93 (doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.291)

90 Alekseyuk P.G., Moldakhanov E.S., Akanova K.S., Anarkulova E.I., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Standardization of saponin-containing preparations with antiviral activity. *International Journal of Applied and Basic Research* (Russia), 2014, 6: 80–81.

91 Богоявленский А.П., Адекенов С.М., Березин В.Э. Сравнительное изучение вирусингибирующей активности некоторых кумаринов на модели вируса гриппа. *Доклады НАН РК*, 2014, 2: 57–62.

92 Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alekseyuk P.G., Alekseyuk M.S., Sokolova N.S., Omirtaeva E.S., Zaitseva I.A., Berezin V.E. Phenolic acids of plant origin as a promising source for the development of antiviral agents. *Medicine*, 2019, 7-8(205-206): 65-76 (doi: 10.31082/1728-452X-2019-205-206-7-8-65-76)

93 Turmagambetova A.S., Sokolova N.S., Alekseyuk M.S., Anarkulova E.I., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Influence of polyphenolic drugs on different subtypes of influenza A virus neuraminidase. *Basic Research* (Russia), 2015, 2(20): 4430–4434.

94 Жанымханова П.Ж., Тойгамбекова Н.Н., Есмаганбетова А.М., Турмагамбетова А.С., Турысбаева А.Ш., Алексюк М.С., Бабенко А.С., Байсаров Г., Мукушева Г.К., Богоявленский А.П., Березин В.Э., Адекенов С.М. Изучение противовирусной активности некоторых флавоноидов и их производных. *Доклады НАН РК*, 2015, 3: 179–184.

95 Турмагамбетова А.С., Аканова К.С., Алексюк П.Г., Богоявленский А.П., Соколова Н.С., Алексюк М.С., Омиртаева Э.С., Зайцева И.А., Молдаханов Е.С., Анаркулова Э.И., Жуманов Ж.Ж.,

- Березин В.Э. Противовирусные свойства растительного препарата ВФ-3. *Микробиология және вирусология*, 2018, 3(22): 67-74.
- 96 Соколова Н.С., Турмагамбетова А.С., Алексюк М.С., Зайцева И.А., Алексюк П.Г., Богоявленский А.П., Березин В.Э. Сравнительное изучение антивирусной активности изофлавонов сои гинестина и дайдзеина. *Известия НАН РК, сер. биол., мед.*, 2014, 2: 113-117.
- 97 Турмагамбетова А.С., Омиртаева Е.С., Алексюк М.С., Богоявленский А.П., Березин В.Э. Оценка терапевтической и профилактической активности нового антивирусного препарата растительного происхождения "Флавовир" in vitro и in vivo. *Известия НАН РК, сер. биол., мед.*, 2016, 3: 118-126.
- 98 Турмагамбетова А.С., Богоявленский А.П., Соколова Н.С., Омиртаева Э.С., Березин В.Э. Противовирусные свойства мангустина и гартанина. *Новости науки Казахстана*, 2020, 4(147): 41-51.
- 99 Bogoyavlenskiy A., Turmagambetova A., Berezin V., Alexyuk P., Alexyuk M. et al. The therapeutic activity of some xanthenes in experimental influenza infection. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2021, 35(1): S65 (doi: 10.1080/13102818.2020.1871545)
- 100 Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.E. Antiviral drugs of plant origin. *Basic research (Russia)*, 2013, 6(5): 1141-1145
- 101 Uzunzhasova A.B., Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Alexyuk M.S., Sokolova N.S., Korulkin D.Yu., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Comparative study antiviral activity of quercetin and its derivatives. *European Science Review*. 2014, 2:3-7.
- 102 Alekseyuk M.S., Alekseyuk P.G., Zaitseva I.A., Sokolova N.S., Turmagambetova A.S., Korulkin D.Yu., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Study of virus-inhibiting activity of kaempferol glycosides. *Известия НАН РК, сер. биол., мед.*, 2014, 5: 41-43.
- 103 Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk M.S., Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Omirtaeva E.S., Berezin V.E. Adjuvant activity of multi-molecular complexes based on Glycyrrhiza glabra saponins, lipids and influenza virus glycoproteins. *Archives of Virology*, 2019, 164(7): 1793-1803 (doi: 10.1007/s00705-019-04273-2)
- 104 Турмагамбетова А.С., Зайцева И.А., Омиртаева Э.С., Соколова Н.С., Богоявленский А.П., Атажанова Г.А., Мукушева Г.К., Адекенов С.М., Березин В.Э. Растительные терпеноиды, как основа создания новых противовирусных препаратов. *Новости науки Казахстана*, 2018, 137: 57-65.
- 105 Турмагамбетова А.С., Алексюк М.С., Богоявленский А.П., Омиртаева Э.С., Соколова Н.С., Березин В.Э. Стимуляция общего противовирусного иммунитета метоксифлавоноидами растительного происхождения. *Микробиология және вирусология*, 2018, № 3 (22), с.57-67.
- 106 Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: A medicinal plant perspective. *J.Applied Microbiology*, 2003, 95(3): 412-27 (doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x)
- 107 Musarra-Pizzo M, Pennisi R, Ben-Amor I, Mandalari G, Sciortino MT. Antiviral activity exerted by natural products against human viruses. *Viruses*, 2021, 13(5): 828 (doi: 10.3390/v13050828)
- 108 Giordano D., Facchiano A., Carbone V. Food plant secondary metabolites antiviral activity and their possible roles in SARS-CoV-2 treatment: An overview. *Molecules*, 2023, 28(6): 2470 (doi: 10.3390/molecules28062470)
- 109 Chouksey, D., Sharma, P., & Pawar, R. Biological activities and chemical constituents of *Illicium verum* hook fruits (Chinese star anise). *Der Pharmacia Sinica*, 2010, 1(3), 1-10.
- 110 Patra J.K., Das G., Bose S., Banerjee S., Vishnuprasad C.N. Rodriguez-Torres M.P., Shin H.-S. Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance. *Phytother. Res.* 2020, 34(6): 1248-1267 (doi: 10.1002/ptr.6614)
- 111 Freddy A. Bernal F.A., Coy-Barrera E. Molecular docking and multivariate analysis of xanthenes as antimicrobial and antiviral agents. *Molecules*, 2015, 20: 13165-13204 (doi: 10.3390/molecules200713165)
- 112 Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2020, 10(5): 766-88 (doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008)
- 113 Napolitano F., Xu X., Gao X. Impact of computational approaches in the fight against COVID-19: An AI guided review of 17 000 studies. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23(1): bbab456 (doi: 10.1093/bib/bbab456)

114 Pandey P., Rane J.S., Chatterjee A., Kumar A., Khan R., Prakash A., Ray S. Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: An in silico study for drug development. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2020, 22: 1–11 (doi: 10.1080/07391102.2020.1796811)

115 Muhammad S., Hira S., Al-Sehemi A.G., Abdullah H., Khan M., Irfan M., Iqbal J. Exploring the new potential antiviral constituents of *Moringa oliefera* for SARS-CoV-2 pathogenesis: An in silico molecular docking and dynamic studies. *Chem. Phys. Lett.*, 2021, 767: 138379 (doi: 10.1016/j.cplett.2021.138379)

116 Mukhtar M., Arshad M., Ahmad M., Pomerantz R., Wigdahl B., Parveen Z. Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Res.*, 2008, 131(2): 111–120 (doi: 10.1016/j.virusres.2007.09.008)

117 Ben-Shabat S., Yarmolinsky L., Porat D., Dahan A. Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. *Drug Deliv Transl Res.*, 2020, 10(2): 354–367 (doi: 10.1007/s13346-019-00691-6)

118 Thomas E., Stewart L.E., Darley B.A., Pham A.M., Esteban I., Panda S.S. Plant-based natural products and extracts: potential source to develop new antiviral drug candidates. *Molecules*, 2021, 26(20): 6197 (doi: 10.3390/molecules26206197)

119 Khakimov B., Tseng L. H., Godejohann M., Bak S., Engelsens S.B. Screening for triterpenoid saponins in plants using hyphenated analytical platforms. *Molecules*, 2016, 21(12): 1614 (doi: 10.3390/molecules21121614)

120 Bucar F., Wubea A., Schmid M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Nat. Prod. Rep.*, 2013, 30: 525–545. |

121 Jorge T.F., Mata A.T., António C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.*, 2016, 28, 374(2079): 20150370 (doi: 10.1098/rsta.2015.0370)

В.Э.БЕРЕЗИН¹, А.П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ¹, П.Г. АЛЕКСЮК¹,

М.С. АЛЕКСЮК¹, А. АЗИЗАН², И.А. ЗАЙЦЕВА¹, Е.С. ОМИРТАЕВА^{1*}

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

²Туро университеті, Невада, АҚШ

*e-mail: omirel@mail.ru

ӨСІМДІК ТЕКТІ БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІ ҚОСЫЛЫСТАР ТҰМАУМЕН ЖӘНЕ COVID-19-БЕН КҮРЕСУГЕ АРНАЛҒАН ВИРУСҚА ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ӘЛЕУЕТТІ КӨЗІ РЕТІНДЕ

Түйін

Тұмау және COVID-19 адам денсаулығына үлкен зиян тигізетін және экономикаға айтарлықтай зақым келтіретін кең таралған жұқпалы аурулардың бірі болып табылады. Қазіргі уақытта тұмаумен және COVID-19-бен күресуге арналғ вирусқа қарсы препараттардың әлеуетті көзі ретінде вирусқа қарсы препараттардың әлеуетті көзі ретінде вирусқа қарсы препараттардың әлеуетті көзі ретінде ан дәрі-дәрмектердің түрлері өте шектеулі және олардың тиімділігі көбінесе жеткіліксіз, бұл антивирустық терапияның мүмкіндіктерін айтарлықтай төмендетеді. Вирустық инфекцияның дамуын тежейтін арнайы вирусқа қарсы препараттардың жетіспеушілігі науқастарды емдеуді қиындатып қана қоймайды, сонымен қатар аурудың ауыр түрімен ауыратын науқастардың өмір сүру мүмкіндігін азайтады және жалпы осы жаппай респираторлық вирустық инфекциялармен күресу тиімділігін төмендетеді. Сондықтан, тұмауға және COVID-19-ға қарсы тиімді жаңа вирусқа қарсы препараттарды әзірлеу үлкен ғылыми, медициналық және әлеуметтік-экономикалық маңызы бар өте өзекті мәселе болып табылады. Шолуда тұмау мен COVID-19-дың терапиясы мен алдын алудың тиімді дәрілік заттарын жасау үшін өсімдік текті биологиялық белсенді қосылыстар негізінде вирусқа қарсы препараттарды әзірлеу бойынша ғылыми деректер келтірілген. Вирусқа қарсы терапияның мақсаты ретінде вирустық циклдің негізгі кезеңдері сипатталған. Өсімдік қосылыстарын қолдану арқылы вирустық инфекцияны тоқтату вирустың көбеюінің әртүрлі кезеңдерінде мүмкін екендігі көрсетілген. Антивирустық препараттарды жасаудың әлеуетті көзі ретінде өсімдіктердің биологиялық белсенді қосылыстарының әртүрлі кластары қарастырылады.

Кілтті сөздер: тұмау вирустары, коронавирустар, өсімдік сығындылары.

IRSTI: 34.25.37; 34.25.19; 34.25.39

V.E. BEREZIN¹, A.P. BOGOYAVLENSKY¹, P.G. ALEXYUK¹,
M.S. ALEXYUK¹, A. AZIZAN², I.A. ZAITSEVA¹, E.S. OMIRTAYEVA^{1*}

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

²Touro University (TUN), Nevada, USA

*e-mail: omirel@mail.ru

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF PLANT ORIGIN AS A PROMISING SOURCE OF ANTIVIRAL DRUGS TO FIGHT AGAINST INFLUENZA AND COVID-19

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.02

Abstract

Influenza and COVID-19 are among the most common infectious diseases, causing great harm to human health and significant economic damage. The range of drugs to fight influenza and COVID-19 is currently very limited, and their efficacy is often insufficient, which significantly reduces the possibilities of antiviral therapy. The insufficiency of specific antiviral drugs capable efficiently suppress viral infection not only complicates the treatment of the sick, but also reduces chances of survival in patients with a severe form of disease and, in general, reduces the effectiveness of the fight with these widespread viral infections. Therefore, development of new antiviral drugs efficient against influenza and COVID-19 is a very actual problem of great scientific, medical and socio-economic importance. The review provides scientific data on the development of antiviral drugs based on biologically active compounds of plant origin to create effective antiviral drugs for the treatment and prevention of influenza and COVID-19. The main stages of viral cycle are described as targets for antiviral therapy. It has been shown that termination of viral infection using plant compounds is possible at various stages of virus reproduction. Different classes of biologically active compounds of plant origin are considered as a potential source for creation of antiviral drugs.

Keywords: influenza viruses, coronaviruses, plant extracts.

Currently, more than two hundred viruses belonging to 25 different families are known to cause serious infections in humans and can be a source of large-scale epidemics and pandemics [1, 2]. The most dangerous of them are respiratory viruses transmitted through the air, due to the mass infection rate and the difficulty of controlling their spread. Among respiratory viruses one of the most important groups are influenza viruses and the recently emerged Sars-Cov2 coronavirus that caused COVID-19 pandemic [3-7].

The efficacy of the fight against viral infections is determined by a complex of factors, the most important of which are possibility of early diagnostics of pathogen, availability of reliable means of vaccination, availability of efficient antiviral drugs and possibility for organization of strong quarantine measures when dangerous and rapidly spreading viruses are appeared. How important to use a combination of these approaches was clearly shown the experience of combating against influenza and COVID-19 epidemics and pandemics.

At the first, pre-epidemic stage, quarantine measures in combination with the use of modern methods of pathogen diagnostics based on molecular analysis are of the greatest importance [8, 9]. Such methods (PCR, RT-PCR, sequencing analysis) make it possible to quickly and reliably identify the virus, which makes it possible to quickly select the appropriate vaccine preparation, and in case of its absence, start to develop a new one. Vaccination is the first barrier in the fight against the spread of viral infections, especially those of a massive nature. Creation of an individual immune barrier and the sufficient immune layer in the population (population immunity) makes it possible to stop, or at least limit the spread of a viral infection [10-13].

At the same time, with an increase in the incidence of viral infection, etiotropic antiviral drugs, which have a direct blocking effect on viruses, begin to play a leading role. Due to the violation of certain mechanisms of virus development, such drugs are able to completely suppress

of virus infection or at least weaken the disease [14-16]. Antiviral drugs become the main means of protecting the body, in the event that infection does occur. Among the requirements for these drugs are: effective suppression of viral infection, a wide range of antiviral activity, low toxicity, good ability to penetrate into infected tissues and cells, no negative effects on the immune system, availability of the drug.

Availability of an efficient diagnostic preparations, vaccines and antiviral drugs to combat dangerous and rapidly spreading viral infections is a vital necessity. This issue is directly related to the problem of ensuring the biosecurity of the country. In the event of large-scale epidemics and pandemics, the possibility of supplying the sanitary and epidemiological service and the population with the necessary diagnostic, vaccine and medicinal preparations may be problematic. Experience shows that in the event of influenza pandemic, or in the latter case, of COVID-19 pandemic, even many industrialized countries with their own pharmaceutical production were not able to fully meet their country's needs for vaccines and therapeutic drugs, since the mass infection requires the use of extraordinary quantities of medical drugs. Those countries that do not have their own pharmaceutical industry become completely dependent on other industrialized countries and cannot promptly provide the necessary medical care to the population.

Influenza and COVID-19 are among the most common infectious diseases of our time, causing not only significant harm to human health, but also causing extremely large economic damage. The social significance of these infections is also very high. Even a common seasonal influenza virus and its associated complications cause more than 200,000 deaths per year [17]. In the case of the emergence of highly pathogenic pandemic strains of influenza, the death toll can be in the millions and tens of millions. Thus, the infamous "Spanish" flu H1N1, which raged at the beginning of the 20th century, claimed the lives of more than 50 million people, and the "Hong Kong" flu H3N2, whose pandemic was observed in the late 70s, caused the death of more than 5 million people [18,19]. In the modern period, the greatest threat is posed by new pandemic variants of the influenza virus, which can arise as a result of recombination of genes of human, animal, and avian influenza viruses, as well as the return of old highly pathogenic influenza variants to which the population no longer has immunity [20, 21]. As for coronaviruses, the SARS-CoV-2 virus, which appeared at the end of 2019 and caused the COVID-19 pandemic, in two years affected about 700 million people and caused the death of almost 7 million people [22-26]. At the same time, more aggressive forms of coronaviruses, which are even more pathogenic, are also known to science [27].

The range of specific medicines for combating influenza viruses and coronaviruses is currently very small, and their efficacy is often insufficient, which significantly reduces the possibilities of antiviral therapy. Thus, the range of anti-influenza drugs is mainly limited to drugs such as rimantadine, oseltamivir and the recently introduced drugs baloxavir and favipiravir. However, the high variability of influenza viruses quickly leads to the emergence of drug-resistant viral strains, which negatively affects the effectiveness of antiviral therapy. Most of the current epidemic strains of influenza A virus have become resistant to rimantadine and oseltamivir [28,29]. There have been reports of the emergence of resistant influenza virus strains to baloxavir, which has been used in medical practice for only three years [30,31].

Effective antiviral drugs for the etiotropic therapy of coronavirus infection have not yet been developed. Previously created anti-influenza drugs (favipiravir, balaxovir), antimalarial drug hydroxychloroquine, anti-HIV drug lopinavir, and anti-Ebola drug remdesivir were tried to treat COVID-19, but they all turned out to be ineffective [32-39]. Therefore, for the drug therapy of COVID-19, symptomatic antipyretic, anti-inflammatory and antithrombotic agents are currently mainly used, aimed at alleviating the patient's condition, but not blocking the development of viral infection.

An insufficient range or lack of effective etiotropic antiviral drugs to fight influenza and COVID-19 reduces the chances of survival in patients with severe form of disease and generally reduces the effectiveness of the fight against these massive respiratory viral infections. Therefore, development of new broad-spectrum antiviral drugs capable of blocking the reproduction of both

influenza viruses and coronaviruses is a very urgent problem of great scientific, medical, social and economic importance.

Creation of new antiviral drugs is based on two basic principles: 1) finding of biologically active compounds of natural origin that have the ability to suppress viral infection, 2) modeling and chemical synthesis of molecules that can block different stages of viral infection. Often, both directions are closely related, since the chemical synthesis of antiviral compounds is largely based on an understanding of the structure and functions of natural biologically active compounds and makes it possible to imitate natural structures or create their modified analogues.

Elaboration of antiviral drugs on the base of biologically active compounds of natural origin is becoming increasingly popular among both virologists and pharmaceutical companies producing antiviral drugs. Plants, animal tissues, and microorganism cells contain thousands of various biologically active compounds, which makes it possible to select substances with necessary properties. In addition, preparations based on natural compounds usually have a wider spectrum of action compared to synthetic ones.

One of the most promising sources for creation of antiviral drugs are biologically active compounds of plant origin, capable of blocking different stages of viral infection and efficiently suppressing the reproduction of viruses. Plants contain a rich set of diverse compounds that can directly or indirectly affect various stages of the infectious process. These are alkaloids, glycosides, terpenes, flavonoids, phenylpropanoids, coumarins, etc. [40-41]. Due to the diverse and often complex mechanisms of action on various stages of viral reproduction, such compounds are very attractive for creation of new antiviral drugs. In addition, with respect to biologically active compounds of plant origin, the emergence of drug resistance is less observed. As is well known, formation of drug-resistant viral strains is one of the main reasons leading to decrease in the effectiveness of drug therapy, especially in relation to rapidly mutating viruses. Therefore, study of natural compounds of plant origin as a source for development of antiviral agents, and creation on their base novel antiviral drugs to combat influenza and COVID-19, is a very promising area of great scientific and practical interest [42-52].

The main critical steps in the reproduction of influenza viruses and SARS-Cov-2 virus, which can block viral infection, are well known. This is the stage of attachment of viral particles to the cell receptors and penetration of virus into the host cell, the stage of viral nucleic acid replication, synthesis and processing of structural and nonstructural viral proteins, the stage of assembly, maturation, and release of viral particles from the cell [53-56]. Therefore, search and identification of compounds that can block one or more stages of virus reproduction is carried out as the first step in the development of antiviral drugs [57-58].

Interaction between virus and cell begins with the process of attachment of viral particles to the surface of host cell. Binding of viruses to the cell membrane occurs due to two main mechanisms: nonspecific adsorption of viral particles on the cell surface or due to the specific interaction of viral receptors with cell receptors. In the first case, adsorption is carried out by electrostatic interaction or on the basis of hydrophobic-hydrophilic interactions. In a specific interaction, the surface receptor of influenza virus (hemagglutinin) or the surface receptor of coronavirus (S-protein) binds to cell receptors [53,56]. Therefore, drug therapy at this stage of infection can also be divided into specific and non-specific.

Since nonspecific step of blocking of virus adsorption is primarily associated with electrostatic interactions between virus and cell, use of polyanionic compounds, such as polysulfates, polysulfonates, polycarboxylates, polyhydroxymetalates, polynucleotides and negatively charged albumins or peptides, effectively inhibits the adsorption of viruses [59-61]. Interferons and their inducers are also an important group of nonspecific inhibitors. Interferons trigger multiple secondary processes that can inhibit almost all stages of viral replication by binding to cell receptors [62].

Specific factors for blocking of virus adsorption, in addition to virus-specific antibodies, include numerous variations of receptor analogs that can "put aside" viral particle from the cell surface. It has been established that many plant agglutinating lectins are able to interact with

influenza virus hemagglutinin with high efficiency and block the stage of virus attachment to cell receptors. At the same time, mannose-binding lectins are the most active, although other lectins that have an affinity for other sugar residues also exhibit antiviral activity [63]. An equally interesting group of chemical compounds capable of blocking the adsorption of viruses are terpenoids, which, due to their structural features, by binding to membrane cholesterol, are able to change the spatial structure of the cell and virus membranes. It has been shown that presence of three sugar residues of 3-O- β -chacotriosyl in such compounds increases their antiviral activity [44, 64-66].

Another group of preparations that can block replication of influenza viruses and coronaviruses are alkaloids and polyphenolic compounds, which not only change the charge of the cell surface, but also prevent specific attachment of viral particles to receptors, and also destroy virus envelope, which leads to inability of binding to cell receptors and increases sensitivity of viral nucleocapsid to proteases and endonucleases [47,67-68]. For example, well-known flavonoid quercetin, found in many plants, is able to block penetration of influenza virus into the cell [69]. Suppression the interaction of S-protein, the external receptor of coronaviruses, with angiotensin-converting enzyme ACE2 is one of the possible mechanisms that can prevent penetration of coronaviruses, including the SARS-CoV2 virus, into the target cell [56,70]. Such blocking can be carried out by various biologically active compounds of plant origin - terpenoids, flavonoids, anthraquinones, gallic acid, quercetin, glycyrrhizin acid and a number of other compounds contained in extracts of some medicinal plants. Thus, anthraquinone emodin contained in many plants, including medicinal plants, has the ability to block interaction of spike protein of coronaviruses with ACE-2 enzyme, which also prevents penetration of SARS coronavirus into the cell [71]. Sesquiterpene lactone artemisinin, isolated from medicinal plant *Artemisia annua*, deactivated SARS-CoV-2 virus by inhibiting its S-protein [72]. Curcumin, thymoquinone, gallic acid, tannic acid, aflavin-3,3'-digallate, and some flavonoids contained in many edible and medicinal plants had a similar effect [73-75]. These compounds, or their combinations, can also be used in medical treatment of COVID.

Transcription of viral genome and assembly of virions are the most complex steps in virus reproduction. This stage is successfully blocked by inhibitors of post-translational modifications of viral proteins associated with protease transformations of polypeptide chains [34, 48]. Among the biologically active compounds capable of inhibiting protease activity are polyphenols. Polyphenolic compounds have the ability to inhibit the protease activity of a number of viral enzymes that are critical for the maturation of viral proteins, which leads to disruption in the assembly of viral particles [52, 76]. Analyzing herbal preparations capable of inhibiting the protease activity of proteins of influenza viruses and coronaviruses, it can be concluded that there is a wide variety of compounds whose mechanism of action is based on blocking areas that are critical for the activity of aspartic protease. Plant substances capable of blocking the protease activity of key viral enzymes include different compounds: terpenes, xanthenes, phenylpropanoids, and flavonoids [50-52, 58]. For example, well-known plant flavonoid quercetin exhibits antiviral properties by affecting several stages of the reproduction cycle of SARS-CoV and SARS-CoV-2 coronaviruses, including the stage of maturation of viral polyproteins, by inhibiting the proteolytic activity of 3-chymotrypsin-like protease, which is responsible for the proteolytic cleavage of viral polyproteins. [77,78]. Ellagic acid, ursolic acid, epigallocatechin gallate, curcumin have a similar effect [77,79-82].

Another target for suppressing the reproduction of viruses is the stage of virus release from the cell. Thus, for influenza virus, the activity of external viral glycoprotein neuraminidase is critical for successful virus reproduction. Due to the enzymatic activity of neuraminidase, sialic acid residues are cleaved from cell receptors, which allows newly formed viral particles to separate from the cell membrane and infect new cells. Inhibition of the enzymatic activity of neuraminidase leads to the interruption of the viral infection. A number of antiviral drugs effective against influenza virus, including well-known anti-influenza drug Oseltamivir (Tamiflu) were elaborated based on this principle [83-85]. In some plants, a number of compounds have been found that can

effectively block the action of neuraminidase and suppress reproduction of influenza viruses. It was found that prodelphinidin-enriched extract obtained from the root of *Pelargonium sidoides* plant and tannin-enriched extract obtained from the bark of *Hamamelis virginiana* plant were able to block of influenza virus neuraminidase activity and suppress viral infection [86–87]. Other plant compounds are known to have a similar effect. Thus, suppression of influenza virus neuraminidase activity was observed after treatment of tannin-enriched fraction of the root and rhizome extracts of the plant *Rhodiola rosea* [88].

Our studies also showed a pronounced antiviral effect of many biologically active compounds of plant origin. High antiviral activity of a number of essential oils [89], saponin-containing plant extracts and purified terpenes [90], coumarins [91], and phenolic acids [92] was revealed. It was shown close relationships between the structure of flavonoids, polyphenols and terpene compounds and their antiviral properties [93-96]. A pronounced antiviral activity of a number of polyphenolic compounds isolated from plants of the flora of Kazakhstan was revealed. Also, high antiviral activity of xanthenes, as well as quercetin and some of its derivatives, has been shown [97-102]. It has been established that certain triterpene and sesquiterpenes contained in many plants of the flora of Kazakhstan are able to effectively suppress human, animal and avian influenza viruses, and also have pronounced immunomodulatory properties [90, 103-105].

Thus, there is a wide variety of plant compounds that can affect the replication of influenza viruses and coronaviruses. Plants are a unique source for obtaining highly active antivirals and for elaboration on their base medical drugs for etiotropic therapy of viral infections. Plants and herbal extracts have been successfully used by mankind for thousands of years to treat a wide variety of diseases. Currently, biologically active compounds of plant origin are used to combat many viral infections, including for the treatment of influenza and coronavirus infections [50-52,82,106-108]. At the present stage, purified compounds capable of blocking the reproduction of viruses are isolated from plant extracts possessed antiviral activity, their structure analyzed using methods of physicochemical analysis, and the relationships between the structure of compound and their antiviral properties is revealed. Subsequently, such compounds can be obtained from natural sources or chemically synthesized for large-scale pharmaceutical production. An example of creation of such efficient antivirals is anti-influenza drug oseltamivir (Tamiflu), originally found in the plant star anise (*Illicium verum*), then isolated from this plant in a purified form and subsequently synthesized chemically for the purposes of pharmaceutical production [109-110].

In the process of study of natural compounds of plant origin as potential sources for creation of new antiviral drugs, several main approaches are used. At the first stage of analysis the molecular docking method is becoming increasingly popular. This method uses computer simulation which makes it possible to evaluate the possibility of steric interactions of biologically active compound with a target - cellular or viral receptor, key enzymes involved in virus reproduction, etc. Application of molecular docking method makes it possible to analyze a large number of various biologically active molecules as potential antiviral agents and select the most promising of them. At this stage of analysis, possible mechanisms of action can also be modeled, which is important for subsequent understanding of mechanisms of interaction of investigated compound with virus or cell. Computer analysis makes it possible significantly simplify and reduce the cost of primary screening of compounds, but cannot replace their experimental study. Subsequently, in accordance with the performed computer analysis, selection of promising plant sources containing substances with potential antiviral activity is carried out for their further experimental study [75, 108, 111-115].

At the second stage, screening studies of plants with a high content of compounds that potentially have antiviral activity (flavonoids, terpenoids, coumarins, phenolic acids, essential oils, etc.) are carried out. Further, a detailed analysis of selected plant materials is carried out in order to isolate purified biologically active compounds that have necessary antiviral properties. To obtain purified biologically active compounds from plant tissues, differential extraction methods by various solvents are used, as well as chromatographic separation methods, among which the most popular method is high-performance liquid chromatography (HPLC), which allows

fractionation of complex mixtures with high resolution. Further, spectrum of antiviral activity of obtained compounds, the mechanisms of their action and the structure of selected compounds are studied. Knowledge of detailed structure of isolated biologically active compound with antiviral activity can subsequently be used for targeted chemical synthesis of this compound. Study the composition and the structure of obtained biologically active compounds is carried out using modern physical and chemical research methods: mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, atomic absorption spectroscopy, etc. [116-121].

Conclusion

Availability of efficient and affordable antiviral drugs is one of the main conditions for successful fight against epidemics and pandemics of viral nature. Along with vaccines, designed to provide the first barrier to prevent the spread of dangerous viruses, antiviral drugs are needed both for treatment and prevention of viral infections, especially in cases where vaccination due to various reasons is not available or is not effective enough.

Among the most dangerous and widespread viruses are influenza viruses and coronaviruses, which have been the source of at least seven pandemics over the past 100 years, affecting several billion people and claiming the lives of more than 130 million people. The respiratory mechanism of transmission of these viruses makes their control extremely difficult, especially in today's society, where high population density and developed transport infrastructure contribute to the rapid spread of infection. For drug therapy of patients, application of efficient antivirals that can block development of viral infection is required. Currently, the range of specific drugs for combating influenza viruses and coronaviruses is very small, and their efficacy is often insufficient, which significantly limits the possibilities of antiviral therapy.

Biologically active compounds of plant origin are one of the most promising sources for creation of new antiviral drugs effective against various viruses, including influenza viruses and coronaviruses. Plants contain a rich set of diverse compounds that can directly or indirectly affect various stages of the infectious process. These are alkaloids, glycosides, terpenes, flavonoids, phenylpropanoids, coumarins, organic acids, esters, etc. Due to the ability to influence on different stages of viral infection, such compounds can have a complex effect and effectively suppress not only the reproduction of virus inside the cell, but also its spread in the body, which makes it possible to block the infection in a short time. Therefore, such compounds are very attractive as a source for creation of new antiviral drugs. In addition, relatively to biologically active compounds of plant origin, the emergence of drug resistance less observed. It is very important point, because quick formation of drug-resistant viral strains is one of the main reasons for decrease in the effectiveness of drug therapy, especially with respect to rapidly mutating viruses, such as influenza viruses and coronaviruses.

Thus, investigation of natural compounds of plant origin as a reach source for development of new antivirals against various viral infections, including medical drugs to combat influenza and COVID-19, is a very promising area of great scientific and practical interest. Currently, this direction is becoming increasingly popular among both virologists and pharmaceutical companies producing antiviral drugs.

Funding

The work was carried out in the frame and with financial support of the Scientific-technical program of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan №BR10965178 "Development of original domestic drugs with antiviral activity efficient against COVID-19 and influenza".

References:

1 Evans A.S., Kaslow R.A. eds. *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*. 4th edn. Plenum Medical Book Company; New York: 1997.

- 2 Murphy F.A. *Epidemiology of viral diseases. Encyclopedia of Virology*, 1999, 482–487 (doi: 10.1006/rwvi.1999.0085)
- 3 Boncristiani H.F. Respiratory Viruses. *PMC NCBI, Encyclopedia of Microbiology*, 2009, 500–518, PMID: PMC7149556 (doi: 10.1016/B978-012373944-5.00314-X)
- 4 Webster RG. Influenza: An Emerging Disease. *Emerg Infect Dis.*, 1998, 4: 436–441.
- 5 Shereen M.A., Khan S., Kazmi A., Bashir N. Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 2020, 24: 91-98 (doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005)
- 6 Bonilla-Aldana D.K., Holguin-Rivera Y., Cortes-Bonilla I., Cardona-Trujillo M.C., Rodriguez-Morales A.J. Coronavirus infections reported by ProMED, February 2000–January 2020. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2020, 35: 101575 (doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101575)
- 7 Yang Y., Peng F., Wang R., Guan K., Chang C. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *Journal of Autoimmunity*, 2020, 109: 102434 (doi: 10.1016/j.jaut.2020.102434)
- 8 Vos L.M., Bruning A.H.L., Reitsma J.B., et al. Rapid molecular tests for influenza, respiratory syncytial virus, and other respiratory viruses: a systematic review of diagnostic accuracy and clinical impact studies. *Clin Infect Dis.*, 2019, 69(7): 1243-1253 (doi: 10.1093/cid/ciz056)
- 9 Zimmerman P.A., King C.L., Ghannoum M., Bonomo R.A., Procop G.W. Molecular Diagnosis of SARS-CoV-2: Assessing and Interpreting Nucleic Acid and Antigen Tests. *Pathog Immun.*, 2021, 6(1): 135–156 (doi: 10.20411/pai.v6i1.422)
10. Chan L., Alizadeh K., Fazel F., Kakish J.E., Karimi N. et al. Review of Influenza Virus Vaccines: The Qualitative Nature of Immune Responses to Infection and Vaccination Is a Critical Consideration. *Vaccines*, 2021, 9(9): 979-997 (doi: 10.3390/vaccines9090979)
- 11 Nypaver C., Dehlinger C., Carter C. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. *J.MidwiferyWomensHealth*, 2021, 66(1): 45-53 (doi: 10.1111/jmwh.13203)
- 12 Zhang Z., Shen Q., Chang H. Vaccines for COVID-19: A Systematic Review of Immunogenicity, Current Development, and Future Prospects. *Front. Immunol.*, 2022, 13 (doi: 10.3389/fimmu.2022.843928)
- 13 Khandker S.S., Godman B., Jawad M.I., Meghla B.A., Tisha T.A. et. al. A Systematic Review on COVID-19 Vaccine Strategies, Their Effectiveness, and Issues. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1387 (doi: 10.3390/vaccines9121387)
- 14 Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.E. Levels of Antiviral Therapy. *J. Human Virology & Retrovirology*, 2016, 3(3):1-6 (doi: 10.15406/jhvr.2016.03.00093)
- 15 Kausar S., Khan F.S., Mujeeb M.I., Rehman U., Akram M. et.al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2021, 35: 20587384211002621 (doi: 10.1177/20587384211002621)
- 16 Jen H.H., Chang, W.J. Lin T.Y., Hsu C.Y., Amy Ming-Fang Yen A.M.-F., Lai C.C., Chen T. H.-H. Evaluating Clinical Efficacy of Antiviral Therapy for COVID-19: A Surrogate Endpoint Approach. *Infectious Diseases and Therapy*, 2021, 10: 815–825 (doi: 10.1007/s40121-021-00431-9)
- 17 Chowell G., Echevarría-Zuno S., Viboud C., Simonsen L., Tamerius J., Miller V.A., Borja-Aburto V.H. Characterizing the epidemiology of the 2009 influenza A/H1N1 pandemic in Mexico. *PLoS Med.*, 2011, 8(5): e1000436. (doi: 10.1371/journal.pmed.1000436)
- 18 Khanna M., Saxena L., Gupta A., Roopali K. “Influenza Pandemics of 1918 and 2009” . *Future Virology*. 2013, 8 (4): 335-342.
- 19 Taubenberger J.K., Reid A.H., Janczewski T.A., Fanning T.G. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.Sci.*, 2001, 356: 829–1839.
- 20 Smith G. J. D., Vijaykrishna D., Bahl J. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009, 459(7250): 1122–1125.
- 21 Nelson M., Gramer M., Vincent A. and Holmes E.C. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *Journal of General Virology*, 2012, 93(10): 2195–2203.
- 22 Wang L.S., Wang Y.R., Ye D.W., Liu Q.Q. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Inter. J. of Antimicrobial Agents*. 2020, (doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105948)
- 23 Wu Y.C., Chen C.C., Chan Y.J. The outbreak of COVID-19: An overview. *J Chin Med Assoc*. 2020, 83(3): 217-220 (doi: 10.1097/JCMA.0000000000000270)

- 24 Majumdar A., Malviya N., Alok S. An overview on COVID-19 outbreak: Epidemic to pandemic. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2020, 11(5):1958-1968 (doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).1958-68)
- 25 Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19: 141–154 (doi: 10.1038/s41579-020-00459-7)
- 26 Covid-19 coronavirus pandemic. *Worldometer*. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>.
- 27 Li H., Hu C.Y., Wu N.P., Yao H.P., Li L.J. Molecular characteristics, functions, and related pathogenicity of MERS-CoV proteins. *Engineering*, 2019, 5(5): 940-947 (doi: 10.1016/j.eng.2018.11.035)
- 28 Hussain M., Galvin H.D., Haw T.Y., Nutsford A.N., Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist.*, 2017, 10:121–134 (doi: 10.2147/IDR.S105473)
- 29 Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2020, 39(7): 1201–1208 (doi: 10.1007/s10096-020-03840-9)
- 30 Noshi T., Kitano M., Taniguchi K., Yamamoto A., Omoto Sh., Baba K., Hashimoto T., Ishida K., Kushima Y., Hattori K., Kawai M., Yoshida R., Kobayashi M., Yoshinaga T., Sato A., Okamatsu M., Sakoda Y., Kida H., Shishido T., Naito A. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.*, 2018, 160: 109–117 (doi: 10.1016/j.antiviral.2018.10.008)
- 31 Gubareva L.V., Fry A.M. Baloxavir and Treatment-Emergent Resistance: Public Health Insights and Next Steps. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020, 221(3): 337–339 (doi: 10.1093/infdis/jiz245)
- 32 Eastman R.T., Roth J.S., Brimacombe K.R., Simeonov A., Shen M., Patnaik S., Hall M.D. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent. Sci.*, 2020, 6(5): 672-683 (doi: 10.1021/acscentsci.0c00489)
- 33 Wang Y., Zhang D., Du G., et.al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Lancet*, 2020, 395: 1569–1578 (doi: 10.1016/S0140-6736(20)31022-9)
- 34 Furuta Y., Komeno T., Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad-spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 2017, 93(7): 449-463 (doi:10.2183/pjab.93.027).
- 35 Delang L., Abdelnabi R., Neyts J. Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral Res.*, 2018, 153: 85-94. (doi: 10.1016/j.antiviral.2018.03.003)
- 36 Chandwani A., Shuter J. Lopinavir/ritonavir in the treatment of HIV-1 infection: a review. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2008, 4(5): 1023-1033 (doi: 10.2147/tcrm.s3285)
- 37 Cortegiani A., Ingoglia G., Ippolito M., Giarratano A., Einav S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *Journal of Critical Care.*, 2020, 57: 279–283 (doi: 10.1016/j.jcrrc.2020.03.005)
- 38 Costedoat-Chalumeau N., Dunogué B., Leroux G. et al. A Critical Review of the Effects of Hydroxychloroquine and Chloroquine on the Eye. *Clinic Rev. Allerg. Immunol.*, 2015, 49: 317–326 (doi.org/10.1007/s12016-015-8469-8)
- 39 Tang D., Li J., Zhang R., Kang R., Klionsky D.J. Chloroquine in fighting COVID-19: good, bad, or both? *Autophagy*. 2020; 16(12): 2273–2275 (doi: 10.1080/15548627.2020.1796014)
- 40 Berdimuratova G.D., Muzychkina R.A., Korulkin D.Yu., Abilov Zh.A., Tulegenova A.U. *Biologically active substances of plants. Isolation, division, analysis*, 2006, Almaty: Atamura, 438 p.
- 41 Zhao Y., Wu Y., Wang M. Bioactive Substances of Plant Origin. *Handbook of Food Chemistry*, Cheung, P., Mehta, B. (eds), 2015, Springer: 967–1008 (doi: 10.1007/978-3-642-36605-5_13)
- 42 Worthley D. L., Bardy P. G., Mullighan C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal. Medicine Journal*, 2005, 35 (9): 548-555 (doi: 10.1111/j.1445-5994.2005.00908.x)
- 43 Ludwig S., Ehrhardt C., Hrinčius E.R., Korte V., Mazur I., Droebner K., Poetter A., Dreschers S., Schmolke M., Planz O. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.*, 2007, 76: 38-47.
- 44 Li Y., Jiang R., Ooi L. S. M., But P. P. H. Ooi V.E.C. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla*. *Phytotherapy Research*, 2007, 5: 466-470 (doi: 10.1002/ptr.1962)
- 45 Sawai R., Kuroda K., Shibata T., Gomyou R., Osawa K., Shimizu K. Anti- influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis*. *J. Ethnopharmacol.*, 2008, 118: 108-112 (doi: 10.1016/j.jep.2008.03.013)
- 46 Hudson J.B. The use of herbal extracts in the control of influenza. *J. Med. Plants. Res.*, 2009, 3: 1189-1194.

- 47 Musarra-Pizzo M., Ginestra G., Smeriglio A. et al. The Antimicrobial and Antiviral activity of polyphenols from almond (*Prunus dulcis* L.) skin. *Nutrients*. 2019, 11(10): 2355 (doi: 10.3390/nu11102355)
- 48 Chang K.O., Kim Y., Lovell S., Rathnayake A.D., Groutas W.C. Antiviral Drug Discovery: Norovirus Proteases and Development of Inhibitors. *Viruses*, 2019, 11(2): 197 (doi: 10.3390/v11020197).
- 49 Subedi L., Tchen S., Prasad Gaire B., Hu B. and Hu K. Adjunctive nutraceutical therapies for COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22: 1963 (doi: 10.3390/ijms22041963)
- 50 Berezin V., Bogoyavlenskiy A., Alexyuk M., Alexyuk P. Plant metabolites as antiviral preparations against coronaviruses. *J. Medicinal Food*, 2021, 24(10): 1028-1038 (doi: 10.1089/jmf.2020.0190)
- 51 Ali S., Alam V., Khatoon F., Fatima U., Elaslali A.E., Mohd Adnan M., Islam A., Hassan I., Snoussi M., De Feo V. Natural products can be used in therapeutic management of COVID-19: Probable mechanistic insights. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 147: 112658 (doi: 10.1016/j.biopha.2022.112658)
- 52 Dushenkov V., Dushenkov A. Botanicals as prospective agents against SARS-COV-2 virus. *Paemi Sino.*, 2022, 24(1): 113–122 (doi: 10.25005/2074-0581-2022-24-1-113-122)
- 53 Dou D., Revol R., Östbye H., Wang H., Daniels R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front. Immunol. Sec. Microbial Immunology*, 2018, 9: 1581 (doi: 10.3389/fimmu.2018.01581)
- 54 Loregian A., Mercorelli B., Nannetti G., Compagnin C., Palù G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 2014, 71: 3659–3683.
55. Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Bonilla H., Jagannathan P., Shafer R.W. SARS-CoV-2 antiviral therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 2021, 34(4): 109–121 (doi: 10.1128/CMR.00109-21)
- 56 Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(1): 3–20 (doi: 10.1038/s41580-021-00418-x)
- 57 Kausar S., Said Khan F.S., Malik A. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2021, 35: 20587384211002621 (doi: 10.1177/20587384211002621)
- 58 Kumari R., Sharma S.D., Kumar A., Ende Z., Mishina M., Wang Y., Falls Z., Samudrala R., Pohl J., Knight P.R. Antiviral Approaches against Influenza Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 2023, 36(1): e0004022 (doi: 10.1128/cmr.00040-22)
- 59 Bergstrom D.E., Lin X., Wood T.D., Witvrouw M., Ikeda S., et al. Polysulfonates derived from metal thiolate complexes as inhibitors of HIV–1 and various other enveloped viruses in vitro. *Antivir Chem Chemother.*, 2002, 13(3): 185–195 (doi: 10.1177/095632020201300305)
- 60 Sepúlveda–Crespo D., Gómez R., De La Mata F.J., Jiménez J.L., Muñoz-Fernández M.A. Polyanionic carboxylate dendrimer–conjugated antiviral drugs as efficient microbicides: Recent trends and developments in HIV treatment/therapy. *Nanomedicine*, 2015, 11(6): 1481–1498 (doi: 10.1016/j.nano.2015.03.008)
- 61 Tan S., Lu L., Li L., Liu J., Oksovet Y. et al. Polyanionic candidate microbicides accelerate the formation of semen–derived amyloid fibrils to enhance HIV–1 infection. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59777 (doi: 10.1371/journal.pone.0059777)
- 62 Loginova S.Y., Kovalchuk A.V., Borisevich S.V., Syromiatnikova S.I., Boriseviche G.V. et al. Antiviral activity of an interferon inducer amixin in experimental West Nile Fever. *Vopr Virusol.*, 2004, 49(2): 8–11.
- 63 Worthley D. L., Bardy P. G., Mullighan C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal*, 2005, 35 (9): 548-555 (doi: 10.1111/j.1445-5994.2005.00908.x)
- 64 Xiao S., Si L., Tian Z., Fan Z., Meng K. et al. Pentacyclic triterpenes grafted on CD cores to interfere with influenza virus entry: A dramatic multivalent effect. *Biomaterials*, 2016, 78:74–85 (doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.034)
- 65 Darshani P., Sarma S.S., Srivastava A.K., Baishya R., Kumar D. Anti-viral triterpenes: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2022, 21: 1761–1842 (doi: 10.1007/s11101-022-09808-1)
- 66 Li H., Cheng C., Shi S., Wu Y., Gao Y. et al. Identification, optimization, and biological evaluation of 3-O- β -chacotriosyl ursolic acid derivatives as novel SARS-CoV-2 entry inhibitors by targeting the prefusion state of spike protein. *Eur J Med Chem*. 2022, 238: 114426 (doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114426)

- 67 Majnooni M.B., Fakhri S., Bahrami G., Naseri M., Farzaei M.H., Echeverría J. Alkaloids as Potential Phytochemicals against SARS-CoV-2: Approaches to the Associated Pivotal Mechanisms. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2021, 2021: 6632623 (doi: 10.1155/2021/6632623)
- 68 Kim D.E., Min J.S., Jang M.S., Lee J.Y., Shin Y.S. et al. Natural bis-benzylisoquinoline alkaloids tetrandrine, fangchinoline and cepharanthine inhibit human coronavirus OC43 infection of MRC5 human lung cells. *Biomolecules.* 2019, 9(11): 696 (doi: 10.3390/biom9110696)
- 69 Li W.R., Li X., He J., Jiang S., Liu S., Yang J. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. *Viruses*, 2016, 8(1): 6 (doi: org/10.3390/v8010006)
- 70 Shang J., Wan Y., Luo C., Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *PNAS.* 2020, 117(21): 11727-11734 (doi: 10.1073/pnas.2003138117)
- 71 Ho T.Y., Wu S.L., Chen J.C. et al. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res.*, 2007, 74(2): 92–101 (doi: 10.1016/j.antiviral.2006.04.014.)
- 72 Rolta R., Salaria D., Sharma P., Sharma B., Kumar V., Rathi B., et al. Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* inhibit spike protein of SARS-CoV-2 binding to ACE2 receptor: In silico approach. *Current Pharmacology Reports*, 2021, 7(4): 135–149 (doi: 10.1007/s40495-021-00259-4)
- 73 Goc A., Sumera W., Rath M., Niedzwiecki A. Phenolic compounds disrupt spike-mediated receptor-binding and entry of SARS-CoV-2 pseudo-virions. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0253489 (doi:10.1371/journal.pone.0253489)
- 74 Xu H., Liu B., Xiao Z., Zhou M., Ge L., Jia F. et al. Computational and experimental studies reveal that thymoquinone blocks the entry of coronaviruses into in vitro cells. *Infectious Diseases and Therapy*, 2021, 10(1): 483–94 (doi: 10.1007/s40121-021-00400-2)
- 75 Bogoyavlenskiy A., Alexyuk M., Alexyuk P., Berezin V., Almalki F.A. et al. Computer analysis of the inhibition of ACE2 by flavonoids and identification of their potential antiviral pharmacophore Site. *Molecules*, 2023, 28(9): 3766 (doi: 10.3390/molecules28093766)
- 76 Ryu Y.B., Jeong H.J., Kim J.H., Kim M.Y., Park J.Y. et al. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL(pro) inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18: 7040–7047 (doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.035)
- 77 Colunga Biancatelli R.M.L., Berrill M., Catravas J.D., Marik P.E. Quercetin and vitamin C: An experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1451 (doi: 10.3389/fimmu.2020.01451)
- 78 Chen L., Li J., Luo C., Liu H., Xu W. et al. Binding interaction of quercetin-3-beta-galactoside and its synthetic derivatives with SARS-CoV 3CL(pro): Structure-activity relationship studies reveal salient pharmacophore features. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14(24): 8295–8306 (doi: 10.1016/j.bmc.2006.09.014)
- 79 Goc A., Niedzwiecki A., Ivanov V., Ivanova S., Rath M. Inhibitory effects of specific combination of natural compounds against SARS-CoV-2 and its Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa, and Mu variants. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2022, 11(4): 87–94 (doi: 10.1556/1886.2021.00022)
- 80 Zhang D.H., Wu K.L., Zhang X., Deng S.Q., Peng B. In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. *Journal of Integrative Medicine*, 2020, 18(2): 152–158 (doi: 10.1016/j.joim.2020.02.005)
- 81 Mishra P., Sohrab S., Mishra S.K. A review on the phytochemical and pharmacological properties of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 7(1): 1–11 (doi: 10.1186/s43094-021-00219-1)
- 82 Garcia S. Pandemics and traditional plant-based remedies. A historicalbotanical review in the era of COVID19. *Front Plant Sci.*, 2020, 11: 571042 (doi: 10.3389/fpls.2020.571042)
- 83 Gubareva L., Mohan T. Antivirals targeting the neuraminidase. In: *Additional Perspectives on Influenza: The Cutting Edge* Neumann G. and Yoshihiro Kawaoka Y. (ed.), 2020, Cold Spring Harbor Laboratory Press (doi: 10.1101/cshperspect.a038455)
- 84 Bantia S., Parker C.D., Ananth S.L., Horn L.L., Andries K. et al. Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of oseltamivir and zanamivir. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45(4): 1162-1167 (doi: 10.1128/AAC.45.4.1162-1167.2001)
- 85 Lloren K.K., Kwon J.J., Choi W.S., Jeong J.H., Ahn S.J. et al. In vitro and in vivo characterization of novel neuraminidase substitutions in influenza A(H1N1)pdm09 virus identified using laninamivir-mediated in vitro selection. *J. Virol.*, 2019, 93(6): e01825-18 (doi: 10.1128/JVI.01825-18)

86 Theisen L.L., Muller C.P. EPs®7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 2012, 94(2): 147–56 (doi: 10.1016/j.antiviral.2012.03.006)

87 Theisen L.L., Erdelmeier C.A., Spoden G.A., Boukhallouk F., Sausy A., Florin L. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: Characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. *PloS One*, 2014, 9(1): e88062 (doi: 10.1371/journal.pone.0088062)

88 Döring K., Langeder J., Duwe S., Tahir A., Grienke U., Rollinger J.M. et al. Insights into the direct anti-influenza virus mode of action of *Rhodiola rosea*. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153895 (doi: 10.1016/j.phymed.2021.153895)

89 Turmagambetova A., Sokolova N., Zaitseva I., Alexyuk M., Bogoyavlenskiy A., Berezin V. Essential oils as antiviral preparations. *Journal of Biotechnology*, 2015, 208: S93 (doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.291)

90 Aleksyuk P.G., Moldakhanov E.S., Akanova K.S., Anarkulova E.I., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Standardization of saponin-containing preparations with antiviral activity. *International Journal of Applied and Basic Research* (Russia), 2014, 6: 80-81.

91 Bogoyavlenskiy A.P., Adekenov S.M., Berezin V.E. Sravnitel'noe izuchenie virusingibiruyushchej aktivnosti nekotoryh kumarinov na modeli virusa grippa. *Doklady NAN RK*, 2014, 2: 57-62.

92 Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Aleksyuk P.G., Aleksyuk M.S., Sokolova N.S., Omirtaeva E.S., Zaitseva I.A., Berezin V.E. Phenolic acids of plant origin as a promising source for the development of antiviral agents. *Medicine*, 2019, 7-8(205-206): 65-76 (doi: 10.31082/1728-452X-2019-205-206-7-8-65-76)

93 Turmagambetova A.S., Sokolova N.S., Aleksyuk M.S., Anarkulova E.I., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Influence of polyphenolic drugs on different subtypes of influenza A virus neuraminidase. *Basic Research* (Russia), 2015, 2(20): 4430-4434.

94 Zhanymkhanova P.Zh., Toigambekova N.N., Esmaganbetova A.M., Turmagambetova A.S., Turysbaeva A.Sh., Aleksyuk M.S., Babenko A.S., Baisarov G., Mukusheva G.K., Bogoyavlenskii A.P., Berezin V.E., Adekenov S.M. Izuchenie protivovirusnoi aktivnosti nekotorykh flavonoidov i ikh proizvodnykh. *Doklady NAN RK*, 2015, 3:179-184.

95 Turmagambetova A.S., Akanova K.S., Aleksyuk P.G., Bogoyavlenskii A.P., Sokolova N.S., Aleksyuk M.S., Omirtaeva E.S., Zaitseva I.A., Moldakhanov E.S., Anarkulova E.I., Zhumanov Zh.Zh., Berezin V.E. Protivovirusnye svoistva rastitelnogo preparata VF-3. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya*, 2018, 3(22): 67-74.

96 Sokolova N.S., Turmagambetova A.S., Aleksyuk M.S., Zaitseva I.A., Aleksyuk P.G., Bogoyavlenskii A.P., Berezin V.E. Sravnitel'noe izuchenie antivirusnoi aktivnosti izoflavonov soi ginestina i daidzeina. *Izvestiya NAN RK, ser. biol., med.*, 2014, 2: 113-117.

97 Turmagambetova A.S., Omirtaeva E.S., Aleksyuk M.S., Bogoyavlenskii A.P., Berezin V.E. Otsenka terapevticheskoi i profilakticheskoi aktivnosti novogo antivirusnogo preparata rastitelnogo proiskhozhdeniya "Flavovir" in vitro i in vivo. *Izvestiya NAN RK, ser. biol., med.*, 2016, 3: 118-126.

98 Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskii A.P., Sokolova N.S., Omirtaeva E.S., Berezin V.E. Protivovirusnye svoistva mangustina i gartanina. *Novosti nauki Kazakhstana*, 2020, 4(147): 41-51.

99 Bogoyavlenskiy A., Turmagambetova A., Berezin V., Alexyuk P., Alexyuk M. et al. The therapeutic activity of some xanthones in experimental influenza infection. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2021, 35(1): S65 (doi: 10.1080/13102818.2020.1871545)

100. Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.E. Antiviral drugs of plant origin. *Basic research* (Russia), 2013, 6(5): 1141-1145

101 Uzunzhasova A.B., Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Alexyuk M.S., Sokolova N.S., Korulkin D.Yu., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Comparative study antiviral activity of quercetin and its derivatives. *European Science Review*. 2014, 2:3-7.

102 Aleksyuk M.S., Aleksyuk P.G., Zaitseva I.A., Sokolova N.S., Turmagambetova A.S., Korulkin D.Yu., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. Study of virus-inhibiting activity of kaempferol glycosides. *News of NAS RK, ser. biol., med.*, 2014, 5: 41-43.

103 Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk M.S., Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Omirtaeva E.S., Berezin V.E. Adjuvant activity of multi-molecular complexes based on *Glycyrrhiza glabra*

saponins, lipids and influenza virus glycoproteins. *Archives of Virology*, 2019, 164(7): 1793-1803 (doi: 10.1007/s00705-019-04273-2)

104 Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Omirtaeva E.S., Sokolova N.S., Bogoyavlenskii A.P., Atazhanova G.A., Mukusheva G.K., Adekenov S.M., Berezin V.E. Rastitelnye terpenoidy, kak osnova sozdaniya novykh protivovirusnykh preparatov. *Novosti nauki Kazakhstana*, 2018, 137: 57-65.

105 Turmagambetova A.S., Aleksyuk M.S., Bogoyavlenskii A.P., Omirtaeva E.S., Sokolova N.S., Berezin V.E. Stimulyatsiya obshchego protivovirusnogo immuniteta metoksisflavonoidami rastitelnogo proiskhozhdeniya. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya*, 2018, № 3 (22), s.57-67.

106 Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: A medicinal plant perspective. *J.Applied Microbiology*, 2003, 95(3): 412–27 (doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x)

107 Musarra-Pizzo M, Pennisi R, Ben-Amor I, Mandalari G, Sciortino MT. Antiviral activity exerted by natural products against human viruses. *Viruses*, 2021, 13(5): 828 (doi: 10.3390/v13050828)

108 Giordano D., Facchiano A., Carbone V. Food plant secondary metabolites antiviral activity and their possible roles in SARS-CoV-2 treatment: An overview. *Molecules*, 2023, 28(6): 2470 (doi: 10.3390/molecules28062470)

109 Chouksey, D., Sharma, P., & Pawar, R. Biological activities and chemical constituents of *Illicium verum* hook fruits (Chinese star anise). *Der Pharmacia Sinica*, 2010, 1(3), 1–10.

110 Patra J.K., Das G., Bose S., Banerjee S., Vishnuprasad C.N. Rodriguez-Torres M.P., Shin H.-S. Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance. *Phytother. Res.* 2020, 34(6): 1248-1267 (doi: 10.1002/ptr.6614)

111 Freddy A. Bernal F.A., Coy-Barrera E. Molecular docking and multivariate analysis of xanthenes as antimicrobial and antiviral agents. *Molecules*, 2015, 20: 13165-13204 (doi: 10.3390/molecules200713165)

112 Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2020, 10(5): 766–88 (doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008)

113 Napolitano F., Xu X., Gao X. Impact of computational approaches in the fight against COVID-19: An AI guided review of 17 000 studies. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23(1): bbab456 (doi: 10.1093/bib/bbab456)

114 Pandey P., Rane J.S., Chatterjee A., Kumar A., Khan R., Prakash A., Ray S. Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: An in silico study for drug development. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2020, 22: 1–11 (doi: 10.1080/07391102.2020.1796811)

115 Muhammad S., Hira S., Al-Sehemi A.G., Abdullah H., Khan M., Irfan M., Iqbal J. Exploring the new potential antiviral constituents of *Moringa oliefera* for SARS-CoV-2 pathogenesis: An in silico molecular docking and dynamic studies. *Chem. Phys. Lett.*, 2021, 767: 138379 (doi: 10.1016/j.cplett.2021.138379)

116 Mukhtar M., Arshad M., Ahmad M., Pomerantz R., Wigdahl B., Parveen Z. Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Res.*, 2008, 131(2): 111–120 (doi: 10.1016/j.virusres.2007.09.008)

117 Ben-Shabat S., Yarmolinsky L., Porat D., Dahan A. Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. *Drug Deliv Transl Res.*, 2020, 10(2): 354–367 (doi: 10.1007/s13346-019-00691-6)

118 Thomas E., Stewart L.E., Darley B.A., Pham A.M., Esteban I., Panda S.S. Plant-based natural products and extracts: potential source to develop new antiviral drug candidates. *Molecules*, 2021, 26(20): 6197 (doi: 10.3390/molecules26206197)

119 Khakimov B., Tseng L. H., Godejohann M., Bak S., Engelsens S.B. Screening for triterpenoid saponins in plants using hyphenated analytical platforms. *Molecules*, 2016, 21(12): 1614 (doi: 10.3390/molecules21121614)

120 Bucar F., Wubea A., Schmid M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Nat. Prod. Rep.*, 2013, 30: 525–545. |

121 Jorge T.F., Mata A.T., António C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.*, 2016, 28, 374(2079): 20150370 (doi: 10.1098/rsta.2015.0370)

МРНТИ: 62.09.39

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА¹, Р.К. БЛИЕВА^{2*}, Г.Б. НАРМУРАТОВА^{2,5},
Г.К. ЖУМАГАЛИЕВА², А.К. КАЛИЕВА³, Г.А. АЛЬ-МААЛИ⁴, Г.Б. АДМАНОВА³,
Б. БАҚЫТЖАНҚЫЗЫ³

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

²Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматы, Казахстан

³Актюбинский региональный университет имени К. Жубанова, Актюбе, Казахстан

⁴Институт ботаники имени Н.Г. Холодного, Киев, Украина

⁵Казахский национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева, Алматы, Казахстан

*e-mail: msyban@mail.ru

α -АМИЛАЗА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В РАЗНЫХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.03

Аннотация

Амилазы представляют собой группу ферментов, которые широко распространены в микробном, растительном и животном мире. Они разлагают крахмал и родственные полимеры с образованием олигосахаридов. По субстратной специфичности амилазы классифицируются на α - и β -амилазу, которые катализируют гидролиз гликозидных связей в амилозе и амилопектине. Настоящий обзор посвящен ферменту α -амилаза, который составляет основную долю ферментов на мировом рынке и находит широкое применение в разных отраслях промышленности, таких как пищевая, текстильная, бумажная, крахмалоперерабатывающая, где он полностью заменил химический гидролиз.

Ключевые слова: α -амилаза, бактерии, грибы, крахмал.

Ферменты являются высокоэффективными биокатализаторами, которые применяются в разных отраслях промышленности благодаря своим неоспоримым преимуществам, таким как мягкие условия реакции и повышенная селективность и специфичность, что приводит к снижению риска образования нежелательных побочных продуктов, повышению выхода конечных продуктов, низкой энергозатратности и высокой экологичности процессов, что, в конечном счете, способствует развитию концепции устойчивого развития [1-6].

Основными ферментами, которые широко используются в разных отраслях промышленности являются амилазы, глюкозидазы, протеазы, пектиназы, целлюлазы, липазы, ксиланазы. Из них амилазы являются одними из наиболее значимых для биотехнологии ферментов, на долю которых приходится примерно 25% всего мирового рынка ферментных препаратов. Амилолитические ферменты получают из различных источников - растений, животных и микроорганизмов [7-13]. Среди них ферменты, полученные из микроорганизмов, нашли наиболее широкое промышленное применение благодаря высокому выходу конечного продукта.

Известно, что все микробные ферменты получают путем глубинного и твердофазного культивирования. Глубинное культивирование — это культивирование микроорганизмов в богатой питательными веществами жидкой среде. Данный метод традиционно используется для производства ферментов из-за легкости контроля различных параметров культивирования, таких как pH, температура, аэрация, влажность, которые, в конечном счете, влияют на экономичность всего процесса. Существуют периодический и непрерывный режимы глубинного культивирования. Как правило, в качестве питательной среды могут быть использованы различные промышленные отходы, такие как шелуха растений, патока, сыворотка и т. д.

Твердофазное культивирование – это выращивание микроорганизмов на увлажненных, хорошо аэрируемых твердых (сыпучих) питательных средах. В настоящее время использованию твердофазного культивирования уделяется особое внимание из-за способности производить большое разнообразие ферментов, устойчивости микроорганизмов к катаболической репрессии, возможности использования агропромышленных отходов в качестве субстрата, минимальных затрат на стерилизацию, и, следовательно, небольшому расходу электроэнергии [14]. Все это, в конечном счете, ведет к снижению общей себестоимости конечного продукта.

По субстратной специфичности амилазы классифицируются на альфа-, бета- и гамма-амилазу, которые катализируют гидролиз гликозидных связей в амилозе и амилопектине [15]. Основными продуцентами амилаз являются бактерии - *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus manihotivorans* и др. и микроскопические грибы - *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. favus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium fellutanum*, *P. chrysogenum*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor sp.* и *Trichoderma pseudo koningii* [16-25].

В настоящее время α -амилазы составляют основную долю ферментов на мировом рынке и находят широкое применение во всех отраслях промышленности, таких как пищевая, текстильная, бумажная, крахмалоперерабатывающая, где микробные амилазы полностью заменили химический гидролиз. Кроме того, они также применяются в фармацевтической и химической промышленности, кормопроизводстве.

α -амилаза (ЕС 3.2.1.1) представляет собой фермент, который катализирует гидролиз α -1,4-гликозидных связей и некоторых разветвленных α -1,6-гликозидных связей внутренних цепей крахмала. α -амилаза имеет трехмерную структуру, способную связываться с субстратом и под действием высокоспецифичных каталитических групп разрывать гликозидные связи. Это, в первую очередь, приводит к высвобождению мальтозы, а также более мелких олигосахаридов и декстринов.

α -Амилазу получают методом глубинной и твердофазной ферментации. Первый метод традиционно используется для производства фермента из-за легкости контроля различных параметров культивирования, которые влияют на экономичность процесса. Роль данных факторов должна изучаться для производства конкретной α -амилазы и соответствовать ее применению. Так, α -амилазы, используемые в гидролизе крахмала, должны быть активными и стабильными при низких значениях рН, тогда как в производстве моющих средств – при высоких значениях рН. Физические и химические параметры α -амилазы бактерий и грибов широко изучены и описаны в литературе [26-34]. В таблице 1 показаны свойства α -амилазы из некоторых микроорганизмов.

Таблица 1 – Физические и химические свойства бактериальной и грибной α -амилазы

Микроорганизм	Культивирование	рН	Температура	Ингибиторы
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	глубинное	7.0	33 °С	–
<i>Bacillus sp.</i>	глубинное	7.0	70 °С	EDTA, HgCl ₂
<i>Bacillus subtilis</i>	твердофазное	7.0	37 °С	
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	глубинное	5.5	55 °С	Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Al ³⁺
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	твердофазное	6.0	50 °С	–
<i>Aspergillus niger</i>	твердофазное	5.5	70 °С	–
<i>Aspergillus niger</i> УО-1	глубинное	4.95	50 °С	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺
<i>Aspergillus oryzae</i>	твердофазное	5.0-9.0	25-35°С	–
<i>Aspergillus fumigatus</i>	глубинное	6.0	30 °С	–
<i>Ruynoporus sanguineus</i>	глубинное	7.0	37 °С	Глюкоза, мальтоза

Бактериальные α -амилазы. α -Амилаза может продуцироваться различными бактериальными культурами, но для коммерческого применения в основном используют бактерии рода *Bacillus*. α -Амилазы, полученные из *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearotherophilus* и *Bacillus amyloliquefaciens*, нашли потенциальное применение в пищевой, текстильной и бумажной промышленности. Известно, что *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus amyloliquefaciens* являются продуцентами термостабильной α -амилазы и широко используются для коммерческого производства фермента [35, 36]. Термостабильность является важной характеристикой большинства промышленных ферментов. Поскольку ферментативный гидролиз и осахаривание крахмала осуществляются при высоких температурах (100–110°C), в настоящее время большой интерес представляют термостабильные амилазы, которые применяются для производства таких ценных продуктов как глюкоза, кристаллическая и жидкая декстроза, мальтоза и мальтодекстрины. В литературе имеются данные о термостабильных α -амилазах, продуцируемых некоторыми бактериальными штаммами, полученными путем как глубинного, так и твердофазного культивирования [37]. Однако, было установлено, что использование глубинного культивирования в промышленных масштабах является наиболее выгодным [38]. Производство α -амилазы путем твердофазного культивирования ограничено бактериями *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium* и *B. licheniformis* [39].

Грибные α -амилазы. Большинство данных, касающихся грибных культур, продуцирующих α -амилазу, ограничены лишь несколькими видами (главным образом родов *Aspergillus* и *Penicillium*) [40, 41]. Использование грибной α -амилазы предпочтительнее для промышленного применения по сравнению с бактериальной из-за ее статуса GRAS (Generally Recognized As Safe), т.е. общепризнанного как безопасного [20].

Виды *Aspergillus*, такие как *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus niger* широко используются для производства α -амилазы в промышленных масштабах [42]. Так, *A. oryzae* применяется в производстве пищевых продуктов, таких как соевый соус, лимонная и уксусная кислоты, крахмал и т.д. [43]. *A. niger* же, благодаря своей кислотоустойчивости (pH < 3), позволяет избегать бактериального заражения в промышленных масштабах [19]. *A. niger* описан в литературе как вид, секретирующий ферменты α -амилазу и глюкоамилазу в глубинных условиях роста с различной молекулярной массой [44]. Он используется для промышленного производства антибиотиков (пенициллина и цефалоспорина), органических кислот (лимонная и уксусная кислоты) и т.д.

Очистка α -амилазы. Коммерческое использование α -амилазы обычно не требует очистки фермента, но для применения в фармацевтической и пищевой промышленности требуются ферменты высокой чистоты. Кроме того, ферменты в очищенном виде также необходимы для изучения их структурно-функциональных особенностей и биохимических свойств [20]. В настоящее время исследованы различные стратегии очистки ферментов с использованием их специфических характеристик. Лабораторная очистка α -амилазы включает различные комбинации ионнообменной хроматографии, гель-фильтрации и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Эти традиционные методы требуют использования дорогостоящего оборудования на каждом этапе, что делает их трудоемкими и могут привести к увеличению потерь конечного продукта [45]. В качестве альтернативы используют экстракцию α -амилазы органическими растворителями, такими как этанол, ацетон [30, 46] и ультрафильтрацию [47]. Экстракция представляет собой переход определенных компонентов из одной фазы в другую при контакте несмешивающихся или частично растворимых жидких фаз друг с другом. Этот процесс широко используется в химической промышленности благодаря своей простоте, низкой стоимости и легкости масштабирования. Очистка биомолекул при помощи жидкостной экстракции успешно проводится в промышленных масштабах уже более десятка лет. Преимуществом использования этой системы является пониженная вязкость, низкая стоимость реагентов и укороченное время разделения фаз [48].

Применение α -амилазы.

Крахмалоперерабатывающая промышленность. Наиболее широко α -амилазы применяются в крахмалоперерабатывающей промышленности для гидролиза крахмала. Ферментативный гидролиз крахмала включает в себя несколько этапов: желатинизацию, при которой происходит растворение гранул крахмала с образованием вязкой суспензии; разжижение, при котором происходит частичный гидролиз крахмала и снижение вязкости; и осахаривание, включающее образование глюкозы и мальтозы [20, 49]. Для этих целей изначально использовалась α -амилаза *Bacillus amyloliquefaciens*, после чего ее заменили α -амилазой *Bacillus stearothermophilus* и *Bacillus licheniformis* [35]. Бактериальные ферменты видов *Bacillus* представляют особый интерес для крупномасштабных биотехнологических процессов из-за их высокой термостабильности [49].

Производство моющих средств. Производство моющих средств является основным потребителем ферментов как по объему, так и по стоимости. Использование ферментов в составе моющих средств повышает их способность удалять трудновыводимые пятна и делает их экологически безопасным продуктом. α -Амилазы имеются в составе всех жидких моющих средств [20, 29, 50]. Они используются в средствах для стирки и мытья посуды с целью разложения остатков крахмальных продуктов, таких как картофель, подливка, заварной крем, шоколад и т. д. до декстринов и других олигосахаридов [51]. α -Амилазы обладают активностью при низких температурах и щелочном pH, сохраняя необходимую стабильность в процессе стирки. Примером амилаз, используемых в производстве моющих средств, может служить α -амилаза видов *Bacillus* и *Aspergillus* [50].

Производство спирта. Производство этанола играет важную роль в экономике многих стран мира. В производстве этанола крахмал является наиболее широко используемым субстратом из-за его низкой цены и легкодоступности сырья [52]. При производстве спирта крахмал необходимо сначала растворить, а затем подвергнуть двум ферментативным стадиям гидролиза для получения ферментируемых сахаров. Биоконверсия крахмала в этанол включает в себя гидролиз и осахаривание, при которых крахмал превращается в сахар при помощи α -амилазы *Saccharomyces cerevisiae* [47, 53]. С целью получения нового активного штамма дрожжей, с помощью которого можно было бы непосредственно получать этанол из крахмала без необходимости проведения дополнительного этапа осахаривания, было проведено слияние протопластов *S. fibuligera* и *S. cerevisiae* [52]. Среди бактерий на первой стадии гидролиза крахмала используется α -амилаза, полученная из терморезистентных бактерий *Bacillus licheniformis*, или рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* или *Bacillus subtilis* [54].

Пищевая промышленность. α -амилаза нашла широкое применение в пищевой промышленности, а именно, в хлебопечении, пивоварении, приготовлении пищевых добавок, производстве тортов, фруктовых соков и крахмальных сиропов [44]. В хлебопечении применяют разные ферменты, из которых амилотические являются основной группой, используемой для интенсификации процесса приготовления теста и улучшения качества хлеба [55-57]. Ведущую роль в предотвращении черствения хлеба играют амилотические ферменты - α -амилаза и глюкоамилаза, расщепляющие полисахариды крахмала до декстринов, которые впоследствии ферментируются дрожжами, препятствуя образованию новых водородных связей между цепочками олигосахаридов и возникновению поперечных связей между молекулами крахмала и белков клейковины, ведущих к кристаллизации структуры хлеба. Добавление α -амилазы в тесто приводит к увеличению скорости брожения и снижению вязкости теста, что приводит к улучшению объема и текстуры готового продукта. Кроме того, в тесте образуется дополнительный сахар, который улучшает вкусовые качества хлеба и цвет корочки. Помимо образования ферментируемых соединений, α -амилазы сохраняют мягкость хлебобулочных изделий, увеличивая срок их хранения [20]. В настоящее время в хлебопекарной промышленности широко используется термостабильная мальтогенная амилаза *Bacillus stearothermophilus* [35].

Текстильная промышленность. α -амилаза используется в текстильной промышленности для расклихтовки текстиля. Проклеивающие вещества, такие как крахмал, наносятся на пряжу для предотвращения разрыва нити, после чего он легко вымывается водой [20, 58]. Для этих целей используется главным образом α -амилаза рода *Bacillus*.

Бумажная промышленность. Применение α -амилазы в целлюлозно-бумажной промышленности связано с модификацией крахмала мелованной бумаги, т. е. для производства низковязкого высокомолекулярного крахмала [20, 35]. Крахмал - хороший проклеивающий материал для отделки бумаги, улучшающий ее качество и повышающий ее жесткость и прочность. Данное покрытие служит для того, чтобы сделать поверхность бумаги достаточно гладкой и прочной, а также для улучшения качества письма. Вязкость природного крахмала, используемого для этих целей, слишком высока и ее можно изменить путем частичного гидролиза полимера с помощью α -амилазы [20, 59]. Примером α -амилазы, полученной из микроорганизмов и используемой в бумажной промышленности, является α -амилаза Amizyme® (PMP Fermentation Products, США), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Дания) и α -амилаза G9995® (Enzyme Biosystems, США) [60].

Таким образом, α -амилаза является основной группой ферментов, используемой для разных отраслей промышленности, основанных на гидролизе крахмала. В настоящее время существует ряд микроорганизмов для эффективного производства данного фермента, но лишь некоторые из них соответствуют критериям для широкого коммерческого применения. Поиск новых микроорганизмов, которые можно использовать для получения промышленной α -амилазы, является непрерывным процессом, требующим постоянного проведения глубоких научных исследований.

Финансирование

Данное исследование финансировалось Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP19674476).

Литература:

- 1 Cruz-Casas D.E., Cristóbal N.A., Juan A.A., Raúl R., Mónica L.C., Adriana C.F. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2021, 3: 100047 (<https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>)
- 2 Chiang J.H., Loveday S.M., Hardacre M.E., Parker M.E. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases. *International Journal of Food Science and Technology*, 2019, 54 (1): 111-120. (<https://doi.org/10.1111/ijfs.13911>)
- 3 Xiaolin L., Yan S., Weiwei K., Jiping W., Wenjun S., Suying W. Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment – A review. *Energy Reports*, 2022, 8: 696-709. (<https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.12.015>)
- 4 Chourasia R., Phukon L.C., Abedin M.M., Padhi S., Singh S.P., Rai A.K. Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of nutraceuticals and value-added products. *Bioresource Technology Reports*, 2022, 19: 101144. (<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144>)
- 5 Dawei N., Chen Z., Tian Y., Xu W., Zhang W., Kim B., Mu W. Comprehensive utilization of sucrose resources via chemical and biotechnological processes: A review. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 107990. (<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107990>)
- 6 Сулейменова Ж., Блиева Р., Бисько Н., Жакипбекова А., Нармуратова Ж., Ахметжанова М., Калиева А. Скрининг микромицетов рода *Aspergillus* по способности к биосинтезу целлюлазы. *Микробиология және вирусология*, 2022, 3(38): 73–82. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2022.03.06>)
- 7 Mamo J., Getachew P., Kuria, M.S., Assefa, F. Application of Milk-Clotting Protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo Cheese Production. *Journal of Food Quality*, 2020, 2020: 12. (<https://doi.org/10.1155/2020/8869010>)

- 8 Shih N.J., Labbe R.G. Purification and Characterization of an Extracellular α -Amylase from *Clostridium perfringens* type A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1776-1779. (<https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1776-1779.1995>)
- 9 Uma MRJ, Satyanarayana T. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α - amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its application. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2): 345-352. (<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.022>)
- 10 Baysal Z., Uyar F., Dogru M., Alkan H. Production of Extracellular alkaline alpha amylase by solid state fermentation with newly isolated *Bacillus* sp. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 38(2): 184-190. (<https://doi.org/10.1080/10826060701885167>)
- 11 . El-Safey E.L., Ammar M.S. Purification and characterization of alpha amylase isolated from *Aspergillus Falvus* Var. *columnaris*. *Ass. Univ. Bull. Res.* 2004, 7(1): 93-100. (https://journals.ekb.eg/article_150611_f8821e1ad506bbb27c85a8d5e2be0012.pdf)
- 12 Gouda M, Elbahloul Y. Statistical optimization and partial characterization of amylases produced by halotolerant *Penicillium* sp. *World journal of Ag. Sci*, 2008, 4(3): 359-368. ([https://www.idosi.org/wjas/wjas4\(3\)/13.pdf](https://www.idosi.org/wjas/wjas4(3)/13.pdf))
- 13 Affifi A.F., Kamel E.M., Foaad M.A., Fwwzi E.M., Housay M.M. Purification and characterization of alpha amylase from *Pencillium olsonii* under the effect of some antioxidants vitamins. *Glob. I. J of Biotech*, 2008, 3(1): 14-21. ([https://idosi.org/gjbb/gjbb3\(1\)08/3.pdf](https://idosi.org/gjbb/gjbb3(1)08/3.pdf))
- 14 Singhanian R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2009, 44: 13–18. (<https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>)
- 15 Liu X., Kokare C. Microbial enzymes of use in industry. *Academic Press*, 2017. 267–298. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>)
- 16 Khoo S.L., Amirul A.A., Kamaruzaman M., Nazalan N., Azizan M.N. Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol (Praha)*, 1994, 39: 392-398. (<https://doi.org/10.1007/BF02814445>)
- 17 Kathiresan K., Manivannan S. α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *Afr. J. Biotechnol.* 2006, 5(10): 829-832. (DOI:10.3923/jm.2006.438.442)
- 18 C.L. Gee, J.M. Holton, A. McPherson Structures of two novel crystal forms of *Aspergillus oryzae* alpha amylase (taka-amylase). *J Biosc and Bioeng*, 2021, 131(6): 605-612. (<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.02.008>)
- 19 Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC16404 grown on orange waste powder. *J Food Process Eng.*, 2006, 73(2): 190-197. (<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021>)
- 20 Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1599-1616. ([https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0))
- 21 Mohapatra B.R., Banerjee U.C., Bapuji M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. Associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J. Biotechnol*, 1998, 60: 113-117. ([http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00197-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00197-1))
- 22 Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D., Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 31(2): 135-152. (<https://doi.org/10.1042/ba19990073>)
- 23 Reddy N.S., Nimmagadda A., Sambasiva Rao K.R.S. An overview of the microbial α -amylase family. *Afr. J. Biotechnol*, 2003, 2: 645-648. (<https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1119>)
- 24 Saxena R.K., Malhotra B., Batra A. Commercial Importance of Some Fungal Enzymes. *Handbook of fungal biotechnology*, 2004, 20: 287–297. (doi: 10.1590/S1517-83822010000400004)
- 25 Abdulaal W.H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. *BMC Biochem*, 2018, 19(4): 1471-2091. (<https://doi.org/10.1186/s12858-018-0094-8>).
- 26 Rahardjo Y.S., Weber F.J., Haemers S., Tramper J., Rinzema A. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme Microb. Technol*, 2005, 36: 900-902. (<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.010>)
- 27 Mukherjee A.K., Borah M., Raí S.K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.*, 2009, 43: 149-156. (DOI:10.1016/j.bej.2008.09.011)

- 28 Ikram ul H., Ashraf H., Iqbal J., Qadeer M.A. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour Technol*, 2003, 87: 57-61. ([https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00198-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00198-0))
- 29 Hmidet N., El-Hadj A.N., Haddar A., Kanoun S., Alya S., Nasri M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 47: 71-79. (<https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.005>)
- 30 Hamilton L.M., Kelly C.T., Fogarty W.M. Purification and properties of the raw starch degrading -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. *Biotechnol. Lett*, 1999, 21: 111-115. (<https://doi.org/10.1023/A:1005413816101>)
- 31 Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 4597-4602. (DOI: 10.1016/j.biortech.2007.07.028)
- 32 Deutch C.E. Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 35: 78-84. (DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01142.x)
- 33 Asoodeh A., Chamani J., Lagzian M. A novel thermostable, acidophilic alpha-amylase from a new thermophilic "*Bacillus* sp. Ferdowsicus" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46: 289-297. (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.013>)
- 34 J. Lee, L. Xiang, S. Byambabaatar, H. Kim, K.S. Jin, M. Ree *Bacillus licheniformis* α -amylase: Structural feature in a biomimetic solution and structural changes in extrinsic conditions. *International Journal of Biol Macromol*, 2019, 127: 286-296. (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.053>)
- 35 Maarel M.J., Veen B., Uitdehaag J.C., Leemhuis H., Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol*, 2002, 94: 137-155. (DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00407-2)
- 36 Gavrilesco M., Chisti Y. Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv*, 2005, 23: 471-499. (DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.03.004)
- 37 Teodoro C.E.S., Martins M.L.L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol*, 2000, 31: 298-302. (<https://www.scielo.br/j/bjm/a/T9LH7Wm9tmgfd4n5nFjT7F/?lang=en&format=pdf>)
- 38 Sodhi H.K., Sharma K., Gupta J.K., Soni S.K. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem*, 2005, 40: 525-534. (DOI:10.1016/j.procbio.2003.10.008)
- 39 Baysal Z., Uyar F., Aytekin C. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*, 2003, 38: 1665-1668. (DOI:10.1016/S0032-9592(02)00150-4)
- 40 Djekrif D.S., Gheribi A.Z., Meraihi Z., Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC16404 grown on orange waste powder. *J Food Process Eng*, 2006, 73: 190-197. (DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021)
- 41 G.H. Dar, A.N. Kamili, R. Nazir, S.A. Bandh, T. R. Jan, M. Z. Chishti Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial Pathogenesis*, 88: 10-15. (<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.016>)
- 42 Hernandez M.S., Rodriguez M.R., Guerra N.P., Roses R.P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J Food Process Eng.*, 2006, 73: 93-100. (DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.01.009)
- 43 Kammoun R., Naili B., Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour Technol.*, 2008, 99: 5602-5609. (DOI: 10.1016/j.biortech.2007.10.045)
- 44 Couto S.R., Sanroman M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering*, 2006, 76: 291-302. (DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022)
- 45 Arauza L.J., Jozalaa A.F., Mazzolab P.G., Penna T.C.V. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci Technol.*, 2009; 20: 146-154. (doi: 10.1590/S1517-83822010000400004)

46 Glymph J.L., Stutzenberger F.J. Production, purification, and characterization of alpha-amylase from *Thermomonospora curvata*. *Appl Environ Microbiol.*, 1977, 34: 391-397. (doi: 10.1128/aem.34.4.391-397.1977)

47 Moraes L.M.P., Filho S.A., Ulhoa C.J. Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 15: 561-564. . (<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008961015119>)

48 Mazzola P.G., Lopes A.M., Hasmann F.A., Jozala A.F., Penna T.C.V., Magalhaes P.O., Rangel-Yagui C.O., Pessoa A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *J Chem Technol Biotechnol.*, 2008, 83: 143-157. (<https://doi.org/10.1002/jctb.1794>)

49 Prakash O., Jaiswal N. Alpha-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(8): 2401-2414. (<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8735-4>)

50 Mitidieri S., Souza Martinelli A.H., Schrank A., Vainstein M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol.*, 2006, 97: 1217-1224. (DOI:10.1016/j.biortech.2005.05.022)

51 Mukherjee A.K., Borah M., Raí S.K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.*, 2009, 43: 149-156. (DOI:10.1016/j.bej.2008.09.011)

52 Chi Z., Chi Z., Liu G., Wang F., Ju L., Zhang T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv.*, 2009, 27: 423-431. (DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.03.003)

53 Oner E.T. Optimization of ethanol production from starch by an amyolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 2006, 23(12): 849-856. (<https://doi.org/10.1002/yea.1399>)

54 Sanchez O.J., Cardona C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.*, 2008, 99: 5270-5295. (DOI:10.1016/j.biortech.2007.11.013)

55 Renzetti S., Rosell S.M. Role of enzymes in improving the functionality of proteins in non-wheat dough systems. *Journal of Cereal Science*, 2016, 67: 35-45. (DOI:10.1016/j.jcs.2015.09.008)

56 S.F. S. Motahar, S. Ariaenejad, M. Salami, Z. Emam-Djomeh, A.S.A. Mamaghani Improving the quality of gluten-free bread by a novel acidic thermostable α -amylase from metagenomics data. *Food Chemistry*, 2021, 352: 129307. (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129307>)

57 Sharma A., Satyanarayana T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 2013, 48(2): 201-211. (DOI:10.1016/j.procbio.2012.12.018)

58 Ahlawat S., Dhiman S.S., Battan B., Mandhan R.P., Sharma J. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 521-526. (<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.003>)

59 Bruinenberg P.M., Hulst A.C., Faber A., Voogd R.H. A process for surface sizing or coating of paper. In: *European Patent Application*, 1996. (<https://patents.google.com/patent/EP0690170A1/en>)

60 Hyde, K.D., Xu, J., Rapior, S. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97, 1–136 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>.

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА¹, Р.К. БЛИЕВА^{2*}, Г.Б. НАРМУРАТОВА^{2,5},
Г.К. ЖУМАГАЛИЕВА², А.К. КАЛИЕВА³, Г.А. АЛЬ-МААЛИ⁴, Г.Б. АДМАНОВА³,
Б. БАҚЫТЖАНҚЫЗЫ³

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

²Қазақстан «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны, Алматы, Қазақстан

³Қ.Жұбанов атындағы Ақтөбе өңірлік университеті, Ақтөбе, Қазақстан

⁴Н.Г. Холодный атындағы Ботаника институты, Киев, Украина

⁵Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ Ұлттық Техникалық Университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: msyban@mail.ru

α -АМИЛАЗА ЖӘНЕ ОНЫ ӨНЕРКӘСІПТИҢ ӘРТҮРЛІ САЛАЛАРЫНДА ҚОЛДАНУ

Түйін

Амилазалар микроб, өсімдік және жануарлар әлемінде кең таралған ферменттер тобы. Олар крахмал және онымен байланысты полимерлерді ыдыратып, ұсақ олигосахаридтер түзеді. Субстраттың ерекшелігі бойынша амилазалар α - және β - амилазаға жіктеледі. Олар амилоза мен амилопектиндегі гликозидтік байланыстардың гидролизін катализдейді. Бұл шолу әлемдік нарықтағы ферменттердің негізгі үлесін құрайтын және микробтық амилазалар химиялық гидролизді толығымен ауыстырған тамақ, тоқыма, қағаз, крахмал өңдеу сияқты әртүрлі салаларда кеңінен қолданылатын α -амилаза ферментіне арналған.

Кілтгі сөздер: α -амилаза, бактериялар, саңырауқұлақтар, крахмал.

IRSTI: 62.09.39

Zh.B. SULEIMENOVA¹, R.K. BLIEVA^{2*}, Zh.B. NARMURATOVA^{2,5},
G.K. ZHUMAGALIEVA², A.K. KALIEVA³, G.A. AL-MAALI⁴, G.B. ADMANOVA³,
B. BAKYITZHANKYZY³

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

²Scientific-Production Enterprise «Antigen», Almaty, Kazakhstan

³K. Zhubanov Aktobe Regional University, Aktobe, Kazakhstan

⁴N.G. Kholodny Institute of Botany, Kiev, Ukraine

⁵Satbayev University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: msyban@mail.ru

α -AMYLASE AND ITS APPLICATIONS IN INDUSTRY

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.03

Abstract

Amylases are a group of enzymes that are widely distributed in microbial, plant and animal kingdoms. They degrade starch and related polymers to small oligosaccharides. By substrate specificity, amylases are classified to α -, and β - amylases, which catalyze the hydrolysis of glycoside bonds in amylose and amylopectin. This review focuses on the microbial α -amylase, which has potential application in a wide number of industrial processes such as food, textile, paper, starch processing, where enzymes have completely replaced chemical hydrolysis.

Keywords: α -amylase, bacteria, fungi, starch.

Enzymes are highly efficient biocatalysts researched for industrial-scale catalysis because of their several distinct advantages that range from their operation in milder reaction conditions, to their exceptional product selectivity, and to their lower environmental and physiological toxicity [1-6]. All this ensures contributes to the development of the concept of sustainable development.

The main enzymes that are widely used in various industries are amylases, glucosidases, proteases, pectinases, cellulases, lipases, xylanases. Of these, amylases are one of the most significant enzymes for biotechnology, accounting for approximately 25% of the total world market for enzyme preparations. Amylolytic enzymes are obtained from various sources - plants, animals and microorganisms [7-13]. Among them, microbial enzymes have found the widest industrial application due to the high yield of the final product.

It is known that all microbial enzymes are obtained by submerged and solid-state cultivation. Submerged is the cultivation of microorganisms in a nutrient-rich liquid medium. This method is traditionally used for the production of microbial enzymes because of the ease of control of various cultivation parameters such as pH, temperature, aeration, humidity, which ultimately affect the economics of the process. There are periodic and continuous modes of submerged cultivation. As a rule, various industrial wastes, such as plant husks, molasses, whey, etc., can be used as a nutrient medium.

Solid-state cultivation is the cultivation of microorganisms on moist, well-aerated solid (free-flowing) nutrient media. At present, the use of solid-state cultivation is given special attention due to the ability to produce a variety of enzymes, the resistance of microorganisms to catabolic repression, the possibility of using agro-industrial waste as a substrate, minimal sterilization costs, and therefore low energy consumption, low susceptibility to contamination [14]. All this ultimately leads to a reduction in the overall cost of the final product.

Based on substrate specificity, amylases are classified into alpha, beta, and gamma amylase, which catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds in amylose and amylopectin [15]. The main producers of amylases are bacteria - *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus manihottivorans*, etc. and microscopic fungi - *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. favus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium fellutanum*, *P. chrysogenum*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor sp.* and *Trichoderma pseudokoningii* [16-25].

Currently, α -amylases make up the bulk of enzymes on the world market and widely used in all industries, such as food, textile, paper, starch processing, where microbial amylases have completely replaced chemical hydrolysis. In addition, they are also used in the pharmaceutical and chemical industries, feed production.

α -amylase (EC 3.2.1.1) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of α -1,4 glycosidic linkages and some branched α -1,6 glycosidic linkages of starch internal chains. α -amylase has a three-dimensional structure that can bind to a substrate and, under the action of highly specific catalytic groups, break glycosidic bonds (Figure 1). This primarily results in the release of maltose, as well as smaller oligosaccharides and dextrin.

α -Amylase is obtained by deep and solid phase fermentation. The first method is traditionally used for enzyme production due to the ease of controlling various cultivation parameters such as pH, temperature, aeration, humidity, which affect the economics of the process. The role of these factors should be studied for the production of a particular α -amylase and appropriate for its application. Thus, α -amylases used in the production of starch must be active and stable at low pH values, while in the production of detergents at high pH values. The physical and chemical parameters of α -amylase of bacteria and fungi are widely studied and described in the literature [26-34]. Table presents the properties of microbial α -amylase.

Table 1 - Physical and chemical properties of bacterial and fungal α -amylases

Microorganism	Cultivation	pH	Temperature	Inhibitor
1	2	3	4	5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	submerged	7.0	33 °C	–
<i>Bacillus sp.</i>	submerged	7.0	70 °C	EDTA, HgCl ₂
<i>Bacillus subtilis</i>	solid-state	7.0	37 °C	–

Table 1 continued

1	2	3	4	5
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	submerged	5.5	55 °C	Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Al ³⁺
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	solid-state	6.0	50 °C	–
<i>Aspergillus niger</i>	solid-state	5.5	70 °C	–
<i>Aspergillus niger</i> UO-1	submerged	4.95	50 °C	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺
<i>Aspergillus oryzae</i>	solid-state	5.0-9.0	25-35°C	–
<i>Aspergillus fumigatus</i>	submerged	6.0	30 °C	–
<i>Pyrenopeziza sanguineus</i>	submerged	7.0	37 °C	glucose, maltose

Bacterial α -amylases. α -Amylase can be produced by various bacteria, but *Bacillus* bacterial strains are the main group for commercial use. α -Amylases from *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus amyloliquefaciens* have found potential applications in the food, textile and paper industries and are known to produce thermostable α -amylase for commercial production [35, 36]. Thermal stability is an important characteristic of industrial enzymes. Since enzymatic hydrolysis and saccharification of starch are carried out at high temperatures (100–110°C), thermostable amylases for starch hydrolysis are currently of great interest for the production of valuable products such as glucose, crystalline dextrose, dextrose syrup, maltose and maltodextrins.

There is literature data on thermostable α -amylases produced by some bacterial strains obtained both by submerged and solid-state cultivation [37]. However, submerged cultivation has been found to be more beneficial than solid-state cultivation [38]. α -amylase production by solid-state cultivation is limited by *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium* and *B. licheniformis* [39].

Fungal α -amylases. Most data on α -amylase-producing fungal strains have been limited to *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Attempts have been made to increase production of microbial enzymes in industrial scale by selection of optimal conditions [40, 41]. The use of fungal α -amylase is preferred for industrial applications over bacteria and yeast due to their GRAS (Generally Recognized As Safe) status, i.e. generally recognized as safe [20].

Aspergillus species such as *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* are the most important for industrial-scale production of α -amylase enzyme [42]. Thus, *A. oryzae* is widely used for soy sauce, citric and acetic acid, starch, etc. production [43]. *Aspergillus niger*, on the other hand, has an important hydrolytic potential in the production of industrial α -amylase and, due to its acid resistance (pH < 3), avoids bacterial contamination [19]. *A. niger* is described in the literature as a species that secretes the enzymes α -amylase and glucoamylase under submerged growth conditions with different molecular weights [44]. It is used for the industrial production of antibiotics (penicillin and cephalosporin), organic acids (citric and acetic acids), etc.

Purification of α -amylase. Commercial use of α -amylase usually does not require enzyme purification, but high purity α -amylases are required for pharmaceutical industry. Purified enzyme is also necessary for studying its structural-functional and biochemical properties [20]. Various strategies for enzyme purification using the specific characteristics of the target biomolecule are currently being investigated. Laboratory purification of α -amylase involves various combinations of ion exchange, gel filtration, and high performance liquid chromatography. These traditional methods require the use of expensive equipment, which makes them labor intensive and can lead to increased wastage of the final product [45]. Alternatively, extraction of α -amylase can be made by ethanol, acetone [30, 46] and ultrafiltration [47]. Extraction is the transition of certain components from one phase to another when immiscible or partially soluble liquid phases come into contact to each other. This process is widely used in the chemical industry due to its simplicity,

low cost and ease of scale-up production. Purification of biomolecules by liquid extraction has been successfully carried out on a large scale for more than a decade. The advantages of using this system are lower viscosity, price of reagents, and short separation time [48].

α -Amylase application.

Starch processing industry. Enzymatic hydrolysis of starch includes several steps: gelatinization, where the starch granules dissolve to form a viscous suspension; liquefaction, a partial hydrolysis of starch and a loss of viscosity; and saccharification involving the formation of glucose and maltose [20, 49]. For this purpose, α -amylases from *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus licheniformis* can be used [35]. Enzymes of *Bacillus* species are of particular interest for large-scale biotechnological processes due to their high thermal stability [49].

Detergents production. Detergent industry is a major consumer of enzymes, both in terms of volume and value. The use of enzymes in detergents increases their ability to remove stubborn stains and makes them an environmentally friendly product. Amylases are enzymes used in all liquid detergents [20, 29, 50]. They are used in laundry and dishwashing detergents to break down leftover starchy foods like potatoes, gravy, custard, chocolate, etc. into dextrin's and other small oligosaccharides [51]. α -Amylases are active at lower temperatures and alkaline pH, maintaining the necessary stability during the washing process. Removing starch from various surfaces is also important to improve their whiteness, as starch is an attractant for many types of soil solids. An example of amylases used in the manufacture of detergents is α -amylase of *Bacillus* and *Aspergillus* species [50].

Ethanol production. For ethanol production, starch is the most widely used substrate due to its low cost and readily available feedstock [52]. In this production, the starch must be dissolved and then subjected to two enzymatic hydrolysis steps to produce fermentable sugars. The bioconversion of starch to ethanol includes hydrolysis and saccharification, where starch is converted to sugar by α -amylase of *Saccharomyces cerevisiae* [47, 53]. In order to obtain a new yeast strain that can directly produce ethanol from starch without the need for a separate saccharifying process, protoplast fusion was performed between the amyolytic yeast *Saccharomyces fibuligera* and *S. cerevisiae* [52]. Among bacteria, α -amylase obtained from thermoresistant bacteria like *Bacillus licheniformis* or from engineered strains of *Escherichia coli* or *Bacillus subtilis* is used during the first step of hydrolysis of starch suspensions [54].

Food industry. α -Amylase has found wide application in the food industry, namely in baking, brewing, food additives, cakes, fruit juices and starch syrups [44]. Different groups of enzymes are used in baking, of which amyolytic enzymes are the main group of enzymes used to intensify the dough preparation process and improve the quality of bread [55–57]. α -Amylase and glucoamylase, play important role in preventing the staleness of bread, breaking down starch polysaccharides into dextrans, which are subsequently fermented by yeast, preventing the formation of new hydrogen bonds between oligosaccharide chains and the emergence of cross-links between starch molecules and gluten proteins, leading to crystallization of the structure of bread.

The addition of α -amylase to the dough leads to an increase in the fermentation rate and a decrease in the dough viscosity, which leads to an improvement in the volume and texture of the finished product. Besides, additional sugar is formed in the dough, which improves the taste, color of the crust and properties of the bread. In addition to producing fermentable compounds, α -amylases keep baked goods soft, increasing their shelf life [20]. Currently, the thermostable maltogenic amylase of *Bacillus stearothermophilus* is widely used in the baking industry [35].

Textile industry. Amylases are used in the textile industry for desizing process. Sizing agents such as starch are applied to the yarn to prevent thread breakage, after which it is easily washed out with water [20, 58]. Amylase from *Bacillus* stain was employed in textile industries for a long time.

Paper industry. The use of α -amylase in the pulp and paper industry is associated with the modification of coated paper starch, i.e., for the production of low-viscosity high-molecular starch

[20, 35]. Starch is a good sizing material for finishing paper, improving its quality and increasing its rigidity and strength. This coating serves to make the surface of the paper sufficiently smooth and durable, as well as to improve the quality of writing. The viscosity of natural starch used for this purpose is too high and can be changed by partial hydrolysis of the polymer with α -amylase [20, 59]. Examples of microorganism-derived amylases used in the paper industry include Amizyme® (PMP Fermentation Products, USA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Denmark), and α -amylase G9995® (Enzyme Biosystems, USA) [60].

Thus, α -amylase is the main group of enzymes used for various industries based on starch hydrolysis. Currently, there are a number of microorganisms for the efficient production of this enzyme, but only a few of them meet the criteria for widespread commercial use. The search for new microorganisms that can be used to obtain industrial α -amylase is a process that requires scientific research.

Funding

The research was carried out with the financial support of the Scientific Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant №AP19674476).

References:

- 1 Cruz-Casas D.E., Cristóbal N.A., Juan A.A., Raúl R., Mónica L.C., Adriana C.F. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2021, 3: 100047 (<https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>)
- 2 Chiang J.H., Loveday S.M., Hardacre M.E., Parker M.E. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases. *International Journal of Food Science and Technology*, 2019, 54 (1): 111-120. (<https://doi.org/10.1111/ijfs.13911>)
- 3 Xiaolin L., Yan S., Weiwei K., Jiping W., Wenjun S., Suying W. Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment—A review. *Energy Reports*, 2022, 8: 696-709. (<https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.12.015>)
- 4 Chourasia R., Phukon L.C., Abedin M.M., Padhi S., Singh S.P., Rai A.K. Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of nutraceuticals and value-added products. *Bioresource Technology Reports*, 2022, 19: 101144. (<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144>)
- 5 Dawei N., Chen Z., Tian Y., Xu W., Zhang W., Kim B., Mu W. Comprehensive utilization of sucrose resources via chemical and biotechnological processes: A review. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 107990. (<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107990>)
- 6 Sulejmenova Zh., Blieva R., Bisko N., ZHakipbekova A., Narmuratova Zh., Ahmetzhanova M., Kalieva A. Skrining mikromicetov roda *Aspergillus* po sposobnosti k biosintezi cellyullazy. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya*, 2022, 3(38): 73–82. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2022.03.06>)
- 7 Mamo J., Getachew P., Kuria, M.S., Assefa, F. Application of Milk-Clotting Protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo Cheese Production. *Journal of Food Quality*, 2020, 2020: 12. (<https://doi.org/10.1155/2020/8869010>)
- 8 Shih N.J., Labbe R.G. Purification and Characterization of an Extracellular α -Amylase from *Clostridium perfringens* type A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1776-1779. (<https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1776-1779.1995>)
- 9 Uma MRJ, Satyanarayana T. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its application. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2): 345-352. (<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.022>)
- 10 Baysal Z., Uyar F., Dogru M., Alkan H. Production of Extracellular alkaline alpha amylase by solid state fermentation with newly isolated *Bacillus sp.* *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 38(2): 184-190. (<https://doi.org/10.1080/10826060701885167>)
- 11 El-Safey E.L., Ammar M.S. Purification and characterization of alpha amylase isolated from *Aspergillus Falvus* Var. *columnaris*. *Ass. Univ. Bull. Res.* 2004, 7(1): 93-100. (https://journals.ekb.eg/article_150611_f8821e1ad506bbb27c85a8d5e2be0012.pdf)

- 12 Gouda M, Elbahloul Y. Statistical optimization and partial characterization of amylases produced by halotolerant *Penicillium* sp. *World journal of Ag. Sci*, 2008, 4(3): 359-368. ([https://www.idosi.org/wjas/wjas4\(3\)/13.pdf](https://www.idosi.org/wjas/wjas4(3)/13.pdf))
- 13 Affifi A.F., Kamel E.M., Foaad M.A., Fwwzi E.M., Housay M.M. Purification and characterization of alpha amylase from *penicillium olsonii* under the effect of some antioxidants vitamins. *Glob. I. J of Biotech*, 2008, 3(1): 14-21. ([https://idosi.org/gjbb/gjbb3\(1\)08/3.pdf](https://idosi.org/gjbb/gjbb3(1)08/3.pdf))
- 14 Singhanian R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2009, 44: 13–18. (<https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>)
- 15 Liu X., Kokare C. Microbial enzymes of use in industry. *Academic Press*, 2017. 267–298. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>)
- 16 Khoo S.L., Amirul A.A., Kamaruzaman M., Nazalan N., Azizan M.N. Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol (Praha)*, 1994, 39: 392-398. (<https://doi.org/10.1007/BF02814445>)
- 17 Kathiresan K., Manivannan S. α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *Afr. J. Biotechnol.* 2006, 5(10): 829-832. (DOI:10.3923/jm.2006.438.442)
- 18 C.L. Gee, J.M. Holton, A. McPherson Structures of two novel crystal forms of *Aspergillus oryzae* alpha amylase (taka-amylase). *J Biosc and Bioeng*, 2021, 131(6): 605-612. (<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.02.008>)
- 19 Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC16404 grown on orange waste powder. *J Food Process Eng.*, 2006, 73(2): 190-197. (<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021>)
- 20 Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1599-1616. ([https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0))
- 21 Mohapatra B.R., Banerjee U.C., Bapuji M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. Associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J. Biotechnol*, 1998, 60: 113-117. ([http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00197-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00197-1))
- 22 Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D., Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 31(2): 135-152. (<https://doi.org/10.1042/ba19990073>)
- 23 Reddy N.S., Nimmagadda A., Sambasiva Rao K.R.S. An overview of the microbial α -amylase family. *Afr. J. Biotechnol*, 2003, 2: 645-648. (<https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1119>)
- 24 Saxena R.K., Malhotra B., Batra A. Commercial Importance of Some Fungal Enzymes. *Handbook of fungal biotechnology*, 2004, 20: 287–297. (doi: 10.1590/S1517-83822010000400004)
- 25 Abdulaal W.H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. *BMC Biochem*, 2018, 19(4): 1471-2091. (<https://doi.org/10.1186/s12858-018-0094-8>).
- 26 Rahardjo Y.S., Weber F.J., Haemers S., Tramper J., Rinzema A. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme Microb. Technol*, 2005, 36: 900-902. (<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.010>)
- 27 Mukherjee A.K., Borah M., Raí S.K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.*, 2009, 43: 149-156. (DOI:10.1016/j.bej.2008.09.011)
- 28 Ikram ul H., Ashraf H., Iqbal J., Qadeer M.A. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour Technol*, 2003, 87: 57–61. ([https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(02\)00198-0](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(02)00198-0))
- 29 Hmidet N., El-Hadj A.N., Haddar A., Kanoun S., Alya S., Nasri M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 47: 71–79. (<https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.005>)
- 30 Hamilton L.M., Kelly C.T., Fogarty W.M. Purification and properties of the raw starch degrading -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. *Biotechnol. Lett*, 1999, 21: 111–115. (<https://doi.org/10.1023/A:1005413816101>)
- 31 Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 4597-4602. (DOI: 10.1016/j.biortech.2007.07.028)

- 32 Deutch C.E. Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 35: 78-84. (DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01142.x)
- 33 Asoodeh A., Chamani J., Lagzian M. A novel thermostable, acidophilic alpha-amylase from a new thermophilic “*Bacillus* sp. Ferdowsicus” isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46: 289-297. (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.013>)
- 34 J. Lee, L. Xiang, S. Byambabaatar, H. Kim, K.S. Jin, M. Ree *Bacillus licheniformis* α -amylase: Structural feature in a biomimetic solution and structural changes in extrinsic conditions. *International Journal of Biol Macromol*, 2019, 127: 286-296. (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.053>)
- 35 Maarel M.J., Veen B., Uitdehaag J.C., Leemhuis H., Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol*, 2002, 94: 137-155. (DOI: 10.1016/s0168-1656(01)00407-2)
- 36 Gavrilesco M., Chisti Y. Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv*, 2005, 23: 471-499. (DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.03.004)
- 37 Teodoro C.E.S., Martins M.L.L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol*, 2000, 31: 298-302. (<https://www.scielo.br/j/bjm/a/T9LH7Wm9tmgfd4n5nFjT7F/?lang=en&format=pdf>)
- 38 Sodhi H.K., Sharma K., Gupta J.K., Soni S.K. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem*, 2005, 40: 525-534. (DOI:10.1016/j.procbio.2003.10.008)
- 39 Baysal Z., Uyar F., Aytakin C. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*, 2003, 38: 1665-1668. (DOI:10.1016/S0032-9592(02)00150-4)
- 40 Djekrif D.S., Gheribi A.Z., Meraihi Z., Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC16404 grown on orange waste powder. *J Food Process Eng*, 2006, 73: 190-197. (DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021)
- 41 G.H. Dar, A.N. Kamili, R. Nazir, S.A. Bandh, T. R. Jan, M. Z. Chishti Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial Pathogenesis*, 88: 10-15. (<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.016>)
- 42 Hernandez M.S., Rodriguez M.R., Guerra N.P., Roses R.P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J Food Process Eng*, 2006, 73: 93-100. (DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.01.009)
- 43 Kammoun R., Naili B., Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour Technol.*, 2008, 99: 5602-5609. (DOI: 10.1016/j.biortech.2007.10.045)
- 44 Couto S.R., Sanroman M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering*, 2006, 76: 291-302. (DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022)
- 45 Arauza L.J., Jozalaa A.F., Mazzolab P.G., Penna T.C.V. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci Technol.*, 2009; 20: 146-154. (doi: 10.1590/S1517-83822010000400004)
- 46 Glymph J.L., Stutzenberger F.J. Production, purification, and characterization of alpha-amylase from *Thermomonospora curvata*. *Appl Environ Microbiol.*, 1977, 34: 391-397. (doi: 10.1128/aem.34.4.391-397.1977)
- 47 Moraes L.M.P., Filho S.A., Ulhoa C.J. Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 15: 561-564. (<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008961015119>)
- 48 Mazzola P.G., Lopes A.M., Hasmann F.A., Jozala A.F., Penna T.C.V., Magalhaes P.O., Rangel-Yaguí C.O., Pessoa A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *J Chem Technol Biotechnol.*, 2008, 83: 143-157. (<https://doi.org/10.1002/jctb.1794>)
- 49 Prakash O., Jaiswal N. Alpha-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(8): 2401-2414. (<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8735-4>)
- 50 Mitidieri S., Souza Martinelli A.H., Schrank A., Vainstein M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol.*, 2006, 97: 1217-1224. (DOI:10.1016/j.biortech.2005.05.022)

51 Mukherjee A.K., Borah M., Raí S.K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.*, 2009, 43: 149-156. DOI:10.1016/j.bej.2008.09.011)

52 Chi Z., Chi Z., Liu G., Wang F., Ju L., Zhang T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv.*, 2009, 27: 423-431. (DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.03.003)

53 Oner E.T. Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 2006, 23(12): 849-856. (<https://doi.org/10.1002/yea.1399>)

54 Sanchez O.J., Cardona C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.*, 2008, 99: 5270-5295. (<https://doi.org/10.1002/yea.1399>)

55 Renzetti S., Rosell S.M. Role of enzymes in improving the functionality of proteins in non-wheat dough systems. *Journal of Cereal Science*, 2016, 67: 35-45. (DOI:10.1016/j.jcs.2015.09.008)

56 S.F. S. Motahar, S. Ariaeenejad, M. Salami, Z. Emam-Djomeh, A.S.A. Mamaghani Improving the quality of gluten-free bread by a novel acidic thermostable α -amylase from metagenomics data. *Food Chemistry*, 2021, 352: 129307. (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129307>)

57 Sharma A., Satyanarayana T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 2013, 48(2): 201-211. (DOI:10.1016/j.procbio.2012.12.018)

58 Ahlawat S., Dhiman S.S., Battan B., Mandhan R.P., Sharma J. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 521-526. (<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.003>)

59 Bruinenberg P.M., Hulst A.C., Faber A., Voogd R.H. A process for surface sizing or coating of paper. In: *European Patent Application*, 1996. (<https://patents.google.com/patent/EP0690170A1/en>)

60 Hyde, K.D., Xu, J., Rapior, S. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97, 1–136 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.27.39, 68.43.37

Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2}, М.Б. АЛИМЖАНОВА^{1,2},
К. АШИМУЛЫ¹, С.Т. ДАУГАЛИЕВА¹, М.И. ХАДЖАЕВА¹, Г.К. БЕЙСЕМБЕКОВА^{1,2}¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

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

РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТИРОВАННОГО ОВОЩНОГО ПРОДУКТА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕШАННОЙ ЗАКВАСКИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ
МОЛОЧНОКИСЛЫЕ И УКСУСНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.04

Аннотация

Овощи – незаменимый ценный продукт питания. Ферментация овощей является одним из широко применяемых способов продления срока годности и сохранности овощных продуктов с получением новых продуктов. Применение заквасочных культур позволяет повысить контролируемость процесса ферментации и получить новые виды продуктов. Из ферментированных овощей выделено 27 изолятов молочнокислых бактерий и 5 изолятов уксуснокислых бактерий. С использованием отобранных по биотехнологически значимым показателям микроорганизмов составлены ассоциации и произведен их скрининг в опытах по ферментации смешанного овощного продукта. Получен ферментированный овощной продукт с высокими органолептическими показателями на основе белокочанной капусты, моркови и болгарского перца с использованием отобранной ассоциации. Составляющие ассоциацию микроорганизмы идентифицированы секвенированием по Сэнгеру как *Lactocaseibacillus* sp. 1K7, *Lactocaseibacillus paracasei* Bel1, *Pediococcus pentosaceus* 2K3 и *Acetobacter pasteurianus* 2-6. Анализ летучих органических соединений отжатого сока методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием показал присутствие органических кислот в отличие от спонтанно ферментированного образца. Спектр летучих соединений продукта с использованием закваски был шире при включении в состав ассоциации *A. pasteurianus* 2-6. Полученные результаты свидетельствуют о возможности улучшения биотехнологически ценных показателей ферментированных овощей при использовании уксуснокислых бактерий в составе закваски.

Ключевые слова: ферментированные овощи, *Lactocaseibacillus*, *Pediococcus*, уксуснокислые бактерии, летучие ароматические соединения.

Овощи являются неотъемлемой частью рациона человека. Однако их высокая подверженность порче требует поиска способов переработки, продлевающих срок годности овощных продуктов. Для повышения сохранности многих продуктов человечеством на протяжении тысячелетий используется спонтанная ферментация. Однако спонтанная ферментация часто приводит к значительным потерям готовой продукции, вплоть до 40% [1]. В настоящее время все больше применяются различные заквасочные культуры для повышения контролируемости и ускорения процесса ферментации [2-4]. Ферментация позволяет получить продукты с добавленной стоимостью, сохранить и улучшить их вкус, повысить пищевую и биологическую ценность за счет использования культур микроорганизмов с определенными свойствами [5-7].

Для ферментации капусты и перца чили обычно используются молочнокислые бактерии, относящиеся к родам *Lactiplantibacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Levilactobacillus*,

Leuconostoc [4, 8-12]. При более высокой концентрации соли характерны *Pediococcus* [13]. При инокуляции капусты молочнокислыми бактериями быстрее происходит снижение pH и накопление молочной кислоты, обеспечивающее консервирование продукта, лучше используется растворимый белок, повышается продукция ароматобразующих аминокислот и других летучих ароматических соединений [4], а также антиоксидантов [14]. Показана способность молочнокислых бактерий *Lactiplantibacillus plantarum* и *Limosilactobacillus fermentum* сокращать уровень нитритов в квашеных овощах [15]. Выявлено регулирующее влияние рассола квашеной капусты на работу кишечника [16].

Во время хранения, нарезки и легкой термической обработки в овощах меняется профиль и продукция летучих соединений [17,18]. Внесение заквасочных культур вносит значительный вклад в формирование физико-химических свойств продуктов, оказывая влияние на структуру и такие показатели как титруемая кислотность, продукция вкусовых и ароматических веществ [4]. Спектр летучих органических соединений ферментированной капусты изучен наиболее подробно [13, 19-21]. Образующийся при сквашивании капусты сок богат минералами, витамином С, органическими кислотами и антиоксидантами [22]. В последние годы показано, что уксуснокислые бактерии, часто сопутствующие естественным ферментациям, вносят значительный вклад в формирование аромата ферментированных продуктов [23, 24] и рассматриваются как полезные для здоровья микроорганизмы [25]. Однако вклад уксуснокислых бактерий в ферментацию капусты не исследован, а продукты ферментации различных сочетаний овощей изучены слабо. Также слабо охарактеризованы наиболее подходящие культуры микроорганизмов для таких смешанных ферментаций. Целью данной работы был подбор молочнокислых и уксуснокислых бактерий для ферментации овощного продукта на основе капусты с добавками других овощей и сравнительное исследование летучих органических соединений полученных продуктов.

Материалы и методы исследования

Для выделения микроорганизмов были использованы образцы квашеных овощей домашнего изготовления: капусты, томатов, огурцов. Гетероферментативные молочнокислые бактерии выделяли из десятикратных серийных разведений на среде MRS, уксуснокислые бактерии – на средах MRS и GYC. Чашки инкубировали при температуре +30 °С в течение 48–72 ч. У всех каталазонегативных и грамположительных изолятов определяли способность к подкислению молока. Микроскопирование прижизненных препаратов микроорганизмов производили на микроскопе PremiereMAX200T. Активную кислотность культуральных жидкостей (pH) определяли на pH-метре Consort C931P, титруемую кислотность в градусах Тернера по ГОСТ 3624-92. Количественные данные представлены в виде среднего и ошибки среднего. Достоверность различий между двумя образцами оценивали с помощью t-теста Стьюдента для $p \leq 0,05$.

Для первичного отбора получали ферментированный продукт на основе белокочанной капусты без внесения хлорида натрия в емкостях объемом 100 мл в течение 5 суток при +30°C. Отбирали варианты без следов плесневения и порчи. На основе выбранных вариантов молочнокислых бактерий составляли ассоциации различающихся по морфологии клеток изолятов – палочковидных и кокковидных. На следующем этапе в ассоциации включали уксуснокислые бактерии, отбирали варианты, показавшие наилучшие органолептические показатели.

Для получения ферментированного овощного продукта выбирали овощи без повреждений и болезней (капуста белокочанная 100 г, болгарский перец 25 г, морковь 25 г), нарезали соломкой, перемешивали, вносили пищевую соль в количестве 5%. Закваску для ферментации овощного продукта составляли из равных соотношений отобранных микроорганизмов. Вносили 5 мл закваски на 100 г субстрата, утрамбовывали в стерильном контейнере объемом 100 мл. Ферментировали при +30°C с неплотно закрытой крышкой в

течение 4 суток. Затем образцы переносили в холодильник при +5°C. Оценку органолептических показателей производили через 9 суток.

Микроорганизмы отобранной ассоциации идентифицировали секвенированием по Сэнгеру.

Для анализа спектра летучих органических соединений методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием использовали сок, отжатый после 4-суточной ферментации продукта, полученного с использованием отобранной ассоциации, а также ассоциации без включения уксуснокислых бактерий. В качестве контроля использовали овощи, хранившиеся в нарезанном виде в течение 3 сут. при +5°C, а также спонтанно сквашенные овощи (4 сут.).

Результаты и обсуждение

Из образцов квашеной капусты выделены 27 изолятов гетероферментативных молочнокислых бактерий, преимущественно кокковидных (23 изолята) и 5 изолятов уксуснокислых бактерий. Преобладание кокковидных молочнокислых бактерий наиболее вероятно связано со сроком ферментации капусты (3-5 сут.), а также с концентрацией вносимого при посоле хлорида натрия.

После предварительного отбора в опыте по ферментации капусты оставлено 16 вариантов. Показатель рН культуральной жидкости отобранных изолятов через 24 ч культивирования в жидкой среде MRS составлял 4,21–4,90 (таблица 1).

Таблица 1 – Активная кислотность (рН) культуральной жидкости изолятов молочнокислых бактерий

№	Изолят	рН	№	Изолят	рН
1	Bel1	4,49±0,03	9	2K7	4,47±0,02
2	Bel2	4,56±0,05	10	2K9	4,21±0,03
3	Bel3	4,49±0,02	11	2K10-2	4,44±0,01
4	1K7	4,27±0,01	12	2K19-2	4,47±0,02
5	1K12-2	4,69±0,03	13	2K11	4,90±0,04
6	1K5	4,89±0,01	14	2K21	4,33±0,01
7	2K16	4,52±0,02	15	2K8	4,46±0,01
8	2K3	4,36±0,01	16	2K12	4,49±0,02

Произведен отбор молочнокислых бактерий для составления ассоциаций на основании морфологии клеток и показателя рН через 24 ч культивирования. С использованием отобранных молочнокислых бактерий составлено 10 ассоциаций молочнокислых и уксуснокислых бактерий. Для получения ферментированного овощного продукта использовали белокочанную капусту (66%), морковь (17%) и болгарский перец (17%). При проведении дегустации наибольшее число предпочтений по органолептическим показателям получил ферментированный продукт с использованием ассоциации №8, включающий молочнокислые бактерии 1K7, Bel1, 2K3 и уксуснокислые бактерии 2–6 (таблица 2).

Оценка ферментированных овощных продуктов, полученных без использования и с использованием закваски на основе отобранного консорциума показала значительное превосходство продукта на основе закваски по всем показателям (рисунок 1). Готовый ферментированный овощной продукт с использованием закваски имел приятный кисловатый вкус, более насыщенный аромат, выраженную хрусткость, лучшие показатели цвета (более теплая цветовая гамма, отсутствие серого оттенка капусты, более насыщенные цвета добавленных овощей) в сравнении с контролем.

Титруемая и активная кислотности контрольного и лучшего опытного образца через 48 ч различались. Показатель рН отжатого сока составил в контрольном образце 3,38±0,02, а в варианте с использованием отобранного консорциума - 3,30±0,00. Титруемая же

кислотность, напротив, была выше ($P < 0,005$) на 12% в контрольном образце (208 ± 3 °Т) в сравнении с опытным (186 ± 2 °Т). Различия в величинах титруемой и активной кислотности свидетельствуют о большем связывании протонов с образованием кислых солей в контрольном варианте.

Таблица 2 – Органолептические показатели ферментированных овощных продуктов, полученных с использованием ассоциаций молочнокислых и уксуснокислых бактерий

№	Состав ассоциации			Аромат	Вкус	Цвет
	Палочковидные молочнокислые бактерии	Кокковидные молочнокислые бактерии	Уксуснокислые бактерии			
контроль	нет	нет	нет	+	+	±
1	1К7	2К3	2-6	+	+	+
2	2К16	2К9	2-2	+	+	+
3	Bel1	2К3	2-6	±	±	-
4	Bel1	2К3	1-4	+	+	+
5	1К7	2К9	2-6	+	+	+
6	1К7	2К3	1-4	+	+	+
7	2К16	2К9	1-4	+	+	+
8	1К7, Bel1	2К3	2-6	++	+	++
9	1К7, 2К16	2К3	1-4	+	+	+
10	1К7, 2К16	2К9	1-4	+	+	+

Примечание – + хорошие показатели, ± присутствие неприятного вкуса или запаха, - серый цвет продукта, ++ улучшенные показатели.

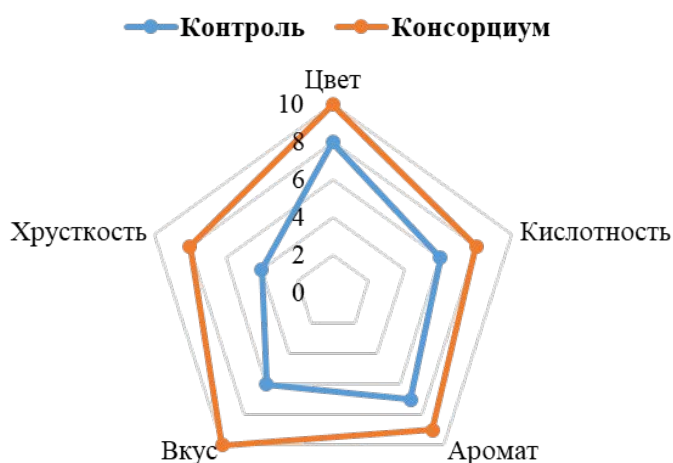


Рисунок 1 – Ферментированный овощной продукт, полученный с использованием отобранного консорциума

Для лучшего консервирования и повышения сохранности продукта в первую очередь важно повышение активной кислотности.

Проведена молекулярно-генетическая идентификация отобранных микроорганизмов. Молочнокислые бактерии определены как *Lacticaseibacillus* sp. 1K7, *Lacticaseibacillus paracasei* Bel1, *Pediococcus pentosaceus* 2K3, уксуснокислые - как *Acetobacter pasteurianus* 2-6 (рисунок 2).

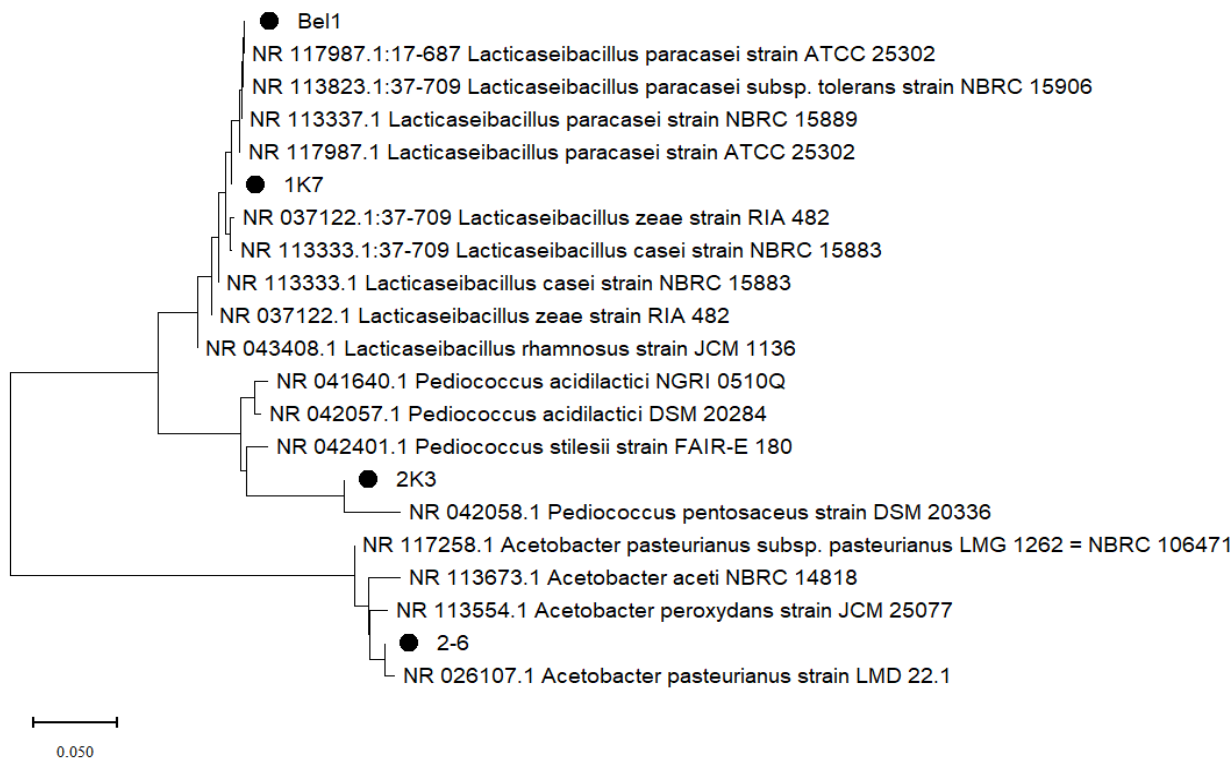


Рисунок 2 – Филогенетическое древо входящих в консорциум молочнокислых и уксуснокислых бактерий

Проведено изучение спектра летучих соединений соков, полученных после нарезки овощей, спонтанной ферментации овощей и ферментации овощей с использованием заквасок на основе консорциума всех четырех культур и консорциума только молочнокислых бактерий. Полученные результаты показали более широкий спектр соединений нарезанных овощей, в ферментированных же овощах общее количество летучих соединений было несколько ниже (рисунок 3).

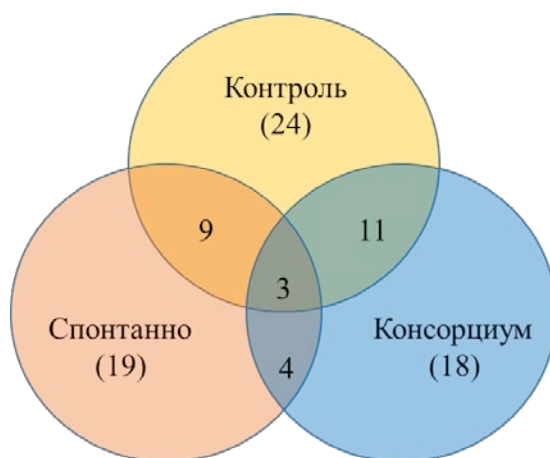


Рисунок 3 – Диаграмма Венна, показывающая количество общих летучих соединений между образцами

При ферментации с помощью закваски были идентифицированы органические жирные кислоты: L-молочная, тетрадекановая (миристиновая) и гексадекановая (пальмитиновая). Спонтанное же сквашивание овощей не привело к образованию органических кислот. В целом все варианты были в значительной степени уникальны по спектру летучих органических соединений. При ферментации с использованием закваски сохранялось несколько большее число химических соединений свежих овощей, чем при спонтанной ферментации, при этом спонтанно ферментированный и полученный с помощью закваски продукты имели лишь 4 общих соединения, что свидетельствует о совершенно разных свойствах этих продуктов. Причиной отсутствия молочной кислоты при спонтанной ферментации продукта может быть слабое уплотнение овощной смеси, сокращающее развитие молочнокислых бактерий, имеющих в растительном сырье.

Сравнительное исследование спектра летучих соединений сока, полученного при ферментации овощей с использованием закваски, выявило большее количество органических летучих соединений в образце с внесением уксуснокислых бактерий *A. pasteurianus* 2-6 в сравнении с закваской только на основе молочнокислых бактерий. Полученные данные свидетельствуют о вкладе уксуснокислых бактерий в формирование запаха полученного ферментированного продукта, что согласуется с данными по ферментации других растительных субстратов [23,24,26].

Заключение

В работе были выделены новые штаммы молочнокислых и уксуснокислых бактерий из ферментированных овощей. Для ферментации смешанного овощного продукта из белокочанной капусты, моркови и болгарского перца отобран консорциум молочнокислых бактерий *Lacticaseibacillus* sp. 1K7, *L. paracasei* Bell, *P. pentosaceus* 2K3 и уксуснокислых бактерий *A. pasteurianus* 2-6, показавший наилучшие показатели при ферментации овощей. Обычно для ферментации капусты применяют молочнокислые бактерии рода *Lactiplantibacillus*. Наше исследование определило высокие органолептические показатели при *Lacticaseibacillus* и *Pediococcus* в совместной ассоциации с уксуснокислыми бактериями. Полученный продукт характеризовался более выраженным ароматом. Проведенное исследование показало расширение спектра летучих соединений отжатого сока при использовании закваски, содержащей уксуснокислые бактерии. Широко известные сведения о высокой биологической ценности продуктов смешанных ферментаций, включающих уксуснокислые бактерии, наряду с расширением сведений о пробиотических свойствах различных штаммов уксуснокислых бактерий [27-33], свидетельствуют о необходимости более широкого включения этих микроорганизмов в закваски для получения ферментированных продуктов с наиболее выраженными полезными свойствами.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке КН МОН РК (грант № AP09258699).

Литература:

- 1 Посокина Н.Е., Лялина О.Ю., Шишлова Е.С., Захарова А.И. Использование штаммов молочнокислых микроорганизмов в процессе направленного ферментирования капусты белокочанной. *Овощи России*, 2018, 4(42): 81-85 (doi: 10.18619/2072-9146-2018-4-81-85)
- 2 Бочаров В.А., Назарова Н.Е., Терехова А.В., Мансуров А.П. Определение оптимальной концентрации кислomолочной закваски для ускорения ферментации и повышения качества квашеной капусты. *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета*, 2016, 1: 99-103 (https://elibrary.ru/download/elibrary_26620344_32450234.pdf)
- 3 Devaki C.S., Premavalli K.S. Fermented vegetable beverages. In: *Fermented Beverages*. Grumezescu A.M., Holban A.M. (eds.). Woodhead Publishing, 2019: 321-367 (doi:10.1016/b978-0-12-815271-3.00008-7)

4 Zhao Y., Zhao Z., Gao Y., Yang G., Liu X., Huang R., Liang W., Li S. Assessment of autochthonous lactic acid bacteria as starter culture for improving traditional Chinese Dongbei Suancai fermentation. *LWT*, 2023, 178: 114615 (doi: 10.1016/j.lwt.2023.114615)

5 Масирбаева А., Сайфудин А., Жантлесова С., Ерденбекова М., Талапбек Ш, Байсариева А. Клиническое применение пробиотиков и пребиотиков. *Микробиология және вирусология*, 2023, 1(40): 72–84 (doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.04)

6 Джакибаева Г., Байдалинов А., Шемшүра О., Измайлова Э., Баймаханова Г. Активность коллекционных молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий, входящих в консорциум. *Микробиология және вирусология*, 2022, 4(39): 117–130 (doi.org/10.53729/MV-AS.2022.04.09)

7 Саубенова М., Олейникова Е., Чижаева А., Алыбаева А., Айтжанова А., Амангелді А., Потороко И. Микробиота человека и болезни цивилизации: в поисках выхода. *Микробиология және вирусология*, 2022, 3(38): 4–22 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.03.01)

8 Посокина Н.Е., Захарова А.И. Молочнокислые микроорганизмы, создающие оптимальные стартовые условия для процесса ферментации капусты белокочанной. *Овощи России*, 2019, 4: 80-84 (doi: 10.18619/2072-9146-2019-4-80-84)

9 Шишлова Е.С., Посокина Н.Е., Лялина О.Ю. Основы ферментирования белокочанной капусты. *Вестник воронежского государственного университета инженерных технологий*, 2018, 80(2): 242-248 (doi: 10.20914/2310-1202-2018-2-242-248)

10 Di Biase M., Le Marc Y., Bavaro A.R., De Bellis P., Lonigro S.L., Lavermicocca P., Postollec F., Valerio F. A Predictive growth model for pro-technological and probiotic *Lacticaseibacillus paracasei* strains fermenting white cabbage. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 907393 (doi: 10.3389/fmicb.2022.907393)

11 Chen T., Su W., Mu Y., Jiang L., Qi Q. Study on the quality formation mechanism of Zao chili with enhanced fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum* 5-1. *Food Chemistry X*, 2023, 17: 100626 (doi: 10.1016/j.fochx.2023.100626)

12 Tian Y., Mu Y., Su W., Qi Q. Correlation between microbiota and volatile flavor compounds during inoculated fermentation of Chinese Pickled pepper (Paojiao). *LWT*, 2023, 178: 114642 (doi: 10.1016/j.lwt.2023.114642)

13 Liang H., He Z., Wang X., Song G., Chen H., Lin X., Ji C., Zhang S. Bacterial profiles and volatile flavor compounds in commercial Suancai with varying salt concentration from Northeastern China. *Food Research International*, 2020, 137: 109384 (doi: 10.1016/j.foodres.2020.109384)

14 Erdoğan A.K., Ertekin Filiz B. Menaquinone content and antioxidant properties of fermented cabbage products: Effect of different fermentation techniques and microbial cultures. *Journal of Functional Foods*, 2023, 102: 105467 (doi: 10.1016/j.jff.2023.105467)

15 Luo W., Wu W., Du X., Yu Y., Wu J., Xu Y., Li L. Regulation of the nitrite, biogenic amine and flavor quality of Cantonese pickle by selected lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102554. (doi: 10.1016/j.fbio.2023.102554)

16 Gaudio G., Weil T., Marzorati G., Solovyev P., Bontempo L., Franciosi E., Bertoldi L., Pedrolli C., Tuohy K.M., Fava F. Microbial and metabolic characterization of organic artisanal sauerkraut fermentation and study of gut health-promoting properties of sauerkraut brine. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 929738 (doi: 10.3389/fmicb.2022.929738)

17 Christensen L.P., Edelenbos M., Kreutzmann S. Fruits and vegetables of moderate climate. In: *Flavours and Fragrances*. Berger R.G. (eds) Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, 135–187: (doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_7)

18 Sun X.-H., Qi X., Han Y.-D., Guo Z.-J., Cui C.-B., Lin C.-Q. Characteristics of changes in volatile organic compounds and microbial communities during the storage of pickles. *Food Chemistry*, 2023, 409: 135285 (doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135285)

19 Major N, Bažon I, Išić N, Kovačević TK, Ban D, Radeka S, Goreta Ban S. Bioactive properties, volatile compounds, and sensory profile of sauerkraut are dependent on cultivar choice and storage conditions. *Foods*, 2022, 11(9): 1218 (doi.org/10.3390/foods11091218)

20 Siddeeg A., Afzaal M., Saeed F., Ali R., Shah Y.A., Shehzadi U., Ateeq H., Waris N., Hussain M., Raza M.A., Al-Farga A. Recent updates and perspectives of fermented healthy super food sauerkraut: a review. *International Journal of Food Properties*, 2022, 25(1): 2320-2331 (doi: 10.1080/10942912.2022.2135531)

21 Wiczorek M.N., Drabińska N. Flavour Generation during lactic acid fermentation of Brassica vegetables—Literature Review. *Applied Sciences*. 2022, 12(11): 5598. (doi: 10.3390/app12115598)

22 Jansone L., Kruma Z., Straumite E. Evaluation of chemical and sensory characteristics of sauerkraut juice powder and its application in food. *Foods*, 2023, 12(1): 19 (doi: 10.3390/foods12010019)

23 Lin H., Bi X., Zhou B., Fang J., Liu P., Ding W., Che Z., Wang Q., He Q. Microbial communities succession and flavor substances changes during Pixian broad-bean paste fermentation. *Food Bioscience*, 2021, 42: 101053 (doi: 10.1016/j.fbio.2021.101053)

24 Zhou X., Zhou W., He X., Deng Y., Li L., Li M., Feng X., Zhang L., Zhao L. Effects of post-fermentation on the flavor compounds formation in red sour soup. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1007164 (doi: 10.3389/fnut.2022.1007164)

25 Torres S., Verón H., Contreras L., Isla M.I. An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*, 2020, 9(2): 112-123 (doi: 10.1016/j.fshw.2020.02.006)

26 Peng X., Yue Q., Chi Q., Liu Y., Tian T., Dai S., Yu A., Wang S., Wang H., Tong X., Jiang L. Microbial diversity and flavor regularity of soy milk fermented using kombucha. *Foods*, 2023, 12(4): 884 (doi: 10.3390/foods12040884)

27 Haghshenas B., Nami Y., Abdullah N., Radiah D., Rosli R., Barzegari A., Khosroushahi A.Y. Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *International journal of food science & technology*, 2015, 50(4): 1056-1064 (doi: 10.1111/ijfs.12718)

28 Aghazadeh Z., Pouralibaba F., Yari Khosroushahi A. The prophylactic effect of *Acetobacter syzygii* probiotic species against squamous cell carcinoma. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects.*, 2017, 11(4): 208-214 (doi: 10.15171/joddd.2017.037)

29 Kim D.-H., Kim H., Seo K.-H. Microbial composition of Korean kefir and antimicrobial activity of *Acetobacter fabarum* DH1801. *Journal of Food Safety*, 2020, 40(1): e12728 (doi: 10.1111/jfs.12728)

30 Neffe-Skocińska K., Wójtowicz M., Dąbrowski M., Jaworska D. Acetic acid bacteria as potential next-generation probiotics [Bakterie kwasu octowego jako potencjalne probiotyki nowej generacji]. *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology. Quality*, 2020, 27(3): 15 - 27 (doi: 10.15193/zntj/2020/124/344)

31 Aitzhanova A., Oleinikova Y., Mounier J., Hymery N., Leyva Salas M., Amangeldi A., Saubenova M., Alimzhanova M., Ashimuly K., Sadanov A. Dairy associations for the targeted control of opportunistic *Candida*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(8): 143 (doi: 10.1007/s11274-021-03096-1)

32 Олейникова Е.А., Чижаева А.В., Саубенова М.Г., Алыбаева А.Ж., Амангелді А.А. Пробиотический потенциал уксуснокислых бактерий. *Мат. междунар. науч.-практ. онлайн конференции «Современные проблемы естественных наук и междисциплинарные исследования»*. Атырау, Х. Досмұхамедов атындағы Атырау университеті, 2021, 2: 161-165.

33 Huang Y.Y., Qin X.K., Dai Y.Y., Huang L., Huang G.R., Qin Y.C., Wei X., Huang Y.Q. Preparation and hypoglycemic effects of chromium- and zinc-rich *Acetobacter aceti*. *World J. Diabetes*, 2022, 13(6): 442-453 (doi: 10.4239/wjd.v13.i6.442).

Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2}, М.Б. АЛИМЖАНОВА^{1,2},
Қ. ӘШІМҰЛЫ¹, С.Т. ДӘУҒАЛИЕВА¹, М.И. ХАДЖАЕВА¹, Г.Қ. БЕЙСЕМБЕКОВА^{1,2}

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

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

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

СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ МЕН СІРКЕ ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫН ҚАМТИТЫН АРАЛАС ҰЙЫТҚЫНЫ ҚОЛДАНА ОТЫРЫП, АШЫТЫЛҒАН КӨКӨНІС ӨНІМІН ЖАСАУ

Түйін

Көкөністер-таптырмас құнды тағам. Көкөністерді ферментациялау-жаңа өнімдерді алу арқылы көкөніс өнімдерінің жарамдылық мерзімі мен сақталуын ұзартудың кеңінен қолданылатын әдістерінің бірі. Ашыту дақылдарын қолдану ашыту процесінің бақылануын арттыруға және өнімнің жаңа түрлерін алуға мүмкіндік береді. Ашытылған көкөністерден сүт қышқылы бактерияларының 27 изоляты және сірке қышқылы бактерияларының 5 изоляты бөлініп алынған. Биотехнологиялық маңызды көрсеткіштер бойынша іріктелген микроорганизмдерді пайдалана отырып, аралас көкөніс өнімін ашыту бойынша тәжірибелерде ассоциациялар жасалып, олардың скринингі жүргізілді. Таңдалған ассоциацияны қолдана отырып, ақ қырыққабат, сәбіз және болгар бұрышы негізінде жоғары органолептикалық көрсеткіштері бар ашытылған көкөніс өнімі алынды. Ассоциацияны құрайтын микроорганизмдер Сэнгер секвенциясы арқылы анықталады: *Lactocaseibacillus* sp. 1K7, *Lactocaseibacillus paracasei* Bell, *Pediococcus pentosaceus* 2k3 және *Acetobacter pasteurianus* 2-6. Масс-спектрометриялық детекторы бар газ хроматографиясы арқылы сығылған шырынның ұшпа органикалық қосылыстарын талдау өздігінен ашытылған үлгіге қарағанда органикалық қышқылдардың болуын көрсетті. Ашытқыны қолданатын өнімнің ұшпа қосылыстарының спектрі *A. pasteurianus* 2-6 қауымдастығына енгізілген кезде кеңірек болды. Нәтижелер ашытылған көкөністердің биотехнологиялық құнды көрсеткіштерін қышқыл құрамында сірке қышқылы бактерияларын қолдану арқылы жақсарту мүмкіндігін көрсетеді.

Кілтті сөздер: ашытылған көкөністер, *Lactocaseibacillus*, *Pediococcus*, сірке қышқылы бактериялары, ұшпа хош иісті қосылыстар.

МРНТИ: 34.27.39, 68.43.37

Y.A. OLEINIKOVA^{1*}, A.Z. ALYBAYEVA¹, Z.N. YERMEKBAY^{1,2},
M.B. ALIMZHANOVA^{1,2}, K. ASHIMULY¹, S.T. DAUGALIYEVA¹, M.I. KHAJAYEVA¹,
G.K. BEISEMBEKOVA^{1,2}

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

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

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

DEVELOPMENT OF A FERMENTED VEGETABLE PRODUCT USING A MIXED STARTER INCLUDING LACTIC ACID BACTERIA AND ACETIC ACID BACTERIA

doi:10.53729/MV-AS.2023. 03.04

Abstract

Vegetables are an indispensable valuable food product. Fermentation of vegetables is one of the widely used methods for extending the shelf life and safety of vegetable products, resulting in new products. The use of starter cultures makes it possible to increase the controllability of the fermentation process and obtain new types of products. 27 isolates of lactic acid bacteria and 5 isolates of acetic acid bacteria were selected from fermented vegetables. Microorganisms with better biotechnologically significant indicators were used for creating associations and screened in the fermentation of mixed vegetable product experiments. A fermented vegetable product with high sensory properties from white cabbage, carrots, and

bell peppers was obtained using a selected association. The association microorganisms were identified by Sanger sequencing as *Lacticaseibacillus* sp. 1K7, *Lacticaseibacillus paracasei* Bell, *Pediococcus pentosaceus* 2K3 and *Acetobacter pasteurianus* 2-6. Volatile organic compounds analysis of the squeezed juice by gas chromatography with mass spectrometric detection showed the presence of organic acids, in contrast to the spontaneously fermented sample. The spectrum of volatile compounds of the product made with the starter was wider when *A. pasteurianus* 2-6 were included in the association. The obtained results indicate the possibility of improving the biotechnologically valuable indicators of fermented vegetables by using acetic acid bacteria in the composition of the starter.

Keywords: fermented vegetables, *Lacticaseibacillus*, *Pediococcus*, acetic acid bacteria, volatile aromatic compounds.

Vegetables are an integral part of the human diet. However, their high susceptibility to spoilage requires the search for processing methods that extend the shelf life of vegetable products. Spontaneous fermentation has been used by mankind for thousands of years to improve the safety of many products. However, spontaneous fermentation often leads to significant losses of finished products, up to 40% [1]. Currently, various starter cultures are increasingly being used to increase controllability and accelerate the fermentation process [2-4]. Fermentation makes it possible to obtain value-added products, preserve and improve their taste, and increase their nutritional and biological value through the use of cultures of microorganisms with certain properties [5-7].

For the fermentation of cabbage and chili peppers, lactic acid bacteria belonging to the genera *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Levilactobacillus*, and *Leuconostoc* are usually used [4, 8-12]. At higher salt concentrations, *Pediococcus* are characteristic [13]. When cabbage is inoculated with lactic acid bacteria, the decrease in pH and the accumulation of lactic acid occur faster, which provides preservation of the product.

When using a starter, soluble protein is also used better, and the production of volatile aromatic compounds and aroma-forming amino acids [4], as well as antioxidants [14], increases. The ability of lactic acid bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* and *Limosilactobacillus fermentum* to reduce the level of nitrites in pickled vegetables was also shown [15]. The regulatory effect of the sauerkraut brine on the functioning of the intestines was revealed [16].

During storage, slicing, and mild heat treatment, the profile and production of volatile compounds in vegetables change [17, 18]. The introduction of starter cultures makes a significant contribution to the formation of the physicochemical properties of products, influencing the structure and such indicators as titratable acidity, and production of flavoring substances [4]. The spectrum of volatile organic compounds in fermented cabbage has been studied in the most detail [13, 19-21]. The juice formed during the fermentation of cabbage is rich in minerals, vitamin C, organic acids, and antioxidants [22]. In recent years, it has been shown that acetic acid bacteria, often associated with natural fermentations, make a significant contribution to the formation of the aroma of fermented products [23, 24] and are considered beneficial microorganisms [25]. However, the contribution of acetic acid bacteria to the fermentation of cabbage has not been studied, and the fermentation products of various combinations of vegetables have been poorly studied. The most suitable cultures of microorganisms for such mixed fermentations are also poorly characterized. The purpose of this work was the selection of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria for the fermentation of a vegetable product based on cabbage with the addition of other vegetables and a comparative study of volatile organic compounds of the obtained products.

Materials and methods of research

To isolate microorganisms, samples of homemade fermented vegetables were used: cabbage, tomatoes, and cucumbers. Heterofermentative lactic acid bacteria were isolated from tenfold serial dilutions on MRS medium; acetic acid bacteria were grown on MRS and GYC media. The plates were incubated at 30°C for 48-72 h. All catalase-negative and gram-positive isolates were tested for their ability to acidify milk. Microscopic examination of live preparations of microorganisms was performed on a PremiereMAX200T microscope. Active acidity of culture liquids (pH) was

determined on a Consort C931P pH meter, titratable acidity was expressed in Turner degrees according to GOST 3624-92. Quantitative data are presented as mean and error of the mean. The significance of differences between the two samples was assessed using Student's t-test for $p \leq 0.05$.

For the primary selection, a fermented product based on white cabbage without the addition of sodium chloride was obtained in 100 ml containers for 5 days at 30°C.

Experimental variants without traces of mold and damage were selected. Based on the selected variants of lactic acid bacteria, associations of isolates differing in cell morphology, rod-shaped and coccoid, were formed. At the next stage, acetic acid bacteria were included in the association, and the variants that showed the best sensory properties were selected.

To obtain a fermented vegetable product, vegetables without damage and disease were chosen (white cabbage 100 g, bell pepper 25 g, carrot 25 g), cut into strips, mixed, and edible salt was added in an amount of 5%. The starter for the fermentation of a vegetable product was composed of equal ratios of selected microorganisms. 5 ml of starter per 100 g of the substrate was added, and vegetables were compacted in a sterile container with a volume of 100 ml. The samples were kept at 30°C with the lid loosely closed for 4 days. Then the samples were transferred to a refrigerator at 5°C. Sensory properties were assessed after 9 days.

The microorganisms of the selected association were identified by Sanger sequencing.

To analyze the spectrum of volatile organic compounds by gas chromatography with mass spectrometric detection, we used juice squeezed after a 4-day fermentation of the product obtained using a selected association, as well as an association without the inclusion of acetic acid bacteria. As a control, vegetables stored cut for 3 days at 5 °C, as well as spontaneously fermented vegetables (4 days), were used.

Results and discussion

From samples of sauerkraut, 27 isolates of heterofermentative lactic acid bacteria, mainly coccoid (23 isolates), and 5 isolates of acetic acid bacteria, were selected. The predominance of coccoid lactic acid bacteria is most likely associated with the period of cabbage fermentation (3-5 days), as well as with the concentration of sodium chloride introduced during salting.

After preliminary selection, 16 variants were selected in the cabbage fermentation experiment. The pH of the culture liquid of the selected isolates after 24 hours of cultivation in liquid MRS medium was 4.21-4.90 (Table 1).

Table 1 - Active acidity (pH) of the culture liquid of lactic acid bacteria isolates

No.	Isolate	pH	No.	Isolate	pH
1	Bel1	4.49±0.03	9	2K7	4.47±0.02
2	Bel2	4.56±0.05	10	2K9	4.21±0.03
3	Bel3	4.49±0.02	11	2K10-2	4.44±0.01
4	1K7	4.27±0.01	12	2K19-2	4.47±0.02
5	1K12-2	4.69±0.03	13	2K11	4.90±0.04
6	1K5	4.89±0.01	14	2K21	4.33±0.01
7	2K16	4.52±0.02	15	2K8	4.46±0.01
8	2K3	4.36±0.01	16	2K12	4.49±0.02

Lactic acid bacteria were selected for associations based on cell morphology and pH after 24 hours of cultivation. Using selected lactic acid bacteria, 10 associations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria were compiled. To obtain a fermented vegetable product, white cabbage (66%), carrots (17%), and bell peppers (17%) were used. During the tasting, the fermented product using association No. 8, including lactic acid bacteria 1K7, Bel1, 2K3, and acetic acid bacteria 2-6, received the greatest number of preferences in terms of sensory properties (Table 2).

Table 2 - Sensory indicators of fermented vegetable products obtained using associations of lactic and acetic acid bacteria

No.	Association			Aroma	Taste	Color
	Rod-shaped lactic acid bacteria	Coccoid lactic acid bacteria	Acetic acid bacteria			
Control	no	no	no	+	+	±
1	1K7	2K3	2-6	+	+	+
2	2K16	2K9	2-2	+	+	+
3	Bel1	2K3	2-6	±	±	-
4	Bel1	2K3	1-4	+	+	+
5	1K7	2K9	2-6	+	+	+
6	1K7	2K3	1-4	+	+	+
7	2K16	2K9	1-4	+	+	+
8	1K7, Bel1	2K3	2-6	++	+	++
9	1K7, 2K16	2K3	1-4	+	+	+
10	1K7, 2K16	2K9	1-4	+	+	+

Note - + good performance, ± presence of an unpleasant taste or smell, - the gray color of the product, ++ improved performance.

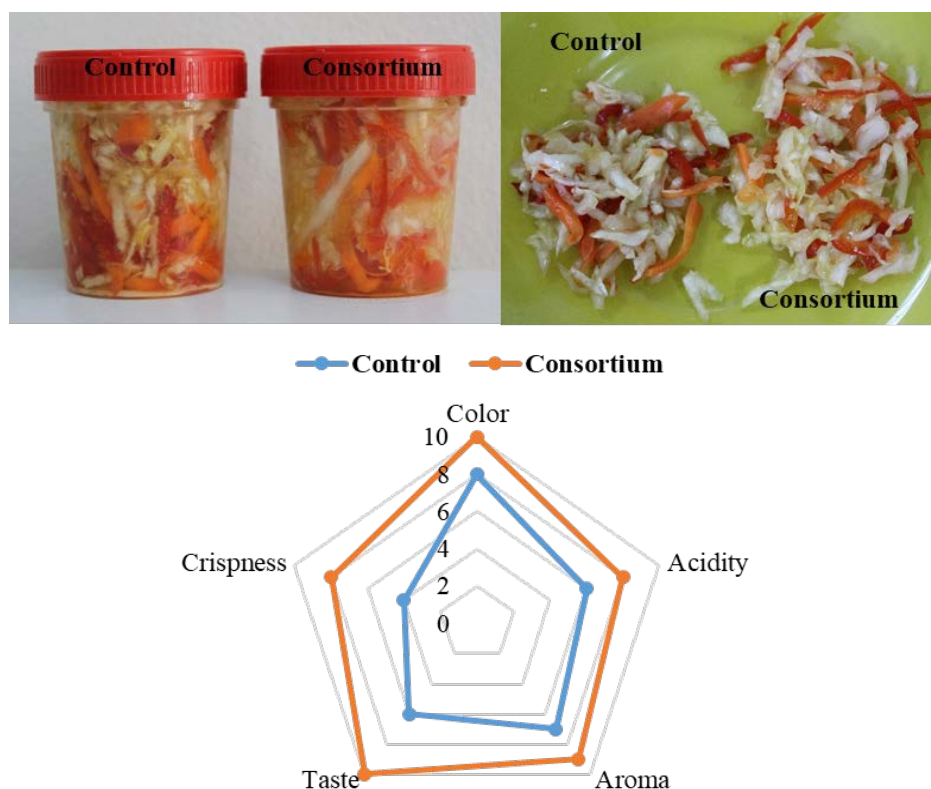


Figure 1 – Fermented vegetable product obtained using the selected consortium

Evaluation of fermented vegetable products obtained with and without the starter based on the selected consortium showed significant superiority of the starter-made product in all respects (Figure 1). The finished fermented with a starter vegetable product had a pleasantly sour taste, richer aroma, pronounced crunchiness, and better color indicators (warmer colors, absence of a gray tint of cabbage, more saturated colors of added vegetables) in comparison with the control.

The titratable and active acidities of the control and the best experimental sample differed after 48 hours. The pH value of the squeezed juice was 3.38 ± 0.02 in the control sample, and 3.30 ± 0.00 in the variant using the selected consortium. The titratable acidity, on the contrary, was higher ($P < 0.005$) by 12% in the control sample ($208 \pm 3^{\circ}T$) in comparison with the experimental

one (186±2°T). Differences in the values of titratable and active acidity indicate a greater binding of protons with the formation of acid salts in the control variant. For better preservation and to increase the safety of the product, it is first of all important to increase the active acidity.

Molecular genetic identification of selected microorganisms was carried out. Lactic acid bacteria were identified as *Lacticasibacillus* sp. 1K7, *Lacticaseibacillus paracasei* Bel1, and *Pediococcus pentosaceus* 2K3 and acetic acid bacteria as *Acetobacter pasteurianus* 2-6 (Figure 2).

The spectrum of volatile compounds of juices obtained after cutting vegetables, spontaneous fermentation of vegetables, and fermentation using starter cultures based on a consortium of all four cultures and a consortium of lactic acid bacteria only were studied. The results showed a wider range of compounds in sliced vegetables, while in fermented vegetables the total amount of volatile compounds was slightly lower (Figure 3).

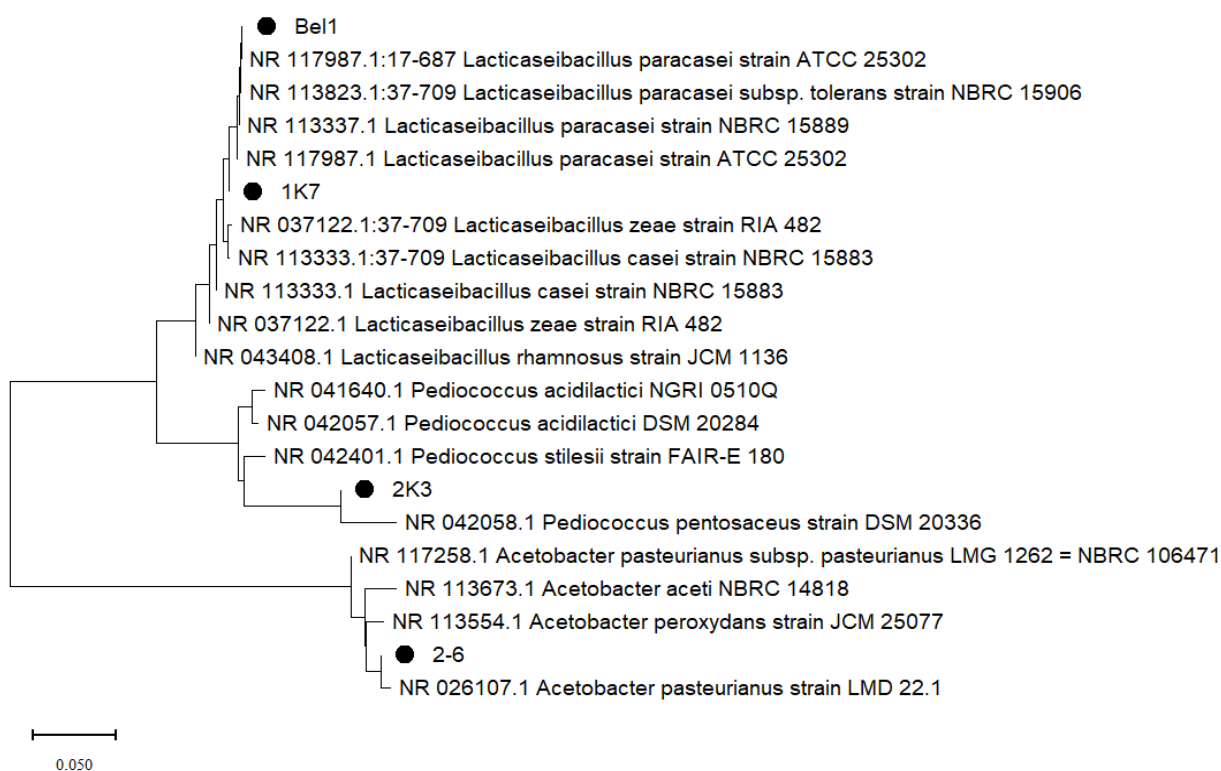


Figure 2 - Phylogenetic tree of lactic and acetic acid bacteria included in the consortium

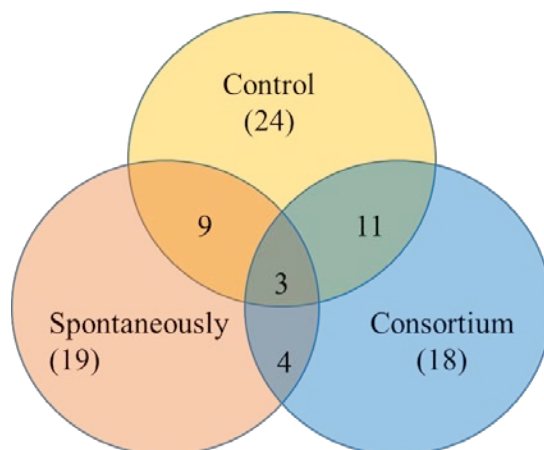


Figure 3 - Venn diagram showing the amount of the common volatile compounds between samples

During fermentation with the starter, some organic fatty acids were identified: L-lactic, tetradecanoic (myristic), and hexadecanoic (palmitic) acids. Spontaneous fermentation of vegetables did not lead to the formation of organic acids. In general, all variants were largely unique in terms of the spectrum of volatile organic compounds. Fermentation with a starter retained slightly more chemical compounds from fresh vegetables than spontaneous fermentation. The spontaneously fermented product and starter-made products had only 4 common compounds indicating completely different properties of these products. The reason for the lack of lactic acid during spontaneous fermentation may be the weak compaction of the vegetable mixture, which reduced the development of lactic acid bacteria present in vegetable raw materials.

The study of the spectrum of volatile compounds in juice obtained by fermenting vegetables using the starter revealed a greater amount of organic volatile compounds in the sample with the introduction of acetic acid bacteria *A. pasteurianus* 2-6 in comparison with the sourdough based on lactic acid bacteria only. The data obtained indicate the contribution of acetic acid bacteria to the formation of the odor of the resulting fermented product, which is consistent with the data on the fermentation of other plant substrates [23,24,26].

Conclusion

In the work, new strains of lactic acid and acetic acid bacteria were isolated from fermented vegetables. For the fermentation of a mixed vegetable product from white cabbage, carrots, and bell peppers, a consortium of lactic acid bacteria *Lacticaseibacillus* sp. 1K7, *L. paracasei* Bell1, *P. pentosaceus* 2K3, and acetic acid bacteria *A. pasteurianus* 2-6, which showed the best performance in the fermentation of vegetables, was used. Usually, lactic acid bacteria of the genus *Lactiplantibacillus* are applied to ferment cabbage. Our study showed high sensory properties with *Lacticaseibacillus* and *Pediococcus* in joint association with acetic acid bacteria. The resulting product was characterized by a more pronounced aroma. The study showed an expansion of the spectrum of volatile compounds in squeezed juice when using starter cultures containing acetic acid bacteria. Widely known information about the high biological value of products of mixed fermentations, including acetic acid bacteria, along with the expansion of information about the probiotic properties of various strains of acetic acid bacteria [27-33], indicate the need for a wider inclusion of these microorganisms in starter cultures in order to obtain fermented products with the most pronounced beneficial properties.

Funding

This research was funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. № AP09258699).

References:

- 1 Posokina N.E., Ljalina O.Ju., Shishlova E.S., Zaharova A.I. Ispol'zovanie shtammov molochnokislyh mikroorganizmov v processe napravlennoogo fermentirovaniya kapusty belokochannoj. *Ovoshhi Rossii*, 2018, 4(42): 81-85 (doi: 10.18619/2072-9146-2018-4-81-85)
- 2 Bocharov V.A., Nazarova N.E., Terehova A.V., Mansurov A.P. Opredelenie optimal'noj koncentracii kislomolochnoj zakvaski dlja uskorenija fermentacii i povyshenija kachestva kvashennoj kapusty. *Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2016, 1: 99-103 (https://elibrary.ru/download/elibrary_26620344_32450234.pdf)
- 3 Devaki C.S., Premavalli K.S. Fermented vegetable beverages. In: *Fermented Beverages*. Grumezescu A.M., Holban A.M. (eds.). Woodhead Publishing, 2019: 321–367 (doi:10.1016/b978-0-12-815271-3.00008-7)
- 4 Zhao Y., Zhao Z., Gao Y., Yang G., Liu X., Huang R., Liang W., Li S. Assessment of autochthonous lactic acid bacteria as starter culture for improving traditional Chinese Dongbei Suancai fermentation. *LWT*, 2023, 178: 114615 (doi: 10.1016/j.lwt.2023.114615)
- 5 Masirbaeva A., Sajfudin A., Zhantlesova S., Erdenbekova M., Talapbek Sh, Bajsarieva A. Klinicheskoe primeneniye probiotikov i prebiotikov. *Mikrobiologiya zhane virusologiya*, 2023, 1(40): 72–84 (doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.04)

6 Dzhakibaeva G., Bajdalinov A., Shemshura O., Izmajlova Je., Bajmahanova G. Aktivnost' kollekcionnyh molochnokislyh bakterij i laktozobrazhivajushhih drozhzhej i molochnokislyh bakterij, vkhodjashhih v konsorcium. *Mikrobiologija zhane virusologija*, 2022, 4(39): 117–130 (doi.org/10.53729/MV-AS.2022.04.09)

7 Saubenova M., Olejnikova E., Chizhaeva A., Alybaeva A., Ajtzhanova A., Amangeldi A., Potoroko I. Mikrobiota cheloveka i bolezni civilizacii: v poiskah vyhoda. *Mikrobiologija zhane virusologija*, 2022, 3(38): 4–22 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.03.01)

8 Posokina N.E., Zaharova A.I. Molochnokislye mikroorganizmy, sozdajushhie optimal'nye startovye uslovija dlja processa fermentacii kapusty belokochannoj. *Ovoshhi Rossii*, 2019, 4: 80-84 (doi: 10.18619/2072-9146-2019-4-80-84)

9 Shishlova E.S., Posokina N.E., Ljalina O.Ju. Osnovy fermentirovaniya belokochannoj kapusty. *Vestnik voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernyh tehnologij*, 2018, 80(2): 242-248 (doi: 10.20914/2310-1202-2018-2-242-248)

10 Di Biase M., Le Marc Y., Bavaro A.R., De Bellis P., Lonigro S.L., Lavermicocca P., Postollec F., Valerio F. A Predictive growth model for pro-technological and probiotic *Lactocaseibacillus paracasei* strains fermenting white cabbage. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 907393 (doi: 10.3389/fmicb.2022.907393)

11 Chen T., Su W., Mu Y., Jiang L., Qi Q. Study on the quality formation mechanism of Zao chili with enhanced fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum* 5-1. *Food Chemistry X*, 2023, 17: 100626 (doi: 10.1016/j.fochx.2023.100626)

12 Tian Y., Mu Y., Su W., Qi Q. Correlation between microbiota and volatile flavor compounds during inoculated fermentation of Chinese Pickled pepper (Paojiao). *LWT*, 2023, 178: 114642 (doi: 10.1016/j.lwt.2023.114642)

13 Liang H., He Z., Wang X., Song G., Chen H., Lin X., Ji C., Zhang S. Bacterial profiles and volatile flavor compounds in commercial Suancai with varying salt concentration from Northeastern China. *Food Research International*, 2020, 137: 109384 (doi: 10.1016/j.foodres.2020.109384)

14 Erdoğan A.K., Ertekin Filiz B. Menaquinone content and antioxidant properties of fermented cabbage products: Effect of different fermentation techniques and microbial cultures. *Journal of Functional Foods*, 2023, 102: 105467 (doi: 10.1016/j.jff.2023.105467)

15 Luo W., Wu W., Du X., Yu Y., Wu J., Xu Y., Li L. Regulation of the nitrite, biogenic amine and flavor quality of Cantonese pickle by selected lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102554. (doi: 10.1016/j.fbio.2023.102554)

16 Gaudio G., Weil T., Marzorati G., Solovyev P., Bontempo L., Franciosi E., Bertoldi L., Pedrolli C., Tuohy K.M., Fava F. Microbial and metabolic characterization of organic artisanal sauerkraut fermentation and study of gut health-promoting properties of sauerkraut brine. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 929738 (doi: 10.3389/fmicb.2022.929738)

17 Christensen L.P., Edelenbos M., Kreutzmann S. Fruits and vegetables of moderate climate. In: *Flavours and Fragrances*. Berger R.G. (eds) Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, 135–187: (doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_7)

18 Sun X.-H., Qi X., Han Y.-D., Guo Z.-J., Cui C.-B., Lin C.-Q. Characteristics of changes in volatile organic compounds and microbial communities during the storage of pickles. *Food Chemistry*, 2023, 409: 135285 (doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135285)

19 Major N., Bažon I., Išić N., Kovačević TK, Ban D, Radeka S, Goreta Ban S. Bioactive properties, volatile compounds, and sensory profile of sauerkraut are dependent on cultivar choice and storage conditions. *Foods*, 2022, 11(9): 1218 (doi.org/10.3390/foods11091218)

20 Siddeeg A., Afzaal M., Saeed F., Ali R., Shah Y.A., Shehzadi U., Ateeq H., Waris N., Hussain M., Raza M.A., Al-Farga A. Recent updates and perspectives of fermented healthy super food sauerkraut: a review. *International Journal of Food Properties*, 2022, 25(1): 2320-2331 (doi: 10.1080/10942912.2022.2135531)

21 Wiczorek M.N., Drabińska N. Flavour Generation during lactic acid fermentation of Brassica vegetables—Literature Review. *Applied Sciences*. 2022, 12(11): 5598. (doi: 10.3390/app12115598)

- 22 Jansone L., Kruma Z., Straumite E. Evaluation of chemical and sensory characteristics of sauerkraut juice powder and its application in food. *Foods*, 2023, 12(1): 19 (doi: 10.3390/foods12010019)
- 23 Lin H., Bi X., Zhou B., Fang J., Liu P., Ding W., Che Z., Wang Q., He Q. Microbial communities succession and flavor substances changes during Pixian broad-bean paste fermentation. *Food Bioscience*, 2021, 42: 101053 (doi: 10.1016/j.fbio.2021.101053)
- 24 Zhou X., Zhou W., He X., Deng Y., Li L., Li M., Feng X., Zhang L., Zhao L. Effects of post-fermentation on the flavor compounds formation in red sour soup. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1007164 (doi: 10.3389/fnut.2022.1007164)
- 25 Torres S., Verón H., Contreras L., Isla M.I. An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*, 2020, 9(2): 112-123 (doi: 10.1016/j.fshw.2020.02.006)
- 26 Peng X., Yue Q., Chi Q., Liu Y., Tian T., Dai S., Yu A., Wang S., Wang H., Tong X., Jiang L. Microbial diversity and flavor regularity of soy milk fermented using kombucha. *Foods*, 2023, 12(4): 884 (doi: 10.3390/foods12040884)
- 27 Haghshenas B., Nami Y., Abdullah N., Radiah D., Rosli R., Barzegari A., Khosroushahi A.Y. Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *International journal of food science & technology*, 2015, 50(4): 1056-1064 (doi: 10.1111/ijfs.12718)
- 28 Aghazadeh Z., Pouralibaba F., Yari Khosroushahi A. The prophylactic effect of *Acetobacter syzygii* probiotic species against squamous cell carcinoma. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects.*, 2017, 11(4): 208-214 (doi: 10.15171/joddd.2017.037)
- 29 Kim D.-H., Kim H., Seo K.-H. Microbial composition of Korean kefir and antimicrobial activity of *Acetobacter fabarum* DH1801. *Journal of Food Safety*, 2020, 40(1): e12728 (doi: 10.1111/jfs.12728)
- 30 Neffe-Skocińska K., Wójtowicz M., Dąbrowski M., Jaworska D. Acetic acid bacteria as potential next-generation probiotics [Bakterie kwasu octowego jako potencjalne probiotyki nowej generacji]. *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology. Quality*, 2020, 27(3): 15 - 27 (doi: 10.15193/zntj/2020/124/344)
- 31 Aitzhanova A., Oleinikova Y., Mounier J., Hymery N., Leyva Salas M., Amangeldi A., Saubenova M., Alimzhanova M., Ashimuly K., Sadanov A. Dairy associations for the targeted control of opportunistic *Candida*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(8): 143 (doi: 10.1007/s11274-021-03096-1)
- 32 Olejnikova E.A., Chizhaeva A.V., Saubenova M.G., Alybaeva A.Zh., Amangeldi A.A. Probioticheskiy potencial uksusnokislyh bakterij. *Mat. mezhdunar. nauch.-prakt. onlajn konferencii «Sovremennye problemy estestvennyh nauk i mezhdisciplinarnye issledovaniya»*. Atyrau, H. Dosmyhamedov atyndary Atyrau universiteti, 2021, 2: 161-165.
- 33 Huang Y.Y., Qin X.K., Dai Y.Y., Huang L., Huang G.R., Qin Y.C., Wei X., Huang Y.Q. Preparation and hypoglycemic effects of chromium- and zinc-rich *Acetobacter aceti*. *World J. Diabetes*, 2022, 13(6): 442-453 (doi: 10.4239/wjd.v13.i6.442)

МРНТИ: 62.99.39

Ф.К. САРСЕКЕЕВА^{1*}, А.И. ТОКЕН¹, А.А. СЕРІК¹, Н.К. ШАКТАЙ¹,
Н.Р. АҚМУХАНОВА¹, С.К. САНДЫБАЕВА¹, Д.К. КИРБАЕВА¹, Р. МАММАДОВ²

¹Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

²Университет Муглы Сытки Космана, Мугла, Турция

*e-mail: fariza.sarsekeyeva@kaznu.edu.kz

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ, ФУНГИЦИДОВ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ РИСОВЫХ ПОЛЕЙ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.05

Аннотация

Изучено воздействие антибиотиков (ампициллина, тетрациклина, цефтриаксона) и фунгицидов (флуконазола, нистатина) широкого спектра действия, а также ультрафиолетового излучения на культуры микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 и цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, *Phormidium* sp Sh-4 и сопутствующие микроорганизмы, выделенные из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.). Ампициллин и тетрациклин в концентрациях 200 мкг/мл и цефтриаксон в концентрации 100 мкг/мл подавляли жизнедеятельность всех цианобактерий и сопутствующих бактерий. Сопутствующие микромицеты подавлялись обоими исследуемыми фунгицидами в концентрации 40 мкг/мл, большинство бактерий – комбинированным препаратом (тетрациклин+фунгицид). Исследуемые штаммы цианобактерий оказались более чувствительны к антибиотикам, чем к фунгицидам. Возможно, это вызвано физиологическим сходством бактерий и цианобактерий, а также их симбиотической взаимосвязью. Облучение культур ультрафиолетовым излучением показало наибольшую чувствительность микроводорослей. При облучении суспензий микроводорослей и цианобактерий УФ–лучами в течение 10-20 минут все клетки микроорганизмов погибали, тогда как 10-15-минутное облучение позволяет избавиться лишь от некоторых неспороносных бактерий.

Ключевые слова: микроводоросли, цианобактерии, альголизация почвы, антибиотики, биоудобрения.

В последнее время сельскохозяйственный сектор сталкивается с новыми вызовами по повышению производительности с целью накормить растущее население мира, одновременно уменьшая негативное воздействие на окружающую среду и сохраняя природные ресурсы для будущих поколений. Свой вклад в решение данных проблем могут внести биопрепараты на основе микроводорослей и цианобактерий. Данные микроорганизмы имеют большой потенциал для повышения плодородия почв и стимуляции роста растений [1,2]. Необходимо отметить высокую положительную экологическую роль цианобактерий в почве в качестве азотфиксаторов и накопителей органических веществ [3], широкий спектр адаптации к различным почвенным и гидротермическим условиям [4], ростстимулирующие свойства [5]. Создание биопрепаратов для повышения плодородия почв открывает новые перспективы их использования в агрономии, а также для решения общих задач биотехнологии, где широко используются стабильно работающие микробные сообщества.

Создание и применение биопрепаратов на основе микроводорослей и цианобактерий — наиболее эффективный прием повышения продуктивности растений и качества их урожая, позволяющий сохранять естественное плодородие почв и экологическое равновесие окружающей среды. Их использование дает возможность регулировать численность и активность полезной микрофлоры в ризосфере возделываемых культур, а также обеспечивать растения азотом, фосфором и другими биоактивными компонентами.

С точки зрения прикладного использования, они экономичны и технологичны, так как их культивирование осуществляется на дешевых питательных средах (без органических соединений и источников минерального азота), а накопление биомассы происходит в короткие сроки даже в экстенсивных культурах, не требующего дорогостоящего оборудования [6].

Следует отметить, что для применения биопрепаратов на посевных полях более эффективно использовать аборигенные штаммы фототрофных микроорганизмов. В связи с этим проведен поиск и выделение культур цианобактерий и микроводорослей из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.) и определен видовой состав альгофлоры исследуемых проб.

Для дальнейших исследований по применению данных штаммов в агробиотехнологии возникает необходимость получения аксеничных культур. Это является сложным процессом, поскольку эти организмы входят в состав консорциумов, включающих, кроме самих цианобактерий и микроводорослей, сопутствующую микрофлору. Существуют методики по очистке водорослей от сопутствующих микроорганизмов с применением методов УФ-излучения, мембранной фильтрации и антибиотиков [6–8]; при этом некоторые водоросли сами обладают фунгицидной и фунгистатической активностью [9]. Однако культуры цианобактерий и микроводорослей весьма специфичны, так как некоторые микроорганизмы могут прочно связываться с их клеточной стенкой или находиться в слизистом чехле (гликокаликсе) цианобактерий, в связи с чем подбор метода очистки является сложной задачей. Отмечено, что развитие этих организмов в аксеничных культурах происходит медленнее и приводит к морфологическим и физиологическим изменениям [7]. Поэтому изучение воздействия различных, отличающихся по механизму и спектру действия антибиотиков и фунгицидов на цианобактерии и микроводоросли для выделения чистых культур, является актуальной задачей. Цель работы – изучение воздействия антибиотиков и фунгицидов, а также ультрафиолетового излучения на рост и развитие цианобактерий и микроводорослей, выделенных из почв рисовых полей Казахстана, для очистки от сопутствующей микрофлоры и получения аксеничных культур. Выделение чистых культур проводили с целью поиска новых штаммов микроводорослей и цианобактерий, характеризующихся высокой скоростью роста и ростстимулирующей активностью по отношению к сельскохозяйственным растениям.

Материалы и методы исследования

Для исследований были использованы штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 и цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, выделенные из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.). Из отобранных почвенных проб в лабораторных условиях на соответствующих стандартных питательных средах (BG11, Тамиа, Заррука, L2min) были получены накопительные культуры микроводорослей и цианобактерий.

Анализ на чистоту на питательных средах МПА, Сабуро и LB [10] показал их загрязнение грибной и бактериальной флорой.

В исследовании использовали антибиотики (ампициллин, тетрациклин, цефтриаксон) и фунгициды (флуконазол, нистатин) широкого спектра действия. Отдельные антибиотики, фунгициды и их комбинации добавляли в жидкую питательную среду, разливали в пробирки и вносили исследуемый штамм цианобактерий и микроводорослей. Для контроля использовали минеральную среду без антибиотиков и фунгицидов. Перед посевом в питательную среду с антибиотиками и фунгицидами небольшое количество биомассы цианобактерий и микроводорослей растирали в пробирке для разрушения окружающих колонии слизистых чехлов, с которыми могут быть связаны сопутствующие микроорганизмы и их споры. Штаммы культивировали при дневном освещении в течение 7 суток при комнатной температуре, затем оценивали их рост визуально и под световым

микроскопом. Для проверки на чистоту культуры высевали на свежую питательную среду, и их стерильность определялась путем культивирования на питательной среде LB.

Для выявления роста сопутствующей микрофлоры штаммы после культивирования в среде с антибиотиками и фунгицидами пересевали на картофельный агар с глюкозой (10 г/л).

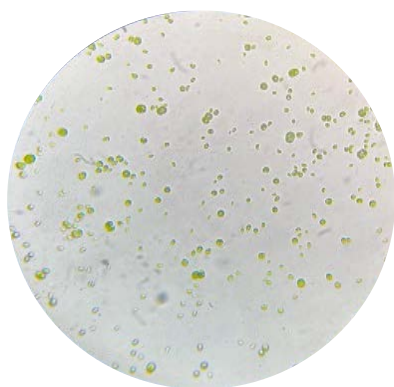
Для изучения влияния УФ-излучений на подавление жизнедеятельности микроорганизмов использовалось стерилизующее действие ультрафиолетовых лучей (254 нм). Культуру цианобактерий на чашках Петри облучали 10–20 минут ультрафиолетовыми лучами. Источником ультрафиолета были бактерицидные лампы БУВ-20, БУВ-40, ПРК-10. Расстояние культуры от источника облучения – 20-30 см. После облучения цианобактерии и микроводоросли высевались на питательный агар, и проводился контроль бактериальной чистоты микроскопическим методом.

Результаты и обсуждение

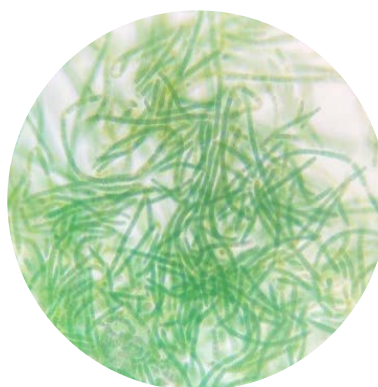
Из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.) микробиологическими методами выделены альгологически чистые культуры микроводорослей и цианобактерий. Пересевы делали на питательных жидких и агаризованных твердых средах Заррука, BG-11 и Громова на чашках Петри и в пробирках, которые помещали на свет. На «неорганической» минеральной среде при освещении преимущественно выживают культуры цианобактерий и микроводорослей [11]. Из выращенных скоплений микроводорослей и цианобактерий вновь делали пересевы на жидкую питательную среду или скошенный агар. Так как среды использовались селективные, предназначенные для культивирования цианобактерий или микроводорослей, отделить их друг от друга особого труда не составило.

Отдельные чистые культуры были выделены методом «штриха». Микробиологической петлей отбирали небольшое количество образца, которое потом распределяли по поверхности питательной среды. Сначала штрихи содержали большое количество цианобактерий и микроводорослей, однако по мере движения петли, число клеток уменьшалось до одиночных клеток. После посева чашки Петри инкубировали до начала роста колоний.

В результате многократных пересевов получены следующие альгологически чистые культуры микроводорослей: *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 и цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 (рисунок 1).



Chlorella vulgaris sp BB-5



Oscillatoria pseudogeminate sp BB-11

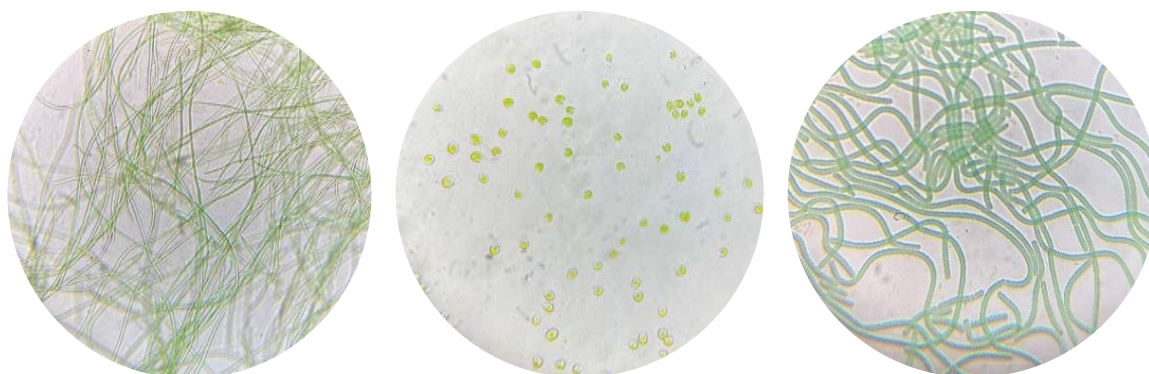
*Phormidium* sp Sh-4*Chlamydomonas* sp Sh-2*Spirulina* sp Sh-8

Рисунок 1 - Альгологически чистые культуры цианобактерий и микроводорослей

Антибиотики антибактериального действия- ампициллин, тетрациклин, цефтриаксон, как и ожидалось, не подавляли рост эукариотических микроводорослей, но угнетали жизнедеятельность цианобактерий, а в повышенных дозах вызывали их гибель (таблица 1). Тетрациклин и цефтриаксон в концентрациях 200 мкг/мл и 100 мкг/мл, соответственно, полностью разрушали клеточную стенку цианобактерий. При этом не до конца позволяли избавиться от бактериальной флоры. При пересеве на питательные среды рост цианобактерий не происходил, тогда как некоторые виды бактерий при пересеве на питательные среды без антибиотков начинали вновь произрастать. Ампициллин оказал статическое воздействие. Также во всех вариантах грибные колонии полностью развивались.

Далее применяли антибиотик тетрациклин в концентрации 40 мкг/мл в сочетании с фунгицидами - флуконазолом и нистатином (100 мкг/мл), что позволило получить чистые от грибной флоры штаммы микроводорослей и цианобактерий, но с изменением формы микроводоросли *Chlorella vulgaris* sp BB-5 в более продолговатую.

Использование антибиотика цефтриаксона в концентрации 100 мкг/мл позволило получить бактериологически чистые штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5 и *Chlamydomonas* sp Sh-2, тогда как концентрация данного антибиотика 40 мкг/мл позволила очистить штаммы цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 от бактериального загрязнения не в полном объеме, а при повышенной концентрации, 100 мкг/мл, наблюдалась гибель клеток самих цианобактерий.

Действие антибиотиков ампициллина и тетрациклина при очистке штаммов микроводорослей и цианобактерий было схожим, концентрация 40 мкг/мл не оказывала никакого влияния на все тестируемые микроорганизмы, концентрация 100 мкг/мл подавляла рост лишь нескольких видов бактерий и производила задержку роста штаммов цианобактерий, тогда как концентрация 200 мкг/мл фиксировала гибель всех клеток бактерий и цианобактерий в том числе.

Таблица 1 – Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, фунгицидам и ультрафиолетовому излучению

Антибиотики, фунгициды (мкг/мл) и УФ-излучение (мин)	Жизнеспособность организмов						
	<i>Chlorella vulgaris</i> sp BB-5	<i>Chlamydomonas</i> sp Sh-2	<i>Oscillatoria pseudogeminate</i> sp BB-11	<i>Phormidium</i> sp Sh-4	<i>Spirulina</i> sp Sh-8	Микромицеты	Бактерии
Контроль (0)	++	++	++	++	++	++	++
Ампициллин (40)	++	++	+	+	+	++	+
Тетрациклин (40)	++	++	+	+	+	++	+
Цефтриаксон (40)	++	++	+	+	+	++	+
Ампициллин (100)	++	++	+	+	+	++	+
Тетрациклин (100)	++	++	+	+	+	++	+
Цефтриаксон (100)	++	++	-	-	-	++	-
Ампициллин (200)	++	++	-	-	-	++	-
Тетрациклин (200)	++	++	-	-	-	++	-
Тетрациклин (40)+нистатин (40)	+	+	+	+	+	-	+
Тетрациклин (40)+флуконазол (40)	+	+	+	+	+	-	+
УФ- излуч. (10)	+	+	+	+	+	+	+
УФ- излуч. (15)	-	-	+	+	+	-	+
УФ- излуч. (20)	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: микроводоросли и цианобактерии: ++ – рост активный; + – рост сдержанный; – – гибель организма; микромицеты и бактерии: ++ – более 10 КОЕ в чашке Петри; + – менее 10 КОЕ в чашке Петри; – – организм отсутствует

Фунгициды (флуконазол и нистатин) способствовали очищению штаммов микроводорослей и цианобактерий от грибов уже при концентрации 40 мкг/мл. Использование данных фунгицидов в составе с антибиотиком тетрациклином в концентрации 40 мкг/мл позволило получить очищенные от грибов штаммы микроводорослей и цианобактерий. Применение только фунгицидных препаратов привело бы к обратному эффекту – увеличению числа колоний бактерий. Возможно, это вызвано тем, что при использовании антибиотика или фунгицида часть микрофлоры уничтожалась, и начинали активно развиваться бактерии или микромицеты, занимая освободившуюся экологическую нишу [12].

Облучение ультрафиолетом (с длиной волны 254 нм и интенсивностью 40 эрг/мм²) показало, что 15-минутное облучение выдержали только цианобактерии, рост микроводорослей уже после 10-минутного облучения сильно замедлялся, а при пересеве на свежие питательные среды микроводоросли переставали размножаться и погибали. Эти результаты показывают высокую устойчивость цианобактерий к физико-химическим факторам внешней среды.

У штаммов микроводорослей и цианобактерий, выживших после воздействия антибиотиков, фунгицидов и ультрафиолетового облучения, определяли наличие сопутствующей микрофлоры. У микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5 и *Chlamydomonas* sp Sh-2 после обработки антибиотиком цефтриаксоном в концентрации 100 мкг/мл и фунгицидом в концентрации 40 мкг/мл сопутствующей микрофлоры не обнаружено, тогда как после всех видов воздействия выжившие штаммы цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 содержали бактерии, но преимущественно одного вида.

Заключение

Таким образом выявлены наиболее эффективные концентрации действия антибиотиков, фунгицидов и ультрафиолетового облучения для получения аксеничных культур микроводорослей и цианобактерий, выделенных из почв посевных полей РК. При обработке антибиотиком цефтриаксоном в концентрации 100 мкг/мл и фунгицидом в концентрации 40 мкг/мл удалось получить аксеничные штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5 и *Chlamydomonas* sp Sh-2. При использовании ультрафиолетового облучения не удалось получить бактериологически чистые культуры, так как при облучении суспензий микроводорослей и цианобактерий УФ–лучами в течение 10–20 минут все клетки микроорганизмов погибали, тогда как 10–15-минутное облучение позволяет избавиться лишь от некоторых неспорозных бактерий.

Финансирование

Исследование проводилось в рамках прехтов по теме: ИРН AP13068051 «Разработка технологии получения биопрепаратов на основе штаммов микроводорослей и цианобактерий для повышения урожайности сельскохозяйственных растений» и AP14870201 «Поиск и изучение новых вторичных метаболитов цианобактерий перспективных для использования в сельскохозяйственной биотехнологии», финансируемым МНВО РК.

Литература:

- 1 Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2009. Вып. 20 С. 120-133 (http://nbuv.gov.ua/j-pdf/eco00_2009_1_19)
- 2 Лукьянов В.А., Стифеев А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе. Монография. Курск. 2014 (https://microalgae.ru/f/prikladnye_aspekty_primeneniya_mikrovodoroslej_v_agrocenozah.pdf)
- 3 Доброжан С.Н., Шалару В.В., Шалару В.М., Стратулат И.И., Семенюк Е.Н. Использование некоторых видов синезеленых азотфиксирующих водорослей в качестве биологического удобрения. Альгология. 2014. Т.24 №3. С.426-479. (<http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/81419>)
- 4 Акшинцев, А. А., Баренбойм, Г. М., Кириченко, В. Е., Никитина, В. Н., & Чернягина, О. А. (2016). Экстремальные природные воды и их биота: цианобактерии некоторых гидротерм Камчатки. *ВОДА: ХИМИЯ И ЭКОЛОГИЯ*, (1), 43-52. (<http://elibrary.ru/item.asp?id=26696965>)
- 5 Al-Shakankery, F. M., Hamouda, R. A. and Ammar, M. M. (2014). The promotive effect of different concentrations of marine algae as bio fertilizers on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) plants. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4, 43201-43211.

(https://www.researchgate.net/publication/265126114_The_promotive_effect_of_different_concentration_s_of_marine_algae_as_biofertilizers_on_growth_and_yield_of_maize_Zea_Mays_L_plants)

6 С.Н. Сейлбек, М. Тортай, Н.Р. Акмуханова, Ф.К. Сарсекеева, Д.К. Кирбаева, Н.Е. Бидағулова, Н.А. Алтыбаева, А.Б. Еламанова. Ақдала егіс алқаптарының микробалдырлар биоалуантүрлілігі және бактерияларға қарсы белсенділігі бар цианобактерияларды бөліп алу. Микробиология және вирусология. №1 (40), 2023. – 201-220 б. (DOI: 10.537290/MV-AS.2023.01.14)

7 Rezanka T., Dembitsky V. M. Folia Microbiol. 2006. Vol. 51. Pp. 159–182. (DOI: 10.1007/BF02931419)

8 Zhubanova A. A., Ernazarova A. K., Kaiyrmanova G. K., Zayadan B. K., Savitskaya I. S., Abdieva G. Zh., Kistaubaeva A. S., Akimbekov N. Sh., Fiziologiya rastenii. 2013. Vol. 60. No. 4. Pp. 588–595. (DOI:10.1134/S1021443713040183)

9 Sirenko L. A., Sakevich A. I., Osipov L. F., Lukina L. F., Kuz'menko M. I., Kozitskaya V. N. i dr. Metody fiziologo-biokhimicheskogo issledovaniya vodoroslei v gidrobiologicheskoi praktike [Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice]. Kiev: Naukova dumka, 1975.

10 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М: Изд-во МГУ, 1976. - С.56-124. (<https://microbius.ru/library/n-s-egorov-rukovodstvo-k-prakticheskim-zanyatiyam-po-mikrobiologii>)

11 Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей. - Москва: Научный мир, 2012. - 184 с. (https://www.studmed.ru/coglin-l-n-pronina-n-a-biotehnologiya-mikrovodorosley_d372e24aa4c.html)

12 Е. Ю. Егупова, В. Б. Багмет, Ш. Р. Абдуллин. ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ И ФУНГИЦИДОВ НА ЦИАНОБАКТЕРИЮ NOSTOC PUNCTIFORME (KUTZ.) HARIOT И СОПУТСТВУЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ. Вестник Башкирского университета. 2017. Т. 22. №1. Стр 86-89. (<https://cyberleninka.ru/article/n/vozdeystvie-antibiotikov-i-fungitsidov-na-tsiyanobakteriyu-nostoc-punctiforme-kutz-hariot-i-soputstvuyuschie-mikroorganizmy>)

Ф.К. САРСЕКЕЕВА^{1*}, А.И. ТӨКЕН¹, А.А. СЕРІК¹, Н.К. ШАКТАЙ¹,
Н.Р. АҚМУХАНОВА¹, С.К. САНДЫБАЕВА¹, Д.К. КИРБАЕВА¹, Р. МАММАДОВ²

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан

²Мугла Ситки Кочман Университеті, Мугла, Түркия

*e-mail: fariza.sarsekeyeva@kaznu.edu.kz

АНТИБИОТИКТЕРДІҢ, ФУНГИЦИДТЕРДІҢ ЖӘНЕ УЛЬТРАКҮЛГІН СӘУЛЕЛЕРДІҢ КҮРІШ АЛҚАПТАРЫНЫҢ ТОПЫРАҒЫНАН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН МИКРОБАЛДЫРЛАР МЕН ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ДАҚЫЛДАРЫНА ӘСЕРІ

Түйін

Кең спектрлі антибиотиктердің (ампицилин, тетрациклин, цефтриаксон) және фунгицидтердің (флуконазол, нистатин), сондай-ақ ультракүлгін сәулеленуінің Бірлік ауылының (Алматы облысы) және Шиелі ауылының (Қызылорда облысы) егіс алқаптарының топырағынан бөлінген *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 микробалдырлар дақылдарына және *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, *Phormidium* sp Sh-4 цианобактерияларына, ілеспе микроорганизмдеріне әсері зерттелді. Зерттелген антибиотиктердің ампицилин, тетрациклин, 200 мкг/мл және цефтриаксонның 100 мкг/мл концентрациясы барлық цианобактериялар мен ілеспе бактериялардың тіршілік әрекетін тежеді. Ілеспе микромицеттердің өсуі, концентрациясы 40 мкг/мл болатын екі зерттелетін фунгицидпен, бактериялардың көпшілігінің өсуі құрамдастырылған препаратпен (тетрациклин + фунгицид) тежелді. Цианобактериялардың зерттелген штамдары фунгицидтерге қарағанда антибиотиктерге сезімтал екендігі дәлелденді. Бұл бактериялар мен цианобактериялардың физиологиялық ұқсастығынан, сондай-ақ олардың симбиотикалық байланысынан туындауы мүмкін. Дақылдарды ультракүлгін сәулемен сәулелендіру микробалдырлардың ең жоғары сезімталдығын көрсетті, сондықтан микробалдырлар мен цианобактериялардың суспензиясын ультракүлгін сәулелермен 10-20 минут

сәулелендіру кезінде микроорганизмдердің барлық жасушалары өлді, ал 10-15 минуттық сәулелену тек кейбір спорасыз бактериялардан арылуға мүмкіндік береді.

Кілтті сөздер: микробалдырлар, цианобактериялар, топырақтың алголизациясы, антибиотиктер, биотыңайтқыш.

IRSTI: 62.99.39

F.K. SARSEKEYEVA^{1*}, A.I. TOKEN¹, A.A. SERIK¹, N.K. SHAKTAY¹,
N.R. AKMUKHANOVA¹, S.K. SANDYBAYEVA¹, D.K. KIRBAYEVA¹, R. MAMMADOV²

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla, Turkey

*e-mail: fariza.sarsekeyeva@kaznu.edu.kz

THE EFFECT OF ANTIBIOTICS, FUNGICIDES AND ULTRAVIOLET RADIATION ON CULTURES OF MICROALGAE AND CYANOBACTERIA ISOLATED FROM THE SOIL OF RICE FIELDS

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.05

Abstract

The effect of broad-spectrum antibiotics (ampicillin, tetracycline, ceftriaxone) and fungicides (fluconazole, nystatin), as well as ultraviolet radiation on microalgae cultures *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 and cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, *Phormidium* sp Sh-4 and concomitant microorganisms isolated from the soil of the sown fields of Birlik village (Almaty region) and Shieli village (Kyzylorda region) was studied. The concentrations of the studied antibiotics ampicillin, tetracycline, 200 µg/ml and ceftriaxone 100 µg/ml suppressed the vital activity of all cyanobacteria and concomitant bacteria. Concomitant micromycetes were suppressed by both studied fungicides at a concentration of 40 µg/ml, most bacteria were suppressed by a combined preparation (tetracycline + fungicide). The studied strains of cyanobacteria were more sensitive to antibiotics than to fungicides. Perhaps this is caused by the physiological similarity of bacteria and cyanobacteria, as well as their symbiotic relationship. Irradiation of cultures with ultraviolet radiation showed the greatest sensitivity of microalgae, so when irradiating a suspension of microalgae and cyanobacteria with UV rays for 10-20 minutes, all microorganism cells died, whereas 10-15 minute irradiation allows us to get rid of only some non-spore-bearing bacteria.

Keywords: microalgae, cyanobacteria, soil algalization, antibiotics, biofertilizer.

Recently, the agricultural sector has been facing new challenges to increase productivity in order to feed a growing world population, while reducing environmental impact and preserving natural resources for future generations. Biological preparations based on microalgae and cyanobacteria can contribute to solving these problems. These microorganisms have great potential for increasing soil fertility and stimulating plant growth [1, 2]. It should be noted about the high positive ecological role of cyanobacteria in the soil as nitrogen fixers, organic matter accumulators [3] and a wide range of adaptation to various soil and hydrothermal conditions [4], but it is also important to note their growth stimulating abilities [5]. The creation of new biological preparations to increase soil fertility opens up new prospects for the use of microbial preparations in agronomy and, with a high probability, can be used to solve general problems of biotechnology, where there is a need for stable microbial communities.

The creation and application of biopreparations based on microalgae and cyanobacteria is the most effective method for increasing plant productivity and the quality of their harvest, allowing for the preservation of the natural fertility of soils and the ecological balance of the environment. Their use makes it possible to regulate the number and activity of beneficial microflora in the rhizosphere of cultivated crops, as well as to provide plants with nitrogen, phosphorus and other bioactive components.

From the point of view of applied use, they are technologically advanced, which includes cheap cultivation media (the absence of organic compounds and mineral nitrogen sources in the medium) and the rapid accumulation of biomass even in extensive cultures that do not require expensive equipment [6].

It should be noted that it is more efficient to use native strains of phototrophic microorganisms for the use of biological preparations in sown fields. In this regard, a search and isolation of cyanobacteria and microalgae cultures from the soil of the sown fields of the Birlik village (Almaty region) and the Shieli village (Kyzylorda region) was carried out. Soil samples were selected and the species composition of the studied samples algoflora was determined in order to isolate strains of cyanobacteria and microalgae.

For further research on the use of these strains in agricultural biotechnology, there is a need to obtain axenic cultures. This is a complex process, since these organisms form consortiums that include concomitant microflora, in addition to the cyanobacteria and microalgae themselves. There are methods for cleaning algae from concomitant microorganisms using UV radiation, membrane filtration, and antibiotics [6–8], while some algae themselves have fungicidal and fungistatic activity [9]. However, cyanobacteria and microalgae cultures are very specific, since some microorganisms can firmly bind to their cell wall or be located in the mucous membrane (glycocalyx) of cyanobacteria, and therefore the selection of a purification method is a difficult task. It was noted that the development of these organisms in axenic cultures is slower and leads to morphological and physiological changes [7]. Therefore, the study of the effect of various antibiotics and fungicides that differ in the mechanism and spectrum of action on cyanobacteria and microalgae for the isolation of pure cultures is an urgent task. The aim of the work is to study the effects of antibiotics and fungicides, as well as ultraviolet radiation on the growth and development of cyanobacteria and microalgae isolated from the rice fields of the Republic of Kazakhstan for purification from the concomitant microflora and obtaining axenic cultures. The pure cultures were isolated in order to search for new strains of microalgae and cyanobacteria, characterized by a high growth rate and growth-stimulating activity in relation to agricultural plants.

Materials and methods of research

The microalgae strains *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 and cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8 isolated from the soil of the sown fields of Birlik village (Almaty region) and Shieli village (Kyzylorda region) were used for research. Enrichment cultures of microalgae and cyanobacteria were obtained from selected soil samples in laboratory conditions on the appropriate standard nutrient media (BG11, Tamia, Zarruka, L2min).

Analysis for purity from bacterial and fungal contamination on nutrient media MPA, Sabur and LB [10] showed their contamination with fungal and bacterial flora.

Broad-spectrum antibiotics (ampicillin, tetracycline, ceftriaxone) and fungicides (fluconazole, nystatin) were used in the study. Individual antibiotics, fungicides, and their combinations were added to a liquid nutrient medium, poured into test tubes, and the investigated strain of cyanobacteria and microalgae was added. For control, a mineral medium without antibiotics and fungicides was used. Before sowing cyanobacteria and microalgae in the medium with antibiotics and fungicides, a small amount of biomass was triturated in a test tube to destroy the mucous membranes surrounding the colonies, which may be associated with concomitant microorganisms and their spores. The strains were cultivated in daylight for 7 days at room temperature, then their growth was assessed visually and under a light microscope. To check for purity, the cultures were plated on a fresh nutrient medium and their sterility was determined by cultivation on LB nutrient medium.

To detect the growth of concomitant microflora, after cultivation in the medium with antibiotics and fungicides, the strains were transplanted onto potato agar with glucose (10 g/l).

To study the effect of UV radiation on the suppression of the vital activity of microorganisms, the sterilizing effect of ultraviolet rays (254 nm) was used. The cyanobacterial culture on the dishes was irradiated for 10-20 minutes with ultraviolet rays. The bactericidal lamps BUV-20, BUV-40, PRK-10 were the source of ultraviolet. The distance of the culture from the source of irradiation is 20-30 cm. After irradiation, cyanobacteria and microalgae were seeded on agar, and the bacterial purity was controlled by a microscopic method.

Results and discussion

Algologically pure cultures of microalgae and cyanobacteria were isolated by microbiological methods from the soils of sown fields of the Birlik village (Almaty region) and the Shieli village (Kyzylorda region). Reseeding were done on liquid and agar solid media of Zarruk, BG-11, and Gromov on Petri dishes and in test tubes, which were placed on light. Cyanobacteria and microalgae cultures predominantly survive in an “inorganic” mineral medium under illumination [11]. From the grown accumulations of microalgae and cyanobacteria, the reseeded was carried out again to a liquid medium or a slant agar. Since the media were selective, intended for the cultivation of cyanobacteria or microalgae, it was not difficult to separate them from each other.

Separate pure cultures were isolated by the "stroke" method. A small amount of the sample was selected with a microbiological loop, which was then distributed over the surface of the medium. At first, the strokes contained a large number of cyanobacteria and microalgae, however, as the loop moved, the number of cells decreased to single cells. After inoculation, the plates were incubated until the colonies began to grow.

As a result of multiple reseedings, the following algologically pure cultures of microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 and cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 were obtained (Figure 1).

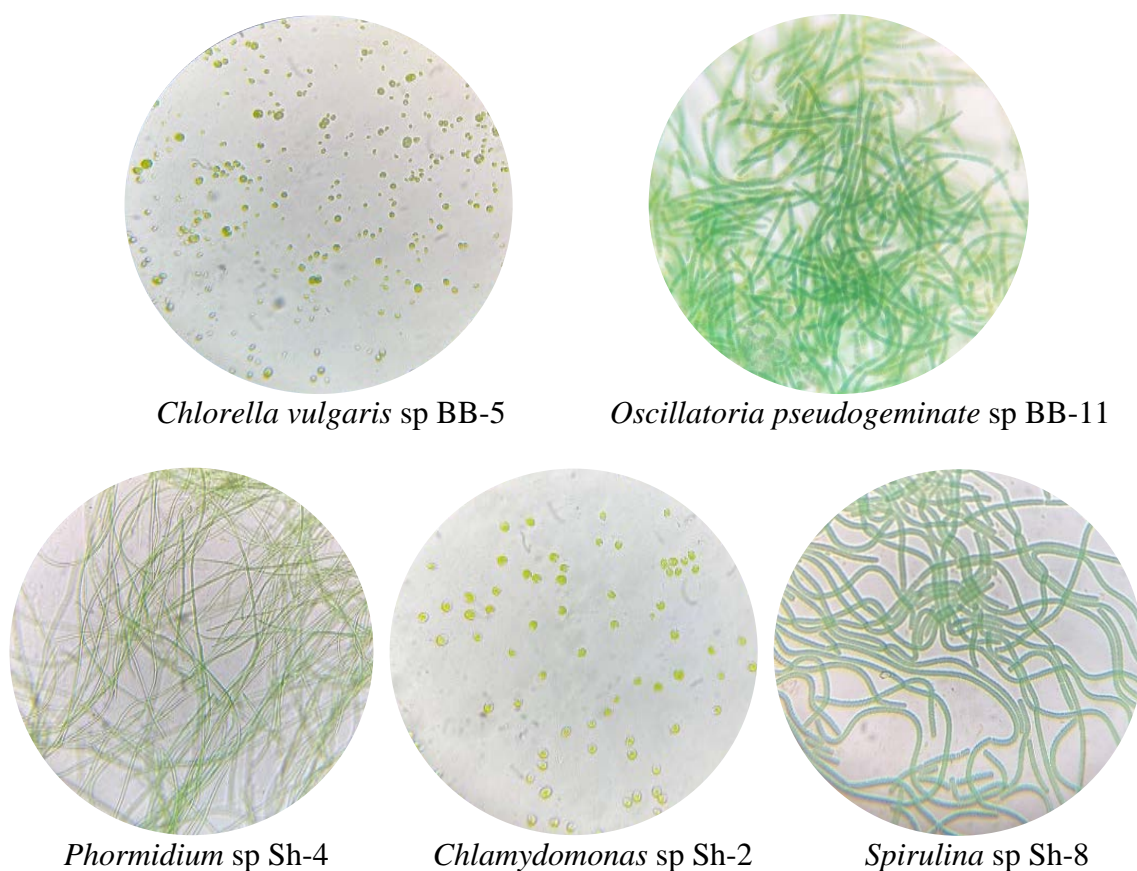


Figure 1 - Algologically pure cultures of cyanobacteria and microalgae

Antibacterial antibiotics – ampicillin, tetracycline, ceftriaxone, as expected, did not suppress the growth of eukaryotic microalgae, but suppressed the vital activity of cyanobacteria, and in high doses caused their death (table 1). Tetracycline and ceftriaxone at concentrations of 200 µg/ml and 100 µg/ml, respectively, completely destroyed the cyanobacterial cell wall. At the same time, it did not completely allow to get rid of the bacterial flora. When transferred to nutrient media, cyanobacteria did not grow, whereas some types of bacteria, when transferred to nutrient media without antibiotics, began to grow again. Ampicillin had a statistical effect. Also, in all variants, fungal colonies have fully developed.

Next, the antibiotic tetracycline was used at a concentration of 40 µg/ml in combination with the fungicides fluconazole and nystatin of 100 µg/ml, which made it possible to obtain pure strains of microalgae and cyanobacteria from the fungal flora, but it should be noted the change in shape into the more oblong microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5.

The use of the antibiotic ceftriaxone at a concentration of 100 µg/ml allowed to obtain bacteriologically pure strains of microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5 and *Chlamydomonas* sp Sh-2, while the concentration of this antibiotic of 40 µg/ml did not allow to purify the strains of cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 from bacterial contamination in full, and at an increased concentration of 100 µg/ml, the death of the cyanobacterial cells themselves was observed.

The action of the ampicillin and tetracycline antibiotics in the purification of microalgae and cyanobacteria strains was similar, at a concentration of 40 µg/ml it had no effect on all tested microorganisms, at a concentration of 100 µg/ml, the growth of only a few bacterial species was inhibited and the growth of cyanobacteria strains was delayed, while at - 200 µg/ml, the death of all bacterial cells, including cyanobacteria, was recorded.

Table 1-Resistance of microorganisms to antibiotics, fungicides and ultraviolet radiation

Antibiotics, fungicides (µg/ml) and UV radiation (min)	Viability of organisms						
	<i>Chlorella vulgaris</i> sp BB-5	<i>Chlamydomonas</i> sp Sh-2	<i>Oscillatoria pseudogeminate</i> sp BB-11	<i>Phormidium</i> sp Sh-4	<i>Spirulina</i> sp Sh-8	Micromycetes	Bacteria
1	2	3	4	5	6	7	8
Control (0)	++	++	++	++	++	++	++
Ampicillin (40)	++	++	+	+	+	++	+
Tetracycline (40)	++	++	+	+	+	++	+
Ceftriaxone (40)	++	++	+	+	+	++	+
Ampicillin (100)	++	++	+	+	+	++	+
Tetracycline (100)	++	++	+	+	+	++	+
Ceftriaxone (100)	++	++	-	-	-	++	-
Ampicillin (200)	++	++	-	-	-	++	-
Tetracycline (200)	++	++	-	-	-	++	-
Tetracycline (40)+nystatin (40)	+	+	+	+	+	-	+

Table 1 continued

1	2	3	4	5	6	7	8
Tetracycline (40)+ fluconazole (40)	+	+	+	+	+	-	+
UV radiation (10)	+	+	+	+	+	+	+
UV radiation (15)	-	-	+	+	+	-	+
UV radiation (20)	-	-	-	-	-	-	-

Note: microalgae and cyanobacteria: ++ – active growth; + – restrained growth,; - - the death of the organism; micromycetes and bacteria: ++ - more than 10 CFU in a Petri dish; + - less than 10 CFUs in a Petri dish; - - the organism is missing

Fungicides (fluconazole and nystatin) contributed to the purification of microalgae and cyanobacteria strains from fungi already at a concentration of 40 µg/ml. The use of these fungicides in combination with the antibiotic tetracycline at a concentration of 40 µg/ml made it possible to obtain strains of microalgae and cyanobacteria purified from fungi. The application of only fungicidal preparations would lead to the opposite effect - an increase in the number of bacterial colonies. Perhaps this is due to the fact that when using an antibiotic or fungicide, part of the microflora was destroyed, and bacteria or micromycetes began to actively develop, occupying the vacated ecological niche [12].

Ultraviolet irradiation (with a wavelength of 254 nm and an intensity of 40 erg/mm²) showed that only cyanobacteria withstood 15 minutes of radiation, the growth of microalgae was significantly slowed down after 10 minutes of radiation, and when transferred to fresh nutrient media, they ceased to multiply and died. These results show the high resistance of cyanobacteria to physical and chemical environmental factors.

The presence of concomitant microflora in strains of microalgae and cyanobacteria that survived after exposure to antibiotics, fungicides, and ultraviolet irradiation, was determined. In microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5 and *Chlamydomonas* sp Sh-2, after treatment with the antibiotic ceftriaxone at a concentration of 100 µg/ml and fungicide at a concentration of 40 µg/ml, concomitant microflora was not found. Whereas, after all exposures, the surviving strains of cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 contained bacteria, but predominantly of the same species.

Conclusion

Thus, the most effective concentrations of the action of antibiotics, fungicides and ultraviolet irradiation for obtaining axenic cultures of microalgae and cyanobacteria isolated from the sowing fields of the Republic of Kazakhstan were identified. When treating with the antibiotic ceftriaxone at a concentration of 100 µg/ml and fungicide at a concentration of 40 µg/ml, it was possible to obtain axenic strains of microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5 and *Chlamydomonas* sp Sh-2. When using ultraviolet irradiation, it was not possible to obtain bacteriologically pure cultures, since when a suspension of microalgae and cyanobacteria was irradiated with UV rays for 10-20 minutes, all cells of microorganisms died, while 10-15 minute irradiation allows us to get rid of only some non-spore-bearing bacteria.

Funding

The study was conducted within the framework of the project on the topic: IRN AP13068051 "Development of technology for obtaining biological preparations based on strains of microalgae and cyanobacteria to increase the yield of agricultural plants" and AP14870201 "Search and study

of new secondary metabolites of cyanobacteria promising for use in agricultural biotechnology", funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Makarova E.I., Oturina I.P., Sidyakin A.I. Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslei – obitatelei vodnyh ekosistem. Ekosistemy, ih optimizatsiya i ohrana. 2009. Vyp. 20 S. 120-133 (http://nbuv.gov.ua/j-pdf/ecooo_2009_1_19)
- 2 Lukanov V.A., Stifeev A.I. Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslei v agrosenoze. Monografiya. Kursk. 2014 (https://microalgae.ru/f/prikladnye_aspekty_primeneniya_mikrovodoroslej_v_agrocenozah.pdf)
- 3 Dobrojan S.N., Shalaru V.V., Shalaru V.M., Stratulat I.I., Semenuk E.N. Ispolzovanie nekotorykh vidov sinezelenykh azotfiksiruiushih vodoroslei v kachestve biologicheskogo udobreniya. Algologia. 2014. T.24 №3. S.426-479. (<http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/81419>)
- 4 Akshincev, A. A., Barenboim, G. M., Kirichenko, V. E., Nikitina, V. N., & Chernagina, O. A. (2016). Ekstremalnye prirodnye vody i ih biota: tsianobakterii nekotorykh gidroterm Kamchatki. VODA: HIMIA I EKOLOGIA, (1), 43-52. (<http://elibrary.ru/item.asp?id=26696965>)
- 5 Al-Shakankery, F. M., Hamouda, R. A. and Ammar, M. M. (2014). The promotive effect of different concentrations of marine algae as bio fertilizers on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) plants. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 4, 43201-43211. (https://www.researchgate.net/publication/265126114_The_promotive_effect_of_different_concentrations_of_marine_algae_as_biofertilizers_on_growth_and_yield_of_maize_Zea_Mays_L_plants)
- 6 S.N. Seilbek, M. Tortai, N.R. Akmuhanova, F.K. Sarsekeeva, D.K. Kirbaeva, N.E. Bidagulova, N.A. Altybaeva, A.B. Elamanova. Aqdala egis alqaptarynyn mikrobaldyrlar bioaluanturliligi jane bakterialarga qarsy belsendiligi bar tsianobakterialardy bolip alu. Mikrobiologia jane virusologia. №1 (40), 2023. – 201-220 b. (DOI: 10.537290/MV-AS.2023.01.14)
- 7 Rezanka T., Dembitsky V. M. Folia Microbiol. 2006. Vol. 51. Pp. 159–182. (DOI: 10.1007/BF02931419)
- 8 Zhubanova A. A., Ernazarova A. K., Kaiyrmanova G. K., Zayadan B. K., Savitskaya I. S., Abdieva G. Zh., Kistaubaeva A. S., Akimbekov N. Sh., Fiziologiya rastenii. 2013. Vol. 60. No. 4. Pp. 588–595. (DOI:10.1134/S1021443713040183)
- 9 Sirenko L. A., Sakevich A. I., Osipov L. F., Lukina L. F., Kuz'menko M. I., Kozitskaya V. N. i dr. Metody fiziologo-biokhimicheskogo issledovaniya vodoroslei v gidrobiologicheskoi praktike [Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice]. Kiev: Naukova dumka, 1975.
- 10 Egorov N.S. Praktikum po mikrobiologii. M: Izd-vo MGU, 1976. - S.56-124. (<https://microbius.ru/library/n-s-egorov-rukovodstvo-k-prakticheskim-zanyatiyam-po-mikrobiologii>)
- 11 Tsoglin L.N., Pronina N.A. Biotehnologiya mikrovodoroslei. - Moskva: Nauchnyi mir, 2012. - 184 s. (https://www.studmed.ru/coglin-l-n-pronina-n-a-biotehnologiya-mikrovodorosley_d372e24aa4c.html)
- 12 Iu. Egupova, V. B. Bagmet, Sh. R. Abdullin. VOZDEYSTVIE ANTIBIOTIKOV I FUNGISIDOV NA TSIANOBAKTERIYU NOSTOC PUNCTIFORME (KUTZ.) HARIOT I SOPUTSTVUIUSCHIE MIKROORGANIZMY. Vestnik Bashkirskogo universiteta. 2017. T. 22. №1. Str 86-89. (<https://cyberleninka.ru/article/n/vozdeystvie-antibiotikov-i-fungitsidov-na-tsiyanobakteriyu-nostoc-punctiforme-kutz-hariot-i-soputstvuyuschie-mikroorganizmy>)

FTAMP: 68.41.53

Ә. ӘБУТӘЛШІ¹, Б.Д. АЙТЖАНОВ¹, С.Ғ. ҚАНАТБАЕВ¹, С.Т. ДӘУҒАЛИЕВА^{2*},
Б.Б. ҚАЙЫПБАЙ³, А.Ә. ӘБУБЕКОВА⁴, А.И. БАЙМАН⁵, S. PELETTO⁶

¹Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринария институты, Алматы, Қазақстан

²Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

³Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрлігінің ветеринариялық бақылау және қадағалау комитетінің Қостанай облыстық аумақтық инспекциясы, Қостанай, Қазақстан

⁴С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық Университеті, Астана, Қазақстан

⁵Батыс Қазақстан инновациялық-технологиялық университеті, Орал, Қазақстан

⁶Пьемонт, Лигурия және Валле-д'Аоста жануарларының алдын алу эксперименттік институты, Болонья, Турин, Италия

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ҚАРАСАНҒА ҚАРСЫ ИММУНДЕЛГЕН ЖАНУАРЛАР АҒЗАСЫНДА ВАКЦИНАЦИЯДАН KEЙІНГІ ПАЙДА БОЛАТЫН ANТИДЕНЕЛЕР ДЕНГЕЙІ ЖӘНЕ ДИНАМИКАСЫ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.06

Түйін

Мақалада қарасанға қарсы иммунделген жануарлар ағзасында вакцинациядан кейінгі пайда болатын антиденелер деңгейі және динамикасы туралы мәліметтер келтірілген. Антиденелердің ең жоғары титрі жануардың бір жақ санына қарасан вакцинасының екі есе мөлшері, яғни 4 мл, екінші жағына «Имунофарм» иммуномодуляторы 5 мл енгізген жануарларда байқалды. Бұл жағдайды, қарасан ауруының алдын алу үшін вакцина қолданғанда, антидене титрінің мейлінше жоғары болып және ұзағырақ сақталынуын қамтамасыз ету үшін пайдалануға болады.

Жүргізілген зерттеулер ҚазҒЗВИ-да ойластырылған латекс-агглютинация реакциясы арқылы, қарасанға қарсы иммунделген жануарлардың қан сарысуындағы антиденелер деңгейін және динамикасын анықтауға болатынын көрсетті. Осы тәсілді пайдалана отырып, вакцинацияланған жануарлардағы иммунитет деңгейін және қолданылған вакцинаның сапасын да анықтауға болады.

Кілтті сөздер: қарасан, вакцина, антидене титрі, латекс-агглютинация реакциясы.

Қарасан (эмфизематозды карбункул) – жануарлардың әдетте жайылым кезеңінде пайда болатын, жіті өтетін, бұлшық еттерді басып көргенде сықырлайтын ерекшеленетін жұқпалы, энзоотиялық ауру. Қоздырушысы - *Clostridium chauvoei* - түзу, аздап иілген анаэробты таяқша, ұзындығы 2-8 мкм. Ауру негізінен ет тіндерінің крепитациялық некрозы және оған жақын тері астындағы тіндердің серозды-геморрагиялық инфильтрациясы түріндегі ауыр, ошақты зақымдану түрінде өтеді. Қарасанмен негізінен 4 жасқа дейінгі ірі қара және ұсақ мүйізді мал ауырады [1,2].

Қарасанға стационарлық сипат тән, ол ауру қоздырушысының сыртқы ортада (топырақ, су) ұзақ уақыт сақталуына байланысты [3,4,5]. Қарасан әлемнің көптеген елдерінде кездеседі [6,7,8,9]. ТМД елдерінде қарасан барлық аймақтарда тіркелген [10,11].

Қазақстандағы жануарлардың жұқпалы патологиясында індет ошақтарының саны бойынша қарасан ауруы бруцеллез бен құтырудан кейінгі орынды алады. 2010-2020 жылдар аралығында Қазақстан Республикасы аумағының 71,4% құрайтын 10 облысы территориясы қарасан ауруынан қолайсыз, ал қалған 4 облыс аумағы (Қызылорда, Солтүстік Қазақстан, Маңғыстау, Түркістан) бұл індеттен таза болып есептелінді [12].

Қарасанның алдын алу және онымен күрес шараларының ең басты бағыттарының бірі осы індетке қарсы вакцина қолдану болып табылады.

Қарасанға қарсы иммундеу үшін ең алғашқы формоль вакцинаны 1925 жылы Лекленч және Валли ұсынды. КСРО-да формоль вакцинаны 1929 жылы С.Н. Муромцев әзірледі.

1959 жылы Ф.И. Қаган және А.И. Колесева қарасанға қарсы концентрацияланған алюминий гидрототықты вакцинасын шығарды [13].

Төрт жастан асқан жануарларда иммунизирлеуші субинфекция арқасында қарасанға қарсы иммунитеттің пайда болуы, ғалымдардың осы ауруға қарсы вакцина жасап шығаруына және оны практикада қолдануға негіз болды [14]. Бұрынғы КСРО және қазіргі ТМД елдерінде жануарлар қарасанының спецификалық профилактикасы ондаған жылдар бойы «ірі қара ІҚ және қойдың қарасанына қарсы инактивтелген, концентрацияланған алюминий гидрототықты вакцинасын» қолдану арқылы жүргізіліп келеді. Бұл вакцинамен жануарларды егу, оларды жайылымға шығарардан 14 күн бұрын жүзеге асуы тиіс. Жануарлардың жайылымда болу мерзімі 6 айдан асатын өңірлерде, бұл ауруға бейім мал басы арасына 6 ай салып жылына екі рет иммунделуі қажет [15].

Қазіргі кезде ҚР ірі қара мал қарасанының алдын алу мақсатында әр түрлі өндірушілер шығарған (Армавир, Ставрополь биофабрикалары, «Антиген» ҒӨО және т.б.) вакциналар пайдаланылып келеді. Осы вакциналарды ҚР аумағында қолдану тиімділігін талдауға арналған кейбір зерттеулер көрсеткендей, жекелеген, вакцина қолданған шаруашылықтарда қарасан індетінің орын алған жағдайлары кездеседі. Басқа аса қауіпті саналатын індеттерге қарсы вакцина пайдалану тәжірибесінде, вакцинамен егілген жануарларды белгілі бір уақыттан кейін серологиялық тәсілдермен зерттеп, олардың қансарысуындағы поствакцинальдық антидене титрін анықтау арқылы иммунделген жануарлардағы пайда болған иммунитет деңгейін анықтайды.

Алайда, қарасан ауруына қарсы қолданылатын вакциналар нұсқаулықтарында ұқсас жағдай, яғни поствакцинальдық антиденелер титрін зерттеу арқылы иммунитеттің қаншалықты дәрежеде пайда болғанын анықтау қарастырылмаған. Мұның басты бір себебі қарасан індетін серологиялық балау әдістерінің ойластырылмағандығы.

Ертеректе жарияланған жекелеген зерттеулер [16,17,18] қарасанға қарсы егілген жануарлардағы антиденені серологиялық реакциялар қою арқылы анықтау әрекеттері зертхана аясында ғана қалып, ресми диагностикалық тәсіл ретінде қабылданған жоқ.

Осыны ескере отырып, ҚазҒЗВИ ғалымдары 2021-2023 жылдары қарасанның серологиялық диагностикасы үшін латекс агглютинациясы реакциясын қоюға арналған антиген ойластырып және осы реакцияны қою әдісі ұсынылды. Жүргізілген зерттеулер аталған антигеннің және оны пайдаланып латекс реакциясын қоюдың қарасан қоздырушысына қарсы жануарлар ағзасында пайда болған антиденелерді анықтау үшін жарамды және телімді тәсіл екендігін дәлелдеп, оған өнертапқыштық ретінде патент рәсімделінді [19].

Жоғарыда айтылғандарды ескере отырып, осы жұмыстың мақсаты ретінде қарасанға қарсы иммунделген жануарлар ағзасындағы вакцинациядан кейінгі пайда болатын антиденелер деңгейі мен динамикасын сараптауға арнадық.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу материалдары ретінде республиканың әр өңірінен әкелінген қарасанға қарсы иммунделген 167 қан сынамасы және ҚазҒЗВИ-да *Clostridium chauvoei* қоздырушысын ультрадыбыс әсерімен дезинтеграциядан өткізіп, латекс бөлшектеріне сенсбилизацияланған қарасан антигені пайдаланылды. Имунизацияланған жануарлардың қан сарысуындағы вакцинациядан кейінгі пайда болатын антиденелер мөлшерін және динамикасын анықтау үшін аталған антигенді пайдаланып латекс агглютинациясы зерттелінетін қан сарысуы 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 қатынаста сұйылтылды. Реакцияның бақылауы ретінде қарасан қоздырушысымен гипериммунизация арқылы алынған оң нәтижелі қан сарысуы және сау қояндардан алынған теріс нәтижелі қан сарысулары қолданылды.

Нәтижелер және оларды талдау

Жұмысымыздың алғашқы кезеңінде, осы жоғарыда аталған тәсілді пайдалана отырып Республиканың әртүрлі аймақтарында (солтүстік, оңтүстік, шығыс, батыс және орталық) қарасанға қарсы иммунизацияланған жануарлардың қан сарысуындағы спецификалық антидене деңгейін анықтау мақсатында зерттеулер жүргіздік. Барлық облыстардан иммунизацияланған жануарлардан алынған 167 қан сынамасы жеткізіліп, оларды аталған антигенді пайдаланып, латекс агглютинациясы реакциясында (ЛАР) зерттелді 1-кесте).

Кесте 1 – Қарасанға қарсы егілген жануарлардың қан сарысуын ЛАР-да зерттеу нәтижелері

№	Аймақ	Сынама алынған облыс атауы	Пайдаланылған вакцина атауы	Вакцинациядан кейінгі зерттеу уақыты (күндер)	Саны			Антидененің орташа титрі
					Сынама	Оң Нәтиже /%	Теріс Нәтиже /%	
1	Солтүстік	Қостанай	Конц. АГТ вакцина, Ставрополь биофабрикасы	150	30	23/76,6	7/23,3	1:11
2	Оңтүстік	Алматы	Армавир биофабрикасы	35	47	47/100	0/0	1:37
3	Шығыс	Шығыс-Қазақстан	Конц. АГТ вакцина, Ставрополь биофабрикасы	23	30	30/100	0/0	1:45
4	Батыс	Батыс-Қазақстан	Конц. АГТ вакцина, Ставрополь биофабрикасы	30	30	30/100	0/0	1:34
5	Орталық	Қарағанды	Конц. АГТ вакцина, Ставрополь биофабрикасы	30	30	30/100	0/0	1:34

*Ескерту: Конц. АГТ – концентрацияланған, алюминий гидрототықты (вакцина), б/ф – биофабрика

Бірінші кестеден көрінгендей, вакцинациядан кейін 23 күннен кейін жануарлардың ЛАР-дағы антидене титрлері 1:45; 30 және 35 күннен кейін, тиісінше 1:34 және 1:37; Вакцинациядан кейін 150 күннен кейін поствакциналдық антиденелер жануарлардың 76,6% анықталды, олардың орташа титрлері 1:11 тең болды. Иммунизацияланған жануарларда вакцинациядан кейінгі антиденелердің титрлерінде олардың орналасу аймағына және вакцина түріне байланысты айтарлықтай айырмашылық болған жоқ.

Осылайша, жүргізілген зерттеулер, институтта жасалынған ЛАР -ын қоюға арналған антигенді пайдалану қарасанға қарсы вакцинацияланған жануарлардың қан сарысуындағы антиденелер деңгейін анықтау мүмкіндігін көрсетті. Сонымен қатар, вакцинациядан кейін 150 күннен кейін поствакциналдық антиденелер жануарлардың тек 76,6%, төмен дәрежедегі титрде сақталғаны белгілі болды.

Жұмысымыздың келесі кезеңінде, Алматы облысы, Талғар ауданы «Сырымбет» ШҚ қарасанға қарсы әр түрлі схемамен егілген ІҚ ағзасындағы вакцинациядан кейінгі антидене титрінің 6 ай арасындағы динамикасын зерттедік.

Тәжірибеге әр қайсысы 10 жануардан тұратын 1- 3 жастағы 4 топ ірі қара малы алынды. 1 топ жануарларына тек қана қарасан вакцинасы пайдалану нұсқаулығына сәйкес, 2 мл мөлшерінде санның бұлшық ет ішіне енгізілді; 2 топ жануарларының бір жақ санына 2 мл қарасан вакцинасы, ал екінші жақ санының бұлшық етіне ҚазҰЗВИ - да шығарылған «Иммунофарм» иммуномодуляторы [20] 5 мл мөлшерінде егілді; 3 топ жануарларына - бір жақ санына қарасан вакцинасының екі есе мөлшері, яғни 4 мл, екінші жағына «Иммунофарм» иммуномодуляторы 5 мл; 4 топ жануарларына - 2 мл қарасан вакцинасы

және 5 мл «Иммунофарм» иммуномодуляторы араластырылып сан бұлшық етіне бірге енгізілді. Зерттеу нәтижелері 2 кестеде берілді.

Кесте 2- Қарасанға қарсы иммунделген ІҚМ поствакциналдық антиденелер динамикасы

№	Жануарлардың ның жеке №	Егілгеннен кейінгі зерттеу мерзімі (күндер) және антидене титрі			
		30	90	150	180
1 топ жануарлары					
1	00331387	1:40	1:30	1:20	1:20
2	58188906	1:40	1:40	1:20	1:10
3	96760014	1:30	1:30	1:20	1:10
4	60237761	1:30	1:30	1:10	-
5	60237760	1:40	1:40	1:20	1:10
6	№ жоқ, ақ сиыр	1:20	1:20	1:10	-
7	60636700	1:40	1:30	1:20	1:10
8	62056139	1:20	1:20	1:10	-
9	59685365	1:40	1:30	1:20	1:10
10	60237768	1:30	1:20	1:10	1:10
Титрдің орташа көрсеткіші		1:33,0	1:29,0	1:16,0	1:8,0
2 топ жануарлары					
11	60237773	1:40	1:30	1:30	1:20
12	60636701	1:30	1:30	1:20	1:10
13	58188905	1:40	1:30	1:20	1:20
14	59685369	1:30	1:30	1:20	1:10
15	58187384	1:30	1:20	1:20	-
16	60636697	1:30	1:20	1:10	-
17	60636704	1:30	1:30	1:20	1:10
18	60636692	1:60	1:40	1:30	1:20
19	62056140	1:40	1:40	1:20	1:10
20	60636695	1:60	1:40	1:20	1:20
Титрдің орташа көрсеткіші		1:39,0	1:31,0	1:21,0	1:12,0
3 топ жануарлары					
21	61278185	1:40	1:40	1:30	1:30
22	61278184	1:60	1:40	1:30	1:30
23	62056143	1:40	1:40	1:30	1:20
24	60006421	1:40	1:30	1:20	1:10
25	59185999	1:20	1:20	1:10	-
26	60636698	1:60	1:60	1:40	1:20
27	6000634	1:30	1:30	1:20	1:10
28	59185991	1:40	1:40	1:30	1:20
29	60237753	1:80	1:80	1:60	1:30
30	60006408	1:40	1:40	1:30	1:20
Титрдің орташа көрсеткіші		1:45,0	1:42,0	1:30,0	1:19,0
4 топ жануарлары					
31	61278205	1:40	1:40	1:20	1:20
32	61278202	1:40	1:30	1:20	1:20
33	62056164	1:30	1:30	1:20	1:10
34	61278192	1:40	1:40	1:20	1:10
35	61286031	1:20	1:20	1:10	-
36	61285954	1:30	1:30	1:20	1:10
37	61278194	1:30	1:30	1:10	-
38	61285945	1:40	1:30	1:20	1:10
39	61278190	1:30	1:30	1:10	1:10
40	61278206	1:30	1:20	1:20	1:10
Титрдің орташа көрсеткіші		1:33,0	1:30,0	1:16,0	1:10

Екінші кестеден көрінгендей, қарасан вакцинасы пайдалану нұсқаулығына сәйкес, 2 мл мөлшерінде бұлшық ет ішіне енгізілген 1 топ жануарларының вакцинациядан 30 күннен кейінгі орташа титрі 1:33 ке тең болды. Бұдан кейінгі зерттеу мерзімдерінде (90, 150 және 180 күндер) қарасанға қарсы иммунделген жануарлардағы антиденелердің орташа титрі, сәйкесінше - 1:29, 1:16 және 1:8 шамасын құрады. Айта кететін жайт, вакцинациядан соң 180 күннен кейінгі зерттеулерде 3 жануарларда (30%) антидене мүлде анықталмады.

Антиденелер титрінің шамамен осыған сәйкес динамикасы, қарасан вакцинасы «Иммунофарм» иммуномодуляторымен араластырылып бірге еккен 4 топ жануарларында да байқалды, бірақ бұл топтағы жануарлардың 180 күннен кейінгі зерттеулерде теріс нәтиже бергендер саны 2-еу (яғни, 20%) болды.

Бір жағына қарасан вакцинасы, ал екінші жағына «Иммунофарм» иммуномодуляторын еккен 2 және 3 топ жануарларында 30 күннен кейінгі антидененің орташа титрі жоғары, сәйкесінше, 1:39,0 және 1:45,0-ті құрады. Бірінші және 4 топтағы жануарлардағы антидене титрімен салыстырғанда, 2 және 3 топтағы жануарларда жоғары титрдегі антидене мөлшері 150 және 180 күнге дейін сақталды, және соңғы мерзімдегі зерттеулерде ағзасында антидене анықталмаған жануарлар саны да осы топтарда өте аз болды (сәйкесінше 20 және 10%).

Сонымен бұл тәжірибеден, жануарларға бір мезгілде, ағзаның әр жеріне қарасан вакцинасы және «Иммунофарм» иммуномодуляторын қоса еккен кезде пайда болатын антидене титрі неғұрлым жоғары және ұзақ мерзімге дейін сақталатыны белгілі болды.

Антиденелердің ең жоғары титрі жануардың бір жақ санына қарасан вакцинасының екі есе мөлшері, яғни 4 мл, екінші жағына «Иммунофарм» иммуномодуляторы 5 мл енгізген жануарларда байқалды. Бұл жағдайды, Иммунофарм иммуномодуляторының екі еселенген мөлшердегі қарасан вакцинасының реактогенділігін бәсеңдетіп, иммундық жүйе жауабын күшейтуге ықпал еткендігімен түсіндіруге болады. Аталған құбылыстың дәлелі біздің бұдан бұрынғы жүргізген зерттеулерімізде көрсетілген болатын [21].

Қорытынды

Республиканың әртүрлі аймақтарында қарасанға қарсы иммунизацияланған жануарлардың қан сарысуындағы спецификалық антидене деңгейі анықталды. Вакцинациядан 23 күннен кейін жануарлардың ЛАР-дағы антидене титрлері 1:45, 35 күннен кейін 1:37, 150 күннен кейін 1:11 тең болды. Соңғы зерттеу мерзімінде поствакциналдық антиденелер жануарлардың тек 76,6% ғана анықталды. Зерттелген жануарларда вакцинациядан кейінгі антиденелер титрлерінде олардың орналасқан аймағына және вакцина түріне байланысты айтарлықтай айырмашылық болған жоқ.

Бұдан кейінгі зерттеулерде, қарасанға қарсы әр түрлі схемамен егілген ІҚМ ағзасындағы вакцинациядан кейінгі антидене титрінің 6 ай арасындағы динамикасы сарапталды.

Қарасан вакцинасымен нұсқаулығына сәйкес егілген жануарларда вакцинациядан 30 күннен кейін поствакциналдық антиденелердің орташа титрі 1:33 ке тең болды. Бұдан кейінгі зерттеу мерзімдерінде (90, 150 және 180 күндер) орташа титр, сәйкесінше - 1:29, 1:16 және 1:8 шамасын құрады. Вакцинациядан 180 күннен кейінгі зерттеулерде 30% жануарларда антидене мүлде анықталған жоқ, яғни бұл жануарлардағы иммунитет деңгейі төмен болғанын көрсетеді.

Жануарларға бір мезгілде, ағзаның әр жеріне қарасан вакцинасы және «Иммунофарм» иммуномодуляторын қоса еккен кезде пайда болатын антидене титрі неғұрлым жоғары және ұзақ мерзімге дейін сақталатыны белгілі болды.

Антиденелердің ең жоғары титрі бір жақ санына қарасан вакцинасының екі есе мөлшері, екінші жағына «Иммунофарм» иммуномодуляторын еккен жануарларда байқалды. Бұл жағдайды, қарасан ауруының алдын алу үшін вакцина қолданғанда, антидене титрінің мейлінше жоғары болып және ұзағырақ сақталуын қамтамасыз ету үшін пайдалануға болады.

Жүргізілген зерттеулер ҚазҒЗВИ-да ойластырылған латекс-аггютинация реакциясы арқылы, қарасанға қарсы имунделген жануарлардың қан сарысуындағы антиденелер деңгейін және динамикасын анықтауға болатынын көрсетті. Яғни, осы тәсілді вакцинацияланған жануарлардағы иммунитет деңгейін және қолданылған вакцинаның сапасын анықтауға және сонымен қатар спецификалық профилактика шараларын талдау үшін де пайдалануға болады.

Әдебиеттер:

- 1 Сайдулдин Т. *Индеттану және жануарлардың жұқпалы аурулары*. Алматы. 2009. 252 бет. (https://www.studmed.ru/sayduldin-t-ndettanu-zh-ne-zhanuarlardy-zh-paly-aurulary-epidemiologiya-i-infekcionnye-bolezni-zhivotnyh_db10a46ee7a.html).
- 2 *Эпизоотология с микробиологией: Учебник* /Под ред. В. А. Кузьмина, А. В. Святковского. СПб., 2017. 432 с. (<https://e.lanbook.com/book/145838>).
- 3 Rychener L., Albon S.I., Djordjevic S.P., Chowdhury P.R., Ziech R.E., de Vargas A.C., et al. *Clostridium chauvoei*, an evolutionary dead-end pathogen. *Front. Microbiol.*, 2017, 8:1054. (doi: 10.3389/fmicb.2017.01054).
- 4 Ziech R.E., Gressler L.T., Frey J., de Vargas A.C. Blackleg in cattle: current understanding and future research needs. *Ciência Rural*, 2018, 48:e20170939. (doi: 10.1590/0103-8478cr20170939).
- 5 Даугалиева С.Т., Даугалиева А.Т., Ашанин А.И., Ерғали Б.Б. Влияние рациона на продуктивность бычков казахской белоголовой породы и концентрацию архей в микробиоме желудочно-кишечного тракта. *Микробиология және вирусология*, 2023, 40:221-239. (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.15).
- 6 Abreu C.C., Blanchard P.C., Adaska J.M., Moeller R.B., Anderson M., Navarro M.A., et al. Pathology of blackleg in cattle in California, *J. Vet. Diagnostic. Investig.*, 2018, 30:894–901. (doi: 10.1177/1040638718808567).
- 7 Gacem F., Madadi M.A., Khecha N., Bakour R. Study of vaccinal properties of *Clostridium chauvoei* strains isolated during a blackleg outbreak in cattle in Algeria. *Kafkas University. Vet. Fak. Derg.*, 2015, 21:825–9. (doi: 10.9775/kvfd.2015.13616).
- 8 Heckler R.F., de Lemos R.A., Gomes D.C., Dutra I.S., Silva O.S., Lobato C.F., et al. Blackleg in cattle in the state Mato Grosso do Sul, Brazil: 59 cases. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2018, 38(01) (doi: 10.1590/1678-5150-pvb-4964).
- 9 Hussain R., Ehtisham-Ul-haque S., Khan I., Jabeen G., Siddique A.B., Ghaffar A., et al. Clinico-hematological, patho-anatomical and molecular based investigation of blackleg disease in Cholistani cattle Pakistan. *J. Agric. Sci.*, 2021, 58:1017–25. (doi: 10.21162/PAKJAS/21.1240).
- 10 Капустин А.В., Алипер Т.И. *Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота*. Мат. Межд. вет. Конгресса - Единый мир – единое здоровье. Уфа. 2017. С. 106-108. (<https://www.dissercat.com/content/etiologicheskaya-struktura-i-spetsificheskaya-profilaktika-klostridiozov-krupnogo-rogatogo>).
- 11 Глотова, Т.И. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам. *Сибирский вестник с.-х.науки*, 2017, Т.47. №1. С.90-96. (<https://www.dissercat.com/content/etiologicheskaya-struktura-i-spetsificheskaya-profilaktika-klostridiozov-krupnogo-rogatogo>).
- 12 Aspen Abutalip, Vladislav Laskavy, Batyrbek Aitzhanov, Gulnara Baikadamova, Aiganym Abubekova. Epizootic situation of animal emcar (blackleg) on the territory of the republic of Kazakhstan for 2010-2020. *Вестник науки Казахского агротехнического университета им.С.Сейфуллина*, 2022, 3:(114). Ч.2. Р. 167-180. (<https://kazatu.edu.kz/pages/nauka/vestnik-nauki-kazahskogo-agrotehniceskogo-universiteta-im-s-sejfullina>).
- 13 Капустин А.В. Разработка вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота. *Russian Journal of Agricultural and So-cio-Economic Sciences*, 2016, 5(53). С. 97-102. (<https://rjoas.com>).
- 14 Капустин А.В. Эффективность вакцины «Клостбовак-8» против клостридиоза крупного рогатого скота, вызванного различными видами *Clostridium spp.* *Ветеринария, зоотехника и биотехнология*, 2016, 9:6-11. (<https://www.litres.ru/serii-knig/zhurnal-veterinariya-zootehniya-i-biotehnologiya/zhurnal-veterinariya-zootehniya-i-biotehnologiya-2016>).

15 Бессарабов Б.Ф., Воронин Е.С. и др. Инфекционные болезни животных /Под ред. А.А. Сидорчука. М., Колос, 2007. 671 с. (https://www.studmed.ru/bessarabov-bf-vashutin-aa-voronin-es-i-dr-infekcionnye-bolezni-zhivotnyh_30a18b3684f.html).

16 Сатин Н.К., Смирнов А.П. Изучение поствакцинальных реакций у крупного рогатого скота при иммунизации вакцинами эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота. *Научн. труды Саратовского с/х ин-та*, 1973, вып.17, ч.2:12-18. (<https://www.dissercat.com/content/infekcionnye-bolezni-nutritii-v-zverovodcheskikh-khozyaistvakh-severnogo-kavkaza>).

17 Одаренко К.И., Грязин В.И. Реакция агглютинации (РА) при эмфизематозном карбункуле. *Тр. КазНИВИ*, 1976, т.16:180-184. (<https://kaz-nivi.kz>).

18 Айтжанов Б.Д. Эффективность метода иммунофлуоресценции при выявлении возбудителей и специфических антител эмфизематозного карбункула и злокачественного отека крупного рогатого скота и овец. Дисс. канд. вет. Наук. Алматы, 1986. 142 с. (<https://library.tou.edu.kz/fulltext/buuk/b636.docx>).

19 Абуталип А., Айтжанов. Б.Д., Касенов М.М., Мырзалиев А., Тусупканулы О. *Способ получения латексного диагностикума для постановки реакции латекс-агглютинации*. Заявка на выдачу патента на полезную модель. №2023/0087.2. от 30.01.2023 г. (https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1416?locale=ru_RU).

20 Регистрационное удостоверение на иммуномодулятор «Имунофарм» № РК-ВП-1-35-35 от 26.03.2018 года. (https://www.gov.kz/uploads/2023/2/22/61d73813a47434817a49357fee70e992_original.5233396.pdf).

21 Горелов Ю.М., Ласковский В.Н., Султанов А.А., Сущих В.Ю., А. Абуталип и др. *Способ повышения иммуногенности вакцин против инфекционной инфекции сибирской язвы и эмфизематозного карбункула (Эмкар)*. ФГБНУ «Саратовский НИВИ»; ТОО «КазНИВИ». № 201200605. Заявл. 18.05.12. Оpubл. 30.12.16. (<https://kzpatents.com>).

А. АБУТАЛИП¹, Б.Д. АЙТЖАНОВ¹, С.Г. КАНАТБАЕВ¹, С.Т. ДАУГАЛИЕВА^{2*},
Б.Б. КАЙЫПБАЙ³, А.А. АБУБЕКОВА⁴, А.И. БАЙМАН⁵, S. PELETTO⁶

¹Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы, Казахстан

²Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

³Костанайская областная территориальная инспекция Комитета ветеринарного контроля и надзора Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, Қостанай, Казахстан

⁴Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина, Астана, Казахстан

⁵Западно-Казахстанский инновационно-технологический университет, Уралск, Казахстан

⁶Экспериментальный институт зоофилактики Пьемонта, Лигурии и Валле д'Аоста, via Bologna, Турин, Италия

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ И ДИНАМИКИ АНТИТЕЛ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ЭМКРА

Аннотация

В статье приводятся данные об уровне и динамике антител, образующихся после вакцинации в организме животных, иммунизированных против эмкара. Самый высокий титр антител наблюдался у животных, которым вводили вдвое больше вакцины «Имунофарм» с одной стороны бедра животного, т.е. 4 мл, а с другой - 5 мл иммуномодулятора "Имунофарм". Это состояние можно использовать для обеспечения максимально высокого титра антител и его сохранения на высоком уровне дольше при использовании вакцины против болезни эмкара.

Проведенные исследования показали, что с помощью реакции латекс-агглютинации, разработанной в КазНИВИ, можно определить уровень и динамику антител в сыворотке крови животных, иммунизированных против эмкара. Используя этот метод, можно также определить уровень иммунитета и качество используемой вакцины у вакцинированных животных.

Ключевые слова: эмкар, вакцина, титр антител, реакция латекс-агглютинации.

IRSTI: 68.41.53

A. ABUTALIP¹, B.D. AITZHANOV¹, S.G. KANATBAYEV¹,
S.T. DAUGALIYEVA^{2*}, B.B. KAIYPBAY³, A.A. ABUBEKOVA⁴, A.I. BAIMAN⁵,
S. PELETTO⁶

¹Kazakh Research Veterinary Institute, Almaty, Kazakhstan

²Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

³Kostanay Regional Territorial Inspectorate of the Committee for Veterinary Control and Supervision of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan, Kostanay, Kazakhstan

⁴Kazakh Agrotechnical University named after Saken Seifullin, Astana, Kazakhstan

⁵West Kazakhstan Innovation and Technology University, Uralsk, Kazakhstan

⁶Experimental Institute for Animal Prevention of Piedmont, Liguria and Valle d'Aosta, via Bologna, Turin, Italy

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

STUDYING THE LEVEL AND DYNAMICS OF ANTIBODIES PRODUCED IN ORGANISM OF ANIMALS AFTER VACCINATION AGAINST EMCAR

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.06

Abstract

The article provides data on the level and dynamics of antibodies formed after vaccination in the body of animals immunized against blackleg. The highest antibody titer was observed in animals that were injected with twice as much of the Immunopharm vaccine on one side of the animal, i.e. 4 ml, and on the other-5 ml of the immunomodulator Immunopharm. This condition can be used to ensure that the antibody titer remains as high as possible and lasts longer when using a vaccine to prevent blackleg disease.

The conducted studies have shown that using the latex-agglutination reaction developed at Kaznivi, it is possible to determine the levels and dynamics of antibodies in the blood serum of animals immunized against blackleg. Using this approach, it is also possible to determine the level of immunity and the quality of the vaccine used in vaccinated animals.

Keywords: Emkar, vaccine, antibody titer, latex agglutination reaction.

Emkar (Emphysematous carbuncle, Blackleg) is an infectious, enzootic disease of animals that usually occurs in the grazing period, is acute, not transmitted, but is characterized by inflammation of the muscles, which becomes hoarse when pressed. The causative agent - *Clostridium chauvoei* - is a straight, slightly curved anaerobic bacillus 2-8 microns long. The disease proceeds mainly in the form of a severe focal lesion in the form of crepitative necrosis of meat tissues and serous-hemorrhagic infiltration of adjacent subcutaneous tissues. Mostly cattle and small cattle under the age of 4 years are sick [1,2].

Emkar is characterized by a stationary nature, due to the long-term preservation of the pathogen in the external environment (soil, water) [3,4,5]. Emkar is found in many countries around the world [6,7,8,9]. In the CIS countries, Emkar is registered in all regions [10,11].

In terms of the number of epidemic foci in the infectious pathology of animals in Kazakhstan, Emkar disease ranks third after Brucellosis and Rabies. In the period from 2010 to 2020, the territory of 10 regions, which make up 71.4% of the territory of the Republic of Kazakhstan, was unfavorable from this disease, and the territories of the remaining 4 regions (Kyzylorda, North Kazakhstan, Mangystau, Turkestan) were considered clean from this infection [12].

One of the main directions of measures for the prevention and control of Emkar is the use of a vaccine against this disease.

The first vaccine was proposed by Leklench and Valli in 1925. In the USSR, the formal vaccine was developed by S.N. Muromtsev in 1929. In 1959, F.I. Kagan and A.I. Koleseva produced a concentrated aluminum hydrotechnical vaccine against Emkar [13].

The emergence of immunity to bacteria due to immunizing subinfection in animals older than four years served as the basis for the development of a vaccine against this disease by scientists and its application in practice [14]. In the countries of the former USSR and the modern CIS, specific prophylaxis has been carried out for several decades using "inactivated concentrated aluminum hydroxide vaccine against emphysematous carbuncle of cattle and sheep". Vaccination of animals with this vaccine must be carried out no later than 14 days before they are put out to pasture. In regions where the duration of the stay of animals on pastures exceeds 6 months, the most susceptible animals to this disease should be immunized twice a year with an interval of 6 months [15].

Currently, in order to prevent Emkar, cattle in the Republic of Kazakhstan, a vaccine from various manufacturers is used (Armavir, Stavropol biofactory, SPC "Antigen", etc.). Some studies devoted to the analysis of the effectiveness of the use of these vaccines in the territory of the Republic of Kazakhstan have shown that in individual farms using the vaccine, there are cases of Emkar. In the practice of using a vaccine against other, considered especially dangerous epidemics, the level of acquired immunity in immunized animals is detected by serological examination of vaccinated animals after a certain time and by determining the titer of post-vaccination antibodies in their blood serum.

However, the guidelines for vaccines used against Emkar disease do not provide for determining the degree of acquired immunity by examining a similar condition, i.e., the titer of post-vaccination antibodies. One of the main reasons for this is the lack of methods for the serological detection of Emkar.

Separate previously published studies [16,17,18] showed that attempts to detect antibodies in animals vaccinated against Emkar by setting up various serological tests remained only within the framework of laboratory studies and were not accepted for practical use. Taking this into account, KazNIVI scientists in 2021-2023 developed an antigen for setting up a latex agglutination reaction for the serological diagnosis of Emkar and proposed a method for setting up this reaction. The conducted studies have proved that this antigen and the latex reaction with its use are specifically and suitable for detecting antibodies formed in the body of animals vaccinated against animals Emkar, for which a patent for the invention was issued [19]. Given the above, the aim of this work was to determine the level and dynamics of antibodies formed after vaccination of animals for the subsequent use of the data obtained to determine the level of post-vaccination immunity against Emkar.

Materials and methods of research

Blood samples from 207 cattle immunized against Emkar delivered from different regions of the republic and Emkar antigen produced by the disintegration of the pathogen *Clostridium chauvoei* under the influence of ultrasound with subsequent sensitization to latex particles were used as research materials. To determine the amount and dynamics of post-vaccination antibodies in the blood serum of immunized animals, the blood serum is examined in the latex agglutination reaction (RLA) in a dilution of sera in a dilution of 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1: 320. Positive blood serum obtained by hyperimmunization of rabbits with the Emkar pathogen and negative blood serum obtained from healthy rabbits were used as a reaction control.

Results and discussion

At the first stage of our work, using the above method, studies were conducted to determine the level of specific antibodies in the blood serum of animals immunized against Emkar in various regions of the Republic (Northern, Southern, Eastern, Western and Central). From all regions, 167 blood samples of immunized animals were delivered, which were examined in the latex agglutination reaction using the developed antigen (Table 1).

Table 1 - results of the study of blood serum of animals vaccinated against Emkar in the reaction of latex agglutination (RLA)

№	Region	Name of areas from which samples were taken	Name of used vaccine	Study time in the post-vaccination period (days)	Quantity			Average anti body titer
					Tested samples	Positive result, %	Negative result, %	
1	Northern	Kostanay	Conc.AH vaccine, Stavropol biofactory	150	30	23/76,6	7/23, 3	1:11
2	Southern	Almaty	Conc.AH vaccine, Armavir biofactory	35	47	47/100	0/0	1: 37
3	Eastern	East Kazakhstan region	Conc.AH vaccine, Stavropol biofactory	23	30	30/100	0/0	1:45
4	Western	West Kazakhstan region	Conc.AH vaccine, Stavropol biofactory	30	30	30/100	0/0	1:34
5	Central	Karaganda	Conc.AH vaccine, Stavropol biofactory	30	30	30/100	0/0	1:34

*Note: Conc.AH – concentrated aluminum hydroxide vaccine

As can be seen from table 1, twenty three days after vaccination, the antibody titers in animals in RLA were 1:45; after 30 and 35 days, respectively 1:34 and 1:37; 150 days after vaccination, post-vaccination antibodies were detected in 76,6% of the animals, the average titers of which were 1:11. In immunized animals, there was no significant difference in antibody titers after vaccination, depending on the area of their location and the type of vaccine.

Thus, the conducted studies have shown the possibility of determining the level of antibodies in the blood serum of animals vaccinated against Emkar in the reaction of latex agglutination (RLA) using the antigen developed at the institute. In addition, 150 days after vaccination, it turned out that post-vaccination antibodies persisted only in 76.6% of animals with a low titer.

At the next stage of our work, the Peasant Farm "Syrymbet" of the Talgar district of the Almaty region, we studied the dynamics of the titer of post-vaccination antibodies in cattle vaccinated according to different schemes against Emkar for 6 months.

The experiment included 4 groups of cattle aged 1-3 years, each of which consisted of 10 animals. Animals of the 1st group received only emkar vaccine in the amount of 2 ml in accordance with the instructions for use; animals of the 2nd group - 2 ml of the emcar vaccine intramuscularly in one side of the thigh, and the other side - the immunomodulator "Immunofarm" [20] in the amount of 5 ml. Animals of the 3rd group - on one side of the thigh was injected with a double size of the Emkar vaccine, i.e. 4 ml, on the other side of the immunomodulator "Immunopharm" 5 ml. Animals of the 4th group - 2 ml of emcar vaccine and 5 ml of "Immunopharm" were mixed and injected together into the thigh muscle. The results of the study are presented in table 2.

Table 2 - Dynamics of post-vaccination antibodies of cattle immunized against Emar

No.	Individual numbers of animals	Terms (days) of the study and antibody titer after vaccination			
		30	90	150	180
animals of the 1st group					
1	00331387	1:40	1:30	1:20	1:20
2	58188906	1:40	1:40	1:20	1:10
3	96760014	1:30	1:30	1:20	1:10
4	60237761	1:30	1:30	1:10	-
5	60237760	1:40	1:40	1:20	1:10
6	no number white cow	1:20	1:20	1:10	-
7	60636700	1:40	1:30	1:20	1:10
8	62056139	1:20	1:20	1:10	-
9	59685365	1:40	1:30	1:20	1:10
10	60237768	1:30	1:20	1:10	1:10
Average titer		1:33,0	1:29,0	1:16,0	1:8,0
animals of the 2nd group					
11	60237773	1:40	1:30	1:30	1:20
12	60636701	1:30	1:30	1:20	1:10
13	58188905	1:40	1:30	1:20	1:20
14	59685369	1:30	1:30	1:20	1:10
15	58187384	1:30	1:20	1:20	-
16	60636697	1:30	1:20	1:10	-
17	60636704	1:30	1:30	1:20	1:10
18	60636692	1:60	1:40	1:30	1:20
19	62056140	1:40	1:40	1:20	1:10
20	60636695	1:60	1:40	1:20	1:20
Average titer		1:39,0	1:31,0	1:21,0	1:12,0
animals of the 3rd group					
21	61278185	1:40	1:40	1:30	1:30
22	61278184	1:60	1:40	1:30	1:30
23	62056143	1:40	1:40	1:30	1:20
24	60006421	1:40	1:30	1:20	1:10
25	59185999	1:20	1:20	1:10	-
26	60636698	1:60	1:60	1:40	1:20
27	6000634	1:30	1:30	1:20	1:10
28	59185991	1:40	1:40	1:30	1:20
29	60237753	1:80	1:80	1:60	1:30
30	60006408	1:40	1:40	1:30	1:20
Average titer		1:45,0	1:42,0	1:30,0	1:19,0
animals of the 4th group					
31	61278205	1:40	1:40	1:20	1:20
32	61278202	1:40	1:30	1:20	1:20
33	62056164	1:30	1:30	1:20	1:10
34	61278192	1:40	1:40	1:20	1:10
35	61286031	1:20	1:20	1:10	-
36	61285954	1:30	1:30	1:20	1:10
37	61278194	1:30	1:30	1:10	-
38	61285945	1:40	1:30	1:20	1:10
39	61278190	1:30	1:30	1:10	1:10
40	61278206	1:30	1:20	1:20	1:10
Average titer		1:33,0	1:30,0	1:16,0	1:10

As can be seen from table 2, the average titer of animals of the 1st group 30 days after vaccination, which were administered the Emkar vaccine according to the instructions for use, i.e. in the amount of 2 ml, was equal to 1:33. In subsequent terms of the study (90, 150 and 180 days), the average antibody titer in animals of this group was 1:29, 1:16 and 1:8, respectively. It should be noted that in studies 180 days after vaccination in 3 animals (30%) no antibodies were found at all.

Approximately the same dynamics of the antibody titer was observed in animals of the 4th group, which received a combined vaccination with the "Immunopharm" immunomodulator, but only in 2 animals of this group (i.e. 20%) negative results were obtained in studies after 180 days.

In animals of the 2nd and 3rd groups, which were vaccinated with the Emkar vaccine on the one hand and the "Immunopharm" immunomodulator on the other, the average antibody titer after 30 days was higher, respectively, 1:39.0 and 1:45.0. Compared with the antibody titer in animals of groups 1 and 4, in animals of groups 2 and 3, the content of antibodies in a high titer remained up to 150 and 180 days. The number of animals in which no antibodies were found in the studies of the last period was also lower in these groups (20 and 10%, respectively).

Thus, from this experience it became clear that the antibody titer formed during the simultaneous administration of the Emkar vaccine and the "Immunopharm" immunomodulator into different parts of the animal body remains higher and longer.

The highest antibody titer was observed in animals that were injected with a double dose of the vaccine, i.e. 4 ml, on one side of the animal's thigh and on the other, 5 ml of the "Immunopharm" immunomodulator. This condition can be explained by the fact that the immunomodulator "Immunopharm" reduces the reactivity of the vaccine administered in a double dose and enhances the response of the immune system. Evidence for this phenomenon was demonstrated in our earlier studies [21].

Conclusion

The level of specific antibodies in the blood serum of animals immunized against Emkar in different regions of the republic was revealed. 23 days after vaccination, the antibody titers in animals were equal to 1:45, after 35 days - 1:37, after 150 days - 1:11. During the last period of the study, post-vaccination antibodies were detected only in 76,6% of the animals. In the studied animals, there was no significant difference in antibody titers after vaccination, depending on the area of their location and the type of vaccine.

In subsequent studies, the dynamics of post-vaccination antibody titers in the body of cattle vaccinated according to various schemes against Emkar was analyzed for 6 months.

In animals vaccinated with the Emkar vaccine, the average titer of post-vaccination antibodies 30 days after vaccination was 1:33. In subsequent terms of the study (90, 150 and 180 days), the average titer was 1:29, 1:16 and 1:8, respectively. In studies 180 days after vaccination, 30% of the animals showed no antibodies at all, which means that these animals had a lower level of immunity.

It is known that the titer of antibodies formed during the simultaneous vaccination of animals in different parts of the body, including the Emkar vaccine and the "Immunopharm" immunomodulator, remains higher and longer.

The highest antibody titer was observed in animals that were injected with a double dose of the vaccine on one side of the thigh and immunomodulator "Immunopharm" on the other side. This condition can be used to ensure that the antibody titer remains as high as possible and lasts longer when using the emcar disease vaccine.

The conducted studies have shown that using the latex agglutination reaction developed in KazNIVI, it is possible to determine the level and dynamics of antibodies in the blood serum of animals immunized against Emkar. That is, the method can be used to determine the level of immunity and the quality of the vaccine used in vaccinated animals, as well as to analyze specific prevention measures.

References:

- 1 Sajduldin T. Indettanu zhəne zhanuarlardyң zhұqpalı aurulary. Almaty. 2009. 252 bet. (https://www.studmed.ru/sayduldin-t-ndettanu-zh-ne-zhanuarlardy-zh-paly-aurulary-epidemiologiya-i-infekcionnye-bolezni-zhivotnyh_db10a46ee7a.html).
- 2 *Jepizootologija s mikrobiologiej: Uchebnik* /Pod red. V. A. Kuz'mina, A. V. Svjatkovskogo. SPb., 2017. 432 s. (<https://e.lanbook.com/book/145838>).
- 3 Rychener L., Albon S.I., Djordjevic S.P., Chowdhury P.R., Ziech R.E., de Vargas A.C., et al. *Clostridium chauvoei*, an evolutionary dead-end pathogen. *Front. Microbiol.*, 2017, 8:1054. (doi: 10.3389/fmicb.2017.01054).
- 4 Ziech R.E., Gressler L.T., Frey J., de Vargas A.C. Blackleg in cattle: current understanding and future research needs. *Cienc Rural*, 2018, 48:e20170939. (doi: 10.1590/0103-8478cr20170939).
- 5 Daugalieva S.T., Daugalieva A.T., Ashanin A.I., Erfali B.B. Vlijanie racionalna na produktivnost' bychkov kazahskoj belogolovoj porody i koncentraciju arhej v mikrobiome zheludochno-kishechnogo trakta. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, 2023, 40:221-239. (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.15).
- 6 Abreu C.C., Blanchard P.C., Adaska J.M., Moeller R.B., Anderson M., Navarro M.A., et al. Pathology of blackleg in cattle in California, *J. Vet. Diagnostic. Investig.*, 2018, 30:894–901. (doi: 10.1177/1040638718808567).
- 7 Gacem F., Madadi M.A., Khecha N., Bakour R. Study of vaccinal properties of *Clostridium chauvoei* strains isolated during a blackleg outbreak in cattle in algeria. *Kafkas Univ. Ve.t Fak. Derg.*, 2015, 21:825–9. (doi: 10.9775/kvfd.2015.13616).
- 8 Heckler R.F., de Lemos R.A., Gomes D.C., Dutra I.S., Silva O.S., Lobato C.F., et al. Blackleg in cattle in the state Mato Grosso do Sul, Brazil: 59 cases. *Pesqui Vet. Bras.*, 2018, 38(01). (doi: 10.1590/1678-5150-pvb-4964).
- 9 Hussain R., Ehtisham-Ul-haque S., Khan I., Jabeen G., Siddique A.B., Ghaffar A., et al. Clinico-hematological, patho-anatomical and molecular based investigation of blackleg disease in Cholistani cattle Pakistan. *J. Agric.Sci.*, 2021, 58:1017–25. (doi: 10.21162/PAKJAS/21.1240).
- 10 Kapustin A.V., Aliper T.I. *Jepizootologija i profilaktika klostridiozov krupnogo rogatogo skota*. Mat. Mezhd. vet. Kongressa - Edinyj mir – edinoe zdorov'e. Ufa. 2017. S. 106-108. (<https://www.dissercat.com/content/etiologicheskaya-struktura-i-spetsificheskaya-profilaktika-klostridiozov-krupnogo-rogatogo>).
- 11 Glotova, T.I. Vozbuditeli i vozrastnaja vospriimchivost' krupnogo rogatogo skota k klostridiozam. *Sibirskij vestnik s.-h.nauki*, 2017, T.47. №1. S.90-96. (<https://www.dissercat.com/content/etiologicheskaya-struktura-i-spetsificheskaya-profilaktika-klostridiozov-krupnogo-rogatogo>).
- 12 Aspen Abutalip, Vladislav Laskavy, Batyrbek Aitzhanov, Gulnara Baikadamova, Aiganym Abubekova. Epizootic situation of animal emcar (blackleg) on the territory of the republic of Kazakhstan for 2010–2020. *Vestnik nauki Kazahskogo agrotehnicheskogo universiteta im.S.Sejfullina*, 2022, 3:(114). 2. P. 167-180. (<https://kazatu.edu.kz/pages/nauka/vestnik-nauki-kazahskogo-agrotehnicheskogo-universiteta-im-s-sejfullina>).
- 13 Kapustin A.V. Razrabotka vakciny protiv jemfizematoznogo karbunkula krupnogo rogatogo skota. *Russian Journal of Agricultural and So-cio-Economic Sciences*, 2016, 5(53). S. 97-102. (<https://rjoas.com>).
- 14 Kapustin A.V. Jefferktivnost' vakciny «Klostbovak-8» protiv klostridioza krupnogo rogatogo skota, vyzvannogo razlichnymi vidami *Clostridium*s pp. *Veterinarija, zootehnika i biotehnologija*, 2016, 9:6-11. (<https://www.litres.ru/serii-knig/zhurnal-veterinariya-zootehniya-i-biotehnologiya/zhurnal-veterinariya-zootehniya-i-biotehnologiya-2016>).
- 15 Bessarabov B.F., Voronin E.S. i dr. Infekcionnye bolezni zhivotnyh /Pod red. A.A. Sidorchuka. 2007, M., 671 s. (https://www.studmed.ru/bessarabov-bf-vashutin-aa-voronin-es-i-dr-infekcionnye-bolezni-zhivotnyh_30a18b3684f.html).
- 16 Satin N.K., Smirnov A.P. Izuchenie postvakcinal'nyh reakcij u krupnogo rogatogo skota pri immunizacii vakcinami jemfizematoznogo karbunkula krupnogo rogatogo skota. *Nauchn. trudy Saratovskogo s/h in-ta*, 1973, vyp.17, ch.2:12-18. (<https://www.dissercat.com/content/infekcionnye-bolezni-nutritiv-v-zverovodcheskikh-khozyaistvakh-severnogo-kavkaza>).
- 17 Odarenko K.I., Grjazin V.I. Reakcija aggljutinacii (RA) pri jemfizematoznom karbunkule. *Tr. KazNIVI*, 1976, t.16:180-184. (<https://kaz-nivi.kz>).

18 Ajtzhанov B.D. Jeффективност' metoda immunoflorescencii pri vyjavlenii возбудитеlej i specificheskikh antitel jemfizematoznogo karbunkula i zlokachestvennogo oteka krupnogo roгатого skota i ovec. *Diss. kand. vet. Nauk.* Almaty, 1986. 142 s. (<https://library.tou.edu.kz/fulltext/buuk/b636.docx>).

19 Abutalip A., Ajtzhанov. B.D., Kasenov M.M., Myrzaliev A., Tusupkanuly O. *Sposob poluchenija lateksnogo diagnostikuma dlja postanovki reakcii lateks-aggljutinacii.* Zajavka na vydachu patenta na poleznuju model'. №2023/0087.2. ot 30.01.2023 g. (https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1416?locale=ru_RU)

20 Registracionnoe udostoverenie na immunomoduljator «Immunofarm» № RK-VP-1-35-35 ot 26.03.2018 goda. (https://www.gov.kz/uploads/2023/2/22/61d73813a47434817a49357fee70e992_original.5233396.pdf).

21 Gorelov Ju.M., Laskovyj V.N., Sultanov A.A., Sushhih V.Ju., A. Abutalip i dr. *Sposob povyshenija immunogennosti vakcin protiv infekcionnoj infekcij sibirskoj jazvy i jemfizematoznogo karbunkula (Jemkar).* FGBNU «Saratovskij NIVI»; TOO «KazNIVI». № 201200605. Zajavl. 18.05.12. Opubl. 30.12.16. (<https://kzpatents.com>).

FTAMP:34.27.17

Г.Қ. АБАЙ^{1*}, Р.Ж. БЕРЖАНОВА², У.Ч. ЧОМАНОВ¹, Ш. ХАРСА³, А.А. САРТАЕВА⁴,
Н.К. ДИНАНОВА²

¹Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері ғылыми зерттеу институты, Алматы,
Қазақстан

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

³Измир Технологиялық Институты, Измир, Түркия

⁴Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: abay.gk@mail.ru

ІРІМШІК ӨНДІРІСІНДЕ ҚОЛДАНЫЛАТЫН ЛАКТОБАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ПРОТЕОЛИТИКАЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.07

Түйін

Тағамдық биотехнология саласында ірімшік биологиялық және нутрицевтикалық құндылығы жоғары сүт өнімі ретінде белгілі. Организммен биосіңірілуі жоғары болғандықтан тұтынушылар арасында мол сұранысқа ие. Пайдалы қасиеттерін нақтылау мақсатында қазіргі таңда ірімшік өндірісіндегі базалық құрам-бөлік – бактериялық ұйытқы дақылдарын белсенділік деңгейлері бойынша іріктеудің маңыздылығы жоғары. Ұйытқы дақылының құрамына енетін лактобактерия штамдарының протеолитикалық қасиеттерін зерттеудің өзектілігі бұл штамдардың соңғы өнімнің органолептикалық қасиеттері мен биологиялық құндылығына тікелей әсер етуімен негізделеді. Лактобактериялардың өніммен бірге адам организміне енген сәттен бастап асқазан – ішек жолындағы микробиомды қалыпқа келтіруге қызмет етуі соңғы өнімнің (ірімшіктің) функционалдылығын нақтылайды. Мақалада функционалды бағыттағы ірімшік өндірісінде қолданылатын бактериялық ұйытқының құрамына кіретін лактобактерия штамдарының технологиялық маңызды протеолитикалық қасиеттерін зерттеу нәтижелері берілген. Зерттеу объектілерінің барлығы дерлік казеин протеолизіне қатыса алатындығы зерттелінді. Жоғары белсенділікке ие штамдар: *Lactiplantibacillus plantarum* СНЕ37 Ch-1 - 19,0±0,5 мм, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8 дақылдарында - 12,0±0,2 мм мөлшерінде мөлдірлену аймағы анықталды. Сонымен қатар, желатинді протеолиздеу қарқындылығы жоғары штамдар *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары екендігі белгілі болды. Олар ЕПЖ (ет-пептонды желатин) қоректік ортасында пробирка бойымен және пробирка түбінде тұнба тұзу арқылы өсу ерекшелігін көрсетіп, жартылай қатты ЕПЖ қоректік ортасын толықтай сұйылтты.

Жұмыс қорытындысы бойынша протеолитикалық белсенділіктері жоғары сүтқышқылды бактериялар штамдары функционалды бағыттағы ірімшік өндірісі үшін қолданылатын ұйытқы дақылдарының құрамына енуіне толық негіз бар.

Кілтті сөздер: лактобактериялар, казеин протеолизі, желатин протеолизі.

Ірімшік – сүттен өндірілетін белоктың ферментативті коагуляциялану өнімі. Ірімшіктің жоғары тағамдық құндылыққа ие болуы құрамында көп мөлшерде белок пен алмастырылмайтын аминқышқылдарының кездесуімен түсіндіріледі [1-3]. Құрамындағы белоктар мен басқа да азоттық қосылыстардың көп бөлігі ерітілген күйде болуына байланысты ірімшік адам организммен оңай сіңіріліп, қорытылады. Ірімшіктің құрғақ затының құрамында 20 – 55% май, 1,5 – 3,5% минералды тұздар, ұшқыш май қышқылдары, карбонильді қосылыстар, дәрумендер, кальций, фосфор, микроэлементтер мен ферменттер кездеседі, энергетикалық құндылығы ондағы май мен белоктың мөлшеріне байланысты 1 кг өнімде 2500-4000 ккал аралығында ауытқып тұрады [4,5].

Ірімшіктің 100 г тұтыну арқылы организмді кальцийдің тәуліктік мөлшерімен қамтамасыз етуге болады. Аталған микроэлементтің жетіспеуі салдарынан организмде тірек-қимыл жүйесінің аппараттары, сүйектер мен тістердің зақымдалу қаупі жоғары.

Сонымен қатар ірімшік құрамында маңызды мөлшерде Д дәрумені кездеседі. Д дәрумені кальцийдің сіңірілуін қамтамасыз етеді. Жеткіліксіздігі салдарынан кальцийдің сіңірілуі төмендеп организм дефициттік күйге өтіп кетуі мүмкін [7, 8]. Сондықтан организмді дәрумендік - минералдық кешенмен қамтамасыз ету жолында функционалды бағыттағы ірімшікті өндіру және күнделікті теңгерілген тағам рационы құрамына ендірудің маңыздылығы жоғары.

Ірімшік өндірісі барысында көптеген күрделі биохимиялық және микробиологиялық процестер жүзеге асырылады. Қазіргі таңда тағамдық биотехнологияның қарыштап дамуы арқасында өндірілетін ірімшіктердің алуантүрлілігі кеңею үстінде. Ірімшіктің әрбір түрінің жетілуі мен қалыптасуы өндірісте пайдаланылатын ұйытқы құрамына енетін микрофлораның сандық және сапалық ерекшеліктеріне байланысты [9-11].

Ірімшік өндірісіне қажетті ұйытқы микрофлорасы ретінде сүтқышқылды бактериялардың түрлі штамдары мен түрлері (лактококстар, термофильді стрептококстар, лактобацилдер) пропионқышқылды бактериялар қолданыс табады. Сүтқышқылды бактериялар сүттің негізгі құрам-бөліктерін – лактоза, белоктар мен майлардың дәмдік, ароматикалық және биологиялық белсенді заттарға дейін трансформациялануын жүзеге асырады, сонымен қатар техникалық зиянды микроорганизмдердің өсуін тежейді. Ұйытқы алу жолында сүтқышқылды бактериялардың таза дақылын бөліп алу микроорганизмдердің салалық коллекциясын қалыптастырудың негізі болып есептеледі. Бәсекеге қабілетті бактериялық ұйытқы дақылдарын іздестіру, бактериялық ұйытқылар мен концентраттар өндіру мен дайындау отандық және түрлі шет елдік ғылыми-зерттеу ұйымдарында қарқынды түрде жүргізілу үстінде [12-14].

Бактериялық ұйытқы дақылдары сүт қышқылын түзу арқылы, белок пен майдың аз мөлшерде және баяу ыдырауына байланысты ферменттелген тағам өнімдерінің органолептикалық және құрылымдық-механикалық сипаттарын қалыптастыратын және биологиялық құндылығына әсер ететін, протеолитикалық қасиетке ие негізгі құрам-бөлік [15-19].

Лактобактериялардың протеолитикалық ферменттері клеткаларды азотпен және аминқышқылдарымен қамтамасыз етуде маңызды роль атқарады, себебі сүтқышқылды бактериялар клеткаларының бұл қосылыстарға деген қажеттелігі жоғары деңгейде. Протеолитикалық ферменттердің басты функциясы белоктарды бактерия клеткалары сіңіре алатындай компоненттер формасына дейін гидролиздеу. Лактобактериялардың протеолитикалық жүйесі протеиназамен түзіледі, бұл клетка қабырғасымен, пептидтер мен аминқышқылдарының тасымалдануы үшін қызмет атқаратын арнайы жүйемен және түрлі цитоплазматикалық пептидазалармен байланысты [20].

Соңғы жылдары тағам шикізаттарынан биоактивті пептидтерді теңгерімді тамақтану арқылы алу және қолдану тұрғысынан сүтқышқылды бактериялардың протеолитикалық белсенділігін зерттеуге деген қызығушылық артып отыр. Көптеген ғалымдардың назары лактобактериялардың протеолитикалық белсенділігінің нәтижесінде түзілетін биоактивті пептидті қосылыстардың иммуномодулирлеуші, антигипертензиялық және гипохолестеринемиялық белсенділіктерін зерттеуге бағытталған [21-24]. Ұйытқының қасиеті оның құрамына кіретін жекелеген штамдардың белсенділігіне тікелей байланысты болғандықтан, ұйытқы құрамына өндірістік құнды штамдарды, ең бастысы протеолитикалық белсенділігі жоғары штамдарды енгізу қажет. Тағам биотехнологиясында жоғары биохимиялық белсенділік пен биотехнологиялық қасиеттерге ие, функционалды тағам өнімдерін өндіруде қолданылатын отандық бәсекеге қабілетті сүтқышқылды бактериялардың ұйытқысын өндіру өзекті және перспективті бағыт болып табылады.

Жұмыстың мақсаты – ірімшік өндірісінде қолданылатын жаңа функционалды-белсенді лактобактерия штамдарының протеолитикалық белсенділігіне баға беру.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Жұмыста зерттеу объектілері ретінде табиғи сиыр, ешкі сүтінен және қолдан жасалған ешкі сүті ірімшігінен бөлініп алынған жаңа сүтқышқылды бактериялардың таза штамдары пайдаланылды.

Лактобактериялар штамдарын дақылдау мақсатында бірнеше қоректік орталар қолданылды:

- майсыздандырылған стерильді сүт;
- MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) қоректік ортасы;
- CJM (cabbage juice medium): 1000 мл қырыққабат қайнатпасына ашытқы автолизаты – 10,0 г; пептон – 10,0 г; глюкоза – 20,0 г; CaCO₃ – 40,0 г; агар – 20,0 г [25];

- казеин протеолизін зерттеу үшін Эйкман сүтті агары: 700 мл дистилденген суға пептон – 10,0-20,0 г; NaCl – 5,0 г; глюкоза – 10,0 г; агар – 20,0 г; 300 мл стерильді майсыздандырылған сүт. Аталған қоректік ортада лактобактериялар дақылдары агар бетінде нүктелік тереңдетіп егілді. Жұмыс нәтижесі өсіп шыққан колония айналасындағы мөлдірлену аймағының диаметрімен өлшенді.

- желатин протеолизін зерттеу мақсатында ет пептонды желатин (ЕПЖ) қоректік ортасы: 1000 мл ет-пептонды сорпаға 15-20% көлемінде желатин қосылады. ЕПЖ қоректік ортасында зерттеу жұмыстары пробиркаларға 10 мл көлемінде құйылған және толықтай суыған жартылай қатты қоректік ортаға укол әдісімен микробиологиялық тұзақты пайдаланып егу арқылы жүргізілді. Лактобактериялардың протеолитикалық белсенділігі пробирка бойымен өсіп, тұнба түзу арқылы және жартылай қатты қоректік ортаны толықтай сұйылтуы арқылы бағаланды.

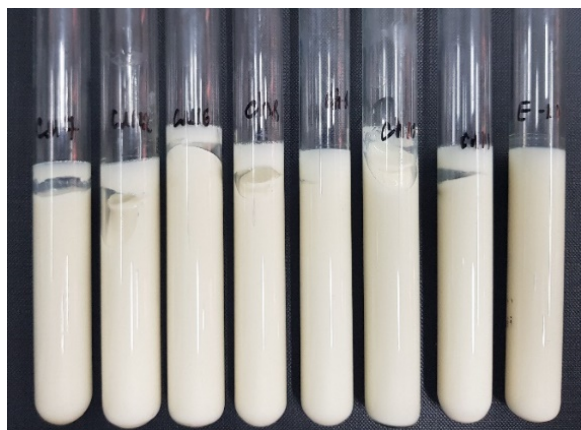
Сүтқышқылды микроорганизмдер MRS және CJM қоректік орталарында 37°C -та 24-36 сағат бойы дақылданды. Барлық зерттеу жұмыстары белсенді тәуліктік дақылдармен жүзеге асырылды. Зерттеу нәтижелері сырт көзбен және микроскопиялық әдістер арқылы анықталды. Стерильділікті тексеру мақсатында ЕПА (ет-пептонды агар) және ЕПС (ет-пептонды сорпа) қоректік орталары қолданылды. Дайын қоректік орталар автоклавта 30 минут бойы 1,5А қысымда стерилизацияланды. Лактобактерия клеткаларын егу және қайта егу жұмыстары, микроскоптау микробиологиялық дәстүрлі әдістермен жүргізілді.

Нәтижелер және оларды талдау

Сүт қышқылды бактериялар сүт қантын – лактозаны сүт қышқылына – лактатқа дейін айналдырып, ортаның рН мәнін төмендетеді, нәтижесінде казеиннің ұюына және қышқылға сезімтал микроорганизмдер өсуінің тежелуіне әсер етеді. Көптеген әдебиеттерде сүт қышқылды бактериялардың сүтті ұйыту уақытының ұзақтығын олардың белсенділігімен байланыстырылады [26].

Лактобактерияларды дұрыс идентификациялау жолында олардың морфологиялық - дақылдық қасиеттерін зерттеумен қатар, каталазалық және оксидазалық белсенділіктерін анықтаудың маңыздылығы жоғары, себебі аталған ерекшеліктер патогенді аэробты және факультативті анаэробты микроорганизмдерге тән деп есептеледі. Жұмыста сүт қышқылды бактериялардың каталазалық және оксидазалық белсенділіктерін анықтау мақсатында арнайы тест препараттар пайдаланылды. Тест көрсеткіштері бойынша барлық дақылдардың каталазалық және оксидазалық белсенділіктері жоқ екендігі анықталды.

Лактобактериялардың сүтті ұйыту белсенділігін анықтау үшін егу материалдары майсыздандырылған стерильді сүтте дақылданды. Сүтті ұйыту қарқындылығы лабораториялық жағдайда жіті бақыланып отырды. Алынған нәтижелер бойынша *Lactococcus lactis subsp. lactis* SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 және *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 штамдарының сүтті ұйыту қарқындылығы *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 штамына қарағанда әлдеқайда жоғары екендігі анықталды.



Сурет 1 – Лактобактериялардың сүтті ұйытуы

Жұмыста *Lactococcus lactis subsp. lactis* SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 және *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 штамдары сүтте өсу барысында, дақылданудың 16-18 сағатында концистенциясы өте тығыз, сарысусыз біртекті ұйытқы түзді (1-сурет).

Ірімшік өндірісі үшін қолданылатын ұйытқы құрамына кіретін перспективті сүтқышқылды бактериялардың негізі қасиеттерінің бірі – протеолитикалық белсенділігі. Протеолитикалық белсенділікті зерттеу үшін казеин және желатин протеолизі процестері қарастырылды. Сүт қосылған агарлы Эйкман қоректік ортасына зерттелініп отырған штамдарды нүктелік тереңдетіп егу жұмыстары жүргізілді. Петри табақшаларын 48 сағат бойы 37 °C температурада дақылдап, уақыт өткен соң мөлдірлену аймағының диаметрі өлшенді (1-кесте).

Кесте 1 Сүтқышқылды бактерияларының казеинді протеолиздеуі

№	Штамдар	Сүтті агарлы орта
		Мөлдірлену аймағының диаметрі, мм
1	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> S5K8 CM-14	12,0±0,2
2	<i>Streptococcus macedonicus</i> LAB 617 CM-16	10,0±0,5
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CHE37 Ch-1	19,0±0,5
4	<i>Lactococcus lactis</i> 1881 Ch-8	12,0±0,5
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> SDCM 5123 CH-10	10,0±0,5
Ескерту: «сандар» - айқындалу аймағының диаметрі		

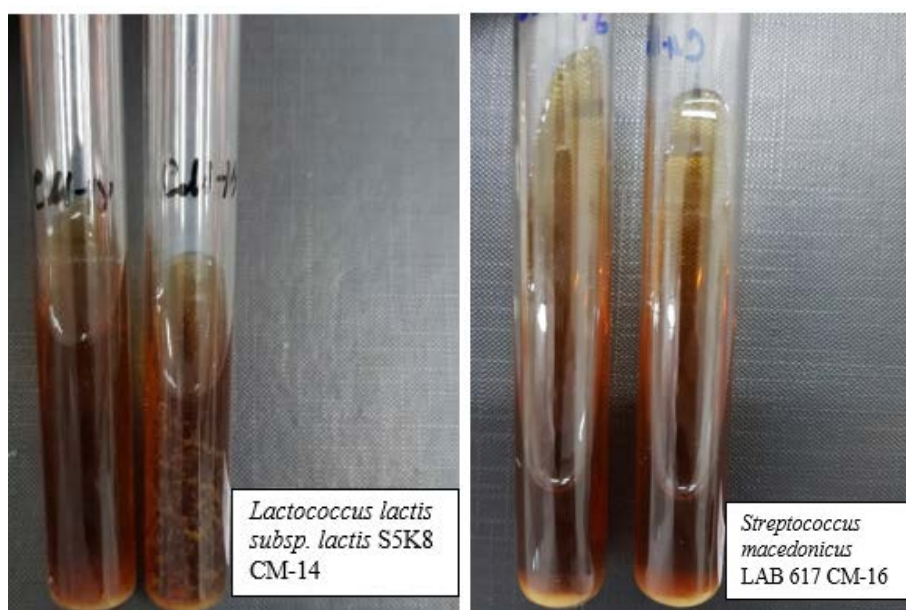
Жұмыс барысында барлық штамдар казеинді протеолиздеуге қабілетті екендігі анықталды. Жоғары протеолитикалық белсенділікке ие штамдар: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8 екендігі белгілі болды, протеолитикалық белсенділіктің жоғары көрсеткіші, сәйкесінше – бацилдерде гидролиздеу аймағы 19,0±0,5 мм, коктарда - 12,0±0,2 мм екендігі анықталды.

Суретте сүтті агарлы Эйкман қоректік ортасында нүктелік тереңдету әдісімен дақылданған лактобактерия колониясының айналасындағы мөлдірлену аймағы айқын бейнеленген (2- сурет).



Сурет 2 – Казеин протеолизі

Лактобактериялардың протеолитикалық белсенділігін анықтаудың келесі әдісі дақылдардың желатинді ыдырату қабілеттігін зерттеу. Бұл мақсатта лактобактерия штамдары ЕПЖ қоректік ортасында дақылданды. 48 сағат бойы 37⁰С температурада өсіргеннен кейін ет-пептонды желатин ортасына укол әдісімен егілген лактобактериялардың: *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары желатинді жақсы ыдырату қасиетіне ие екендігі ортаның өзгерісі арқылы анықталды (3-сурет).



Сурет 3 – Желатин протеолизі

Суретте жартылай қатты ет-пептонды желатин қоректік ортасында лактобактериялардың өсу ерекшеліктері бейнеленген. *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары жартылай қатты ет пептонды желатин қоректік ортасын толықтай сұйылтумен қатар, пробирка бойымен және тұнба түзу арқылы өсуге қабілетті екендігін байқатты. Нәтижесінде аталған екі штамм желатин протеолизін жүргізе алатындығы белгілі болды.

Қорытынды

Зерттеу жұмысы барысында табиғи сүт өнімдерінен бөлініп алынған лактобактериялардың протеолитикалық қасиеттері зерттелді. Бұл мақсатта казеин мен желатинді протеолиздеу қарқындылығы анықталды. Нәтиже бойынша барлық штамдар казеинді протеолиздеуге қабілетті екендігі зерттелінді. Жоғары белсенділікке ие штамдар: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 - $19,0 \pm 0,5$ мм, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8 дақылдарында - $12,0 \pm 0,2$ мм мөлшерінде мөлдірлену аймағы анықталды. Сонымен қатар, желатинді протеолиздеу қарқындылығы жоғары штамдар *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары екендігі белгілі болды.

Сүт казеині мен желатинді протеолиздеу белсенділігін анықтау мәліметтері бойынша протеолитикалық белсенділігі жоғары сүтқышқылды бактериялар штамдары функционалды бағыттағы ірімшік өндірісі үшін ұйытқы дақылдары құрамына қосуға пайдаланылады.

Әдебиеттер:

1 Almena-Aliste M., Mietton B. Cheese classification, characterization, and categorization: A global perspective. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2 (1): 2003-2012. (<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012>)

2 Afshari R., Pillidge C.J., Dias D.A., Osborn A.M., Gill H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020, 60 (1): 33-47. (<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>)

3 Vacca G.M., Stocco G., Dettori M.L., Summer A., Cipolat-Gotet C., Bittante G., Pazzola M. Cheese yield, cheesemaking efficiency, and daily production of 6 breeds of goats. *Journal of dairy science*, 2018, 101 (9): 7817-7832. (<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14450>)

4 Суюнчев О.А., Вобликова Т.В. Особенности технологии сыров из козьего молока. *Переработка молока*, 2007, 11: 44-46. (<https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-proizvodstva-syrov-iz-koziego-moloka>)

5 Nam J.H., Cho Y.S., Rackerby B., Goddik L., Park S.H. Shifts of microbiota during cheese production: impact on production and quality. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021, 105 (6): 2307-2318. (<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5>)

6 Tunick M.H., Van Hekken D.L. Dairy Products and Health: Recent Insights. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63 (43): 9381-9388. (<https://doi.org/10.1021/jf5042454>)

7 Силаева В.М., Сахаров С.Д. Нормализация молока по жиру и ее значимость для сыроделия. *Переработка молока*. 2007, 10: 6-8. (<http://www.milkbranch.ru/magazine/archive/viewdoc/2007/10/821.html>)

8 Тултабаева Т.Ч., Чоманов У.Ч., Амирова Ж.Т. Производство мягких комбинированных сыров с растительными добавками. *Известия ВУЗов Кыргызстана*. 2010, 3: 22-23. (<http://www.science-journal.kg/ru/journal/2/archive/7898>)

9 Johnson M.E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of dairy science*, 2017, 100 (12): 9952-9965. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979>)

10 Blaya J., Barzideh Z., LaPointe G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of dairy science*, 2018, 101 (4): 3611-3629. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>)

11 Katechaki E., Panas P., Rapti K., Kandilogiannakis L., Koutinas A.A. Production of hard-type cheese using free or immobilized freeze-dried kefir cells as a starter culture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56 (13): 5316-5323. (<https://doi.org/10.1021/jf703585y>)

12 Тултабаева Т.Ч., Чоманов У.Ч. Термодинамические и реологические характеристики комбинированных мягких сыров. 2011, 2: 103-110. (<http://www.vestnik.nauka.kz/wp-11content/uploads/2011/06/13pdf>)

13 Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford Tom P., Ross R Paul, Fitzgerald G.F., Cotter Paul D. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology reviews*, 2013, 37: 664-698. (<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>)

14 Oyeniran A., Ibrahim S.A., Gyawali R., Tahergorabi R., Zimmerman T., Krastanov A. A modified reinforced clostridial medium for the isolation and enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp.*

- bulgaricus in a mixed culture. *Journal of dairy science*, 2020, 103(6): 5030-5042. (<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17894>)
- 15 Nagaoka S. Yogurt Production. *Methods in molecular biology*, 2019, 1887: 45-54. (https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_5)
- 16 Garcia-Cano I, Rocha-Mendoza D., Ortega-Anaya J., Wang K., Kosmerl E., Jimenez-Flores R. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103:5243-5257. (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>)
- 17 Ouiddir M., Bettache G., Leyva Salas M., Pawtowski A., Donot C., Brahimi S., Mabrouk K., Coton E., Mounier J. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiology*, 2019, 82: 160-170. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.020>)
- 18 Hayek S.A., Gyawali R., Aljaloud S.O., Krastanov A., Ibrahim S.A. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, 2019, 86 (4):490-502. (<https://doi.org/10.1017/S002202991900075X>)
- 19 Kang W., Pan L., Peng C., Dong L., Cao S., Cheng H., Wang Y., Zhang C., Gu R., Wang J., Zhou H. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(11): 9980-9991. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18704>)
- 20 Camara S.P., Dapkevicius A., Riquelme C., Elias R.B., Silva C., Malcata F.X., Dapkevicius M. Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Science and Technology International*, 2019, 25(4): 303-317. (<https://doi.org/10.1177/1082013218823129>)
- 21 Grujovic M.Z., Mladenovic K.G., Nikodijevic D.D., Comic L.R. Autochthonous lactic acid bacteria-presentation of potential probiotics application. *Biotechnology letters*, 2019, 41(11): 1319-1331. (<https://doi.org/10.1007/s10529-019-02729-8>)
- 22 Gomand F., Borges F., Burgain J., Guerin J., Revol-Junelles A.M., Gaiani C. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. *Annual review of food science and technology*, 2019, 10: 285-310. (<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121140>)
- 23 Behare P.V., Mazhar S., Pennone V., McAuliffe O. Evaluation of lactic acid bacteria strains isolated from fructose-rich environments for their mannitol-production and milk-gelation abilities. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103 (12): 11138-11151. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19120>)
- 24 Головин М. А., Ганина В. И., Машенцева Н. Г. Холестеринредуцирующие пробиотические бактерии в молочной продукции. *Молочная промышленность*. 2014. 5:46–47. (<https://earthpapers.net/razrabotka-probioticheskoy-kompozitsii-s-vysokoy-sposobnostyu-k-reduktsii-holesterina>)
- 25 Eun J. J., Dae W. M., Joon S. O., Jin S. M., Hyunbin S., Kwang Y. K., Nam S. H. Development of cabbage juice medium for industrial production of leuconostoc mesenteroides starter. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2017, 28;27(12):2112-2118. (<https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08050>).
- 26 Гусев М. В., Минеева Л. А. Молочнокислые бактерии. *Микробиология*, 2004, 4:15-19. (<https://www.at.alleng.org/d/bio/bio092.htm>)

Г.Қ. АБАЙ^{1*}, Р.Ж. БЕРЖАНОВА², У.Ч. ЧОМАНОВ¹, Ш. ХАРСА³,
А.А. САРТАЕВА⁴, Н.К. ДИНАНОВА²

¹Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Алматы, Казахстан

²Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

³Измирский Технологический Институт, Измир, Турция

⁴Казахский национальный женский педагогический университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: abay.gk@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРА

Аннотация

В области пищевой биотехнологии сыр известен как молочный продукт с высокой биологической и нутрицевтической ценностью. Благодаря высокой биодоступности организмом, пользуется большим спросом у потребителей. В целях уточнения полезных свойств в настоящее время в производстве сыра большое значение имеет отбор по уровням активностей культур лактобактерий, входящих в состав закваски. Актуальность исследования морфолого-культуральных и протеолитических свойств штаммов лактобактерий, входящих в состав культуры закваски, обусловлена непосредственным влиянием этих штаммов на органолептические свойства и биологическую ценность конечного продукта. Лактобактерии в составе закваски должны служить для нормализации микробиома желудочно – кишечного тракта, тем самым обеспечивая функциональность конечного продукта (сыра). В статье представлены результаты исследования морфолого-культуральных и протеолитических свойств штаммов лактобактерий, входящих в состав бактериальной закваски, используемой при производстве сыров функциональной направленности. Выявлено, что все объекты исследования могут участвовать в протеолизе казеина. Активными штаммами, показавшими высокие результаты, являются *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 - 19,0±0,5 мм, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 и *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, зона просветления у последних - 12,0±0,2 мм. В протеолизе желатина могут участвовать лишь два штамма - *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 и *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16. По итогам работы имеются все основания полагать, что штаммы молочнокислых бактерий с высокой протеолитической активностью могут войти в состав закваски, используемой для производства сыров функционального назначения.

Ключевые слова: лактобактерии, протеолиз казеина, протеолиз желатина.

IRSTI:34.27.17

G.K. ABAY^{1*}, R.Zh. BERZHANOVA², U.Ch. CHOMANOV¹, S. HARSA³,
A.A. SARTAYEVA⁴, N.K. DINANOVA²

¹Kazakh Research Institute of Processing and Food Industry, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

³Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey

⁴Kazakh National Women's Teacher Training University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: abay.gk@mail.ru

INVESTIGATION OF PROTEOLYTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA USED IN CHEESE PRODUCTION

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.07

Abstract

In the field of food biotechnology, cheese is known as a dairy product with high biological and nutraceutical value. Due to the high bioavailability of the body, it is in great demand among consumers. In

order to clarify the useful properties, currently in the production of cheese, it is of great importance to select the activity levels of lactobacillus cultures that are part of the starter culture. The relevance of the study of morphological, cultural and proteolytic properties of lactobacillus strains that are part of the starter culture is due to the direct influence of these strains on the organoleptic properties and biological value of the final product. Lactic acid bacteria in the starter culture should serve to normalize the microbiome of the gastrointestinal tract, thereby ensuring the functionality of the final product (cheese). The article presents the results of a study of the morphological, cultural and proteolytic properties of lactobacillus strains that are part of the bacterial starter culture used in the production of functional cheeses. It was revealed that all the objects of the study can participate in the proteolysis of casein. Active strains that have shown high results are *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 - 19.0 ± 0.5 mm, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 and *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, the zone of enlightenment in the latter - 12.0 ± 0.2 mm. Only two strains can participate in gelatin proteolysis - *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 и *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16. According to the results of the work, there is every reason to believe that strains of lactic acid bacteria with high proteolytic activity can be part of the starter culture used for the production of functional cheeses.

Keywords: lactobacillus, casein proteolysis, gelatin proteolysis.

Cheese is a product of enzymatic coagulation of protein produced from milk. The high nutritional value of cheese is explained by the fact that it contains a large amount of protein and essential amino acids [1-3]. Due to the fact that most of the proteins and other nitrogen compounds it contains are in a dissolved state, cheese is easily absorbed and digested by the human body. The dry matter of cheese contains 20 – 55% fat, 1.5 – 3.5% mineral salts, volatile fatty acids, carbonyl compounds, vitamins, calcium, phosphorus, trace elements and enzymes, the energy value fluctuates between 2500-4000 kcal per 1 kg of product, depending on the amount of fat and protein in it [4,5].

By consuming 100 g of cheese, the body can be supplied with a daily amount of calcium. Due to the lack of this trace element, there is a high risk of damage to the apparatus of the musculoskeletal system, bones and teeth in the body. At the same time, a significant amount of vitamin D is found in cheese. Vitamin D ensures the absorption of calcium. As a result of insufficient calcium absorption, the body can go into a deficit state [7, 8]. Therefore, on the way to providing the body with a vitamin and mineral complex, the production of functional cheese and its inclusion in the daily balanced diet of food are of great importance.

In the process of cheese production, many complex biochemical and microbiological processes are carried out. Currently, thanks to the rapid development of Food Biotechnology, the variety of cheeses produced is expanding. The maturation and formation of each type of cheese depends on the quantitative and qualitative characteristics of the microflora, which is included in the initial composition used in production [9-11].

Propionic acid bacteria of various strains and types of lactic acid bacteria (lactococcus, streptococcus, lactobacillus) are used as the main microflora necessary for the production of cheese. Lactic acid bacteria carry out the transformation of the main components of milk-lactose, proteins and fats into taste, aromatic and biologically active substances, and also inhibit the growth of technically harmful microorganisms. The basis for the formation of an industry collection of microorganisms is the isolation of a pure culture of lactic acid bacteria on the way to clotting. The search for competitive bacterial clot cultures, production and preparation of bacterial clot and concentrates are intensively carried out in domestic and foreign research organizations [12-14].

Bacterial clotting cultures form organoleptic and structural-mechanical properties of fermented food products due to the formation of lactic acid, low protein and fat breakdown and slow breakdown, and have proteolytic properties [15-19].

Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria play an important role in supplying cells with nitrogen and amino acids, because the need for these compounds by lactic acid bacteria cells is at a high level. The main function of proteolytic enzymes is to hydrolyze proteins to the form of components so that they can be absorbed by bacterial cells. The proteolytic system of lactic acid

bacteria is formed by proteinase, which is associated with the cell wall, a special system that functions for the transport of peptides and amino acids, and various cytoplasmic peptidases [20].

In recent years, there has been a growing interest in studying the proteolytic activity of lactic acid bacteria in terms of obtaining and using bioactive peptides from food raw materials through a balanced diet. The attention of many scientists is focused on the study of immunomodulatory, antihypertensive and hypocholesterolemic activity of bioactive peptide compounds formed as a result of proteolytic activity of lactic acid bacteria [21-24]. Since the properties of the wort directly depend on the activity of individual strains included in its composition, it is necessary to include industrially valuable strains in the wort composition, and most importantly, strains with high proteolytic activity. An urgent and promising direction in Food Biotechnology is the production of domestic competitive lactic acid bacteria, which have high biochemical activity and biotechnological properties, are used in the production of functional food products.

The purpose of the work is to assess the proteolytic activity of new functionally– active strains of lactic acid bacteria used in the production of cheese.

Materials and methods of research

Pure strains of fresh lactic acid bacteria isolated from natural cow's, goat's milk and homemade goat's milk cheese were used as objects of research in the work.

Several Culture Media have been used for the purpose of culturing *Lactobacillus* strains:

- skimmed sterile milk;
- MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) nutrient medium;
- CJM (cabbage juice medium): yeast autolysate per 1000 ml of cabbage decoction – 10.0 g; peptone – 10.0 g; glucose – 20.0 g; Saso3 - 40.0 g; agar – 20.0 g [25];
- Aikman's milk agar for the study of casein proteolysis: peptone – 10.0-20.0 g per 700 ml of distilled water; NaCl – 5.0 g; glucose – 10.0 g; agar – 20.0 g; 300 ml of sterile skim milk. In this nutrient medium, lactic acid bacteria crops were sown with point deepening on the surface of the agar. The result of the work was measured by the diameter of the opacity zone around the sprouted colony.

-meat peptone gelatin (MPG) nutrient medium for the study of gelatin proteolysis: gelatin in a volume of 15-20% is added to 1000 ml of meat-peptone broth. Research work on the nutrient medium of the EPP was carried out by inoculation using a microbiological trap by injection method on a semi-solid nutrient medium, poured into test tubes in a volume of 10 ml and completely cooled. The proteolytic activity of lactic acid bacteria was assessed by growing along the test tube, forming a precipitate and completely diluting the semi-solid culture medium.

Lactic acid microorganisms were cultured in MRS and CJM culture media at 37°C for 24-36 hours. All research work was carried out with active diurnal crops. The results of the study were determined visually and by microscopic methods. In order to test sterility, MPA (meat-peptone agar) and MPB (meat-peptone broth) culture media were used. The finished culture media were sterilized in an autoclave for 30 minutes at a pressure of 1.5 A. Inoculation and re-grafting of *Lactobacillus* cells, microscopy was carried out using traditional microbiological methods.

Results and discussion

Lactic acid bacteria convert milk sugar – lactose to lactic acid – lactate, lowering the pH value of the medium, resulting in casein clotting and inhibition of the growth of acid-sensitive microorganisms. In many literature, the duration of milk clotting time by lactic acid bacteria is correlated with their activity [26].

On the way to correct identification of lactic acid bacteria, along with the study of their morphological and crop properties, it is important to identify catalase and oxidase activity, since these features are considered characteristic of pathogenic aerobic and facultative anaerobic microorganisms. In order to determine the catalase and oxidase activity of lactic acid bacteria, special test preparations were used in the work. According to the test indicators, it was found that not all crops have catalase and oxidase activity.

In order to determine the activity of milk clotting of lactic acid bacteria, sowing materials were cultured in skimmed sterile milk. The intensity of milk clotting was closely monitored in laboratory conditions. According to the results obtained, *Lactococcus lactis subsp. lactis* SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 and *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 it was found that the milk clotting intensity of the strains was much higher than that of the *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 CH-1 strain.

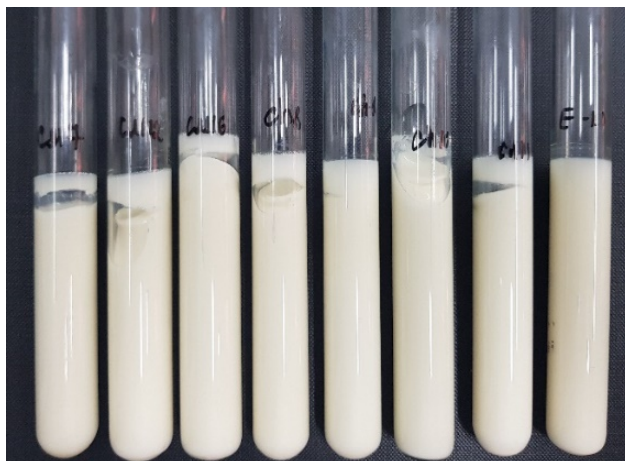


Figure 1 - Milk clotting by lactic acid bacteria

Lactococcus lactis subsp. lactis SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 and *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 in the course of growth in milk, at 16-18 hours of cultivation, formed a very dense, whey-free homogeneous clot (Figure 1).

One of the main properties of promising lactic acid bacteria, which are part of the preparation used for cheese production, is proteolytic activity. For the study of proteolytic activity, the processes of casein and gelatin proteolysis were considered. Point-depth grafting of the studied strains on the agaric eikman nutrient medium with milk was carried out. Petri dishes were cultured at 37 °C for 48 hours, and after the time, the diameter of the opacity zone was measured (Table 1).

Table 1. Casein proteolysis of lactic acid bacteria

№	Strains	Milk agaric medium
		Opacity area diameter, mm
1	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> S5K8 CM-14	12,0±0,2
2	<i>Streptococcus macedonicus</i> LAB 617 CM-16	10,0±0,5
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CHE37 Ch-1	19,0±0,5
4	<i>Lactococcus lactis</i> 1881 Ch-8	12,0±0,5
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> SDCM 5123 CH-10	10,0±0,5
Note: " numbers " - the diameter of the detection zone		

In the course of the work, it was found that all strains are capable of proteolytic casein strains with high proteolytic activity: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, a high indicator of proteolytic activity, respectively – in bacils, the hydrolysis zone is 19.0±0.5 mm, in cocs - 12.0±0.2 mm.

The figure clearly shows the opacity zone around the colony of lactic acid bacteria, cultured by point deepening in the milk agaric eikman nutrient medium (Figure 2).

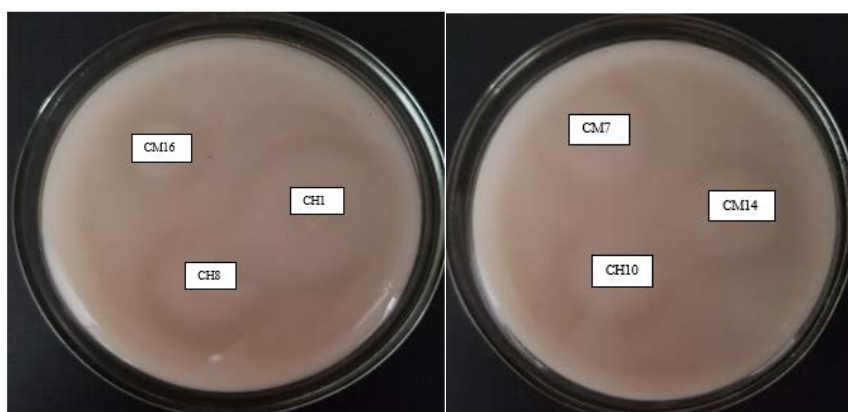


Figure 2 - Casein proteolysis

The next method for determining the proteolytic activity of lactic acid bacteria is the study of the ability of crops to break down gelatin. For this purpose, strains of lactic acid bacteria were cultured in the nutrient medium of the EPC. Lactic acid bacteria injected into a meat-peptone gelatin medium after 48 hours of cultivation at a temperature of 37⁰C. the fact that strains *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 have good gelatin decomposition properties was determined by a change in the medium (Figure 3).

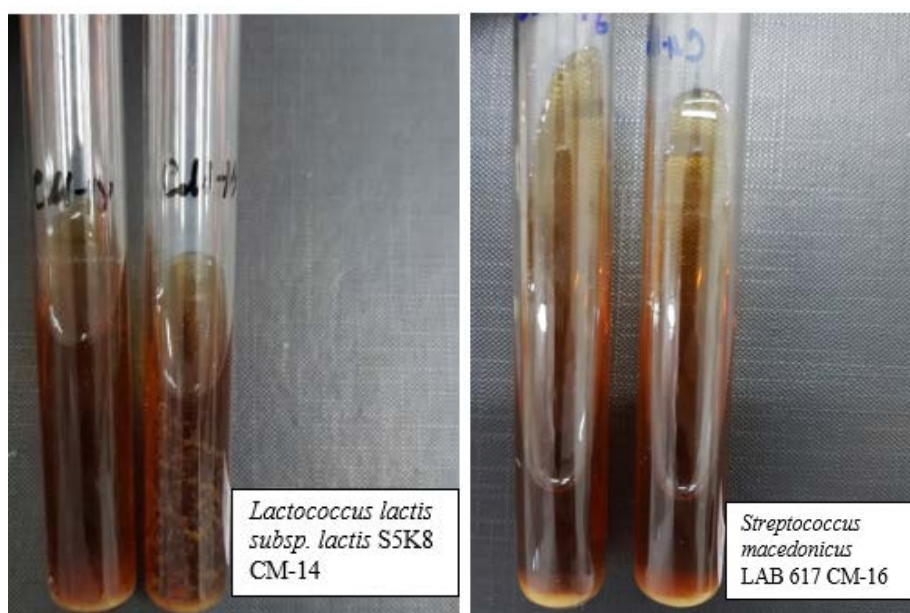


Figure 3 - Gelatin proteolysis

The picture shows the features of the growth of lactic acid bacteria in a semi-solid meat-peptone gelatin nutrient medium. *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 were observed to be able to grow along a test tube and through the formation of sediment, in addition to completely diluting the nutrient medium of semi-hard meat peptone gelatin. As a result, it turned out that the two mentioned strains can carry out gelatin proteolysis.

Conclusion

In the course of the research work, the proteolytic properties of lactic acid bacteria isolated from natural dairy products were studied. For this purpose, the intensity of proteolysis of casein and gelatin was determined. As a result, it was studied that all strains are capable of proteolysis of

casein. Strains with high activity: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1-19.0±0.5 mm, *Lactococcus lactis* subsp. *in cultures of lactis* S5K8 CM-14 and *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, an area of opacity was determined in the amount of - 12.0±0.2 mm. In addition, strains with high gelatin proteolysis intensity are *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S5K8 CM-14 and *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 strains.

According to the data on the determination of the proteolysis activity of milk casein and gelatin, strains of lactic acid bacteria with high proteolytic activity are used for inclusion in the composition of yeast cultures for the production of cheese of functional orientation.

References:

- 1 Almena-Aliste M., Mietton B. Cheese classification, characterization, and categorization: A global perspective. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2 (1): 2003-2012. (<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012>)
- 2 Afshari R., Pillidge C.J., Dias D.A., Osborn A.M., Gill H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020, 60 (1): 33-47. (<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>)
- 3 Vacca G.M., Stocco G., Dettori M.L., Summer A., Cipolat-Gotet C., Bittante G., Pazzola M. Cheese yield, cheesemaking efficiency, and daily production of 6 breeds of goats. *Journal of dairy science*, 2018, 101 (9): 7817-7832. (<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14450>)
- 4 Suyunchev O.A., Voblikova T.V. Osobennosti tekhnologii syrov iz koz'ego moloka, Pererabotka moloka, 11, 44-46 (2007). (<https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-proizvodstva-syrov-iz-koziego-moloka>)
- 5 Nam J.H., Cho Y.S., Rackerby B., Goddik L., Park S.H. Shifts of microbiota during cheese production: impact on production and quality. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021, 105 (6): 2307-2318. (<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5>)
- 6 Tunick M.H., Van Hekken D.L. Dairy Products and Health: Recent Insights. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63 (43): 9381-9388. (<https://doi.org/10.1021/jf5042454>)
- 7 Silaeva V.M., Saharov S.D. Normalizaciya moloka po zhiru i ee znachimost' dlya syrodeliya. Milk processing, 10, 6-8 (2007). (<http://www.milkbranch.ru/magazine/archive/viewdoc/2007/10/821.html>)
- 8 Tultabaeva T.Ch., Chomanov U., Muhtarhanova R. Myagkij syr iz koz'ego moloka obogashchennyj rastitel'nyim belkom, kompleks - kak faktor razvitiya nacional'noj ekonomiki Respubliki Kazahstan: Materialy mezhdunarodnoj nauchno- prakticheskoy konferencii, Semey, 425-427 (2004). (<http://www.science-journal.kg/ru/journal/2/archive/7898>)
- 9 Johnson M.E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of dairy science*, 2017, 100 (12): 9952-9965. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979>)
- 10 Blaya J., Barzideh Z., LaPointe G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of dairy science*, 2018. 101 (4): 3611-3629. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>)
- 11 Katechaki E., Panas P., Rapti K., Kandilogiannakis L., Koutinas A.A. Production of hard-type cheese using free or immobilized freeze-dried kefir cells as a starter culture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56 (13): 5316-5323. (<https://doi.org/10.1021/jf703585y>)
- 12 Tultabaeva T.Ch., Chomanov U.Ch. Kombinirovannyj myagkij syr, Agropromyshlennyj kompleks - kak faktor razvitiya nacional'noj ekonomiki Respubliki Kazahstan: Materialy mezhdunarodnoj nauchno- prakticheskoy konferencii, Semey, 418-420 (2004). (<http://www.vestnik.nauka.kz/wp-11content/uploads/2011/06/13pdf>)
- 13 Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford Tom P., Ross R Paul, Fitzgerald G.F., Cotter Paul D. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology reviews*, 2013, 37: 664-698. (<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>)
- 14 Oyeniran A., Ibrahim S.A., Gyawali R., Tahergorabi R., Zimmerman T., Krastanov A. A modified reinforced clostridial medium for the isolation and enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in a mixed culture. *Journal of dairy science*, 2020, 103(6): 5030-5042. (<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17894>)
- 15 Nagaoka S. Yogurt Production. *Methods in molecular biology*, 2019, 1887: 45-54. (https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_5)
- 16 Garcia-Cano I, Rocha-Mendoza D., Ortega-Anaya J., Wang K., Kosmerl E., Jimenez-Flores R. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and

antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103:5243-5257. (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>)

17 Ouiddir M., Bettache G., Leyva Salas M., Pawtowski A., Donot C., Brahimi S., Mabrouk K., Coton E., Mounier J. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiology*, 2019, 82: 160-170. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.020>)

18 Hayek S.A., Gyawali R., Aljaloud S.O., Krastanov A., Ibrahim S.A. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, 2019, 86 (4):490-502. (<https://doi.org/10.1017/S002202991900075X>)

19 Kang W., Pan L., Peng C., Dong L., Cao S., Cheng H., Wang Y., Zhang C., Gu R., Wang J., Zhou H. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(11): 9980-9991. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18704>)

20 Camara S.P., Dapkevicius A., Riquelme C., Elias R.B., Silva C., Malcata F.X., Dapkevicius M. Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Science and Technology International*, 2019, 25(4): 303-317. (<https://doi.org/10.1177/1082013218823129>)

21 Grujovic M.Z., Mladenovic K.G., Nikodijevic D.D., Comic L.R. Autochthonous lactic acid bacteria-presentation of potential probiotics application. *Biotechnology letters*, 2019, 41(11): 1319-1331. (<https://doi.org/10.1007/s10529-019-02729-8>)

22 Gomand F., Borges F., Burgain J., Guerin J., Revol-Junelles A.M., Gaiani C. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. *Annual review of food science and technology*, 2019. 10: 285-310. (<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121140>)

23 Behare P.V., Mazhar S., Pennone V., McAuliffe O. Evaluation of lactic acid bacteria strains isolated from fructose-rich environments for their mannitol-production and milk-gelation abilities. *Journal of Dairy Science*, 2020. 103 (12): 11138-11151. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19120>)

24 Golovin M. A., Ganina V. I., Mashenceva N. G. Holesterinreduciruyushchie probioticheskie bakterii v molochnoj produkcii. *Molochnaya promyshlennost'*. 2014. 5:46-47. (<https://earthpapers.net/razrabotka-probioticheskoy-kompozitsii-s-vysokoy-sposobnostyu-k-reduktsii-holesterina>)

25 Eun J. J., Dae W. M., Joon S. O., Jin S. M., Hyunbin S., Kwang Y. K., Nam S. H. Development of cabbage juice medium for industrial production of leuconostoc mesenteroides starter. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2017, 28;27(12):2112-2118. (<https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08050>)

26 Gusev M. V., Mineeva L. A. Molochnokislye bakterii, *Mikrobiologiya*, 4, 15-19 (2004). (<https://www.at.alleng.org/d/bio/bio092.htm>)

MPHTI: 34.25.21

Б.Т. БАЙҚАРА^{1,2*}, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.Д. ДАУЛБАЕВА¹,
С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ¹, Т.Б. САБЫРЖАН^{1,2}, S.R. FEREDOUNI³,
К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. КЫДЫРМАНОВ¹

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

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

³Научно-исследовательский институт экологии дикой природы Венского ветеринарного университета, Вена, Австрия

*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/MUTE SWAN/MANGYSTAU/9421/2022, ИЗОЛИРОВАННОГО ОТ ЗИМУЮЩИХ ПТИЦ НА ПОБЕРЕЖЬЕ КАСПИЙСКОГО МОРЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.08

Аннотация

В данной статье представлены результаты сравнительного молекулярно-генетического анализа полного генома высокопатогенного вируса гриппа А A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1). Исследование проведено на изоляте, полученном от погибшего лебедя-шипунa (*Cygnus olor*) во время вспышки инфекции среди водоплавающих птиц, зимующих на Мангистауском побережье Каспия. В результате исследования данный изолят определен как высокопатогенный штамм, относящийся к H5 клада 2.3.4.4b.

Ключевые слова: грипп птиц, секвенирование, филогенетический анализ, патогенность.

Вирус гриппа А, принадлежащий к семейству *Orthomyxoviridae* рода *Alphainfluenzavirus*, представляет собой одноцепочечные РНК-вирусы с минус нитью и сегментированным геномом [1]. Вирусы гриппа (ВГ) птиц отличаются по поверхностным белкам гемагглютинаина и нейраминидазы. Описано 19 различных подтипов гемагглютинаина (H1-H19) [2] и 11 подтипов нейраминидаз (N1-N11) [3] ВГ. Каждый подтип вируса характеризуется определенной комбинацией гемагглютинаина и нейраминидазы, которой он обладает. Геномы ВГ птиц состоят из восьми различных генных сегментов из рибонуклеиновых кислот (РНК). Вирион гриппа включает следующие белки: гемагглютинин (НА), нейраминидазу (NA), матричный (M1), белок протонного ионного канала (M2), нуклеопротеин (NP), основной белок полимеразы 1 (PB1), основной белок полимеразы 2 (PB2), кислотный белок полимеразы (РА) и неструктурные белки 1 (NS1) и 2 (NS2) [4]. В зависимости от вирулентности ВГ у домашних и диких птиц он может классифицироваться как низкопатогенный грипп птиц или высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) [5, 6]. Возбудители большинства инфекций гриппа птиц у домашних кур – штаммы низкопатогенного гриппа птиц, которые вызывают легкую форму заболевания с проявлением респираторных, кишечных или репродуктивных признаков. ВПГП, следовательно, вызывает у птиц тяжелую форму болезни и приводит к высокой смертности. ВПГП продолжает циркулировать в орнитофауне и периодически поражает домашних птиц [7].

До сегодняшнего дня вспышки ВПГП среди домашних птиц вызывались штаммами H5 или H7, которые, однако, редко выявлялись в популяциях диких птиц. Несмотря на это, в последние годы возникли высоковирулентные штаммы ВГ птиц H5N1, которые проявили способность инфицировать как домашних, так и многие виды диких птиц [8, 9], увеличивая риск рекомбинации птичьих и человеческих штаммов. Так, в 2005 г. в Восточной Азии 112 человек заразились вирусом H5N1, в результате чего 57 человек погибли. Большинство этих

случаев среди людей произошло в результате прямого контакта с инфицированной домашней птицей или птичьим пометом [10]. Осенью 2020 года во многих местах Казахстана начался падеж от птичьего гриппа диких водно-болотных птиц, мигрировавших на юг, вскоре началась гибель домашней птицы. Во время вспышек H5N8 общая потеря птицы на конец 2020 г. составила 2 млн голов [11].

Цель данного исследования: молекулярно-генетическая характеристика патогенности штамма вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1), выделенного от погибшего лебедя-шипун (*Cygnus olor*) во время вспышки инфекции среди водоплавающих птиц, зимующих на Мангистауском побережье Каспия.

Материалы и методы исследования

Сбор клинических образцов. Трахеальные и клоакальные смывы павших птиц были взяты с соблюдением сертифицированных методик, рекомендованных ВОЗ и Международным Эпизоотическим Бюро [12, 13]. Смывы брали стерильным ватным тампоном с пластиковой ручкой, помещали во флаконы с вирус транспортировочной средой, содержащей комплекс антибиотиков (пенициллин 2000 ед/мл, стрептомицин 2 мг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, нистатин 50 ед/мл) и бычий сывороточный альбумин в конечной концентрации 0,5%. Пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Изоляция вируса. Выделение вируса проводили путем инокуляции ПЦР-положительного образца в аллантоисную полость трех 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионов и последующей инкубацией при +37°C в течение 48 ч. Наличие вируса в аллантоисной жидкости проверяли микрометодом РГА с использованием 0,75% суспензии куриных эритроцитов [14]. Вирус был обнаружен при первичном заражении и было проведено клонирование с предельным разведением 10^{-1} , 10^{-3} и 10^{-5} . Для исследования вируса использовали 10^{-5} разведение с титром 1:512. Выделение РНК из смывов проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden), в соответствии с рекомендациями производителя из 140 мкл смыва.

Обратная транскрипция и мультиплекс ПЦР (ОТ-ПЦР). Скрининг образцов РНК на принадлежность к вирусам гриппа А в мультиплекс ОТ-ПЦР проводили одновременно в одношаговой реакции с набором OneTaq® One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) с праймерами к М, Н5 и N1 генам вируса гриппа А [15]. Для контроля специфичности мультиплекс ПЦР использовали выделенный и идентифицированный в лаборатории экологии вирусов НПЦ микробиологии и вирусологии вирус гриппа А/лебедь шипун/Актау/1460/06 (H5N1). При приготовлении реакционной смеси использовали праймеры к матричному гену, генам НА Н5 и NA N1.

Таблица 1 - Список праймеров для полного секвенирования генома ВГ

№ п/п	Название гена (длина)	Название праймера: 3' прямая нуклеотидная последовательность	Название праймера: 5' обратная нуклеотидная последовательность	Длина ожидаемого продукта
1	2	3	4	5
1	PB2 (2341)	PB2 F1: AGC AAA AGC AGG TCA [16]	PB2 R 1032: CTY GTT CTT TTG AAA GTG AA [16]	1032
		PB2 F781: GAG AAA TGA TGA TGT TGA CCA [16]	PB2 R 1734: GGR TCT TGT GAC CAT TGA AT [16]	953
		PB2 F 1625: TCG TCA TCA ATG ATG TGG GA [16]	R5 REV: TAA TAC GAC TCA CTA TAA GTA [16]	718
2	PB1 (2341)	Bm-PB1-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC A [16]	PB1-1262R: TTR AAC ATG CCC ATC ATC AT [17]	1262

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
		PB2-1124F: ARA TAC CNG CAG ARA TGC T [17]	Bm-PB1-2341R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT [16]	1217
3	PA (2233)	Bm-PA-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT AC [16]	PA-1498R: TNG TYC TRC AYT TGC TTA TCA T [17]	1498
		PA-747F: CAT TGA GGG CAA GCT TTC [17]	Bm-PA-2233R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT [16]	1486
4	HA (1778)	SZAHAF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GG [16]	SZAHAR: AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT [16]	1778
5	NP (1565)	SZANPF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GT [18]	E001 NP-734R: ATT TTC CCT TTG AGG ATG TTG CAC ATT C [17]	734
		E003 NP-517F: GGA ATG GAY CCC AGG ATG TGC TC [17]	SZANPR: AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT C [18]	1048
6	NA (1413)	SZANAF: AGC AAA AGC AGG AGT TTA AAA TG [18]	SZANAR: AGT AGA AAC AAG GAG TTT TTT [16]	1413
7	M (1027)	SZAMF: CTC GAG CAA AAG CAG GTA GAT [18]	SZAMR: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	1027
8	NS (890)	SZANSF: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	SZANSR: ATG AGA AAC AAG GGT GTT TTT T [18]	890

Секвенирование генома. Для амплификации всего генома гриппа А использовали 13 пар праймеров [16-18] (таблица 1). Были амплифицированы все восемь генных сегментов с 2-3 перекрывающимися продуктами ПЦР для обеспечения качества последовательности с обоих направлений. ОТ-ПЦР проводили с использованием набора для одноступенчатой ОТ-ПЦР OneTaq (NEB, США) в соответствии с протоколом производителя. Амплификация проводилась при следующих параметрах: обратная транскрипция при 48°C 45 мин, начальная - 2 мин денатурация при 95°C и амплификация в 40 циклов, включающая денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг праймеров (56°C, 20 сек) и удлинение цепи (72°C, 2 мин) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Продукты ОТ-ПЦР вырезали из геля и очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США). Секвенирование ДНК проводили на очищенных продуктах ПЦР с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 (ABI, Фостер-Сити, Калифорния) на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, Калифорния, США). Секвенирование каждого продукта ПЦР проводили с обеих сторон. Большинство последовательностей содержат уникальные пики со значениями качества выше 40. Полученные последовательности были сопоставлены с другими штаммами вируса птичьего гриппа H5 из GenBank (алгоритм Clustal W) и построены филогенетические деревья с использованием метода объединения соседей и алгоритма модели Tamura-Nei [19] с программным обеспечением MEGA 7.0 [20].

Результаты и обсуждение

Исследованы биологические образцы в виде трахеальных и клоакальных смывов, собранных от одиннадцати павших птиц: десяти лебедей-шипуну (*Cygnus olor*) и одного лебедя-кликуну (*Cygnus cygnus*), зимовавших на озере Караколь (Карагие-Каракольский государственный заказник 43°63'18"N 51°19'3"E) в Мангистауском побережье Каспия в декабре 2022 г.

В результате ПЦР-скрининга биоматериалов от павших лебедей обнаружены фрагменты М-гена вируса гриппа А в 17 пробах (8 трахеальных, 9 клоакальных). Гены HA

и NA в положительных образцах амплицировались с помощью праймеров, специфичных к подтипам H5 и N1.

Штамм вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) был изолирован из клоакальных смывов погибшего лебедя-шипунa на 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионах.

Полногеномное секвенирование и BLASTn анализы показали значительное генетическое сходство штамма вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 по всем восьми генам с высокопатогенными эпизоотическими вариантами ВГ, изолированными от домашних и диких птиц в Восточной Европе и Африке (таблица 2) [21]. Как видно из таблицы 1, донорами шести из восьми генов изучаемого штамма являлись высокопатогенные варианты вируса гриппа H5N1.

Молекула гемагглютини́на вируса A/H5N1 содержит локус патогенности. Во время посттрансляционного процессинга предшественник HA подвергается протеолитическому расщеплению на фрагменты HA1 и HA2 под действием протеаз, синтезируемых инфицированными клетками [22, 23]. Патогенность ВГ в основном определяют по сайту расщепления. Аминокислотный состав сайта расщепления HA штамма A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 состоит из последовательности KRRKR/GLF, что возможно идентичное мотиву высокопатогенных вариантов ВГ птиц, обнаруженных в европейских странах, включая Великобританию в 2016–2017 гг.

Таблица 2 - Сравнение нуклеотидных последовательностей сегментов генома штамма гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) с таковыми наиболее близкими штаммами в GenBank

Ген или сегмент	Размер (нуклеотиды)	Содержание GC (%)	Ближайший родственник	Идентичность на уровне нуклеотидов (%)	Регистрационный номер ближайшего родственника в GenBank
PB2	2,292	44.6	A/dalmatian pelican/Astrakhan/41 7-2/2021	99.02	OP597563.1
PB1	1,489	47.7	A/Anas platyrhynchos/Belgium/10402_H195386/2017 (H1N1)	97.85	MT439902.1
PA	1,194	41.8	A/pelican/Dagestan/397-1/2021(H5N5)	96.97	OP597572.1
HA	1,708	41.7	A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021(H5N1)	98.65	MW961468.1
NP	1,527	47.8	A/duck/Bangladesh/51601/2021(H5N1)	99.07	OP030703.1
NA	1,393	44.5	A/goose/Chelyabinsk/1341-3/2021(H5N1)	98.85	OP597622.1
M	960	50.3	A/ibis/Egypt/RLQP-229S/2022(H5N1)	99.17	OP491852.1
NS	861	43.9	A/mallard/Ukraine/A N-223-13-01/2020(H7N3)	98.72	MW856000.1

Для филогенетического анализа были отобраны штаммы вируса ВПП подтипа H5N1, циркулировавшие среди домашних и диких птиц в Евразии и Африке в период с 2020 по 2022 год. В филогениях ген HA вируса A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 кластеризуется с вирусами подтипа H5N1, обнаруженными среди домашних и диких птиц в России, Китае и

Индии, а также на Ближнем Востоке и в Западной Африке. Филогенетическое дерево гена НА показывает, что штамм из этого исследования, как и ранее описанные штаммы из Казахстана (номер ссылки GISAID EPI_ISL_2932614) [11] и GenBank NCBI OP740959.1 [24], принадлежит к кладу H5 2.3.4.4b вирусов ВПГП (рисунок 1).

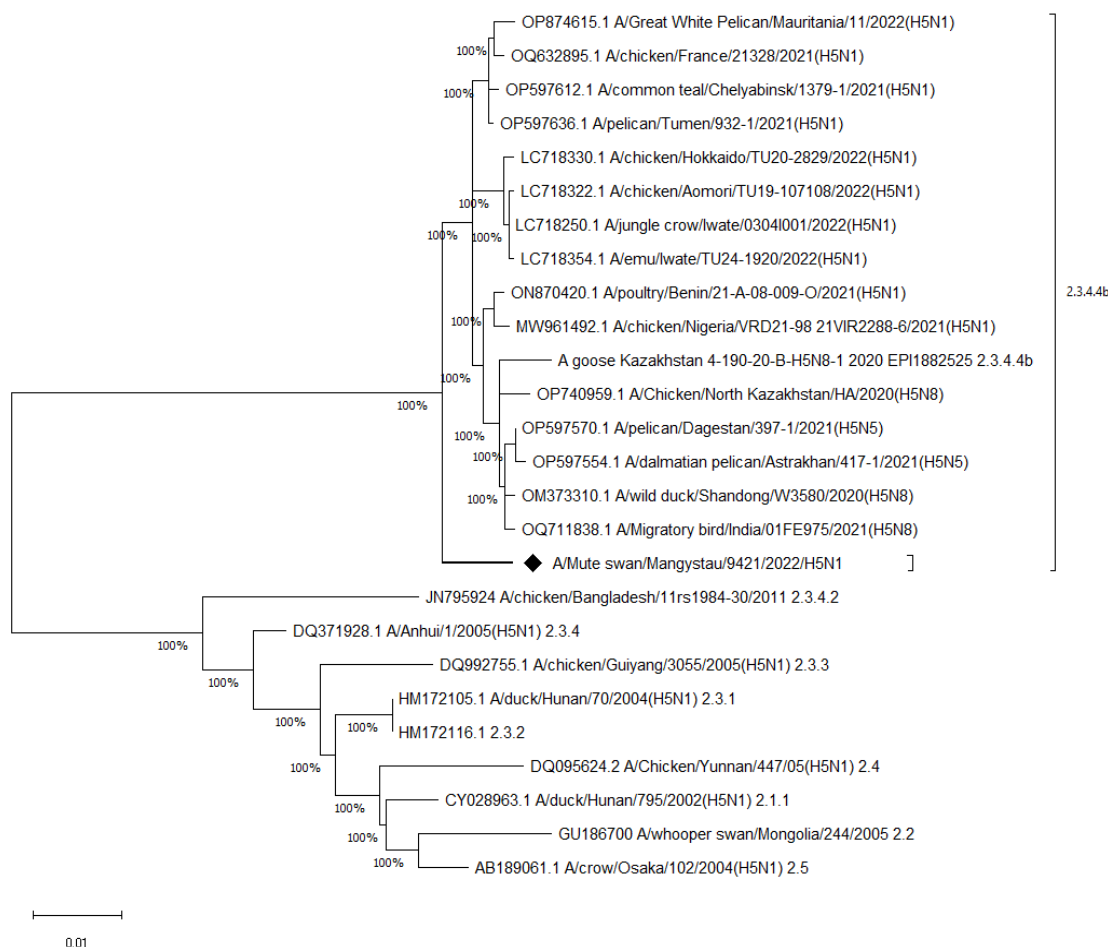


Рисунок 1 - Филогенетическая топология гена НА вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1)

С точки зрения патогенности, представляют интерес следующие гены вируса гриппа А и кодируемые ими белки: НА, М2, NS1 и PB1-F2 [25].

Способность НА распознавать клеточные рецепторы хозяина связана со структурой рецепторсвязывающего сайта [26]. В белке НА исследуемого штамма выявлена замена аминокислотного остатка в положении 156 треонина на аланин, который может приводить к повышенному связыванию с рецепторами сиаловой кислоты ($\alpha 2,6$ -SA) [27].

Вирулентность штаммов ВГ также связывают с особенностями строения белка NS. Два продукта его посттрансляционного расщепления – белки NS1 и NS2 участвуют в регуляции многочисленных аспектов жизненного цикла вируса гриппа и могут влиять на их патогенные свойства [28]. Обнаружены аминокислотные замены в белке NS1 исследуемого штамма A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 – замена Pro на Ser в положении 42 и Val - на Ala в положении 149 в белке NS1, связаны с вирулентностью и патогенностью у мышей. Также было обнаружено, что мутация NS1, такая как Pro42Ser, модулирует вирулентность вирусов H5N1 [29].

Изолят A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 содержал замену Ala на Lys в 184 положении белка NP, который увеличивает репликацию и патогенность H5N1 [30]. Выявление в белке NP аминокислотного остатка как лейцин в 136 положении, изолейцина

в 109 положении и валина в 33 положении указывает на вирусы, схожие с изолированными от птиц, тогда как обнаружение метионина, валина и изолейцина в этих же положениях указывает на вирусы, подобные выделенным от человека [31]. У исследуемого изолята обнаружены Leu136, Ile109 и Val33, то есть аминокислотные остатки подобные птичьим.

Филогенетический анализ белка NA исследуемого вируса A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 показал ближее родство с вирусами, выявленными в Бангладеш и Японии (рисунок 2).

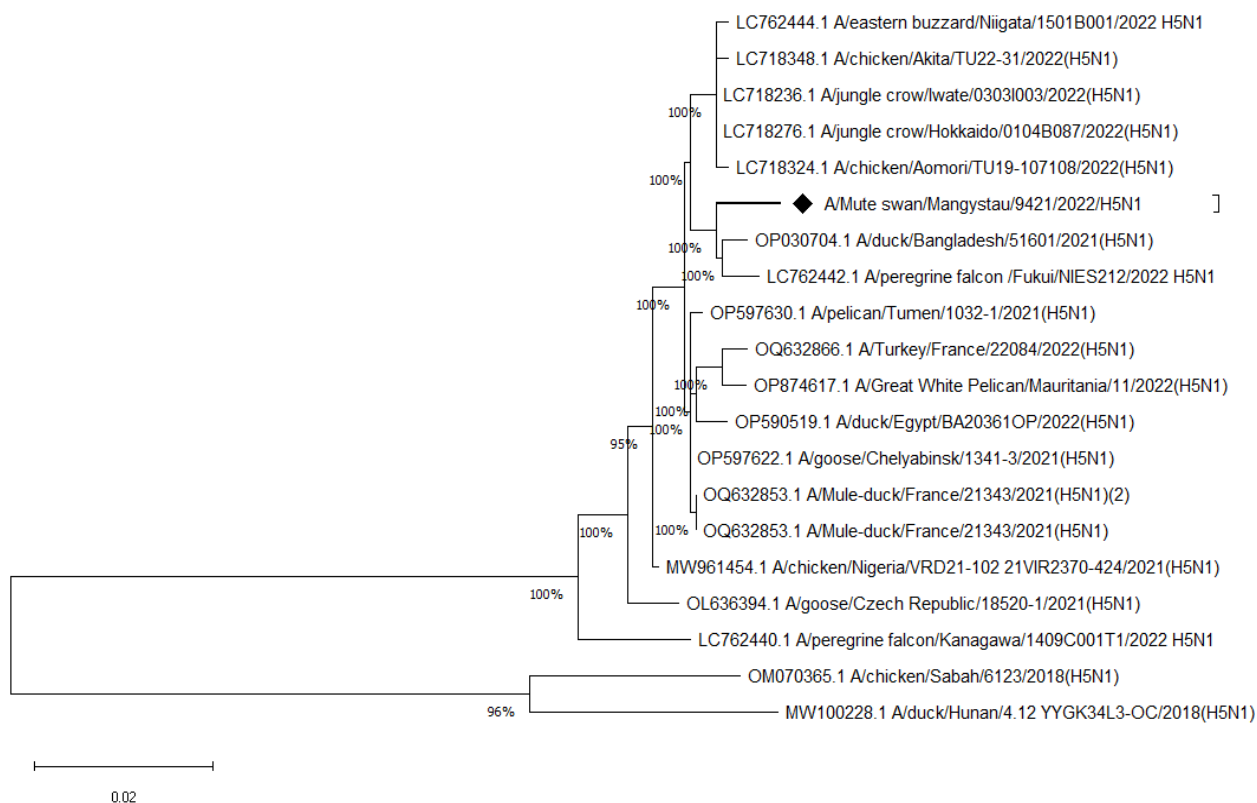


Рисунок 2 - Филогенетическое дерево гена NA A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) и других вирусов, циркулирующих по всему миру

Аминокислотная замена Lys389Arg в белке PB2 повышает полимеразную активность ВГ в клетках млекопитающих [32, 33] и эта замена была выявлена в результате секвенирования генома исследуемого штамма H5N1.

Аминокислотные замены Leu89Val, Gly309Asp, Thr339Lys, Arg477Gly, Ile495Val и Lys627Glu были отмечены в изоляте A/Mute swan/Mangystau/9421/2022. Было описано, что эти замены в полимеразном белке PB2 в сочетании с изменениями в полипептидах M1 и NA повышают активность и вирулентность полимеразы у мышей [34].

Выявлены уникальные замены аминокислотных остатков в нескольких белках: NA – Asn3Lys и Ala511Ser; NA – Glu287Gly, Gln308His, Val394Ile, Ala395Glu и Ser442Ile; M2 – Gln164Leu; NS1 – Ala76Thr, Ile81Asp и Val85Pro.

Заключение

Проведенные исследования показали, что изолят A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) относится к ВПГП H5 клада 2.3.4.4b. Определены полные нуклеотидные последовательности всех восьми сегментов генома данного штамма. Анализ нуклеотидной последовательности гена NA и NA вируса гриппа H5N1 показал идентичность 98,65% A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021 (H5N1) и 98,85% A/goose/Chelyabinsk/1341-

3/2021(H5N1), соответственно. Выявлены значимые изменения в геноме вируса, такие как аминокислотные замены в белке HA Thr156Ala (приводящие к повышенному связыванию вируса с рецепторами клеток-хозяина), NS Pro42Ser и Val149Ala (модулирующий вирулентность и патогенность вирусов H5N1), NP Ala184Lys (увеличивающий репликацию вируса H5N1), которые обусловлены патогенностью данного штамма. В геноме вируса A/H5N1 выявлен ряд молекулярных маркеров, свидетельствующих о высокой патогенности штамма для птиц отряда куриных и млекопитающих и не обнаружены мутации, облегчающие инфицирование людей.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта AP0925899 "Молекулярная эволюция и экология вирусов гриппа А, циркулирующих среди диких птиц в Казахстане и выявление нового подтипа" выполняемого в рамках Договора на грантовое финансирование по научным и (или) научно-техническим проектам на 2021-2023 годы (Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан).

Литература:

- 1 Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*, 2018; 46: D708-D717. (doi: 10.1093/nar/gkx932)
- 2 Fereidouni S., Starick E., Karamendin K., Di Genova C., D. Scott S., Khan Y., Harder T. and Kydyrmanov A. Genetic characterization of a new candidate hemagglutinin subtype (H19) of influenza A viruses. *Emerging Microbes & Infections*, 2023; (doi: 10.1080/22221751.2023.2225645).
- 3 Wu Ying, Wu Yan, Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 2014; 22(4): 183–191. (doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010.52)
- 4 AbuBakar U., Amrani L., Kamarulzaman F.A., Karsani S.A., Hassandarvish P., Khairat J.E. Avian Influenza Virus Tropism in Humans. *Viruses*, 2023; 15, 833. (doi: 10.3390/v15040833)
- 5 Donis R. O. and G. J. Smith. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2014; 9 (5): 271-6. (doi: 10.1111/irv.12324)
- 6 Zhou X., Gao L., Wang Y., Li Y., Zhang Y., Shen C., Liu A., Yu Q., Zhang W., Pekin A., Guo F., Smith C., Clements A.C.A., Edwards J., Huang B., Soares Magalhães R.J. Geographical variation in the risk of H7N9 human infections in China: implications for risk-based surveillance. *Sci Rep.*, 2020; 10(1): 10372. (doi: 10.1038/s41598-020-66359-1)
- 7 Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., Karibayev T., Al Kafagi T., Chvala I., Byrne A., Meruyert A., King J., Harder T., Grund C., Essen S., Reid S.M., Brouwer A., Zinyakov N.G., Tegzhanov A., Irza V., Pohlmann A., Beer M., Fouchier R.A.M., Akhmetzhan A.S, Brown I.H. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg Microbes Infect*, 2021; 10: 148–151. (doi: 10.1080/22221751)
- 8 Cha R.M., Lee Y-N., Park M-J., Baek Y-G., Shin J-I., Jung C.H., Sagong M., Heo G-B., Kang Y-M., Lee K-N., et al. Genetic Characterization and Pathogenesis of H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus Isolated in South Korea during 2021–2022. *Viruses*, 2023; 15(6):1403. (doi: 10.3390/v15061403)
- 9 Байкара Б.Т., Садуакасова М.А., Карабасова А.С., Жусупбеков Ж.С., Султанов А.А. Эпизоотологический мониторинг гриппа домашней птицы. Вестник КазНУ. Серия биологическая, 2021; 3(88): 79-86. (doi: 10.26577/eb.2021.v88.i3.08)
- 10 World Health Organization. Communicable disease surveillance and response (CSR): Avian influenza. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/. Accessed 19 August 2005.
- 11 Amirgazin A., Shevtsov A., Karibayev T., Berdikulov M., Kozhakhmetova T., Syzdykova L., Ramankulov Y., Shustov A.V. Highly pathogenic avian influenza virus of the A/H5N8 subtype, clade 2.3.4.4b, caused outbreaks in Kazakhstan in 2020. *PeerJ*, 2022; 10: e13038. (doi: 10.7717/peerj.13038)
- 12 WHO/CDS/CSR/NCS/ Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Geneva, 2002.–P. 15-18.
- 13 Office International des Epizooties (OIE), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.– Paris, 2000

- 14 Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints // *J. Amer. Hyg.*, 1938; 2: 493-497. (doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408)
- 15 Kydyrmanov A., Sayatov M., Karamendin K., Zhumatov K., Asanova S., Daulbayeva K., Starick E., Fereidouni S. Monitoring of influenza A viruses in wild bird populations in Kazakhstan in 2002-2009. *Arch Virol.*, 2017; Jan;162(1):147-155. (doi: 10.1007/s00705-016-3076-4)
- 16 Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 2001; 146: 2275–2289. (doi: 10.1007/s007050170002)
- 17 Li O.T.W., Barr I., Leung C.Y.H., Chen H., Guan Y., et al. Reliable universal RT-PCR assays for studying influenza polymerase subunit gene sequences from all 16 hemagglutinin subtypes. *J Virol Methods*, 2007; 142: 218-222. (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.01.015.)
- 18 Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006; 311: 1576 – 1580. (doi: 10.1126/science.1121586.)
- 19 Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993; 10: 512–526. (doi: 10.1093/oxfordjournals .molbev.a040023)
- 20 Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016; 33: 1870–1874. (doi: 10.1093/molbev/msw054)
- 21 Brookes S.M., Mansfield K.L., Reid S.M., Coward V., Warren C., Seekings J., Brough T., Gray D., Núñez A., Brown I.H. Incursion of H5N8 high pathogenicity avian influenza virus (HPAIV) into gamebirds in England. *Epidemiol Infect*, 2022; 150: e51. (doi:10.1017/S0950268821002740)
- 22 Luczo J.M., Stambas J., Durr P.A., Michalski W.P., Bingham J. Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: the role of the haemagglutinin cleavage site motif. *Rev Med Virol*, 2015; 25(6): 406–430. (doi: 10.1002/rmv.1846)
- 23 Russell C.J. Hemagglutinin Stability and Its Impact on Influenza A Virus Infectivity, Pathogenicity, and Transmissibility in Avians, Mice, Swine, Seals, Ferrets, and Humans. *Viruses*, 2021; 13, 746. (doi: 10.3390/v13050746)
- 24 Baikara B., Seidallina A., Baimakhanova B., Kasymbekov Y., Sabyrzhan T., Daulbaeva K., Nuralibekov S., Khan Y., Karamendin K., Sultanov A., Kydyrmanov A. Genome Sequence of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020(H5N8). *Microbiology Resource Announcements*, 2023; 12: 6 (doi: 10.1128/mra.01151-22)
- 25 Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol.*, 1999; 73(2): 1146-55. (doi: 10.1128/JVI.73.2.1146-1155.1999.)
- 26 Weis, W., Brown, J., Cusack, S. *et al.* Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988; **333**: 426–431. (doi: 10.1038/333426a0)
- 27 Linster M., van Boheemen S., de Graaf M., Schrauwen E.J.A., Lexmond P., Mänz B., Bestebroer T.M., Baumann J., van Riel D., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E., Matrosovich M., Fouchier R.A.M., Herfst S. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*, 2014; 10; 157(2): 329-339. (doi: 10.1016/j.cell.2014.02.040)
- 28 Li Z., Jiang Y., Jiao P., Wang A., Zhao F., Tian G., Wang X., Yu K., Bu Z., Chen H. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*, 2006; 80: 11115–11123 (doi: 10.1128/JVI.00993-06)
- 29 Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R., Lamb R.A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci*, 2008; 105(11): 4381–4386. (doi: 10.1073/pnas.0800482105.)
- 30 Wasilenko J. L., Sarmiento L., Pantin-Jackwood M. J. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Arch Virol*, 2009; 154, 969–979 (doi: 10.1007/s00705-009-0399-4)
- 31 Chen G. W., Chang S. C., Mok C. K., Lo Y. L., Kung Y. N., Huang J. H., Shih Y. H., Wang J. Y., Chiang C. et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12, 1353–1360 (doi: 10.3201/eid1209.060276)
- 32 Yamayoshi S., Yamada S., Fukuyama S., et al. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J Virol*, 2014; 88: 3127–3134. (doi: 10.1128/JVI.03155-13.)
- 33 Yamayoshi S., Kiso M., Yasuhara A., et al. Enhanced replication of highly pathogenic influenza A(H7N9) virus in humans. *Emerg Infect Dis*, 2018; 24: 746–750. (doi: 10.3201/eid2404.171509.)

34 Alkie T.N., Cox S., Embury-Hyatt C., Stevens B., Pople N., Pybus M.J., Xu W., Hisanaga T., Suderman M., Koziuk J., Kruczkiewicz P., Nguyen H.H., Fisher M., Lung O., Erdelyan C.N.G, Hochman O., Ojic D., Yason C., Bravo-Araya M., Bourque L., Bollinger T.K., Soos C., Giacinti J., Provencher J., Ogilvie S., Clark A., MacPhee R., Parsons G.J., Eaglesome H., Gilbert S., Saboraki K., Davis R., Jerao A., Ginn M., Jones M.E.B., Berhane Y. Characterization of neurotropic HPAI H5N1 viruses with novel genome constellations and mammalian adaptive mutations in free-living mesocarnivores in Canada. *Emerg Microbes Infect*, 2023; 12(1): 2186608. (doi: 10.1080/22221751.2023.2186608.)

Б.Т. БАЙҚАРА^{1,2*}, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.Д. ДАУЛБАЕВА¹,
С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ¹, Т.Б. САБЫРЖАН^{1,2}, S.R. FERREIDOUNI³,
К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹

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

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

³Вена ветеринарлық университетінің Жабайы табиғат экологиясы ғылыми-зерттеу институты, Вена, Австрия

*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

КАСПИЙ ТЕҢІЗІ ЖАҒАЛАУЫНДА ҚЫСТАЙТЫН ҚҰСТАРДАН БӨЛІНГЕН ЗАРДАПТЫЛЫҒЫ ЖОҒАРЫ ҚҰС ТҰМАУЫ ВИРУСЫ А/MUTE SWAN/MANGYSTAU/9421/2022 ШТАМЫНЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Түйін

Осы мақалада зардаптылығы жоғары А/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) құс тұмауы вирусының толық геномына салыстырмалы молекулалы-генетикалық талдау нәтижелері көрсетілген. Каспий теңізінің Маңғыстау жағалауында қыстайтын, су құстары арасында ауру өршіген уақытта сыбырлақ аққудан (*Cygnus olor*) алынған изолят зерттелді. Зерттеу нәтижесінде осы изолят H5 2.3.4.4b кладына жататын, зардаптылығы жоғары штамм екені анықталды.

Кілтті сөздер: құс тұмауы, тізбектеу, филогенетикалық талдау, зардаптылық.

IRSTI: 34.25.21

Б.Т. БАЙҚАРА^{1,2*}, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.Д. ДАУЛБАЕВА¹,
S.Sh. NURALIBEKOV¹, Т.Б. САБЫРЖАН^{1,2}, S.R. FERREIDOUNI³, К.О. КАРАМЕНДИН¹,
А.И. КЫДЫРМАНОВ¹

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

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

³Research Institute of Wildlife Ecology, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria

*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF A HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA STRAIN A/MUTE SWAN/MANGYSTAU/9421/2022 ISOLATED FROM BIRDS WINTERING ON THE COAST OF THE CASPIAN SEA

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.08

Abstract

This article presents the results of a comparative molecular genetic analysis of the entire genome of the highly pathogenic influenza A virus A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1). The study was carried out on an isolate obtained from a dead mute swan (*Cygnus olor*) during an outbreak of infection among waterfowl wintering on the Mangistau coast of the Caspian Sea. As

a result of the study, this isolate was identified as a highly pathogenic strain belonging to the H5 clade 2.3.4.4b.

Keywords: avian influenza, sequencing, phylogenetic analysis, pathogenicity.

Influenza A virus, belonging to the *Orthomyxoviridae* family of the *Alphainfluenzavirus* genus, is a single-stranded negative sense RNA virus with a segmented genome [1]. Influenza A virus (AIV) are subtyped on the base of surface glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase. Nineteen different hemagglutinin subtypes (H1-H19) [2] and 11 subtypes of neuraminidase (N1-N11) [3] have been described. Each virus subtype is characterized by a specific combination of hemagglutinin and neuraminidase that it possesses. Influenza A virus genome is composed of eight distinct ribonucleic acid (RNA) segments. Influenza virion includes the following proteins: hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matrix (M1), proton ion channel protein (M2), nucleoprotein (NP), polymerase basic protein 1 (PB1), polymerase basic protein 2 (PB2), polymerase acid protein (PA) and non-structural proteins 1 (NS1) and 2 (NS2) [4]. Depending on the virulence of AI in domestic and wild birds, it can be classified as low pathogenic avian influenza or highly pathogenic avian influenza (HPAI) [5, 6]. The causative agents of most avian influenza infections in domestic chickens are low pathogenic avian influenza strains that cause a mild form of the disease along with respiratory, intestinal, or reproductive signs. HPAI cause severe disease in birds and lead to high mortality. HPAI continue to circulate in the avifauna and occasionally affect domestic fowls [7].

Until now, outbreaks of HPAI in poultry have been caused by H5 or H7 strains, which, however, have rarely been detected in wild bird populations. Despite this, in recent years, highly virulent AI H5N1 strains have emerged, which have shown the ability to infect both domestic and many wild bird species [8, 9] and the risk for reassortment of avian and human strains increases. As in 2005 H5N1 viruses have infected 112 human cases in East Asia resulting in 57 deaths. Most of these human cases resulted from direct contact with infected poultry or poultry droppings [10]. During autumn 2020, in many places in Kazakhstan die-offs started by avian influenza in wild wetland birds which had been migrating southwards, soon, death began in poultry. During the H5N8 outbreaks the total loss of poultry was 2 million at the end of 2020 [11].

The aim of this study: molecular genetic characterization of the pathogenicity of the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) influenza virus strain isolated from a dead mute swan (*Cygnus olor*) during an outbreak of infection among waterfowl wintering on the Mangystau coast of the Caspian Sea.

Materials and methods of research

Collection of clinical specimens. Tracheal and cloacal swabs of dead birds were taken in compliance with certified methods recommended by WHO and the International Epizootic Bureau [12, 13]. The swabs were taken with a sterile cotton swab with a plastic handle, placed in vials with a virus transport medium containing a complex of antibiotics (penicillin 2000 U/ml, streptomycin 2 mg/ml, gentamicin 50 µg/ml, nystatin 50 U/ml) and bovine serum albumin in final concentration 0.5%. Samples were stored in liquid nitrogen (-196°C) prior to testing.

Virus isolation. Virus isolation was carried out by inoculation of a PCR-positive sample into the allantoic cavity of three 10-11-day-old chicken embryos and subsequent incubation at +37°C for 48 hours [14]. The virus was detected during the initial infection and cloning was carried out with the limiting dilution of 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5} . To study the virus, a 10^{-5} dilution with a titer of 1:512 was used. Isolation of RNA from swabs was performed using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden), according to the manufacturer's recommendations from 140 µl of swab.

Reverse transcription and multiplex PCR (RT-PCR). Screening of RNA samples for belonging to influenza A virus in the RT-PCR multiplex was carried out simultaneously in a one-step reaction with the OneTaq® One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) with primers for the M, H5 and N1 genes of the influenza virus A [15]. To control the specificity of the

PCR multiplex, we used the influenza virus A/mute swan/Aktau/1460/06 (H5N1) isolated and identified in the Laboratory of Virus Ecology at the Research and Production Center for Microbiology and Virology. When preparing the reaction mixture, primers for the M gene, genes for hemagglutinin H5 and NA N1 were used.

Table 1 - List of primers for whole AIV genome sequencing

№	Gene name (length)	Primer name: 3' forward nucleotide sequence	Primer name: 5' reverse nucleotide sequence	Expected product length
1	PB2 (2341)	PB2 F1: AGC AAA AGC AGG TCA [16]	PB2 R 1032: CTY GTT CTT TTG AAA GTG AA [16]	1032
		PB2 F781: GAG AAA TGA TGA TGT TGA CCA [16]	PB2 R 1734: GGR TCT TGT GAC CAT TGA AT [16]	953
		PB2 F 1625: TCG TCA TCA ATG ATG TGG GA [16]	R5 REV: TAA TAC GAC TCA CTA TAA GTA [16]	718
2	PB1 (2341)	Bm-PB1-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC A [16]	PB1-1262R: TTR AAC ATG CCC ATC ATC AT [17]	1262
		PB2-1124F: ARA TAC CNG CAG ARA TGC T [17]	Bm-PB1-2341R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT [16]	1217
3	PA (2233)	Bm-PA-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT AC [16]	PA-1498R: TNG TYC TRC AYT TGC TTA TCA T [17]	1498
		PA-747F: CAT TGA GGG CAA GCT TTC [17]	Bm-PA-2233R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT [16]	1486
4	HA (1778)	SZAHAF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GG [16]	SZAHAR: AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT [16]	1778
5	NP (1565)	SZANPF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GT [18]	E001 NP-734R: ATT TTC CCT TTG AGG ATG TTG CAC ATT C [17]	734
		E003 NP-517F: GGA ATG GAY CCC AGG ATG TGC TC [17]	SZANPR: AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT C [18]	1048
6	NA (1413)	SZANAF: AGC AAA AGC AGG AGT TTA AAA TG [18]	SZANAR: AGT AGA AAC AAG GAG TTT TTT [16]	1413
7	M (1027)	SZAMF: CTC GAG CAA AAG CAG GTA GAT [18]	SZAMR: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	1027
8	NS (890)	SZANSF: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	SZANSR: ATG AGA AAC AAG GGT GTT TTT T [18]	890

Genome sequencing. For amplification of the entire influenza A genome, 13 pairs of primers were used [16-18] (table 1). All eight gene segments were amplified with 2-3 overlapping PCR products to ensure sequence quality from both directions. RT-PCR was performed using the OneTaq One-Step RT-PCR Kit (NEB, USA) according to the manufacturer's protocol. Amplification was carried out under the following parameters: reverse transcription at 48°C for 45 min, initial 2 min denaturation at 95°C and amplification for 40 cycles, including denaturation (94°C, 30 sec), primer annealing (56°C, 20 sec) and chain elongation (72°C, 2 min) followed by final elongation at 72°C, 10 min. PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels. RT-PCR products were excised from the gel and purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA). DNA sequencing was performed on purified PCR products using the BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (ABI, Foster City, CA) on an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA). Sequencing of each PCR product was performed on both sides. Most of the sequences contain unique peaks with quality values above 40. The obtained sequences were matched with other strains of the H5 avian influenza virus

from GenBank (Clustal W algorithm) and phylogenetic trees were built using the neighbor joining method and the Tamura-Nei model algorithm [19] with software MEGA 7.0 [20].

Results and discussion

Biological samples in the form of tracheal and cloacal swabs collected eleven dead birds: ten mute swan (*Cygnus olor*) and one whooper swan (*Cygnus cygnus*) wintering on Lake Karakol (Karagye-Karakol State Reserve 43°63'18"N 51°19'3"E) in the Mangistau coast of the Caspian Sea in December 2022.

PCR screening of biomaterials from swan carcasses detected fragments of M-gene of influenza A virus in 17 samples (8 tracheal, 9 cloacal). The HA and NA genes in the positive samples were amplified using primers specific for the H5 and N1 subtypes.

The influenza A virus strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) was isolated from the cloacal swabs of a dead mute swan on 10-11 day-old chicken embryos.

Whole genome sequencing and BLASTn analyzes showed significant genetic similarity of the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 influenza virus strain for all eight genes with highly pathogenic epizootic influenza virus variants isolated from domestic and wild birds in the Eastern Europe and Africa (table 2) [21]. As can be seen from Table 1, the donors of six of the eight genes of the studied strain were highly pathogenic variants of the H5N1 influenza virus.

The A/H5N1 virus HA molecule contains the pathogenicity locus. During post-translational processing, the hemagglutinin precursor undergoes proteolytic cleavage into HA1 and HA2 fragments under the action of proteases synthesized by infected cells [22, 23]. The pathogenicity of AIV is mainly determined by the cleavage site. The amino acid composition of the HA cleavage site of strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 consists of the KRRKR/GLF sequence, which is possibly identical to the motif of HPAI virus variants found in European countries, including the UK in 2016–2017.

Table 2 - Comparison of the nucleotide sequences of the genome segments of the influenza strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) with those of the closest strains in GenBank

Gene or segment	Size (nucleotides)	GC content (%)	Closest relative	Identity at nucleotide level (%)	GenBank accession no. for closest relative
PB2	2,292	44.6	A/dalmatian pelican/Astrakhan/417-2/2021	99.02	OP597563.1
PB1	1,489	47.7	A/Anas platyrhynchos/Belgium/10402_H195386/2017 (H1N1)	97.85	MT439902.1
PA	1,194	41.8	A/pelican/Dagestan/397-1/2021(H5N5)	96.97	OP597572.1
HA	1,708	41.7	A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021(H5N1)	98.65	MW961468.1
NP	1,527	47.8	A/duck/Bangladesh/51601/2021(H5N1)	99.07	OP030703.1
NA	1,393	44.5	A/goose/Chelyabinsk/1341-3/2021(H5N1)	98.85	OP597622.1
M	960	50.3	A/ibis/Egypt/RLQP-229S/2022(H5N1)	99.17	OP491852.1
NS	861	43.9	A/mallard/Ukraine/AN-223-13-01/2020(H7N3)	98.72	MW856000.1

For phylogenetic analysis, HPAI virus strains of the H5N1 subtype were selected that circulated among domestic and wild birds in Eurasia and Africa in the period from 2020 to 2022.

In phylogenies, the HA gene of the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 virus clustered with viruses of the H5N1 subtype found in poultry and wild birds in Russia, China, and India, as well as in the Middle East and West Africa. The phylogenetic tree of the HA gene shows that the strain from this study, like the previously described strains from Kazakhstan (reference number GISAID EPI ISL 2932614) [11] and GenBank NCBI OP740959.1 [24], belongs to the H5 clade 2.3.4.4b of HPAI viruses (Fig. 1).

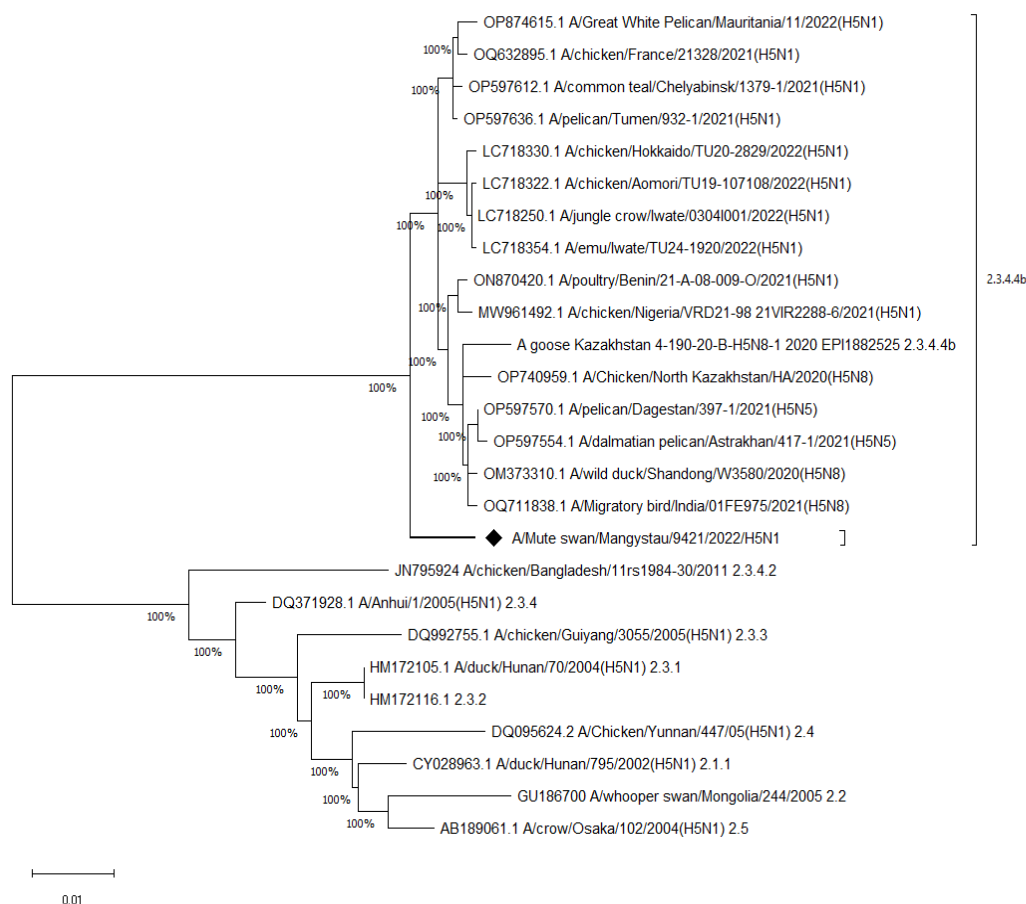


Figure 1 - Phylogenetic topology of the HA gene of influenza virus A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1)

From the point of view of pathogenicity, the following influenza A virus genes and the proteins encoded by them are of interest: HA, M2, NS1, and PB1-F2 [25].

The ability of HA to recognize host cell receptors is related to the structure of the receptor-binding site [26]. In the HA protein of the studied strain, a replacement of the amino acid residue at position 156 of Thr with Ala was revealed, which might lead to increased binding to sialic acid receptors ($\alpha 2,6$ -SA) [27].

The virulence of strains of influenza viruses is also associated with structural features of the NS protein. Two products of its post-translational cleavage, NS1 and NS2 proteins, are involved in the regulation of numerous aspects of the influenza virus life cycle and may affect their pathogenic properties [28]. Amino acid substitutions were found in the NS1 protein of the studied strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 - the substitution of Pro for Ser at position 42 and Val for Ala at position 149 in the NS1 protein are associated with virulence and pathogenicity in mice. An NS1 mutation such as Pro42Ser has also been found to modulate the virulence of H5N1 viruses [29].

The A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 isolate contained a substitution of Ala for Lys at position 184 of the NP protein, which increases the replication and pathogenicity of H5N1 [30].

The detection of amino acid residues in the NP protein as Leu at position 136, isoleucine at position 109, and Val at position 33 indicate avian-like viruses, while the detection of Met, Val, and Ile at the same positions indicate human-like viruses [31]. The studied isolate contained Leu136, Ile109 and Val33, i.e. amino acid residues similar to those of birds.

Phylogenetic analysis of the NA protein of the studied strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 displayed a close relationship with the viruses identified in Bangladesh and Japan (Figure 2).

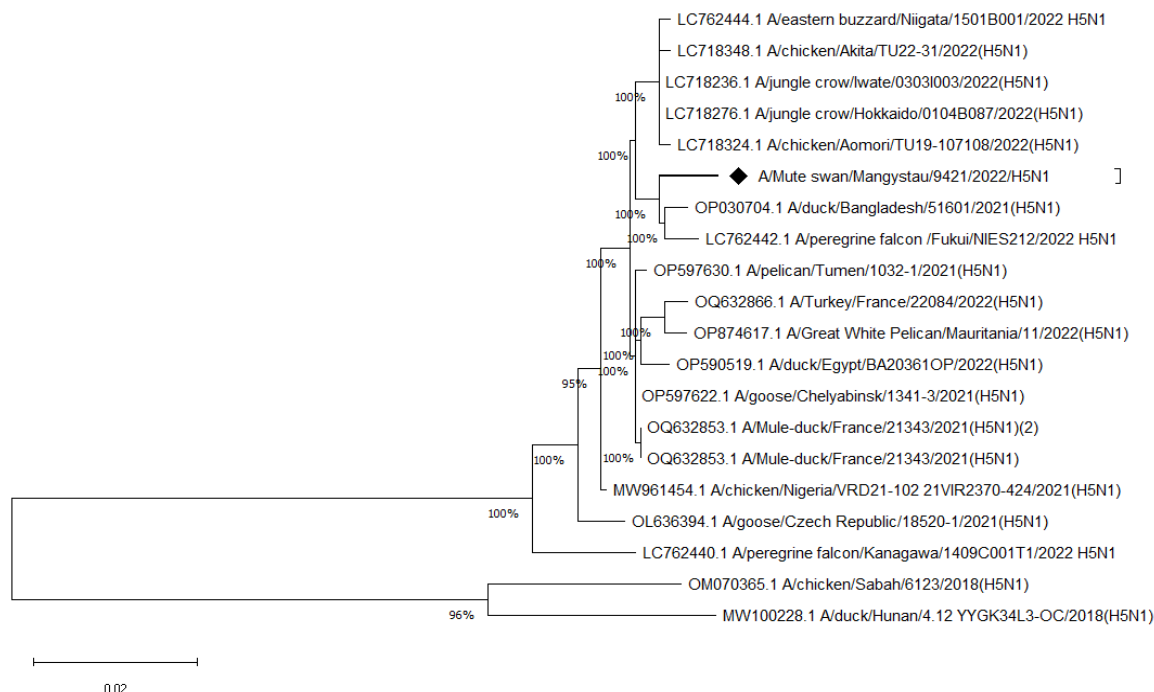


Figure 2 - Phylogenetic tree of the NA gene of A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) and other viruses circulating around the world.

The amino acid substitution Lys389Arg in the PB2 protein increases the polymerase activity in mammalian cells [32, 33], and this substitution was revealed as a result of genome sequencing of the studied H5N1 strain.

Amino acid substitutions for Leu89Val, Gly309Asp, Thr339Lys, Arg477Gly, Ile495Val, and Lys627Glu were noted in the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 isolate. These substitutions in PB2, combined with changes in M1 and HA proteins, have been described to increase polymerase activity and virulence in mice [34].

Unique substitutions of amino acid residues in several proteins have been identified: HA - Asn3Lys and Ala511Ser; NA, Glu287Gly, Gln308His, Val394Ile, Ala395Glu, and Ser442Ile; M2 - Gln164Leu; NS1 - Ala76Thr, Ile81Asp and Val85Pro.

Conclusion

The studies demonstrated that the isolate, A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) belongs to HPAI H5 clade 2.3.4.4b. The complete nucleotide sequences of all eight segments of the genome of this strain were determined. Analysis of the nucleotide sequence of the HA and NA gene of the H5N1 influenza virus showed the identity of 98.65% A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021(H5N1) and 98.85% A/goose/Chelyabinsk/1341-3/2021(H5N1) respectively. Significant changes in the virus genome have been identified, such as amino acid substitutions in the HA Thr156Ala protein (resulting in increased virus binding to host cell receptors), NS Pro42Ser and Val149Ala (modulating the virulence and pathogenicity of H5N1 viruses), NP Ala184Lys (increasing H5N1 virus replication), which are due to the pathogenicity of this strain. A number of molecular markers have been identified in the A/H5N1 virus genome,

indicating a high pathogenicity of the strain for birds of the order chickens and mammals, and no mutations facilitating human infection have been detected.

Funding

The work was carried out within the framework of the project AP0925899 "Molecular evolution and ecology of influenza A viruses circulating among wild birds in Kazakhstan and revealing of a novel subtype" carried out under the Grant Funding Agreement for scientific and (or) scientific and technical projects for 2021-2023 (Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan).

References:

- 1 Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*, 2018; 46: D708-D717. (doi: 10.1093/nar/gkx932)
- 2 Fereidouni S., Starick E., Karamendin K., Di Genova C., D. Scott S., Khan Y., Harder T. and Kydyrmanov A. Genetic characterization of a new candidate hemagglutinin subtype (H19) of influenza A viruses. *Emerging Microbes & Infections*, 2023; (doi: 10.1080/22221751.2023.2225645).
- 3 Wu Ying, Wu Yan, Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 2014; 22(4): 183–191. (doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010.52)
- 4 AbuBakar U., Amrani L., Kamarulzaman F.A., Karsani S.A., Hassandarvish P., Khairat J.E. Avian Influenza Virus Tropism in Humans. *Viruses*, 2023; 15, 833. (doi: 10.3390/v15040833)
- 5 Donis R. O. and G. J. Smith. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2014; 9 (5): 271-6. (doi: 10.1111/irv.12324)
- 6 Zhou X., Gao L., Wang Y., Li Y., Zhang Y., Shen C., Liu A., Yu Q., Zhang W., Pekin A., Guo F., Smith C., Clements A.C.A., Edwards J., Huang B., Soares Magalhães R.J. Geographical variation in the risk of H7N9 human infections in China: implications for risk-based surveillance. *Sci Rep.*, 2020; 10(1): 10372. (doi: 10.1038/s41598-020-66359-1)
- 7 Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., Karibayev T., Al Kafagi T., Chvala I., Byrne A., Meruyert A., King J., Harder T., Grund C., Essen S., Reid S.M., Brouwer A., Zinyakov N.G., Tegzhanov A., Irza V., Pohlmann A., Beer M., Fouchier R.A.M., Akhmetzhan A.S, Brown I.H. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg Microbes Infect*, 2021; 10: 148–151. (doi: 10.1080/22221751)
- 8 Cha R.M., Lee Y-N., Park M-J., Baek Y-G., Shin J-I., Jung C.H., Sagong M., Heo G-B., Kang Y-M., Lee K-N., et al. Genetic Characterization and Pathogenesis of H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus Isolated in South Korea during 2021–2022. *Viruses*, 2023; 15(6):1403. (doi: 10.3390/v15061403)
- 9 Baikara B.T., Saduakassova M.A., Karabasova A.S., Zhusupbekov Zh.S., Sultanov A.A. Epizootologicheskij monitoring grippa domashnej pticy. *Vestnik KazNU. Seriya biologicheskaya*, 2021; 3(88): 79-86. (doi: 10.26577/eb.2021.v88.i3.08)
- 10 World Health Organization. Communicable disease surveillance and response (CSR): Avian influenza. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/. Accessed 19 August 2005.
- 11 Amirgazin A., Shevtsov A., Karibayev T., Berdikulov M., Kozhakhmetova T., Syzdykova L., Ramankulov Y., Shustov A.V. Highly pathogenic avian influenza virus of the A/H5N8 subtype, clade 2.3.4.4b, caused outbreaks in Kazakhstan in 2020. *PeerJ*, 2022; 10: e13038. (doi: 10.7717/peerj.13038)
- 12 WHO/CDS/CSR/NCS/ Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Geneva, 2002.–P. 15-18.
- 13 Office International des Epizooties (OIE), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.– Paris, 2000
- 14 Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints // *J. Amer. Hyg.*, 1938; 2: 493-497. (doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408)
- 15 Kydyrmanov A., Sayatov M., Karamendin K., Zhumatov K., Asanova S., Daulbayeva K., Starick E., Fereidouni S. Monitoring of influenza A viruses in wild bird populations in Kazakhstan in 2002-2009. *Arch Virol.*, 2017; Jan;162(1):147-155. (doi: 10.1007/s00705-016-3076-4)
- 16 Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.*, 2001; 146: 2275–2289. (doi: 10.1007/s007050170002)

- 17 Li O.T.W., Barr I., Leung C.Y.H., Chen H., Guan Y., et al. Reliable universal RT-PCR assays for studying influenza polymerase subunit gene sequences from all 16 hemagglutinin subtypes. *J Virol Methods*, 2007; 142: 218-222. (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.01.015.)
- 18 Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006; 311: 1576 – 1580. (doi: 10.1126/science.1121586.)
- 19 Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993; 10: 512–526. (doi: 10.1093/oxfordjournals .molbev.a040023)
- 20 Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016; 33: 1870–1874. (doi: 10.1093/molbev/msw054)
- 21 Brookes S.M., Mansfield K.L., Reid S.M., Coward V., Warren C., Seekings J., Brough T., Gray D., Núñez A., Brown I.H. Incursion of H5N8 high pathogenicity avian influenza virus (HPAIV) into gamebirds in England. *Epidemiol Infect*, 2022; 150: e51. (doi:10.1017/S0950268821002740)
- 22 Luczo J.M., Stambas J., Durr P.A., Michalski W.P., Bingham J. Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: the role of the haemagglutinin cleavage site motif. *Rev Med Virol*, 2015; 25(6): 406–430. (doi: 10.1002/rmv.1846)
- 23 Russell C.J. Hemagglutinin Stability and Its Impact on Influenza A Virus Infectivity, Pathogenicity, and Transmissibility in Avians, Mice, Swine, Seals, Ferrets, and Humans. *Viruses*, 2021; 13, 746. (doi: 10.3390/v13050746)
- 24 Baikara B., Seidallina A., Baimakhanova B., Kasymbekov Y., Sabyrzhan T., Daulbaeva K., Nuralibekov S., Khan Y., Karamendin K., Sultanov A., Kydyrmanov A. Genome Sequence of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020(H5N8). *Microbiology Resource Announcements*, 2023; 12: 6 (doi: 10.1128/mra.01151-22)
- 25 Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol.*, 1999; 73(2): 1146-55. (doi: 10.1128/JVI.73.2.1146-1155.1999.)
- 26 Weis, W., Brown, J., Cusack, S. *et al.* Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988; **333**: 426–431. (doi: 10.1038/333426a0)
- 27 Linster M., van Boheemen S., de Graaf M., Schrauwen E.J.A., Lexmond P., Mänz B., Bestebroer T.M., Baumann J., van Riel D., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E., Matrosovich M., Fouchier R.A.M., Herfst S. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*, 2014; 10; 157(2): 329-339. (doi: 10.1016/j.cell.2014.02.040)
- 28 Li Z., Jiang Y., Jiao P., Wang A., Zhao F., Tian G., Wang X., Yu K., Bu Z., Chen H. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*, 2006; 80: 11115–11123 (doi: 10.1128/JVI.00993-06)
- 29 Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R., Lamb R.A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci*, 2008; 105(11): 4381–4386. (doi: 10.1073/pnas.0800482105.)
- 30 Wasilenko J. L., Sarmiento L., Pantin-Jackwood M. J. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Arch Virol*, 2009; 154, 969–979 (doi: 10.1007/s00705-009-0399-4)
- 31 Chen G. W., Chang S. C., Mok C. K., Lo Y. L., Kung Y. N., Huang J. H., Shih Y. H., Wang J. Y., Chiang C. et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12, 1353–1360 (doi: 10.3201/eid1209.060276)
- 32 Yamayoshi S., Yamada S., Fukuyama S., et al. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J Virol*, 2014; 88: 3127–3134. (doi: 10.1128/JVI.03155-13.)
- 33 Yamayoshi S., Kiso M., Yasuhara A., et al. Enhanced replication of highly pathogenic influenza A(H7N9) virus in humans. *Emerg Infect Dis*, 2018; 24: 746–750. (doi: 10.3201/eid2404.171509.)
- 34 Alkie T.N., Cox S., Embury-Hyatt C., Stevens B., Pople N., Pybus M.J., Xu W., Hisanaga T., Suderman M., Koziuk J., Kruczkiewicz P., Nguyen H.H., Fisher M., Lung O., Erdelyan C.N.G, Hochman O., Ojkic D., Yason C., Bravo-Araya M., Bourque L., Bollinger T.K., Soos C., Giacinti J., Provencher J., Ogilvie S., Clark A., MacPhee R., Parsons G.J., Eaglesome H., Gilbert S., Saboraki K., Davis R., Jerao A., Ginn M., Jones M.E.B., Berhane Y. Characterization of neurotropic HPAI H5N1 viruses with novel genome constellations and mammalian adaptive mutations in free-living mesocarnivores in Canada. *Emerg Microbes Infect*, 2023; 12(1): 2186608. (doi: 10.1080/22221751.2023.2186608.)

FTAMP: 68.35.53.

У.З. САГЫНДЫКОВ¹, М.Ж. СУЛТАНОВА², Н. АКЖАНОВ^{2*}, Ә. СӘДУАҚАС²,
А. НУРЫШ², К.О. ДОДАЕВ³

¹Л. Н. Гумилёв атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан

²Қазақ қайта өңдеу және тамақ өнеркәсібі ғылыми-зерттеу институты, Астана, Қазақстан

³Ташкент химия-технологиялық институты, Ташкент қаласы, Өзбекстан

*e-mail: nurtore0308@gmail.com

СҮТҚЫШҚЫЛ БАКТЕРИЯЛАРЫ НЕГІЗІНДЕГІ ПРОБИОТИКАЛЫҚ СУСЫН САПАСЫНА ГРЕК ЖАҢҒАҒЫ ҚАБЫҒЫНАН АЛЫНҒАН СУЛЫ –ЭТАНОЛДЫ ЭКСТРАКТТЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.09

Түйін

Қазіргі әлемде ғылым, тамақ технологиялары мен медицина дамыған сайын көптеген аурулардың алдын алуға, өнімділікті арттыруға, әл-ауқатты жақсартуға бағытталған барған сайын тиімді, ғылыми негізделген ұтымды және сонымен бірге функционалды тамақтануды құру қажеттілігі артып келеді.

Әлемдік және отандық тәжірибе көрсеткендей, халықтың ұлттық ауқымдағы микронутриенттермен қамтамасыз етілуін жақсартудың ең тиімді және экономикалық қол жетімді жолы – азық-түлікті адамның физиологиялық қажеттіліктеріне сәйкес келетін деңгейге байыту. Шығу тегі табиғи биологиялық белсенді заттарды пайдалану арқылы функционалды мақсаттағы ашытылған сүт өнімдерін жасау әрі олардың асортиментін кеңейту - дамушы бағыт болып табылады.

Бұл зерттеу жұмысында грек жаңғағы қабығынан сулы-этанолды экстракт алынып, маңызды биологиялық құрамы зерттелді. Экстракттің витаминдік әрі минералды құрамы бай, антиоксиданттық қасиетке ие екендігі дәлелденді. Жаңа функционалды бағыттағы қышқылсүт өнімі арнайы технология бойынша жасалып, оның құрамы осы экстрактпен байытылды. Бұл өнімнің физика-химиялық, микробиологиялық әрі органолептикалық қасиеттері зерттелді.

Кілтті сөздер: пробиотик, экстракт, грек жаңғағы, қабық, сүтқышқылды бактериялар.

Қазіргі уақытта әлемнің барлық дамыған мемлекеттерінде салауатты өмір салты, оның ішінде дұрыс тамақтану мәселесі мемлекеттік саяси даму дәрежесіне көтерілген. Әсіресе, еліміз үшін тамақтануды түзету мәселесі өзекті. Соңғы жылдары ашу үдерісі арқылы жасалатын тамақ өнімдерінің нарығы едәуір артқан, өнім құрамындағы пробиотиктер түпкілікті өнімнің сипаттамасы мен сапасын анықтайтын маңызды ерекшелікті орындайды [1].

Елімізде, дәрігерлердің пайымдауынша, тұрғындардың 85-90% арасында дисбактериозға - ішектің микрофлорасының қалыпты бұзылысына бейім. Осы негізде адамның ішек микрофлорасын қалыпта ұстайтын және ағзаға, жеке мүшелерге реттеуші әсерін көрсететін тамақ өнімдерінің жасалуы өзекті болып табылады [2].

Қолданбалы биотехнологияның қарыштап дамып, жаңа негіздегі ашыған қышқылсүт өнімдерін өндіруді дамушы бағыт екенін көруге болады. Бұл пробиотиктерді - микрогазлардың бір немесе аралас дақылдарының негізінде өндірілетін өнімдер, олар адамның қолданысы кезінде табиғи микрофлораның қасиеттеріне жағымды әсер етеді. Мұндай ашытқылардың ерекше қасиеттері бар: микробқа қарсы заттарды түзеді, керексіз ішек микрофлорасын басуға қатысады, шырышты қабатта дамиды, ас қорыту жолында өміршең болады [3].

Сүт өнімдерінің негізгі пайдасы, олар зат алмасу үрдісін оңтайландырып, ішек жұмысына өз пайдасын тигізеді. Сүт құрамындағы ақуыздар жедел ыдырап, оңай сіңімді болып келеді. Сол себепті сүт өнімдері тез қорытылады. Сүтқышқыл бактериялар топтары

патогендік микроазалардың өсуін тежейтін В1, В2, С дәрумендерін, антибиотиктерді, қышқылдарды бөлуге қабілетті. Бұл қасиеттер ішекте кездесетін түрлі патогенді микрофлораның өсуін тежеуде үлкен маңызға ие. Пробиотиктердің антагонистік белсенді штаммдардың қолданылуы осындай құнды өнімдер алу үшін маңызды [4].

Ашыған сүт өнімдері кәдімгі сүтпен салыстырғанда сіңімдірек болып келеді, себебі олар асқазандағы және ішектің секреторлық әрекетіне өз әсерін тигізеді, сол арқылы арнайы ферменттер жұмыс жасап, қарқындылығы артады. Ашу кезінде сүт құрамында әртүрлі микроағзалар бөлетін заттардың саны да артады, сол арқылы пайдасы молайып отырады [5].

Бүгінгі таңда сүт өнімдерін алуда ашыту мақсатында түрлі бактериялар қолданылады. Бір жағынан осы микроағзалардың нәтижесінде ағзаның жұмыс жасауы реттеліп, микробтық жүйе қалыпқа келеді, иммунитет орнығып, аурулардың алдын алу немесе оларды емдеу жеңілдейді. Сүтқышқыл бактериялар көмегімен ашыған, ішектің қалыпты микрофлорасының өкілдері негіздерінде пробиотикалық өнімдерді зерттеп, әзірлеп және өндіру үлкен қызығушылыққа ие [6].

Ғылыми зерттеу жұмыстарынан пробиотиктердің протеолитикалық әрі микроағзаларға қарсы белсенділігі бар екені, токсиндерді бейтараптандыра алатыны, ішектің қышқылдық-негіздік теңдігін сақтауға көмектесетіні, лактоза сіңімділігіне жауап беретіні белгілі болды. Сол арқылы бұл бактериялар ішек моторикасын жақсартып, патогендік бактериялармен шірік және газ түзгіш флораның өсуін тоқтатады. Биологиялық белсенді өнімдерді пробиотикалық микроағзалармен жинаудың потенциалды қабілеті бактерия түрлері мен штаммдарына байланысты, сонымен бірге өсіру жағдайын да ескеру қажет [7].

Тамақ өнеркәсібінде табиғи антиоксиданттарға деген қажеттілік динамикалық түрде артып келе жатқандықтан, ауылшаруашылық және тамақ қалдықтары табиғи антиоксиданттар ретінде фенолдық қосылыстарды алу үшін тамаша нысанға айналады [8].

Грек жаңғақтары басқа жаңғақтарға қарағанда жоғары антиоксиданттық қабілетке ие, өйткені қабық негізінен лигниннен тұрады, ол фенолдың күшті көзі. Фенолдар тамақ өнеркәсібінде тамақ тұрақтандырғыш ретінде де қолданылады және қазіргі уақытта маңызды антиоксиданттар болып саналады [9].

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу нысаны ретінде сиыр сүті, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* және *Lactobacillus acidophilus* белсенді пробиотикалық штаммдары Л.Н.Гумилёв атындағы Еуразия Ұлттық Университетінің «Биотехнология және микробиология» зертханасында зерттеліп, белсенді штаммдары зерттеуге алынды; грек жаңғағы қабығы негізінде алынған сулы-этанолды экстракт (50%); қоспасыз сүт қышқылды өнім (бақылау үлгісі); зерттелетін үлгі ретінде – 10% экстрактпен байытылған сүт қышқылды өнім алынды.

Грек жаңғағы - Алматы облысынан жиналды. Экстракция «АСВ-6» жартылай автоматты Сокслет аппаратында жүргізілді. «Novital Magnum 4V» ұсатқышымен және «МШЛ-1П» зертханалық диірменінде ұнтақталады.

«МШЛ-1П» диірмені мерзімді әсер ететін құрылғы болып табылады. Диірменнің алынбалы барабаны «Novital Magnum 4V» ұсатқышта алдын ала ұсақталған жаңғақ қабықтарымен және ұнтақтаушы болат шарлармен толтырылады. Барабан айналғанда, материал шарлардың жанасуы мен соққы әрекеті нәтижесінде ұсақталады. Ұнтақтау уақыты ұнтақтау мөлшеріне байланысты және 1 сағаттан 3 сағатқа дейін өзгереді.

Экстракциялау «АСВ-6» жартылай автоматты Сокслет экстракциялық аппаратында жүзеге асырылады.

Қойылған мақсаттар мен міндеттерге қол жеткізу мынадай техникалық шарттар мен МЕМСТ-тарды пайдалануға негізделетін болады:

Грек жаңғағы құрамы - МЕМСТ 32874-2014 "Грек жаңғағы. Техникалық шарттар" бойынша [10];

Йодтың массалық концентрациясын анықтау әдісі - МУК 4.1.1090-02 бойынша [11];
 Темірді анықтау әдісі - МЕМСТ 26573-2014 бойынша [12];
 Мырышты анықтау әдісі - МЕМСТ 26573.2-2014 бойынша [12];
 Аминқышқылдарды анықтау әдісі - MVI MN 1363-2000 бойынша [13];
 Кверцетинді анықтау әдісі - МЕМСТ Р 57990-2017 [14];
 Катехин құрамын анықтау әдісі - МЕМСТ ISO 14502-2-2015 [15];
 Сүт және сүт өнімдері сүт қышқылды микроорганизмдерді анықтау әдістері - МЕМСТ 33951-2016 бойынша [16];
 Қышқылдықты анықтаудың титриметриялық әдістері - МЕМСТ 3624-92 бойынша [17];
 Сүт және өнімдер, сүт өңдеу. Микробиологиялық талдау әдістері МЕМСТ 32901-2014 бойынша [18].

Қышқылсүт өнімінің ылғал ұстау қабілетін анықтау. Белсенді пробиотиктермен әрі пребиотикпен байытылған өнімнің маңызды қасиеттерінің бірі - ылғал ұстау қабілеті центрифуга көмегімен анықталды. Центрифугалау 1000 айн/мин жасалды. 10 мл өнім-ұйындыны сынақ түтікшесінде 1000 айн/мин центрифугаланды.

Нәтижелер және оларды талдау

Жұмыста ұсынылған зерттеулер ашытылған сүт өнімін өндіруде жаңғақ қабығын пайдалану мүмкіндігін зерттеуге бағытталған. Қышқылсүт өнімін дайындау үшін грек жаңғағы қабығынан алынған сығынды қолданылды. «Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері ҒЗИ» ЖШС АФ зертханасында "Профилактикалық мақсаттағы өнімді алу мақсатында жаңғақ қалдықтарының дәстүрлі емес түрлерін пайдалану" жобасын іске асыру барысында сығынды алынды, ол кейіннен осы зерттеулерде ашытылған сүт өнімінің негізгі компоненттеріне профилактикалық қоспа ретінде пайдаланылды.

Грек жаңғағы қабығынан сығынды алу үшін белгілі бір технологиялық операциялар қолданылды: шикізатты дайындау, қабықтың сұрыпталған партиясын жуу және кептіру. Экстракция "АСВ-6" Сокслетінің жартылай автоматты аппаратында жүргізіледі. Бөлінген сығынды - белгілі бір иісі бар ашық қоңыр түсті сұйықтық. "АСВ-6" Сокслетінің жартылай автоматты аппаратында жаңғақ қалдықтарын экстракциялау режимі келесідей: шикізаттың массасы 5 гр, еріткіштің концентрациясы – 50% Сулы-этанол, ұнтақтау мөлшері 300 мкм және экстракция уақыты 120 минут.

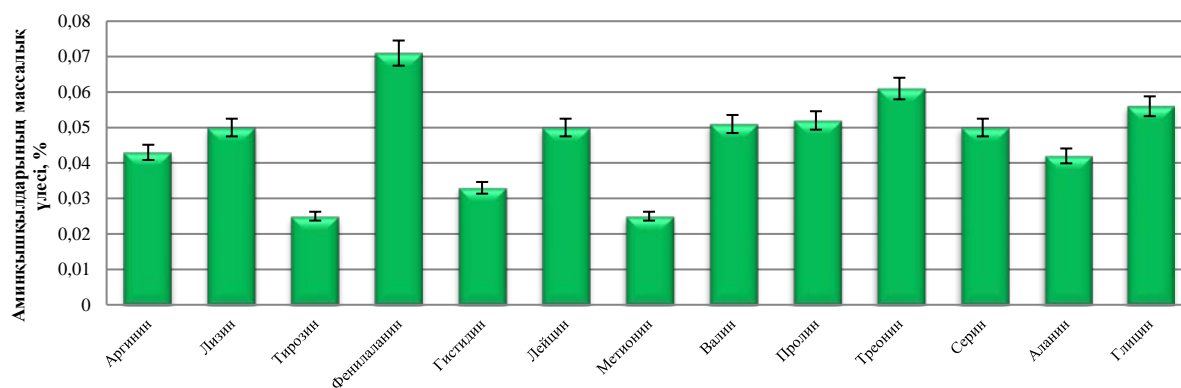
1-кестеде грек жаңғағы қабығынан алынған сығындының физика-химиялық құрамының параметрлері келтірілген.

Кесте 1 – Грек жаңғағы қабығының сығындысының физика-химиялық құрамы

Атауы	Грек жаңғағы қабығынан алынған сығынды
Катехин, мг/дм ³	169,02±1,11
Кверцетин, мг/дм ³	100,98±0,67
Витамин С, мг/100 г	0,140±0,048
Витамин Е мг/100 г	0,10±0,05
Темір	0,10±0,002
Цинк	0,03±0,001
Йод	0,25±0,002

1-кесте мәндері бойынша грек жаңғағы қабығының сығындысының физика-химиялық құрамында антиоксиданттық белсенділігі бар катехин мен кверцетиннің мөлшері жоғары болды. Сонымен қатар С, Е витаминдері де салыстырмалы түрде жоғары. Ал микроэлементтер қатары бойынша темір мен йодтың үлес салмағы жоғары. Бұл биологиялық белсенді заттардың жоғары мөлшері – экстракттың пайдасын дәлелдейді.

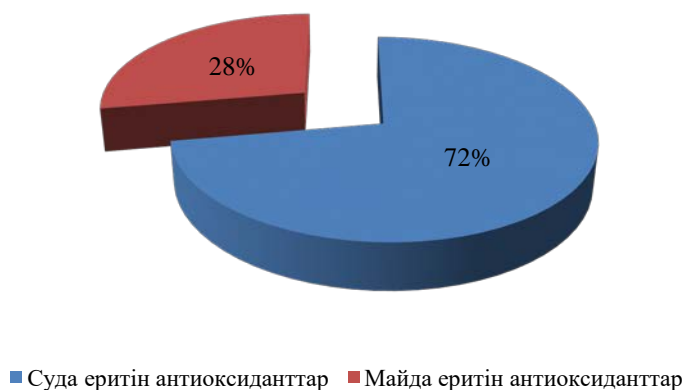
Грек жаңғағы қабығының сығындысы бай аминқышқылдарының құрамымен сипатталады, бұл сығындының тағамдық құндылығының жоғары деңгейін көрсетеді.



Сурет 1 – Грек жаңғағы қабығының сығындысындағы аминқышқылдарының мөлшері

1-сурет бойынша грек жаңғағы қабығының сығындысы адам ағзасы синтездемейтін алмаспайтын аминқышқылдармен қатарымен және алмасатын аминқышқылдарының бай көзінен тұратыны дәлелденді. Бұл зерттеу бойынша экстракт құрамындағы аминқышқылдар түрлі ақуыз түзу үдерісіне белсенді қатынаса алатынын дәлелдейді, сол себепті де тағамдық құндылығы жоғары.

Грек жаңғағы қабығының сығындысындағы майда еритін және суда еритін антиоксиданттардың құрамын зерттеу (2-сурет) суда еритін антиоксиданттардың үлесі майда еритін антиоксиданттардың үлесінен 2 есе көп екенін көрсетті.



Сурет 2 – Грек жаңғағы қабығының сығындысындағы май мен суда еритін антиоксиданттардың мөлшері

2-сурет бойынша грек жаңғағы қабығының сығындысындағы майда еритін және суда еритін антиоксиданттардың құрамы бойынша суда еритін антиоксиданттардың үлесі өте жоғары екені белгілі болды. Бұл ерекшелікті суда еритін антиоксиданттар ретінде катехин мен кверцетиннің үлес салмағының жоғары болуымен дәлелдеуге болады. Ал майда еритін антиоксидант ретінде Е витаминінің үлес салмағымен дәлелдеуге болады.

Грек жаңғағы қабығының сығындысының тағамдық қауіпсіздігін зерттеу құрамында улы элементтер мен пестицидтердің жоқтығын көрсетеді (2-кесте).

Кесте 2 – Грек жаңғағы қабығының сығындысының тағамдық қауіпсіздігі

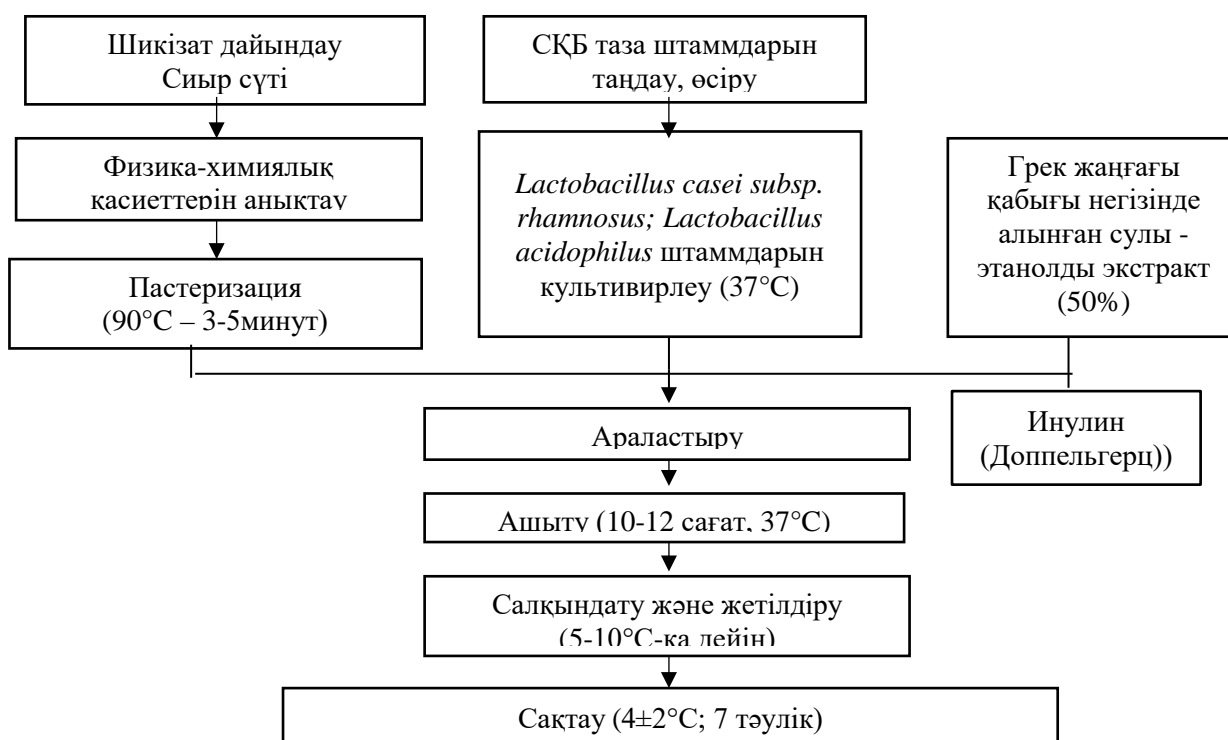
Улы элементтер	Нақты нәтижелер, мг/дм ³ :
Қорғасын	0,000023±0,0001
Кадмий	табылмады
Мышьяк	табылмады
Сынап	табылмады
Пестицидтер, мг/кг	табылмады
ГХЦГ: α, β, γ, - изомеры	табылмады
ДДТ және оның метаболиттері	табылмады

2-кесте мәндері бойынша грек жаңғағы қабығының сығындысының тағамдық қауіпсіздігін зерттеу құрамында улы элементтер мен пестицидтер зерттеу барысында табылмады. Тек қорғасынның 0,000023±0,0001 мг/дм³ кездеседі, алайда бұл көрсеткіш рұқсат етілген шаманың өзінен 10 есе төмен, яғни мүлде қауіпі жоқ.

Осылайша, бай физика-химиялық құрамы, әртүрлі гормондардың, антиденелер мен ферменттердің өндірілуіне ықпал ететін маңызды аминқышқылдарының едәуір мөлшері және грек жаңғағы қабығының сығындысының қауіпсіздігінің жоғары деңгейі оны емдік профилактикалық қасиеттері бар диеталық қосымша ретінде пайдалануға толық негіз береді.

Қышқылсүт өнімдерін жасау барысында олардың консистенциясын, сыртқы түрі мен сақтау тұрақтылығын айтарлықтай жақсартуға мүмкіндік беретін шикізаттар кеңінен қолданылады. Бүгінгі таңда пробиотикалық функционалды өнімдерді жасауда табиғи пайдасы мол заттарды іздеу және өндіріске енгізу үлкен маңыздылыққа ие. Бұл тұрғыда функционалды маңызы бар, антиоксиданттық белсенділігі бар грек жаңғағының қабығының экстрактісін сүт қышқылды өнімге қосу арқылы оны байыту – пайдасы мол өнім ретінде жаңа рецептураның дамуына әкеледі.

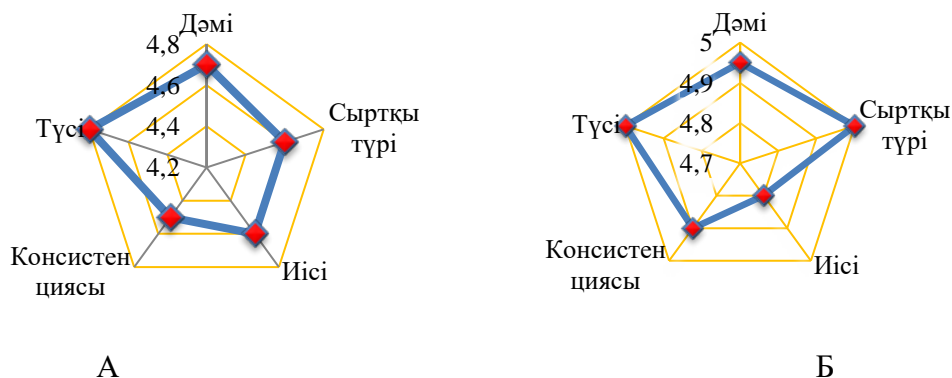
Әрі қарай, рецепт бойынша 10% сығынды қатынасында ашытылған сүт өнімі дайындалды. 3-суретте ашытылған сүт өнімін дайындау технологиясы көрсетілген.



Сурет 3 – Грек жаңғағы қабығының сығындысын қолдана отырып, ашытылған сүт өнімінің тәжірибелік технологиясы

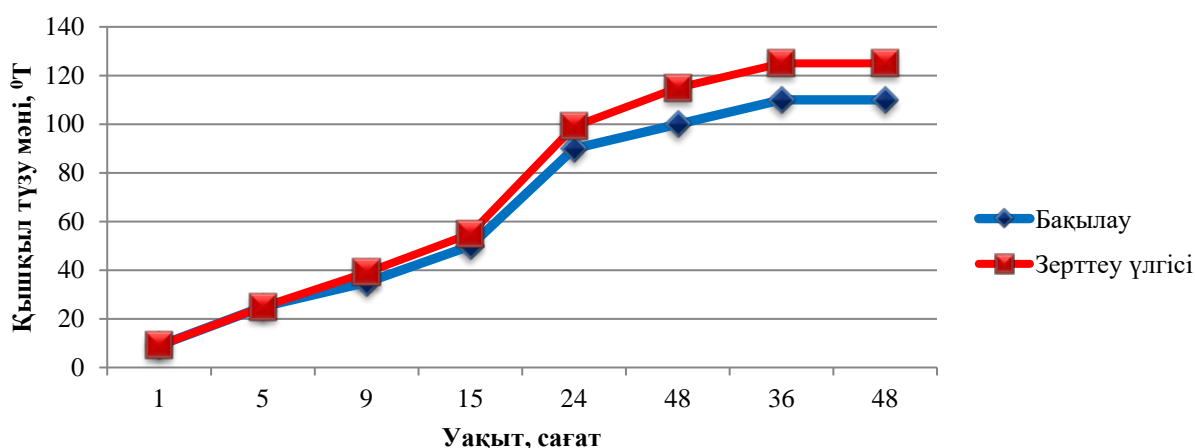
3-сурет бойынша ашытылған сүт өнімін дайындау технологиясы шикізат ретінде сиыр сүтін өңдеуден басталған. Сүттің физика-химиялық қасиеттерін анықтап, пастеризация жасап араластыруға жіберіледі. Ал сүтқышқыл бактерия ретінде *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*; *Lactobacillus acidophilus* штаммдарын культивирлеу (+37°C) жүргізіледі. Арнайы технология бойынша алынған Грек жаңғағы қабығы негізінде алынған сулы - этанолды экстракт пен Инулин салынып, барлығы араластыруға жіберіледі. 10-12 сағат ашытылған соң, салқындатылып, сақтауға қойылады. Осылайша дайын өнім шығарылады.

Сүт қышқылды өнімнің органолептикалық және физика-химиялық көрсеткіштерін бағалау дайын өнімді алғаннан кейін, сондай-ақ сақтау кезінде жүргізілді. Төменгі 4-суретте өнімнің органолептикалық ерекшелігі 5-баллдық өлшемде берілген.



Сурет 4 - Қышқылсүт өнімдерінің органолептикалық сапа көрсеткіштерінің профилограммасы, А – бақылау үлгісі; Б – зерттелетін үлгі

Сиыр сүті негізінде жасалған, грек жаңғағы қабығының экстрактісімен байытылған сүт қышқылды өнімнің органолептикалық көрсеткіші бойынша жағымды өнім болып шықты. Дәмі де, иісі де жағымды қышқылсүт өнімі. Әрі бұл өнімнің дәмі аса ерекшелніп, тәтті дәмі басым болды. Әрі құрамындағы инулиннің қатынасының артуы – оның пребиотикалық басымдығын дәлелдейді. 5-суретте бұл өнімнің қышқыл түзу мәнінің деректері келтірілген.

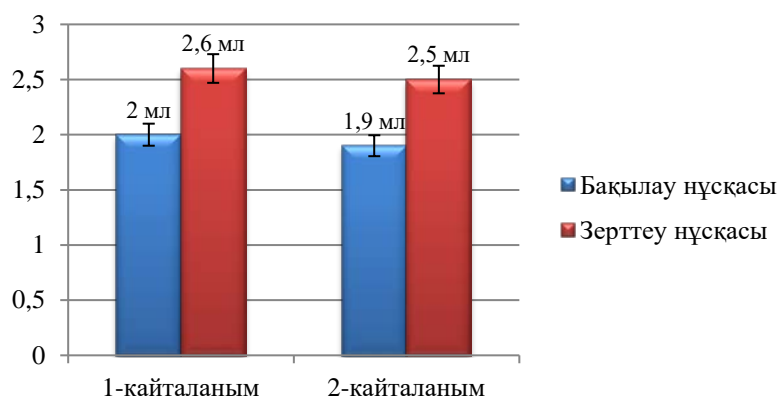


Сурет 5 – Титрлеу қышқылдығының өзгеруі, °Т

Зерттеу қорытындысы бойынша өнім биохимиясы зерттеліп, титрлеу әдісімен сүт өнімдерінің қышқылдығын анықталды. Сапалы сүт өнімдерінде Тернердің градустары қышқылсүт өнімі үшін 120°Т – көлемінде. Бұл пребиотикалық сусындардың да мәндерінің орташа есебі – 122,5 °Т тең.

Қышқыл түзу белсенділігі - лактоқұрамды пробиотиктердің ерекше белсенділігінің көрсеткіші және құрамындағы пребиотиктердің белсенділігінің негізінде. Титрленген қышқылдық 120°Т жоғары болғандықтан, біздің қолданған *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*; *Lactobacillus acidophilus* штаммдары – активті болғаны. Нәтижелер қорытындысы бойынша алынған деректер – зерттелген штаммдардың көпшілігі жақсы қышқыл түзуші қабілетке ие екенін көрсетеді.

Қышқылсүт өнімінің ылғалұстау қабілеті – 10 мл көлемнен 1000 айн/мин центрифугаланды. Бұл өнімнің құрамындағы ұйытындының белсенділігін тексеру үшін жасалды (Сурет 6).



Сурет 6 - Грек жаңғағының қабығының экстрактісімен байытылған сүт қышқылды өнімнің ылғалұстағыш қабілетінің нәтижелері

Грек жаңғағының қабығының экстрактісін қосу ұйындының синергетикалық қабілетінің төмендеуіне әкелді. Өнімнің ылғал ұстағыш қабілеті бойынша – барлық өнімдердің ұйытындылары белсенді қышқылсүт өнімдері екені дәлелденді. Барлық ашытқының ылғалұстағыш қабілетінің қорытындысы бойынша салыстырмалы түрде зерттеу өнімінің ылғалұстағыш қабілеті басым екені дәлелденді. Бұл сүт қышқылды өнімнің маңыздылығын дәлелдейді. 3-кестеде бұл өнімнің микробиологиялық көрсеткіші келтірілген.

Кесте 3 - Грек жаңғағының қабығының экстрактісімен байытылған сүт қышқылды өнімнің микробиологиялық көрсеткіштері

Көрсеткіштер атауы	Көрсеткіштің реттелетін мәні	Көрсеткіштердің нақты мәні / нұсқалары	
		Бақылау	Зерттеу нұсқасы
Сүтқышқыл бактериялар КТБ/см ³ (г)	Рұқсат етіледі	2,2x10 ⁷	3,9x10 ⁸
ІТТБ (колиформтар)	0,1 г рұқсат етілмейді	0,1	Табылмады
МАжФАНМс, КТБ/см ³ (г), көп емес	1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1x10 ³
Патогендік м.о, оның ішінде сальмонеллалар	10г рұқсат етілмейді	Табылмады	Табылмады
<i>E. coli</i>	1,0 г рұқсат етілмейді	0,1	0,1
Ашытқылар, КТБ/г	100 көп емес	Табылмады	Табылмады
<i>S. aureus</i> , КТБ/г	1,0 г рұқсат етілмейді	Табылмады	Табылмады
Зеңдер, КТБ/г	100 көп емес	Табылмады	Табылмады

Бұл зерттеу қорытындысы бойынша грек жаңғағы қабығының экстрактісімен байытылған қышқылсүт өнімінің құрамында сүтқышқыл бактерия санының орташа мәннен

жоғарғы мәнде кездесетінін көруге болады, яғни бақылау нұсқасымен салыстырғанда шамамен 2-есеге көп. Мезофилді аэробты факультативті анаэробты микроорганизмдер саны 2-нұсқада да орташа деңгейде кездесті. Ал патогенді және шартты патогенді микроағзалар, ашытқылар мен зең саңырауқұлақтары табылмады.

Қорытынды

Қорытындылай келе, грек жаңғағы қабығының экстрактісімен байытылған, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*; *Lactobacillus acidophilus* белсенді штаммдары салынған әрі пребиотик инулин қосылған қышқылсүт өнімінің органолептикалық, физико-химиялық әрі микробиологиялық көрсеткіштері толық сипатталды. Бұл өнім дәмі мен иісі жағынан жағымды, консистенциясы бойынша біртекті қышқылсүт өнімі болып табылады. Биологиялық құрамы бойынша – минералды-витаминдік құрамы байытылған, антиоксиданттық қасиетке ие функционалды өнім ретінде қолдануға болады.

Бұл технология бойынша жаңа өнім жасау арқылы – қышқылсүт өнімдерінің ассортиментін кеңейтіп, халық денсаулығын көтеруде өсімдік қалдықтарын тиімді пайдалану жолдары ұсынылды, яғни қалдықсыз технология негізінде жаңа өнімнің дайындалуы сипатталды. Сонымен қатар бұл өнім пробиотикалық әрі пребиотикалық пайда ғана емес, минералды-витаминдік құрамы бойынша да бай, әрі антиоксиданттық қасиет беретін өнім дайындалды.

Қаржыландыру

Жұмыс Қазақстан Республикасының Ауыл шаруашылығы министрлігі BR0764970-ОТ-21 "Профилактикалық қасиеттері бар өнімді алу үшін жаңғақ қалдықтарының дәстүрлі емес түрлерін пайдалану" қаржыландыратын жоба шеңберінде 2021-2023 жылдар кезеңінде жүзеге асырылды.

Қорытындылай келе, біз осы ғылыми жобаның барлық қатысушыларына эксперименттік зерттеулер жүргізуге қатысқаны үшін және "ҚазҒЗИ Қайта өңдеу және тамақ өнеркәсібі" ЖШС Астана филиалының басшылығы мен ғалымдарына алғысымызды білдіреміз.

Әдебиеттер:

- 1 Yang J., Liu R. H., Halim L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *Food Science and Technology*, 2009, 42. № 1: P. 1-8. (DOI:10.1016/j.lwt.2008.07.007)
- 2 Amaral J. S. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 51(26): P. 76-82. (DOI: 10.1021/jf030451d)
- 3 Brown P. J., Leslie C. A., Dandekar A. *Juglans regia* Walnut. *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*, 2020, 55: P. 246. (DOI:10.1017/S0014479705213066)
- 4 Wei Q., Ma, X., Zhao Z., Zhang S., Liu S. Antioxidant activities and chemical profiles of pyrolygneous acids from walnut shell. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2010, 88, 2: P. 149-154. (DOI:10.1016/j.jaap.2010.03.008)
- 5 Saleida A.M. Effect of adding green walnut husks on some qualitative properties of cooked sausages. *Food Science and Technology*, 2016, 65: P. 751-757. (DOI:10.1016/j.lwt.2015.08.069)
- 6 Абдулжанова М., Кистаубаева, А., Игнатова, Л., Жантлесова, С., Кабыкенова, А., & Собхиль-Сохайми. (2023). Получение йогурта на основе сухого кобыльего молока, обогащенного пробиотическими микрокапсулами. *Микробиология және вирусология*, 2(41), 96–123. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2023.02.06>)
- 7 Абибаева, Г., Сармурзина, З., Бисенова, Г., Мусабаева, Б., & Тултабаева, Т. (2022). Характеристика штаммов пробиотиков для разработки напитков профилактического назначения. *Микробиология және вирусология*, 4(39), 141–151. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2022.04.11>)
- 8 Zabihi M., Ahmadpour A., Asl A. H. Removal of mercury from water by carbonaceous sorbents derived from walnut shell. *Journal of Hazardous materials*, 2009, 167, 1-3: C. 230-236. (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.12.108)

9 Queiros C. S., Cardoso S., Lourenco A., Ferreira J., Miranda I., Lourenço M., Pereira H. Characterization of walnut, almond, and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2020, 10, 1: С. 175-188. (DOI:10.1007/s13399-019-00424-2)

10 ГОСТ 32874-2014 "Орехи грецкие. Технические условия." – М.: Стандартинформ, 2014. – 15 с.

11 Методические указания. МУК 4.1.1090-02 "Определение йода в воде". – М.: 2002.

12 ГОСТ 26573.2-2014 "Премиксы. Методы определения марганца, меди, железа, цинка, кобальта". – М.: Стандартинформ, 2014. – 20 с.

13 МВИ.МН 1363-2000 Метод определения аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Минздрав Республики Беларусь. Минск: 2000. – 24 с.

14 ГОСТ Р 57990-2017. Продукция пищевая специализированная, биологически активные добавки к пище. Метод определения кверцетина. – М.: Стандартинформ, 2017. – 12 с.

15 ГОСТ ISO 14502-2-2015. Метод определения содержания катехинов. – М.: Стандартинформ, 2015. – 20 с.

16 ГОСТ 33951-2016 Молоко и молочная продукция Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М.: Стандартинформ, 2016. – 13 с.

17 ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – М.: Изд-во стандартов, 2001. – 10 с.

18 ГОСТ 32901-2014. Молоко и продукты, переработки молока. Методы микробиологического анализа. – М.: Стандартинформ, 2015. – 27 с.

У.З. САГЫНДЫКОВ¹, М.Ж. СУЛТАНОВА², Н. АКЖАНОВ^{2*}, А. САДУАКАС²,
А. НУРЫШ², К.О. ДОДАЕВ³

¹Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилева, Астана, Казахстан

²Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Астана, Казахстан

³Ташкентский Химико-Технологический институт, г.Ташкент, Узбекистан

*e-mail: nurtore0308@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДНО–ЭТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ СКОРЛУПЫ ГРЕЦКОГО ОРЕХА НА КАЧЕСТВО ПРОБИОТИЧЕСКОГО НАПИТКА НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Аннотация

В современном мире по мере развития науки, пищевых технологий и медицины возрастает потребность в создании все более эффективного, научно обоснованного, рационального и в то же время функционального питания, направленного на профилактику многих заболеваний, повышения работоспособности и улучшение самочувствия населения.

Как показывает мировой и отечественный опыт, наиболее эффективным и экономически доступным способом улучшения обеспеченности населения микронутриентами национального масштаба является обогащение продуктов питания до уровня, соответствующего физиологическим потребностям человека. Актуальным направлением современной науки является разработка и расширение ассортимента кисломолочных продуктов функционального назначения с использованием природных биологически активных веществ.

В данной исследовательской работе был извлечен водно-этанольный экстракт из скорлупы грецкого ореха и изучен его биологический состав. Доказано, что экстракт богат витаминным и минеральным составом, обладает антиоксидантными свойствами. Кисломолочный продукт нового функционального направления, обогащенный экстрактом из скорлупы грецкого ореха, был разработан по специальной технологии. Также в статье изучены физико-химические, микробиологические и органолептические свойства разработанного продукта.

Ключевые слова: пробиотик, экстракт, грецкий орех, скорлупа, молочнокислые бактерии.

IRSTI: 68.35.53.

U.Z. SAGYNDYKOV¹, M.Zh. SULTANOVA², N. AKZHANOV^{2*}, A. SADUAKAS²,
A. NURYSH², K.O. DODAEV³

¹L. N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

²Kazakh Scientific Research Institute of Processing and Food Industry, Astana, Kazakhstan

³Tashkent Institute of Chemical Technology, Tashkent, Uzbekistan

*e-mail: nurtore0308@gmail.com

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF WATER–ETHANOL EXTRACT FROM WALNUT SHELL ON THE QUALITY OF A PROBIOTIC DRINK BASED ON LACTIC ACID BACTERIA

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.09

Abstract

In the modern world, with the development of science, food technology and medicine, there is an increasing need to create an increasingly effective, scientifically based, rational and at the same time functional nutrition aimed at preventing many diseases, improving working capacity and improving the well-being of the population.

As world and domestic experience shows, the most effective and economically affordable way to improve the provision of micronutrients to the population on a national scale is to enrich food to a level corresponding to the physiological needs of a person. The current direction of modern science is the development and expansion of the range of functional dairy products using natural biologically active substances.

In this research work, an aqueous ethanol extract was extracted from the walnut shell and its biological composition was studied. It is proved that the extract is rich in vitamin and mineral composition, has antioxidant properties. A fermented milk product of a new functional direction enriched with walnut shell extract was developed using a special technology. The physicochemical, microbiological and organoleptic properties of the developed product are also studied in the article.

Keywords: probiotic, extract, walnut, shell, lactic acid bacteria.

Currently, in all developed states of the world, the problem of a healthy lifestyle, including proper nutrition, has been elevated to the rank of state political development. Especially relevant for our country is the issue of nutrition correction. In recent years, the market for food products made through the discovery process has increased significantly, the probiotics contained in the product fulfill an important feature that determines the characteristics and quality of the final product [1].

In the country, doctors believe, among 85-90% of the population are prone to dysbacteriosis - a normal violation of the intestinal microflora. On this basis, the creation of food products that keep the human intestinal microflora in shape and show a regulatory effect on the body, individual organs is relevant [2].

It can be seen that Applied Biotechnology is rapidly developing, and the production of fermented acid milk products on a new basis is a developing direction. These are probiotics - products produced on the basis of single or mixed cultures of micrograms, which have a positive effect on the properties of natural microflora during human use. Such yeasts have special properties: form antimicrobial substances, participate in suppressing unwanted intestinal microflora, develop on the mucous membrane, become viable in the digestive tract [3].

The main benefit of dairy products is that they optimize the metabolic process and bring their benefits to the work of the intestines. The proteins contained in milk are quickly broken down and easily digestible. For the same reason, dairy products are digested faster. Groups of lactic acid bacteria are able to secrete vitamins B1, B2, C, antibiotics, acids that inhibit the growth of pathogenic microorganisms. These properties are of great importance in inhibiting the growth of various

pathogenic microflora found in the intestines. The use of antagonistic active strains of probiotics is important for obtaining such valuable products [4].

Fermented milk products are more digestible compared to regular milk, as they have an effect on the secretory activity of the stomach and intestines, thereby creating special enzymes and increasing their intensity. During fermentation, the number of substances secreted by various microorganisms in milk also increases, thereby increasing the benefits [5].

Today, various bacteria are used in the production of dairy products for the purpose of fermentation. On the one hand, as a result of these microorganisms, the functioning of the body is regulated, the microbial system is normalized, immunity is established, and it is easier to prevent diseases or treat them. The research, development and production of probiotic products on the basis of representatives of normal intestinal microflora fermented with the help of lactic acid bacteria is of great interest [6].

From scientific research, it turned out that probiotics have proteolytic and anti-microbial activity, can neutralize toxins, help maintain acid-base balance in the intestines, and are responsible for lactose digestibility. Thus, these bacteria improve intestinal motility and stop the growth of putrefactive and gas-forming flora with pathogenic bacteria. The potential ability to collect biologically active products with probiotic microorganisms depends on the types and strains of bacteria, but the cultivation conditions must also be taken into account [7].

As the need for natural antioxidants in the food industry is dynamically increasing, agricultural and food waste becomes an ideal target for obtaining phenolic compounds as natural antioxidants [8].

Walnuts have a higher antioxidant capacity than other nuts, as the shell consists mainly of lignin, which is a powerful source of phenol. Phenols are also used in the food industry as food stabilizers and are currently considered important antioxidants [9].

Materials and methods of research

Cow's milk as an object of study; active probiotic strains of *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* were studied in the laboratory "Biotechnology and microbiology" of the Eurasian National University named after L. N. Gumilyov; aqueous-ethanol extract (50%) based on walnut shells; lactic acid product without additives (control sample); lactic acid product enriched with 10% extract were taken as the test sample.

Walnuts-collected from the Almaty region. Extraction was carried out on the semi-automatic Soxlet apparatus" ASV-6". Crushed by the crusher" Novital Magnum 4V "and in the laboratory mill" Mshl-1p".

Mill "Mshl-1p" is a device of periodic action. The removable drum of the mill is filled with pre-crushed walnut shells and grinding steel balls in the "Novital Magnum 4V" crusher. When the drum rotates, the material is crushed as a result of the contact and impact action of the balls. The grinding time depends on the amount of grinding and varies from 1 hour to 3 hours.

Extraction is carried out on the semi-automatic Soxlet extraction apparatus" ASV-6".

The achievement of the set goals and objectives will be based on the use of the following technical conditions and GOSTS:

Walnut composition-GOST 32874-2014 " Walnut. Technical specifications " [10];

Method for determining the mass concentration of iodine - according to Muk 4.1.1090-02 [11];

Iron determination method - according to GOST 26573-2014 [12];

Zinc determination method - according to GOST 26573.2-2014 [12];

Amino acid determination method-according to MVI MN 1363-2000 [13];

Quercetin determination method-GOST R 57990-2017 [14];

Method for determining the catechin content-GOST ISO 14502-2-2015 [15];

Methods for detecting lactic acid microorganisms in milk and dairy products - according to GOST 33951-2016 [16];

Titrimetric methods for determining acidity - according to GOST 3624-92 [17];

Milk and products, milk processing. Methods of microbiological analysis according to GOST 32901-2014 [18].

Determination of the moisture retention capacity of an acid milk product. One of the most important properties of the product, enriched with active probiotics and prebiotics, was the ability to retain moisture using a centrifuge. The centrifugation was made at 1000 rpm. 10 ml of product-clot is centrifuged into a test tube at 1000 rpm.

Results and discussion

The research presented in the paper is aimed at studying the possibility of using walnut shells in the production of a fermented milk product. Acid for the preparation of the milk product, an extract from walnut shells was used. In the laboratory of AF" Kazakh Research Institute of processing and food industries "LLP, during the implementation of the project" use of non-traditional types of nut waste for the purpose of obtaining products for preventive purposes", an extract was obtained, which was subsequently used in these studies as a preventive additive to the main components of fermented milk products.

To extract extract from walnut shells, certain technological operations were used: preparation of raw materials, washing and drying of the sorted batch of shells. Extraction is carried out on a semi-automatic device of the Socslet" ASV-6". The separated extract is a light brown liquid with a specific odor. The mode of extraction of Walnut waste in the semi-automatic apparatus of the Soxlet" ASV – 6 " is as follows: the mass of raw materials is 5 GR, the concentration of the solvent is 50% aqueous-ethanol, the grinding amount is 300 microns and the extraction time is 120 minutes.

Table 1 presents the parameters of the physico-chemical composition of the extract from walnut shells.

Table 1- Physico-chemical composition of walnut shell extract

Name	Extract from walnut shells
Catechin, mg/dm ³	169,02±1,11
Quercetin, mg/dm ³	100,98±0,67
Vitamin C, mg/100g	0,140±0,048
Vitamin E mg/100g	0,10±0,05
Iron	0,10±0,002
Zinc	0,03±0,001
Iodine	0,25±0,002

According to the values of Table 1, the physico-chemical composition of walnut shell extract had a high content of catechin and quercetin, which have antioxidant activity. At the same time, vitamins C and E are also relatively high. And in terms of the number of trace elements, iron and iodine have a high specific gravity. This proves the benefit of the extract – a high content of biologically active substances.

Walnut shell extract is characterized by a rich amino acid composition, which indicates a high level of nutritional value of the extract.

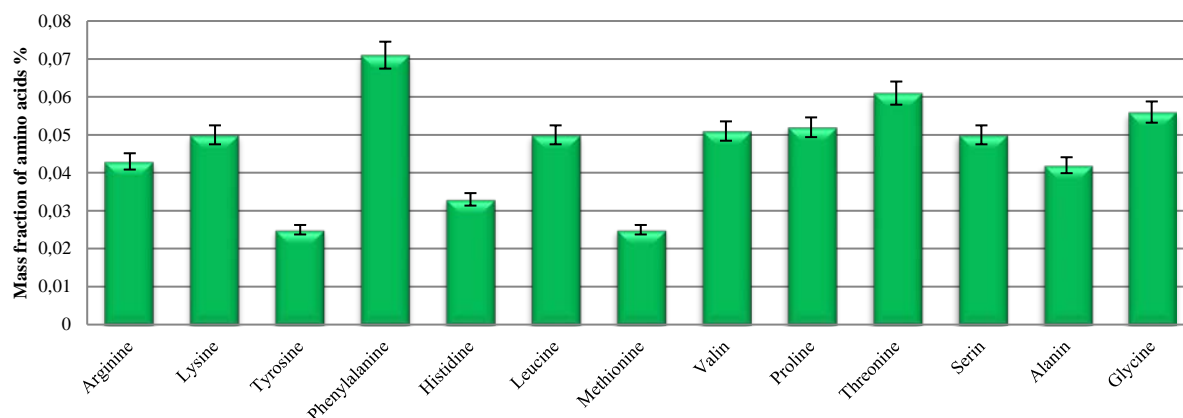


Figure 1-amino acid content in walnut shell extract

According to figure 1, it has been proven that walnut shell extract consists of a series of non-exchangeable amino acids that are not synthesized by the human body and a rich source of exchangeable amino acids. This study proves that the amino acids contained in the extract can actively participate in the process of forming various proteins, which is why they have a high nutritional value.

A study of the content of fat-soluble and water-soluble antioxidants in walnut shell extract (Figure 2) showed that the proportion of water-soluble antioxidants is 2 times higher than the proportion of fat-soluble antioxidants.

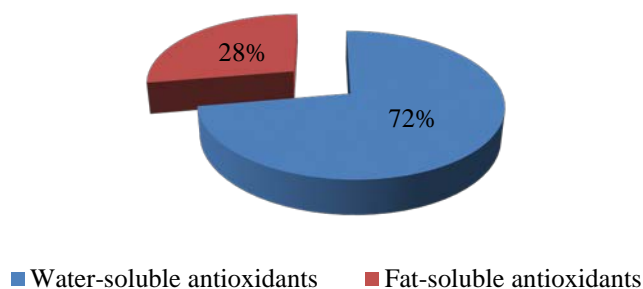


Figure 2 – The content of fat and water-soluble antioxidants in walnut shell extract

According to figure 2, it turned out that the proportion of water-soluble antioxidants in walnut shell extract in terms of fat-soluble and water-soluble antioxidants is high. This feature can be evidenced by the high specific gravity of catechin and quercetin as water-soluble antioxidants. And as a fat-soluble antioxidant, it can be proven by the specific weight of vitamin E.

A study of the food safety of walnut shell extract shows that it does not contain toxic elements and pesticides (Table 2).

Table 2 - Nutritional safety of walnut shell extract

Toxic elements	Specific results, mg/dm ³ :
Lead	0,000023±0,0001
Cadmium	not found
Arsenic	not found
Mercury	not found
Pesticides, mg / kg	not found
GHT: α, β, γ, - isomers	not found
DDT and its metabolites	not found

Food safety study of walnut shell extract according to Table 2 values no toxic elements or pesticides were found in the study. Only 0.000023 ± 0.0001 mg/dm³ of lead is found, however, this figure is 10 times lower than the permissible value itself, that is, there is no danger at all.

Thus, the rich physico-chemical composition, a significant amount of essential amino acids that contribute to the production of various hormones, antibodies and enzymes, and the high level of safety of walnut shell extract give every reason to use it as a dietary supplement with therapeutic and prophylactic properties.

In the manufacture of acid milk products, raw materials are widely used, which can significantly improve their consistency, appearance and storage stability. Today, in the creation of probiotic functional products, the search for and introduction into production of substances with abundant natural benefits is of great importance. In this context, its enrichment with the addition of an extract of walnut shells, which has a functional value, anti – oxidant activity, to a lactic acid product-leads to the development of a new recipe as a product with more benefits.

Next, according to the recipe, a fermented milk product was prepared in a ratio of 10% extract. Figure 3 shows the technology for preparing a fermented milk product.

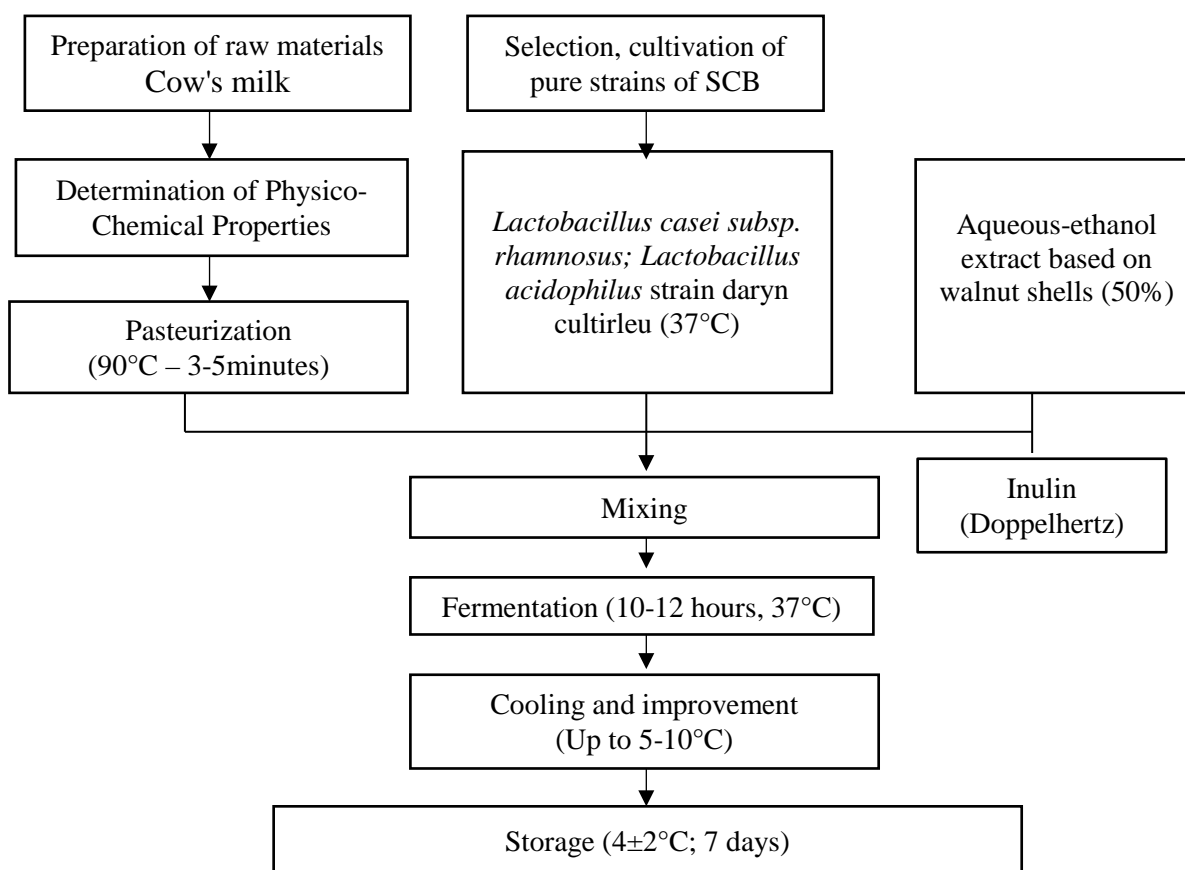


Figure 3-experimental technology of a fermented milk product using walnut shell extract

According to figure 3, the technology for preparing a fermented milk product began with the processing of cow's milk as a raw material. The physical and chemical properties of milk are determined, pasteurized and sent for mixing. And *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*; cultivation of *Lactobacillus acidophilus* strains (37°C) is carried out. Water-ethanol extraction and inulin, obtained on the basis of walnut shells obtained according to a special technology, are placed, and everything is sent for mixing. After fermentation for 10-12 hours, it is cooled and placed for storage. This is how the finished product is produced.

The assessment of organoleptic and physico-chemical indicators of lactic acid products was carried out after receiving the finished product, as well as during storage. In the lower figure 4, the organoleptic feature of the product is given in the 5-point dimension.

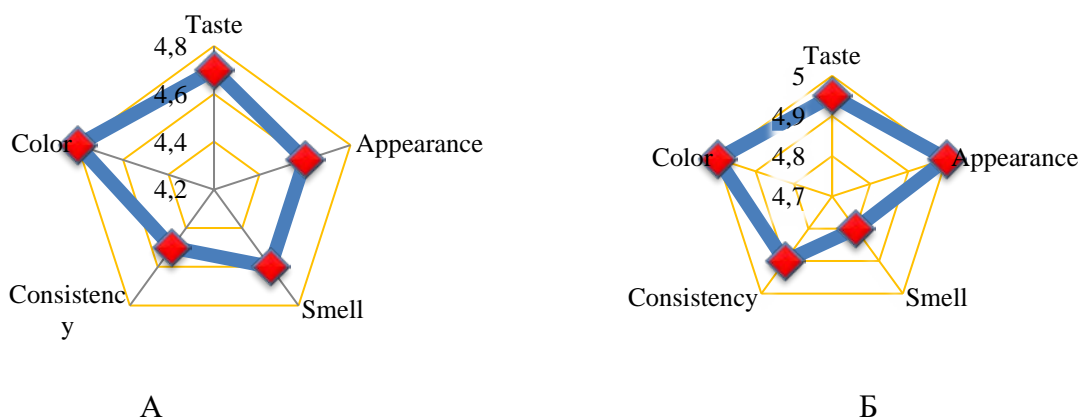


Figure 4-profilogram of organoleptic quality indicators of acid milk products, a-control sample; B-sample under study

The sour milk product, made on the basis of cow's milk, enriched with walnut shell extract, turned out to be a pleasant product in terms of organoleptic indicators. Both the taste and smell are pleasant sourmilk product. And the taste of this product was more distinctive, with a predominance of sweet taste. And the increase in the ratio of inulin in its composition – proves its prebiotic predominance. Figure 5 presents the data of the acid formation value of this product.

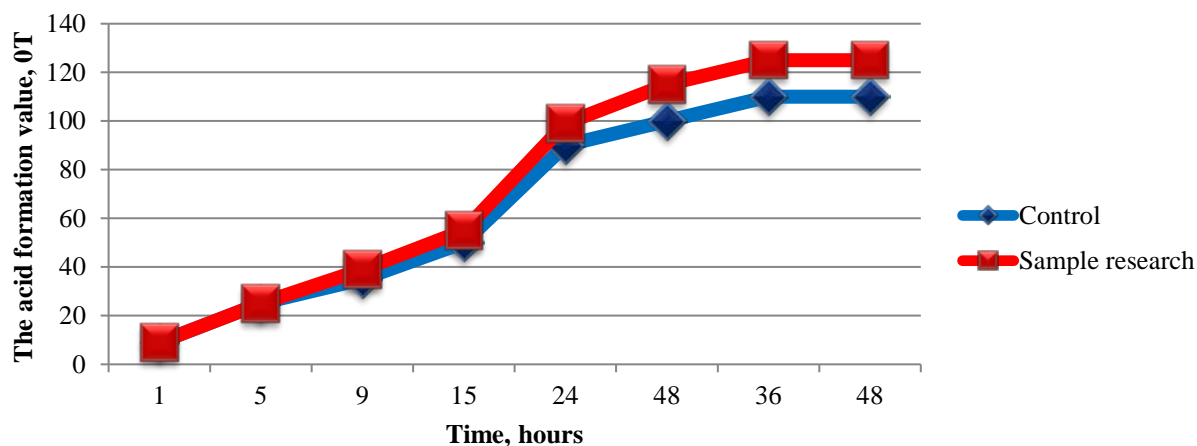


Figure 5-change in the acidity of titration, °T

According to the results of the study, the biochemistry of products was studied and the acidity of dairy products was determined by titration. In high – quality dairy products, Turner's degrees are acidic for a milk product in a volume of 120°T. This is the average calculation of the values of both probiotic drinks – equal to 122.5 °T.

Acid formation activity is an indicator of the specific activity of lactostructured probiotics and is based on the activity of the prebiotics it contains. Since the titrated acidity is higher than 120°t, we used *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*; *Lactobacillus acidophilus* strains - active. The data obtained as a result of the results show that most of the studied strains have good acid – forming abilities.

The moisture retention capacity of the acid milk product is centrifuged at 1000 rpm from a volume of 10 ml. This was done to check the activity of the clot contained in the Product (Figure 6).

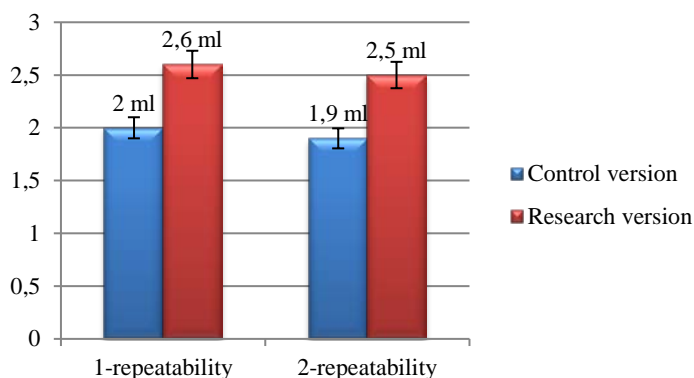


Figure 6 - results of the moisture-retaining capacity of a sour milk product enriched with walnut shell extract

The addition of walnut shell extract led to a decrease in the synergistic ability of the clot. According to the moisture – retaining capacity of the product-it has been proven that the clots of all products are active acid milk products. Based on the results of the moisture-retaining ability of all yeast, it was proved that the moisture-retaining ability of the research product prevails in comparison. This acid proves the importance of the milk product. Table 3 presents the microbiological indicator of this product.

Table 3-microbiological indicators of a sour milk product enriched with walnut shell extract

Name of indicators	Adjustable value of the indicator	Actual value / options for indicators	
		Control	Research version
Lactic acid bacteria CFU/cm ³ (g)	Allowed	2,2x10 ⁷	3,9x10 ⁸
GWGB (coliform)	0.1g not allowed	0,1	Not found
QMAFAnM CFU/cm ³ (g).	1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1x10 ³
Pathogenic m.o, including salmonella	10g not allowed	Not found	Not found
<i>E. coli</i>	1,0g not allowed	0,1	0,1
Yeasts, CFU/g	Not more than 100	Not found	Not found
<i>S. aureus</i> , CFU/g	1.0 g not allowed	Not found	Not found
Mold, CFU/g	Not more than 100	Not found	Not found

According to the results of this study, it can be seen that the number of lactic acid bacteria in the composition of an acid milk product enriched with walnut shell extract is higher than the average value, that is, about 2 times more than in the control version. The number of mesophilic aerobic facultative anerobic microorganisms was also met at a moderate level in Version 2. And pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms, yeast and mold fungi were not found.

Conclusion

In conclusion, enriched with walnut shell extract, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*; organoleptic, physico-chemical and microbiological indicators of the acid milk product with the addition of the prebiotic inulin, containing active strains of *Lactobacillus acidophilus*, were described in detail. This product is a sour milk product, pleasant in taste and smell, homogeneous in consistency. According to the biological composition – can be used as a functional product with a enriched mineral-vitamin composition, antioxidant properties.

By creating a new product on this technology – expanding the range of acid milk products, ways to effectively use plant waste in improving the health of the population were proposed, that is, the preparation of a new product on the basis of waste-free technology was described. At the

same time, this product has been prepared, which provides not only probiotic and prebiotic benefits, but also rich in mineral and vitamin composition, as well as antioxidant properties.

Funding

The work was carried out in the period 2021-2023 within the framework of the project funded by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan BR0764970-OT-21 "Use of non-traditional types of Walnut waste to obtain products with preventive properties".

In conclusion, we would like to express our gratitude to all participants of this scientific project for their participation in conducting experimental research and to the management and scientists of the Astana branch of Kaznii processing and food industry LLP.

References:

- 1 Yang J., Liu R. H., Halim L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *Food Science and Technology*, 2009, 42. № 1: P. 1-8. (DOI:10.1016/j.lwt.2008.07.007)
- 2 Amaral J. S. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 51(26): P. 76-82. (DOI: 10.1021/jf030451d)
- 3 Brown P. J., Leslie C. A., Dandekar A. *Juglans regia* Walnut. *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*, 2020, 55: P. 246. (DOI:10.1017/S0014479705213066)
- 4 Wei Q., Ma, X., Zhao Z., Zhang S., Liu S. Antioxidant activities and chemical profiles of pyrolytic acids from walnut shell. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2010, 88, 2: P. 149-154. (DOI:10.1016/j.jaap.2010.03.008)
- 5 Saleida A.M. Effect of adding green walnut husks on some qualitative properties of cooked sausages. *Food Science and Technology*, 2016, 65: P. 751-757. (DOI:10.1016/j.lwt.2015.08.069)
- 6 Abdulzhanova M., Kistaubaeva, A., Ignatova, L., Zhantlesova, S., Kabykenova, A., & Sobkhi-el-Sohaimi. (2023). Poluchenie jogurta na osnove suhogo kobyl'ego moloka, obogashchennogo probioticheskimi mikrokapsulami. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya*, 2(41), 96–123. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2023.02.06>)
- 7 Abitaeva, G., Sarmurzina, Z., Bisenova, G., Musabaeva, B., & Tultabaeva, T. (2022). Harakteristika shtammov probiotikov dlya razrabotki napitkov profilakticheskogo naznacheniya. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya*, 4(39), 141-151. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2022.04.11>)
- 8 Zabihi M., Ahmadpour A., Asl A. H. Removal of mercury from water by carbonaceous sorbents derived from walnut shell. *Journal of Hazardous materials*, 2009, 167, 1-3: C. 230-236. (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.12.108)
- 9 Queiros C. S., Cardoso S., Lourenco A., Ferreira J., Miranda I., Lourenço M., Pereira H. Characterization of walnut, almond, and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2020, 10, 1: C. 175-188. (DOI:10.1007/s13399-019-00424-2)
- 10 GOST 32874-2014 "Orekhii greckie. Tekhnicheskie usloviya." – M.: Standartinform, 2014. – 15 s.
- 11 Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.1.1090-02 "Opredelenie joda v vode". – M.: 2002.
- 12 GOST 26573.2-2014 "Premiksy. Metody opredeleniya marganca, medi, zheleza, cinka, kobal'ta". – M.: Standartinform, 2014. – 20 s.
- 13 MVI.MN 1363-2000 Metod opredeleniya aminokislot v produktah pitaniya s pomoshch'yu vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. Minzdrav Respubliki Belarus'. Minsk: 2000. - 24 s.
- 14 GOST R 57990-2017. Produktiya pishhevaya specializirovannaya, biologicheski aktivnye dobavki k pishche. Metod opredeleniya kvercetina. – M.: Standartinform, 2017. – 12 s.
- 15 GOST ISO 14502-2-2015. Metod opredeleniya soderzhaniya katekhinov. – M.: Standartinform, 2015. – 20 s.
- 16 GOST 33951-2016 Moloko i molochnaya produktiya Metody opredeleniya molochnokislykh mikroorganizmov. – M.: Standartinform, 2016. – 13 s.
- 17 GOST 3624-92. Moloko i molochnye produkty. Titrimetricheskie metody opredeleniya kislotnosti. – M.: Izd-vo standartov, 2001. – 10 s.
- 18 GOST 32901-2014. Moloko i produkty, pererabotki moloka. Metody mikrobiologicheskogo analiza. – M.: Standartinform, 2015. – 27 s.

MPHTI: 34.27.19, 62.09.39, 65.63.03, 65.63.33

Г.Н. БИСЕНОВА^{1*}, З.С. САРМУРЗИНА¹, Г.К. АБИТАЕВА¹, Б.К. МУСАБАЕВА¹,
Е.Н. НАЙМАНОВ², Ж.Б. ТЕКЕБАЕВА¹

¹Республиканская коллекция микроорганизмов, Астана, Казахстан

²Астана-Өнім, Астана, Казахстан

*e-mail: bisseanova84@mail.ru

РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУР ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.10

Аннотация

Пищевая промышленность является одной из стратегических отраслей в развивающихся странах и играет важнейшую роль в экономике, продовольственной безопасности и общественном здравоохранении. Разработка пробиотических рецептур пищевых продуктов является ключевым направлением для будущего рынка функциональных продуктов питания. Целью настоящего исследования являлась разработка рецептуры профилактических напитков на основе молока и молочной сыворотки с использованием витаминов, минералов, пребиотиков и пробиотиков, изучение их органолептических, физико-химических, микробиологических показателей и пищевой безопасности.

В результате работы были разработаны три вариации рецептур по каждому профилактическому напитку, среди которых был отобран вариант №3 с высокими органолептическими и технологическими показателями.

В качестве пробиотической закваски использован консорциум молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* 1A B-RCM 0947, *Lactobacillus paracasei* 2A B-RCM 0948, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RCM 0610, обладающих антимикробной активностью в отношении условно-патогенных бактерий. В качестве пребиотической добавки использованы инулин и пектин, для обогащения использованы витамины А, С, В2, минералы йодид калия и магний (Sigma, USA).

Изучена пищевая безопасность профилактических напитков №1 и №2 на наличие условно-патогенных микроорганизмов - энтерококков, золотистого стафилококка, колиформ, сальмонелл, кишечной палочки, листерий, дрожжей, грибов. В результате оценки пищевой безопасности выявлено отсутствие роста условно-патогенной микрофлоры на диагностических средах. Определены физико-химические свойства профилактических напитков №1 и №2 - массовая доля жира, белка, СОМО, лактозы, воды, кислотность, плотность и их соответствие нормативному документу. Для сохранения и определения сроков профилактических напитков изучена жизнеспособность пробиотических микроорганизмов при хранении при +4°C в течение 30 суток. В результате исследуемые профилактические напитки содержат в своем составе соответствующее количество пробиотических молочнокислых бактерий $1,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл, а также установлен рекомендуемый срок хранения для профилактического напитка №1 – до 30 суток, для профилактического напитка №2 – до 7-10 суток.

Ключевые слова: рецептура, профилактический напиток, пробиотики, молоко, молочная сыворотка.

На сегодняшний день одним из основных направлений в области здорового питания является создание инновационной технологии приготовления кисломолочных продуктов (напитков) профилактического значения, обогащенных минеральными веществами и витаминами, пробиотиками и пребиотиками. Перспективным направлением в пищевой промышленности является разработка и создание новых видов натуральных напитков, обладающих функционально-технологическими свойствами, повышенной пищевой и биологической ценностью [1].

Динамично развивающийся рынок функциональных продуктов питания и необходимость обеспечения все более привлекательного ассортимента предусматривает

разработку новых продуктов, богатых пребиотиками, полифенолами, минералами, витаминами, полноценными белками или незаменимыми полиненасыщенными жирными кислотами [2].

Разработка пищевых рецептур с пробиотиками и витаминами является ключевой областью исследований для будущего рынка функциональных продуктов питания. Согласно экономическим прогнозам, мировой рынок пищевых добавок с пробиотиками вырастет с 3,3 до 7 миллиардов долларов в период с 2015 по 2025 год [3]. Было установлено, что различные пробиотики проявляют оздоровительные свойства, нормализуют нарушенную микробиоту кишечного тракта, подавляют патогенов, обладают гипополидемическим, антитератогенным и антиоксидантным потенциалом [4, 5], а также иммунологическим эффектом и продукцией биоактивных соединений [6].

Выбор пробиотических штаммов основан на их безопасности, функциональности и технологической пригодности [7, 8]. Популярные пробиотические штаммы включают бактерии из рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Enterococcus* [9]. Пробиотики определяются как «живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина» [10, 11].

Для профилактики развития витаминных и минеральных дефицитных состояний рекомендуется использовать витаминно-минеральные добавки [12]. Для увеличения биологической и пищевой ценности в напитки необходимо добавлять витамины, белки, растительные экстракты лекарственных растений с высокими антиоксидантными свойствами [13].

Следовательно, введение биоактивных добавок в рецептуры кисломолочных продуктов позволяет получить продукты с более высокой пищевой ценностью и биодоступностью ингредиентов.

Таким образом, приоритетным направлением в создании кисломолочных продуктов (напитков) профилактического значения являются исследования по созданию комбинированных продуктов на молочной основе с направленно заданным составом и свойствами. При создании комбинированных кисломолочных продуктов (напитков) осуществляют корректировку минерального и витаминного состава, а также придают продуктам лечебно-профилактические свойства за счет включения в их состав активных пробиотических штаммов.

Целью данной работы являлась разработка рецептуры профилактических напитков на основе коровьего молока и молочной сыворотки с использованием витаминов, минералов, пребиотиков и пробиотиков.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили профилактический напиток №1 на основе молока и профилактический напиток №2 на основе молочной сыворотки, обогащенные пробиотическими бактериями рода *Lactobacillus*, витаминами, минеральными веществами и пребиотиком.

Для получения профилактического напитка №1 на основе молока и профилактического напитка №2 на основе молочной сыворотки использовали консорциум пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* 1A B-RCM 0947, *Lactobacillus paracasei* 2A B-RCM 0948, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RCM 0610. Отбор штаммов консорциума осуществлялся путем скрининга выделенных и коллекционных штаммов молочнокислых бактерий Республиканской коллекции микроорганизмов по пробиотическим свойствам [14].

В результате работы разработаны несколько вариантов рецептур двух профилактических напитков №1 и №2. Для определения подходящей рецептуры профилактического напитка на основе молока и молочной сыворотки были проведены исследования потребительских характеристик напитков с разными дозами внесенных витаминов, минералов и пребиотиков. В итоге были разработаны 3 композиции по каждому

напитку, контролем служили 2 варианта (с внесением закваски и без внесения закваски). Инкубацию напитков проводили при +37°C в термостате, в течение 6-9 часов.

Для оценки пищевой безопасности профилактических напитков №1 и №2 использовали селективные хромогенные среды, произведенные компанией Nissui Pharmaceutical Co., Ltd (Япония). Высев проводили из свежеприготовленных профилактических напитков на чашки Петри с питательными средами, содержащими тестовые штаммы Compact Dry: энтерококки (ETC), золотистый стафилококк (X-SA), колиформ (CF), сальмонелла (SL), кишечная палочка и колиформ (EC), листерии (LS), дрожжи и грибы (YM).

Кислотообразующую активность молочнокислых бактерий и консорциумов определяли методом Тернера [15]. Для испытания молочных напитков на наличие патогенной микрофлоры использованы селективные и хромогенные среды Compact Dry [16-17].

Определение органолептических и физико-химических показателей качества и безопасности напитков проводили в соответствии с действующими государственными стандартами [18-19].

Результаты и обсуждение

Для испытаний профилактического напитка №1 на основе молока использованы витамины А, С, В2, минералы йодид калия, магний (Sigma, USA) и два пребиотика инулин и пектин. Добавление витаминов и минералов рассчитано в соответствии с ГОСТ 32252-2013 [18].

Таблица 1 – Вариация рецептуры профилактического напитка №1 на основе молока

Состав	Норма	Вар.1	Вар.2	Вар.3	Контроль 1	Контроль 2
Консорциум: <i>L. casei</i> 1А, <i>L. paracasei</i> 2А, <i>L. brevis</i> 4 LB	3-5%, 10 ⁷ КОЕ/мл	3%	3%	3%	3%	-
Пребиотик Пектин	до 5%	5%	5%	-	-	-
Пребиотик Инулин	до 5%	5%	-	5%	-	-
Витамин А, мг/л:	0,5-1,0	0,5	-	0,5	-	-
Витамин С, мг/л:	50-120	50	-	50	-	-
Витамин В2, мг/л:	1,0-2,5	-	1	-	-	-
Йодид калия, мг/л	0,14±0,03	-	-	0,14±0,03	-	-
Магний, мг/л	1,2	-	1,2	-	-	-
Молоко натуральное	До 100%	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл
Кислотность, °Т, не более	70	70	70	70	-	-

Варианты рецептур профилактического напитка №2 на основе молочной сыворотки представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Вариация рецептуры профилактического напитка №2 на основе молочной сыворотки

Состав	Норма	Вар.1	Вар. 2	Вар.3	Контроль 1	Контроль 2
1	2	3	4	5	6	7
Консорциум: <i>L. casei</i> 1А, <i>L. paracasei</i> 2А, <i>L. brevis</i> 4 LB	3 %, 10 ⁷ КОЕ/мл	3 %	3 %	3 %	3 %	-
Пребиотик Пектин	до 5%	5%	5%	-	-	-
Пребиотик Инулин	до 5%	5%	-	5%	-	-

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
Витамин А, мг/л:	0,5-1,0	0,5	-	0,5	-	-
Витамин С, мг/л:	50-120	50	-	50	-	-
Витамин В2, мг/л:	1,0-2,5	-	1	-	-	-
Йодид калия, мг/л	0,14±0,03	-	-	0,14	-	-
Магний, мг/л	1,2	-	1,2	-	-	-
Сыворотка молочная	До 100%	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл
Кислотность, °Т, не более	50-90 °Т.	50-90	50-90	50-90	-	-

Далее, определены показатели качества напитков: органолептические свойства, активность сквашивания, рН, кислотность разрабатываемых напитков профилактического назначения №1 и №2 на основе коровьего молока и молочной сыворотки в лабораторных условиях (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели качества профилактических напитков №1 и №2

Варианты	Органолептические свойства	Время (ч)	рН	Кислотность, °Т
Профилактический напиток №1 на основе молока				
Вариант 1	Цвет желтый, вкус кисломолочный с приятным привкусом, консистенция слегка вязкая, осадок нерастворимый	6-7	5,8	38
Вариант 2	Цвет желтый, вкус приятный кисломолочный, консистенция слегка вязкая, осадок нерастворимый	6	5,0	40
Вариант 3	Цвет молочный белый, вкус кисломолочный, консистенция слегка вязкая	6	5,5	38
Контроль 1	Цвет молочный, вкус кисломолочный, консистенция слегка вязкая	6	5,0	38
Контроль 2	Цвет молочный, консистенция жидкая.	6	5,0	40
Профилактический напиток №2 на основе молочной сыворотки				
Вариант 1	Цвет желтый, вкус кислый, консистенция жидкая, осадок нерастворимый	6-7	4,5	54
Вариант 2	Цвет ярко-желтый, вкус кислый, консистенция жидкая, осадок нерастворимый	6	4,5	52
Вариант 3	Цвет молочный, вкус кислый, консистенция жидкая	6	4,5	54
Контроль 1	Цвет светло-зеленый, вкус кислый, консистенция жидкая	6	4,0	60
Контроль 2	Цвет молочный, консистенция жидкая.	6	4,5	54

Анализируя данные таблиц №1-3, отмечено, что добавление в рецептуру профилактических напитков №1 и №2 пребиотика пектина вызывает нерастворимый осадок, и добавление витамина В2 придает напиткам желтоватую окраску. В связи с этим, дальнейшее добавление и использование перечисленных ингредиентов в технологических и коммерческих целях, является нецелесообразным. Таким образом, в исследуемых вариантах рецептов профилактических напитков №1 и №2 был отобран вариант 3, наиболее подходящий по цвету и внешнему виду продукта.

Исследуя органолептические свойства, активность сквашивания, рН, кислотность разрабатываемых различных вариантов профилактического напитка №1, отобран вариант

№3, имеющий следующие пищевые и дегустационные характеристики: молочно-белый цвет, кисломолочный вкус, слегка вязкую консистенцию, рН 5,5, кислотность 38, активность (время) сквашивания 6-7 часов. Аналогично, по вышеперечисленным характеристикам разрабатываемых различных вариантов профилактического напитка №2, отобран вариант №3, имеющий следующие пищевые и дегустационные характеристики: молочно-белый цвет, кислый вкус, жидкую консистенцию, рН 4,5, кислотность 54, активность (время) сквашивания 6 часов.

Таким образом, для дальнейших исследований по технологическим параметрам отобран вариант 3 профилактического напитка №1 и вариант 3 профилактического напитка №2, состоящий из стартовых пробиотических культур молочнокислых бактерий (консорциум *Lactobacillus casei* 1A, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus brevis* 4 LB), обогащенных инулином, витаминами (А, С) и минералом (йодидом калия).

Однообразное или несбалансированное питание может привести к недостатку того или иного витамина, что в последующем может повлечь нарушение обмена веществ и возникновение различных заболеваний. Поэтому важно знать усредненные величины, необходимые для поступления с пищей или в виде биологически активных добавок, обеспечивающие оптимальную реализацию физиолого-биохимических процессов, закрепленных в генотипе человека. Следует отметить, что суточные нормы потребления витаминов весьма приблизительны и условны, рассчитаны на усредненного человека.

Исходя из того, что физиологическая потребность (для взрослых) в сутки витамина С не более 50-100 мг, витамина А не более 1,0-1,6 мг кг и йодсодержащих продуктов не более 290 мкг, определена максимальная доза напитков профилактического назначения – не более 500 мл в сутки.

Исследование оценки пищевой безопасности показало отсутствие роста условно-патогенной микрофлоры на диагностических средах - энтерококков, золотистого стафилококка, колиформ, сальмонеллы, кишечной палочки, листерий, дрожжей и грибов.

Органолептические показатели профилактических напитков зависят от качества сырья, технологии, вида и качества молочнокислых микроорганизмов, добавок и хранения. Определение органолептических показателей профилактических напитков проводили совместно с сотрудниками АО «Астана-Өнім» по показателям - внешний вид, консистенция, вкус, запах и цвет (таблица 4). Объем образцов профилактических напитков №1 и №2 составлял по 1000 мл.

Таблица 4 – Органолептические свойства профилактических напитков

Наименование показателей	Профилактический напиток №1	Профилактический напиток №2
Внешний вид и консистенция	Консистенция слегка вязкая, однородная масса с крупцами. Наблюдается отделение сыворотки.	Жидкая консистенция Однородная жидкость.
Вкус и запах	Вкус и запах кисломолочный	Вкус и запах свойственный молочной сыворотке (кисловатый)
Цвет	Молочно-белый, слегка кремового цвета	Цвет бледно-зеленый

Подводя итоги изучения таблицы 4, отметим, что профилактические напитки соответствуют нормативным документам. Профилактический напиток №1 имеет следующие органолептические свойства: консистенция слегка вязкая, однородная масса с крупцами, наблюдается отделение сыворотки, вкус и запах кисломолочный, молочно-белого цвета, слегка кремового. Профилактический напиток №2 имеет следующие органолептические свойства: жидкая консистенция, однородная жидкость, вкус и запах свойственный молочной сыворотке (кисловатый), цвет бледно-зеленый.

Пищевая ценность включает содержание основных химических веществ, степень их усвоения, вкусовые качества, безвредность.

Определение физико-химических показателей проведено на анализаторе молока «Эксперт профи» в аккредитованной лаборатории РГП «Центр санитарно-эпидемиологической экспертизы» Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан. Результаты лабораторных испытаний проведены согласно СТ РК 2069-2015 «Продукты кисломолочные. Общие технические условия» и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», утв. решением Совета ЕЭК от 09.10.2013 г., №67, ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», утв. решением Комиссии ТС от 09.12.2011 г. №88 по показаниям безопасности. Условия проведения испытаний: влажность - 23,0% и температура - 22,73-24,63°C (таблицы 5, 6).

Таблица 5 - Физико-химические свойства профилактического напитка №1

Наименование показателей	Результаты исследования	Основные показатели согласно нормативной документации*	Нормативная документация на методы испытаний
Массовая доля жира, %, не менее	3,74	0,1-9,9*	СТ РК 1733
Массовая доля СОМО, %	8,37	не менее 7,8*	СТ РК 1733
Кислотность, °Т	70,0	70-140*	СТ РК 1733
Плотность, кг/м ³	1,02849	-	СТ РК 1733
Массовая доля белка, %	3,18	2,6-4,0*	СТ РК 1733
Массовая доля лактозы, %	4,46	-	СТ РК 1733
Массовая доля солей, %	0,71	-	СТ РК 1733
Точка замерзания, °С	0,522	-	СТ РК 1733
Массовая доля воды, %	0,0	-	СТ РК 1733
Проводимость, (Ms/cm) (Фальсификация)	5,78	-	СТ РК 1733
Температура пробы, °С	24,63	-	СТ РК 1733

Согласно таблице 5, основные физико-химические показатели профилактического напитка №1 соответствуют нормативному документу СТ РК 1733-2015 на вид продукта «Кисломолочные продукты, кроме йогурта, сметаны, творога, в том числе продукты с бифидобактериями и другими пробиотическими микроорганизмами». Основные физико-химические показатели профилактического напитка №1: жир - 3,74%, белок – 3,18%, кислотность – 70°Т, СОМО (сухой обезжиренный молочный остаток) – 8,37%.

Таблица 6 - Физико-химические свойства профилактического напитка №2

Наименование показателей	Результаты исследования	Основные показатели согласно нормативной документации*	Нормативная документация на методы испытаний
1	2	3	4
Массовая доля жира, %, не менее	1,39	0,1-9,9*	СТ РК 1733
Массовая доля СОМО, %	9,57	не менее 7,8*	СТ РК 1733
Кислотность, °Т	80	70-140*	СТ РК 1733
Плотность, кг/м ³	1,03508	-	СТ РК 1733
Массовая доля белка, %	3,65	2,6-4,0*	СТ РК 1733

Продолжение таблицы 6

1	2	4	5
Массовая доля лактозы, %	5,13	-	СТ РК 1733
Массовая доля солей, %	0,80	-	СТ РК 1733
Точка замерзания, °C	0,59	-	СТ РК 1733
Массовая доля воды, %	0,0	-	СТ РК 1733
Проводимость, (Ms/cm) (Фальсификация)	9,09	-	СТ РК 1733
Температура пробы, °C	22,73	-	СТ РК 1733

Согласно таблице 6, основные физико-химические показатели профилактического напитка №2 соответствуют нормативному документу СТ РК 1733-2015 на вид продукта «Кисломолочные продукты, кроме йогурта, сметаны, творога, в том числе продукты с бифидобактериями и другими пробиотическими микроорганизмами». Основные физико-химические показатели профилактического напитка №2: жир – 1,39%, белок – 3,65%, кислотность – 80°Т, СОМО (сухой обезжиренный молочный остаток) – 9,57%.

Исследование микробиологических свойств профилактических напитков проведены в асептических условиях и с соблюдением рецептуры приготовления. Для определения содержания молочнокислых бактерий использовали метод определения жизнеспособных пробиотических бактерий при температуре +37°С – 12-16 часов (таблица 7).

Таблица 7 – Содержание пробиотических молочнокислых бактерий в исследуемых профилактических напитках

Наименование	Пробиотические молочнокислые бактерии, КОЕ/ мл	
	Норма по НД*	Результаты
Профилактический напиток №1	1x10 ⁶	1x10 ⁷
Профилактический напиток №2	1x10 ⁶	1x10 ⁷

*Межгосударственный стандарт 32923-2014 Продукты кисломолочные, обогащенные пробиотическими микроорганизмами

Как видно из таблицы 7, профилактические напитки №1 и №2 содержат в своем составе соответствующее количество пробиотических молочнокислых бактерий.

Далее проведено определение количества клеток пробиотических микроорганизмов в профилактических напитках в течение месяца при хранении при +4°С.

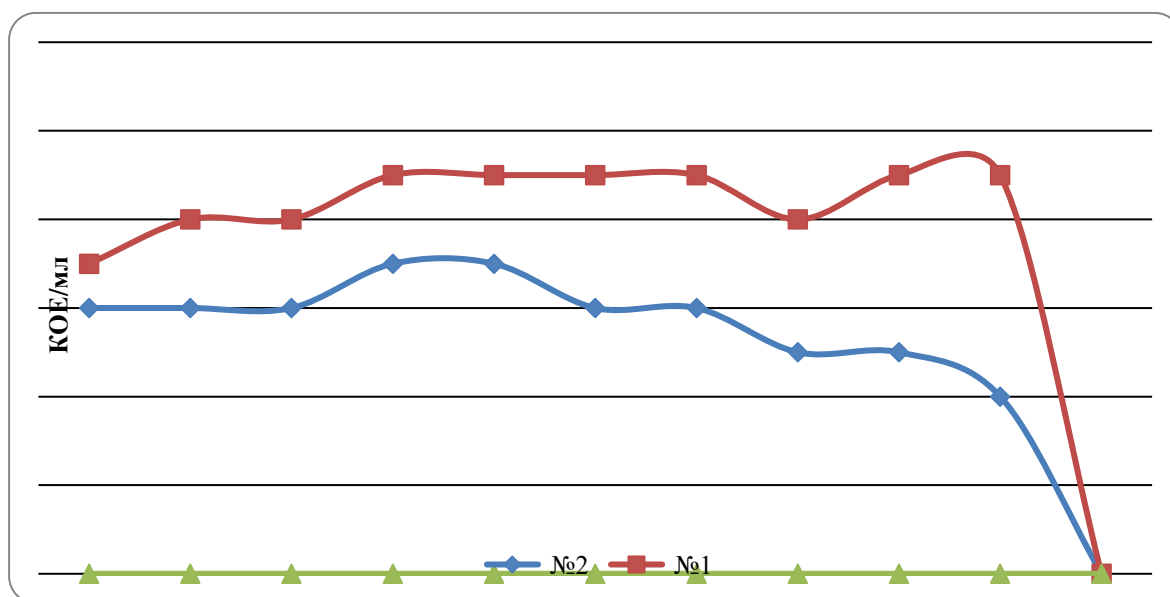


Рисунок 1 – Определение количества клеток пробиотических микроорганизмов в профилактических напитках в течение 30 суток, Log КОЕ/мл

Как видно из рисунка 1, определение количества клеток пробиотических микроорганизмов в профилактических напитках в течение месяца зависит от длительности хранения. Так, в профилактическом напитке №1 наблюдается наибольший прирост количества пробиотических бактерий до 10^9 КОЕ/мл на 5 сутки и сохраняется до 30 суток хранения. Напротив, в профилактическом напитке №2 прирост клеток также наблюдается на 5 сутки, но постепенно снижается после 7 суток хранения.

Таким образом, анализируя данные по определению количества клеток пробиотических микроорганизмов, рекомендуемый срок хранения профилактического напитка №1 – до 30 суток, профилактического напитка №2 – 7-10 суток при температуре хранения не более $+4^{\circ}\text{C}$.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что выбранные рецептуры по получению профилактических напитков на основе молока и молочной сыворотки с добавлением витаминов, минералов и пребиотика не влияют на органолептические свойства и на количество жизнеспособных пробиотических молочнокислых бактерий в разработанных продуктах.

Разработанные профилактические напитки будут полезны для профилактики витаминной недостаточности у людей направленных на обеспечение организма в витаминах их поступлением с пищей. Высокая распространенность среди населения полигиповитаминозных состояний служат основанием для применения обогащенных комплексом витаминов пищевых продуктов. Для поддержания витаминного статуса в рацион целесообразно включать пищевые продукты, обогащенные комплексом микронутриентов, в т. ч. в форме молочных напитков, что повышает их эффективность для оптимизации витаминного и минерального статуса.

Финансирование

Работа выполнена в рамках финансирования Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан (№ BR 10764998).

Литература:

1 Вобликова Т.В., Буеракова Д.Ю., Трубина И.А. Перспективы развития рынка молочных продуктов с функциональными свойствами. Проблемы и перспективы повышения продуктивных и племенных качеств сельскохозяйственных животных: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции, посвящённой 75-летию Героя социалистического Труда, академика РАСХН, доктора сельскохозяйственных наук, профессора В.А. Мороза. Ставрополь: Изд-во «АГРУС», 2012, 287-289. (<https://cyberleninka.ru/article/n/rynok-moloka-i-molochnoy-produktsii-problemy-i-perspektivy-razvitiya/viewer>)

2 Dzyuba N., Valevskaya L., Atanasova V., Sokolovskaya A. Elaboration of the recipe of the fermented milk dessert for child food. *Eureka Life Sci.*, 2017, 4: 3–9. (<https://journal.eu.jr.eu/life/article/view/371>)

3 Terpou A., Papadaki A., Lappa IK., Kachrimanidou V., Bosnea LA., Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, 2019, 11 (32):1591 (doi: 10.3390/nu11071591)

4 Soni R., Jain NK., Shah V., Soni J., Suthar D., Gohel P. Development of probiotic yogurt: effect of strain combination on nutritional, rheological, organoleptic and probiotic properties. *J Food Sci Technol.*, 2020, 57: 2038–2050 (doi: 10.1007/s13197-020-04238-3)

5 Singh Narayan K., Gaurkhede S, Sharma V, Kumar A, Bhushan B, Mishra V. Technological and Functional Assessment of Riboflavin Enriched Probiotic SoyCurd. *Fermentation*, 2021, 7 (2): 47 (doi: 10.3390/fermentation7020047)

6 Scourboutakos MJ, Franco-Arellano B, Murphy SA, Norsen S, Comelli EM, L'Abbe´ MR. Mismatch between probiotic benefits in trials versus food products. *Nutrients*, 2017, 9(4):400 (doi: 10.3390/nu9040400)

7 Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11(8): 506-514 (doi:10.1038/nrgastro.2014.66)

8 Quinto E., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J., Gírbés T. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr. Sci.*, 2014, 5 (18): 1765-1775 (doi: 10.4236/fns.2014.518190)

9 Szajnar K., Pawlos M., Znamirska A. The Effect of the Addition of Chokeberry Fiber on the Quality of Sheep's Milk Fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lact. Acidophilus* // *Int. J. Food Sci.* – 2021. -№7928745. (doi: 10.1155/2021/7928745)

10 Organization FaAOaWH, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002, P.1–11.

11 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11 (8): 506–514 (doi: 10.1038/nrgastro.2014.66)

12 Калинин В. М. Актуальные вопросы питания: витамины и минеральные вещества при занятиях физической культурой и спортом. Томск: Изд-во Томского государственного педагогического университета, 2008. (<https://www.dissercat.com/content/razrabotka-produktov-sportivnogo-pitaniya-na-osnove-molochnoi-syvorotki>)

13 Колотий Т.Б. Функциональные напитки на основе молочной сыворотки и фруктов дикорастущих растений. Адыгейский сыр: история, традиции, инновации: материалы Международной научно-практической конференции. Майкоп: МГТУ, 2019, 95-97. (<https://doi.org/10.47370/2072-0920-2021-17-2-33-39>)

14 Абиатаева Г., Сармурзина З., Бисенова Г., Мусабаева Б., Тултабаева Т. Характеристика штаммов пробиотиков для разработки напитков профилактического назначения. *Микробиология және вирусология*, 2022, №4 (39): 141-151 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)

15 Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Li K., Shaikhin S, Saduakhassova S, Kushugulova A, Marotta F. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods. *Asian J. Applied Sci.*, 2016, 9: 143-158 (doi:10.3923/ajaps.2016.143.158)

16 Ioana D. Olaru, Wael Elamin, Mutsawashe et all. Evaluation of the InTray and Compact Dry culture systems for the diagnosis of urinary tract infections in patients presenting to primary health clinics in Harare, Zimbabwe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2021, 40 (12): 2543-2550 (doi: 10.1007/s10096-021-04312-4)

17 Shingo Mizuochi, Maria Nelson Matrix Extension Study: Validation of Compact Dry YM for Enumeration of Yeast and Mold in Selected Foods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2016. 99 (3): 695–704 (doi:10.5740/jaoacint.16-0059)

18 Сыворотка молочная. Технические условия. ГОСТ 53438-2009, Москва, 2010. (<https://files.stroyinf.ru/Data/486/48685.pdf>)

19 Молоко питьевое для питания детей дошкольного и школьного возраста. Технические условия. ГОСТ 32252-2013, Москва, 2019. (<https://files.stroyinf.ru/Data/558/55861.pdf>)

Г.Н. БИСЕНОВА^{1*}, З.С. САРМУРЗИНА¹, Г.К. АБИТАЕВА¹, Б.К. МУСАБАЕВА¹,
Е.Н. НАЙМАНОВ², Ж.Б. ТЕКЕБАЕВА¹

¹Республикалық микроорганизмдер коллекциясы, Астана, Қазақстан

²Астана-Өнім, Астана, Қазақстан

*e-mail: bissenova84@mail.ru

СҮТ МЕН САРСЫТУ НЕГІЗІНДЕГІ АЛДЫН АЛУ СУСЫНДАР ФОРМУЛАСЫН ӘЗІРЛЕУ ЖӘНЕ ОНЫҢ ҚАСИЕТТЕРІН АНЫҚТАУ

Түйін

Тамақ өнеркәсібі дамушы елдердегі стратегиялық салалардың бірі болып табылады және экономикада, азық-түлік қауіпсіздігінде және халықтың денсаулығында маңызды рөл атқарады. Пробиотикалық тағамдық құрамдарды дамыту функционалдық азық-түлік нарығының болашағы үшін басты бағыт болып табылады. Бұл зерттеудің мақсаты витаминдерді, минералдарды,

пробиотиктерді және пробиотиктерді пайдалана отырып, сүт пен сарысу негізіндегі профилактикалық сусындардың формуласын жасау, олардың органолептикалық, физико-химиялық, микробиологиялық қасиеттерін және тағам қауіпсіздігі зерттеу жүргізілді.

Жұмыстың нәтижесінде әрбір профилактикалық сусын үшін рецепттердің үш вариациясы әзірленді, олардың ішінде органолептикалық және технологиялық көрсеткіштері жоғары №3 нұсқа таңдалды.

Шартты патогенді бактерияларға қарсы микробқа қарсы белсенділігі бар *Lactobacillus casei* 1A B-RCM 0947, *Lactobacillus paracasei* 2A B-RCM 0948, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RCM 0610 сүт қышқылы бактерияларының консорциумы қолданылды. Пребиотикалық қоспа ретінде инулин мен пектин, байыту үшін А, С, В2 витаминдері, калий йодиді мен магний минералдары қолданылды (Sigma, USA).

Шартты патогенді микроорганизмдердің – энтерококктардың, алтын түстес стафилококктардың, таяқшалардың, сальмонеллалардың, ішек таяқшаларының, листериялардың, ашытқылардың, саңырауқұлақтардың болуына №1 және №2 профилактикалық сусындардың тағамдық қауіпсіздігі зерттелді. Азық-түлік қауіпсіздігін бағалау нәтижесінде диагностикалық ортада шартты патогенді микрофлораның өсуінің жоқтығы анықталды. №1 және №2 профилактикалық сусындардың физико-химиялық қасиеттері – майдың, ақуыздың, ҚМСҚ, лактозаның, судың, қышқылдықтың, тығыздықтың массалық үлесі және олардың ҚР СТ 1733-2015 нормативтік құжатына сәйкестігі анықталды. Профилактикалық сусындарды сақтау және қабылдау мерзімін анықтау үшін 30 күн бойы +4°C температурада сақтау кезінде пробиотикалық микроорганизмдердің өміршеңдігі зерттелді.

Нәтижесінде зерттелген профилактикалық сусындардың құрамында пробиотикалық сүт қышқылы бактерияларының тиісті мөлшері $1,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл, соның ішінде №1 профилактикалық сусын үшін ұсынылатын сақтау мерзімі 30 күнге дейін, №2 профилактикалық сусын үшін жарамдылық мерзімі 7-10 күн аралығын қамтиды.

Кілтті сөздер: рецепт, профилактикалық сусын, пробиотиктер, сүт, сүт сарысуы.

IRSTI:34.27.19, 62.09.39, 65.63.03, 65.63.33

G.N. BISSENOVA*¹, Z.S. SARMURZINA¹, G.K. ABITAYEVA¹, B.K. MUSSABAYEVA¹,
E.N. NAIMANOV², J.B. TEKEBAYEVA¹

¹Republican collection of microorganisms, Astana, Kazakhstan

²Astana-Onim, Astana, Kazakhstan

*e-mail: bissenova84@mail.ru

DEVELOPMENT OF RECIPES FOR PROPHYLACTIC MILK AND WHEY-BASED DRINKS AND DETERMINATION OF THEIR PROPERTIES

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.10

Abstract

The food industry is a strategic industry in developing countries and plays a critical role in the economy, food security and public health. The development of probiotic food formulations is a key area for the future market of functional foods. The aim of this study was to develop a recipe for preventive milk and whey-based drinks using vitamins, minerals, prebiotics and probiotics and to study their organoleptic, physico-chemical, microbiological properties and food safety.

As a result of the work, three variations of recipes were developed for each preventive drink, among which option №3 with high organoleptic and technological indicators was selected.

A consortium of lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* 1A B-RCM 0947, *Lactobacillus paracasei* 2A B-RCM 0948, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RCM 0610, which have antimicrobial activity against opportunistic bacteria, was used as a probiotic starter. Inulin and pectin were used as a prebiotic supplement, vitamins A, C, B2, minerals potassium iodide and magnesium were used for enrichment (Sigma, USA).

The food safety of prophylactic drinks №1 and №2 for the presence of opportunistic microorganisms - enterococci, *Staphylococcus aureus*, coliforms, salmonella, *Escherichia coli*, listeria, yeast, fungi was

studied. As a result of the food safety assessment, the absence of growth of opportunistic microflora on diagnostic media was revealed. The physicochemical properties of prophylactic drinks №1 and №2 were determined - the mass fraction of fat, protein, DSMR, lactose, water, acidity, density and their compliance with the regulatory document. To preserve and determine the timing of prophylactic drinks, the viability of probiotic microorganisms was studied during storage at +4°C for 30 days. As a result, the investigated preventive drinks contain in their composition the appropriate amount of probiotic lactic acid bacteria 1.0×10^6 - 1.0×10^7 CFU/ml, and the recommended shelf life for prophylactic drink №1 is up to 30 days, for prophylactic drink №2 - up to 7- 10 days.

Keywords: formulation, prophylactic drink, probiotics, milk, whey.

Today, one of the main trends in the field of healthy nutrition is the creation of innovative technologies for the preparation of dairy products (drinks) of preventive value, enriched with minerals and vitamins, probiotics and prebiotics. A promising direction in the food industry is the development and creation of new types of natural beverages with functional and technological properties and increased nutritional and biological value [1].

The dynamic market for functional foods and the need for an increasingly attractive product range calls for the development of new products rich in prebiotics, polyphenols, minerals, vitamins, complete proteins or essential polyunsaturated fatty acids [2].

The development of food formulations with probiotics and vitamins is a key area of research for the future market for functional foods. According to economic projections, the global market for probiotic food supplements is expected to grow from \$3.3 billion to \$7 billion between 2015 and 2025 [3]. Various probiotics have been found to exhibit health-promoting properties, normalise impaired gut microbiota, inhibit pathogens, have hypolipidemic, antitumorogenic and antioxidant potential [4-5], as well as immunological effects and the production of bioactive compounds [6].

The selection of probiotic strains is based on their safety, functionality and technological suitability [7-8]. Popular probiotic strains include bacteria from the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* [9]. Probiotics are defined as "living microorganisms that, when administered in adequate amounts, benefit the health of the host" [10-11].

Vitamin and mineral supplements are recommended to prevent the development of vitamin and mineral deficiencies [12]. Vitamins, proteins, herbal extracts of medicinal plants with high antioxidant properties should be added to beverages to increase their biological and nutritional value [13].

Consequently, the introduction of bioactive additives in the formulation of dairy products makes it possible to obtain products with a higher nutritional value and bioavailability of the ingredients.

Thus, the priority in the creation of sour-milk products (drinks) of preventive value is research on the creation of combined products on a dairy basis with a specifically defined composition and properties. When creating combined sour-milk products (beverages), mineral and vitamin composition is corrected, as well as products are given therapeutic and preventive properties due to the inclusion of active probiotic strains in their composition.

The aim of this work was to develop a recipe for prophylactic drinks based on cow's milk and whey, using vitamins, minerals, prebiotics and probiotics.

Materials and methods of research

The objects of the study were a prophylactic milk-based drink №1 and a prophylactic whey-based drink №2, enriched with probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus*, vitamins, minerals and prebiotic.

A consortium of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 1A B-RCM 0947, *Lactobacillus paracasei* 2A B-RCM 0948, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RCM 0610 was used to obtain preventive milk-based drink 1 and preventive whey-based drink 2. The consortium strains were

selected by screening the isolated and collection strains of lactic acid bacteria from the Republican Collection of Microorganisms for probiotic properties [14].

Selective chromogenic media produced by Nissui Pharmaceutical Co., Ltd (Japan) were used to evaluate the food safety of prophylactic beverages №1 and №2. Inoculation was performed from freshly prepared prophylactic beverages on media cups containing Compact Dry test strains: Enterococci (ETS), Staphylococcus aureus (X-SA), Coliform (CF), Salmonella (SL), E. coli and Coliform (EC), Listeria (LS), Yeast and Fungi (YM).

As a result of the work, several variants of two prophylactic drinks No. 1 and No. 2 were developed. To determine the appropriate formulation of a prophylactic drink based on milk and whey, consumer characteristics of drinks with different doses of added vitamins, minerals and prebiotics were studied. As a result 3 compositions were developed for each drink, with 2 controls (with and without sourdough). Incubation of the drinks was carried out at 37° C in the thermostat for 6-9 hours.

The acid-forming activity of lactic acid bacteria and consortia was determined by the Turner method [15]. Selective and chromogenic Compact Dry media were used to test milk beverages for the presence of pathogenic microflora [16-17].

The organoleptic and physico-chemical quality and safety parameters of the beverages were determined in accordance with the current state standards [18-19].

Results and discussion

Vitamins A, C, B2, minerals potassium iodide, magnesium (Sigma, USA) and two prebiotics inulin and pectin were used to test milk-based preventive drink No. 1. The addition of vitamins and minerals are calculated in accordance with GOST 32252-2013 [18].

Table 1 - Variation of the recipe for prophylactic milk-based drink No. 1

Composition	Norma	Var.1	Var.2	Var.3	Counter. 1	Counter. 2
Consortium: <i>L. casei</i> 1A, <i>L. paracasei</i> 2A, <i>L. brevis</i> 4 LB	3-5%, 10 ⁷ CFU/ml	3%	3%	3%	3%	-
Pectin prebiotic	up to 5%	5%	5%	-	-	-
Prebiotic Inulin	up to 5%	5%	-	5%	-	-
Vitamin A, mg/l:	0,5-1,0	0,5	-	0,5	-	-
Vitamin C, mg/l:	50-120	50	-	50	-	-
Vitamin B2, mg/l:	1,0-2,5	-	1	-	-	-
Potassium iodide, mg/l	0,14±0,03	-	-	0,14±0,03	-	-
Magnesium, mg/l	1,2	-	1,2	-	-	-
Natural milk	Up to 100%	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Acidity, °СТ, max.	70	70	70	70	-	-

The variations for prophylactic whey-based drink No. 2 are shown in Table 2.

Table 2 - Variation of prophylactic whey-based drink formula No. 2

Composition	Norma	Var.1	Var. 2	Var.3	Contr.1	Contr.2
1	2	3	4	5	6	7
Consortium: <i>L. casei</i> 1A, <i>L. paracasei</i> 2A, <i>L. brevis</i> 4 LB	3%, 10 ⁷ CFU/ml	3 %	3 %	3 %	3 %	-
Pectin prebiotic	up to 5%	5%	5%	-	-	-
Prebiotic Inulin	up to 5%	5%	-	5%	-	-
Vitamin A, mg/l:	0,5-1,0	0,5	-	0,5	-	-

Table 2 continued

1	2	3	4	5	6	7
Vitamin C, mg/l:	50-120	50	-	50	-	-
Vitamin B2, mg/l:	1,0-2,5	-	1	-	-	-
Potassium iodide, mg/l	0,14±0,03	-	-	0,14	-	-
Magnesium, mg/l	1,2	-	1,2	-	-	-
Milk serum	Up to 100%	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Acidity, ° T, not more than	50-90 °T.	50-90	50-90	50-90	-	-

Further, the quality parameters of drinks were determined: organoleptic properties, fermentation activity, pH, acidity of developed preventive drinks No.1 and No.2 based on cow's milk and whey under laboratory conditions (Table 3).

Table 3 - Quality indicators for prevention drinks No. 1 and No. 2

Options	Organoleptic properties	Time (h)	pH	Acidity, ⁰ T
<i>Milk-based preventive drink No. 1</i>				
Option 1	Colour yellow, tastes milky with a pleasant aftertaste, consistency slightly viscous, the precipitate is insoluble	6-7	5,8	38
Option 2	Colour yellow, pleasantly sour taste, slightly viscous consistency, the precipitate is insoluble	6	5,0	40
Option 3	Colour milky white, flavour milky, consistency slightly viscous	6	5,5	38
Control 1	Colour milky, flavour milky, consistency slightly viscous	6	5,0	38
Control 2	Colour is milky and the consistency is liquid.	6	5,0	40
<i>Prophylactic drink No. 2 based on whey</i>				
Option 1	Colour yellow, taste sour, consistency liquid, the precipitate is insoluble	6-7	4,5	54
Option 2	Colour bright yellow, taste sour, consistency liquid, the precipitate is insoluble	6	4,5	52
Option 3	Colour milky, taste sour, consistency liquid	6	4,5	54
Control 1	Colour light green, flavour sour, consistency liquid	6	4,0	60
Control 2	Ccolour is milky and the consistency is liquid.	6	4,5	54

Analysing the data in Tables 1-3, it is noted that the addition of prebiotic pectin to the formulation of prophylactic beverages No.1 and No.2 causes an insoluble sediment, and the addition of vitamin B2 gives the beverages a yellowish colour. In this regard, further addition and use of the listed ingredients for technological and commercial purposes, is not feasible. Therefore, in the investigated variants of the formulation of prophylactic drink No. 1 and No. 2, variant 3 was selected as the most suitable in terms of colour and appearance of the product.

By research of organoleptic properties, fermentation activity, pH, acidity of developed varieties of preventive drinks № 1, variant № 3 was selected which has following food and tasting characteristics: milky-white colour, sour taste, slightly viscous consistence, pH 5,5, acidity 38, fermentation activity (time) 6-7 hours. Similarly, according to the above mentioned characteristics of developed various variants of prophylactic drinks №2, variant №3 was selected, which has the following food and tasting characteristics: milky-white colour, sour taste, liquid consistency, pH 4.5, acidity 54, activity (time) of fermentation 6 hours.

Thus, for further research on technological parameters variant 3 of prophylactic drink No.1 and variant 3 of prophylactic drink No.2 consisting of probiotic starter cultures of lactic acid bacteria (*Lactobacillus casei* 1A, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus brevis* 4 LB), enriched with inulin, vitamins (A, C) and a mineral (potassium iodide) were selected.

A monotonous or unbalanced diet can lead to vitamin deficiencies, which can subsequently lead to metabolic disorders and the occurrence of various diseases. Therefore, it is important to know the average values required for intake with food or in the form of dietary supplements to ensure optimal realization of physiological and biochemical processes, anchored in the human genotype. It should be noted that the daily intake of vitamins is very approximate and conditional, calculated for an average person.

Based on the fact that the physiological requirement (for adults) per day of vitamin C is not more than 50-100 mg, vitamin A not more than 1.0-1.6 mg kg and iodine-containing products not more than 290 µg, the maximum dose of preventive drinks is defined as not more than 500 ml per day.

The food safety assessment study showed no growth of opportunistic microflora on diagnostic media - Enterococci, Staphylococcus aureus, Coliforms, Salmonella, E. coli, Listeria, Yeasts and Fungi.

Organoleptic characteristics of prophylactic drinks depend on the quality of raw materials, technology, type and quality of lactic acid microorganisms, additives and storage. Determination of organoleptic parameters of prophylactic drinks was carried out together with employees of "Astana-Onim" JSC according to indicators - appearance, consistency, taste, smell and colour (Table 4). The volume of samples of prophylactic beverages №1 and №2 was 1000 ml each.

Table 4 - Organoleptic properties of prevention drinks

Name of indicators	Prophylactic drink No. 1	Prophylactic drink No.2
Appearance and consistency	The consistency is a slightly viscous, homogeneous mass with particles. There is a separation of the whey.	Liquid consistency A homogeneous liquid.
Taste and smell	The taste and smell is sour milk	Taste and smell typical of whey (sour)
Colour	Milky white, slightly creamy colour	Colour palegreen

Summing up the study of Table 4, we note that the prophylactic drinks comply with the normative documents. Prophylactic drink No.1 has the following organoleptic properties: consistency slightly viscous, homogeneous mass with grains, there is a separation of whey, taste and smell is milky, milky-white, slightly creamy. Prophylactic drink No.2 has the following organoleptic properties: liquid consistency, homogeneous liquid, taste and smell typical of whey (sour), colour pale green.

The nutritional value includes the content of the main chemical substances, their digestibility, taste and harmlessness.

Determination of physico-chemical parameters was performed on a milk analyzer Expert Pro in an accredited laboratory of RSE Center of Sanitary and Epidemiological Expertise of the Medical Center of the Office of the President of the Republic of Kazakhstan. Results of laboratory tests conducted in accordance with ST RK 2069-2015 "Sour-milk products. General technical conditions" and TR CU 033/2013 "About safety of milk and dairy products", approved by decision of EEC Council of 09.10.2013, № 67, TR CU 021/2011 "About safety of food products", approved by decision of CU Commission of 09.12.2011, № 88 on safety indications. Test conditions: humidity - 23.0% and temperature - 22.73-24.63°C (Tables 5, 6).

Table 5 - Physico-chemical properties of prevention drink No.1

Name of indicators	Research results	Key indicators according to regulatory documentation*	Regulatory documentation for test methods
Mass fraction of fat, %, min.	3,74	0,1-9,9*	ST RK 1733
Mass fraction of TOMO, %, min.	8,37	atleast 7.8*	ST RK 1733
Acidity, °T	70,0	70-140*	ST RK 1733
Density, kg/m ³	1,02849	-	ST RK 1733
Mass fraction of protein, %	3,18	2,6-4,0*	ST RK 1733
Mass fraction of lactose, %	4,46	-	ST RK 1733
Mass fraction of salts, %	0,71	-	ST RK 1733
Freezing point, °C	0,522	-	ST RK 1733
Mass fraction of water, %	0,0	-	ST RK 1733
Conductivity, (Ms/cm) (False)	5,78	-	ST RK 1733
Sample temperature, °C	24,63	-	ST RK 1733

According to Table 5 the main physico-chemical parameters of the prophylactic drink No.1 correspond to the normative document ST RK 1733-2015 for the product "Dairy products, except yogurt, sour cream, cottage cheese, including products with bifidobacteria and other probiotic microorganisms". Main physico-chemical parameters of prophylactic drink №1: fat - 3.74%, protein - 3.18%, acidity - 70°T, REM (skimmed milk residue) - 8.37%.

Table 6 - Physico-chemical properties of prevention drink No.2

Name of indicators	Research results	Key indicators according to regulatory documentation*	Regulatory documentation for test methods
Mass fraction of fat, %, min.	1,39	0,1-9,9*	ST RK 1733
Mass fraction of TOMO, %, min.	9,57	atleast 7.8*	ST RK 1733
Acidity, °T	80	70-140*	ST RK 1733
Density, kg/m ³	1,03508	-	ST RK 1733
Mass fraction of protein, %	3,65	2,6-4,0*	ST RK 1733
Mass fraction of lactose, %	5,13	-	ST RK 1733
Mass fraction of salts, %	0,80	-	ST RK 1733
Freezing point, °C	0,59	-	ST RK 1733
Mass fraction of water, %	0,0	-	ST RK 1733
Conductivity, (Ms/cm) (False)	9,09	-	ST RK 1733
Sample temperature, °C	22,73	-	ST RK 1733

According to Table 6 the main physico-chemical parameters of the prophylactic drink №2 comply with the normative document ST RK 1733-2015 for the product type "Dairy products, except yogurt, sour cream, cottage cheese, including products with bifidobacteria and other probiotic microorganisms". Main physico-chemical parameters of preventive drink No.2: fat - 1.39%, protein - 3.65%, acidity - 80°T, REM (skimmed milk residue) - 9.57%.

The microbiological properties of the prophylactic drinks were studied under aseptic conditions and in compliance with the recipe. To determine the content of lactic acid bacteria a method of determining viable probiotic bacteria at 37°C - 12-16 hours was used (Table 7).

Table 7 - Probiotic lactic acid bacteria content in the prophylactic drinks tested

Name	Probiotic lactic acid bacteria, CFU/mL	
	ND norm*	Results
Prophylactic drink No.1	1×10^6	1×10^7
Prophylactic drink No.2	1×10^6	1×10^6
*Interstate Standard 32923-2014 Fermented milk products enriched with probiotic microorganisms		

As shown in Table 7, prophylactic drinks No. 1 and No. 2 contain the appropriate amount of probiotic lactic acid bacteria in their composition.

Next, the cell count of probiotic microorganisms in prophylactic beverages was determined for one month at +4°C storage.

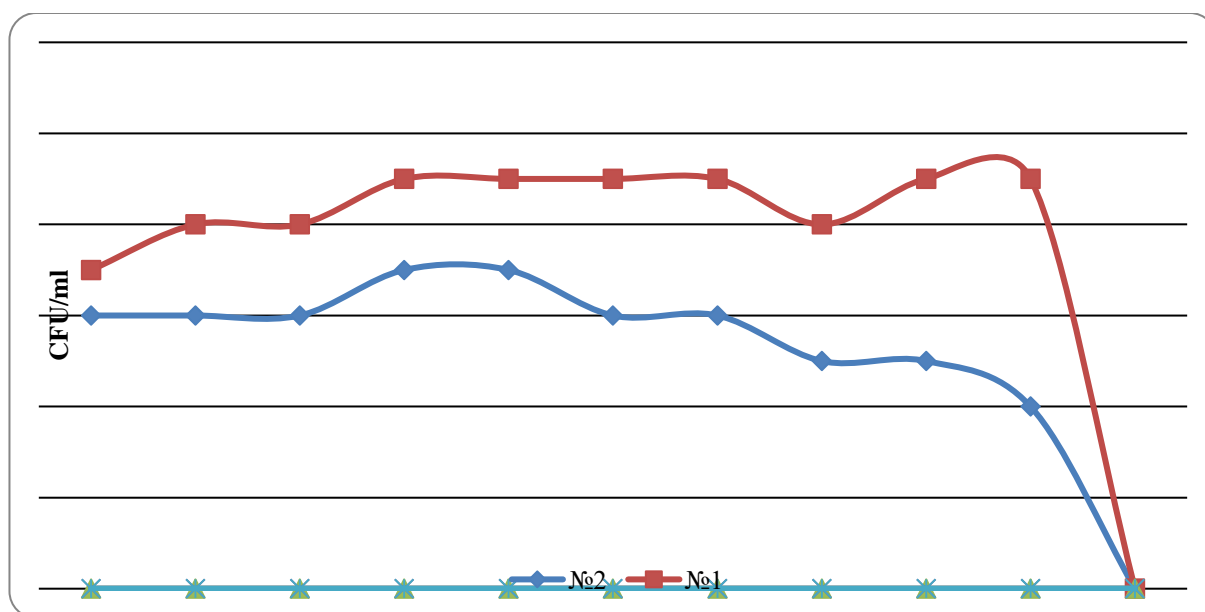


Figure 1 - Determination of the cell count of probiotic microorganisms in prophylactic drinks at 30 days, CFU/ml

As can be seen from Figure 1, the number of probiotic microorganisms cells in prophylactic drinks depends on the duration of storage. Thus, prophylactic drink №1 shows the greatest increase in the number of probiotic bacteria to 10^9 CFU/ml on day 5 and is maintained until 30 days of storage. In contrast, in prophylactic drink No. 2, cell growth is also observed on day 5, but gradually decreases after 7 days of storage.

Thus, analyzing the data on determining the number of cells of probiotic microorganisms, the recommended shelf life of prophylactic drink №1 - up to 30 days, prophylactic drink №2 - 7-10 days at a storage temperature of no more than 4 ° C.

Conclusion

As a result of the study, it was found that the selected formulations for prophylactic milk and whey-based drinks with the addition of vitamins, minerals and prebiotic do not affect the organoleptic properties and the number of viable probiotic lactic acid bacteria in the developed products.

The prophylactic drinks developed will be useful in preventing vitamin deficiencies in people aimed at providing the body with vitamins and their intake with food. The high prevalence of polyhypovitaminous conditions among the population provides the basis for the use of food products enriched with a complex of vitamins. To maintain the vitamin status in the diet it is advisable to include food products enriched with a complex of micronutrients, including in the

form of dairy drinks, which increases their effectiveness in optimizing the vitamin and mineral status.

Funding

The work was carried out under funding from the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (No. BR 10764998).

References:

- 1 Voblikova T.V., Buerakova D.Ju., Trubina I.A. Perspektivy razvitiya rynka molochnyh produktov s funkcional'nymi svojstvami. Problemy i perspektivy povysheniya produktivnyh i plemennyh kachestv sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh: sbornik nauchnyh trudov po materialam Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, posvjashhennoj 75-letiju Geroja socialisticheskogo Truda, akademika RASHN, doktora sel'skohozjajstvennyh nauk, professora V.A. Moroza. Stavropol': Izd-vo «AGRUS», 2012, 287-289. (<https://cyberleninka.ru/article/n/rynok-moloka-i-molochnoy-produktsii-problemy-i-perspektivy-razvitiya/viewer>)
- 2 Dzyuba N., Valevskaya L., Atanasova V., Sokolovskaya A. Elaboration of the recipe of the fermented milk dessert for child food. *Eureka Life Sci.*, 2017, 4: 3-9. (<https://journal.eu-jr.eu/life/article/view/371>)
- 3 Terpou A., Papadaki A., Lappa IK., Kachrimanidou V., Bosnea LA., Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, 2019, 11 (32):1591 (doi: 10.3390/nu11071591)
- 4 Soni R., Jain NK., Shah V., Soni J., Suthar D., Gohel P. Development of probiotic yogurt: effect of strain combination on nutritional, rheological, organoleptic and probiotic properties. *J Food Sci Technol.*, 2020, 57: 2038–2050 (doi: 10.1007/s13197-020-04238-3)
- 5 Singh Narayan K., Gaurkhede S, Sharma V, Kumar A, Bhushan B, Mishra V. Technological and Functional Assessment of Riboflavin Enriched Probiotic SoyCurd. *Fermentation*, 2021, 7 (2): 47 (doi: 10.3390/fermentation7020047)
- 6 Scourboutakos MJ, Franco-Arellano B, Murphy SA, Norsen S, Comelli EM, L'Abbe' MR. Mismatch between probiotic benefits in trials versus food products. *Nutrients*, 2017, 9(4): 400 (doi: 10.3390/nu9040400)
- 7 Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11(8): 506-514 (doi:10.1038/nrgastro.2014.66)
- 8 Quinto E., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J., Girbés T. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr. Sci.*, 2014, 5 (18): 1765-1775 (doi: 10.4236/fns.2014.518190)
- 9 Szajnar K., Pawlos M., Znamirowska A. The Effect of the Addition of Chokeberry Fiber on the Quality of Sheep's Milk Fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lact. Acidophilus* // *Int. J. Food Sci.* – 2021. -№7928745. (doi: 10.1155/2021/7928745)
- 10 Organization FaAOaWH, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002, P.1–11.
- 11 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11 (8): 506–514 (doi: 10.1038/nrgastro.2014.66)
- 12 Kalinin V. M. Aktual'nye voprosy pitaniya: vitaminy i mineral'nye veshhestva pri zanjatijah fizicheskoy kul'turoj i sportom. Tomsk: Izd-vo Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta, 2008. (<https://www.dissercat.com/content/razrabotka-produktov-sportivnogo-pitaniya-na-osnove-molochnoi-syvorotki>)
- 13 Kolotij T.B. Funkcional'nye napitki na osnove molochnoj syvorotki i fruktov dikorastushhijh rastenij. Adygejskij syr: istorija, tradicii, innovacii: materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii. Majkop: MGTU, 2019, 95-97. (<https://doi.org/10.47370/2072-0920-2021-17-2-33-39>)
- 14 Abitaeva G., Sarmurzina Z., Bisenova G., Musabaeva B., Tultabaeva T. Karakteristika shtammov probiotikov dlja razrabotki napitkov profilakticheskogo naznachenija. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, 2022, №4 (39): 141-151 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)
- 15 Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Li K., Shaikhin S, Saduakhassova S, Kushugulova A, Marotta F. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial

activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods. *Asian J. Applied Sci.*, 2016, 9: 143-158 (doi:10.3923/ajaps.2016.143.158)

16 Ioana D. Olaru, Wael Elamin, Mutsawashe et al. Evaluation of the InTray and Compact Dry culture systems for the diagnosis of urinary tract infections in patients presenting to primary health clinics in Harare, Zimbabwe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2021, 40 (12): 2543-2550 (doi: 10.1007/s10096-021-04312-4)

17 Shingo Mizuochi, Maria Nelson Matrix Extension Study: Validation of Compact Dry YM for Enumeration of Yeast and Mold in Selected Foods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2016. 99 (3): 695–704 (doi:10.5740/jaoacint.16-0059)

18 Syvorotka molochnaja. Tehnicheskie uslovija. GOST 53438-2009, Moskva, 2010. (<https://files.stroyinf.ru/Data/486/48685.pdf>)

19 Moloko pit'evoe dlja pitaniya detej doskol'nogo i shkol'nogo vozrasta. Tehnicheskie uslovija. GOST 32252-2013, Moskva, 2019. (<https://files.stroyinf.ru/Data/558/55861.pdf>)

МРНТИ: 34.25.01

Д.И. МҰЗАРАП¹, Ш.Т. ТАБЫС¹, Н.А. СӘРСЕНҚҰЛОВА¹, М.К. КЕНЖЕБАЕВА¹,
М. МАМБЕТАЛИЕВ¹, А.К. НАХАНОВ¹, К.Д. ЖУГУНИСОВ¹, О. ЭРГАНИШ²

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский, Казахстан

²Сельчукский университет, Конья, Турция

*e-mail: m.dias00@mail.ru

ОСВЕЖЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ПРОВЕРКА ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ НА ЦЕЛЕВЫХ ЖИВОТНЫХ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.11

Аннотация

Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов. В связи с этим в данной статье представлены результаты исследования по освежению штамма, возбудителя одного из таких инфекционных заболеваний, как парагриппа-3 крупного рогатого скота (ПГ-3 КРС) в культуре клеток ПТ и изучение патогенных свойств штамма на естественно восприимчивых животных. В результате освежения вируса в культуре клеток инфекционная активность образцов штамма составила в пределах от $6,87 \pm 0,17$ до $7,33 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/мл. При изучении патогенности освеженного штамма на животных установлено, что у телят, зараженных освеженным вирусом, с 3-х по 9-е сутки наблюдались клинические признаки характерные для ПГ-3 КРС, такие как повышение температуры тела до $+41,2^\circ\text{C}$, потеря аппетита, а также истечение из носа и глаз. Вирусологические и серологические исследования назальных смывов и сывороток крови, отобранных у телят, подтверждали наличие вируса и формирование к нему вируснейтрализующих антител в титрах от 1:64 до 1:256. После проведенных работ вирусную суспензию штамма лиофилизировали, проверяли на стерильность и биологическую активность для дальнейшего хранения и исследования.

Ключевые слова: вирус ПГ-3 КРС, освежение штамма, клинические признаки, защитная среда, лиофилизированные ампулы.

Вирусы парагриппа-3 представляют собой одноцепочечные РНК-вирусы с оболочкой, которые относятся к семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Orthoparamyxovirinae*, роду *Respirovirus*, виду *Bovine respirovirus-3* [1,2]. Возбудитель данной болезни состоит из семи белков и имеет геном с отрицательной полярностью, состоящий из 15 000 нуклеотидов в длину [3]. Данное заболевание распространено во многих странах, возбудители его представляет собой вирусы с липидной оболочкой со спиками гликопротеинов, обладающие гемоагглютинирующей и гемолитической активностью [9]. Вирусы парагриппа-3 связываются и реплицируются в реснитчатых эпителиальных клетках верхних и нижних дыхательных путей и связаны с широким спектром заболеваний, а степень инфекции коррелирует с пораженным местом [4-7]. Порой респираторные проявления включают апноэ, брадикардию, паротит, респираторный дистресс-синдром и редко диссеминированную инфекцию [8].

Вирус ПГ-3 КРС вызывает серьезные респираторные инфекции у копытных и может вызывать заболевание отдельно или в сочетании с другими патогенами, в основном вирусами, бактериями и микоплазмами [10]. Считается, что антитела к ПГ-3 КРС выявлены почти у 80% молочного и мясного скота, что может демонстрировать широкое распространение вируса [11].

Вирус ПГ-3 КРС был впервые идентифицирован в Соединенных Штатах Америки в 1959 году, когда вирус был выделен из носовых мазков телят с такими симптомами, как

отсутствие аппетита, кашель, выделения из носа, другие респираторные признаки, лихорадка, слезотечение и конъюнктивит [12]. Хотя ПГ-3 КРС обычно обнаруживается у крупного рогатого скота, сообщалось о случаях заражения мелких жвачных животных, буйволов, яков, верблюдовых, лошадей, свиней, собак и обезьян, а также людей [13-17]. Заболеваемость и смертность могут быть выше в случаях коинфекции с другими патогенами, поскольку важной ролью респираторных вирусных возбудителей КРС является иммуносупрессия [18,19]. ПГ-3 КРС в основном поражает КРС в возрасте от двух до шести месяцев, вероятно, из-за снижения пассивного материнского иммунитета животного, хотя было зарегистрировано несколько вспышек у более молодых животных [20]. Более того, дополнительные стрессы, вызванные более суровым климатом во многих странах, наряду с увеличением затрат на лечение, низкими показателями роста голов и снижением стоимости туш наносят значительный экономический ущерб молочным и мясным фермам, составляющим примерно 1 миллиард долларов в год [21].

В коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ МЗ РК хранятся и поддерживаются возбудители ряда инфекций, используемые для разработки профилактических и диагностических средств против опасных инфекций с целью обеспечения биологической безопасности на территории Республики Казахстан. Эти музейные штаммы микроорганизмов периодически подвергаются проверке остаточной биологической активности, а также по необходимости освежаются на чувствительных системах культивирования.

В этой связи целью наших исследований является проверка остаточной биологической активности и сохранение патогенных свойств образцов штамма вируса ПГ-3 КРС за период хранения в условиях коллекции.

Материалы и методы исследования

1.1. Вирус и клеточная культура

Для проведения исследований были использованы 2 образца штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС, хранящиеся в условиях коллекции в течение 30 и 20 лет (1993 г. и 2003 г. изготовления). Испытуемые образцы штамма вируса хранились в лиофилизированном состоянии под вакуумом с защитной питательной средой, состоящей из 5 % пептона и 3 % сахарозы. Для их освежения и определения их биологической активности, согласно паспортным данным, была использована первично трипсинизированная культура клеток почки телят (ПТ). Клеточная культура выращена в питательной среде DMEM с содержанием 10 % фетальной сыворотки крови КРС. Определение их остаточной биологической активности проводили согласно методике [22].

1.2. Освежение патогенного вируса ПГ-3 КРС

Для освежения исследуемого вируса образцы штамма «Белорусский» наработали по общепринятой методике [16, 23] в культуре клеток ПТ. Для определения биологической активности полученных вирусосодержащих суспензий (ВСС) приготовили разведения начиная с 10^{-1} до 10^{-8} в 3-повторностях и разлили в 96-луночные культуральные планшеты с монослоем культуры клеток ПТ.

1.3. Опыты на целевых животных

Для оценки патогенных свойств штамма нами были проведены опыты на целевых животных в специальных помещениях-вивариях, которые соответствуют условиям биологической безопасности (ABSL-2) для окружающей среды и персонала. Перед опытом были выбраны 4 головы 4-6 месячных телят серонегативных к вирусу ПГ-3 КРС. Серонегативность КРС к данному вирусу была определена в реакции нейтрализации (РН) с постоянной дозой вируса и разными разведениями исследуемой сыворотки крови, согласно методике [24,25]. До начала опыта животных выдерживали на карантине в течение 14 дней.

Заражение было проведено с использованием ингаляционного аппарата (ИНГАЛЯТОР FLEXINEB E3 2020 MODEL), как показаны на рисунке 1.



Рисунок 1 - Аэрозольное заражение телят вирулентным вирусом ПГ-3 КРС с помощью ингалятора

Для заражения надевали вышеуказанный специальный ингалятор на морду животных, заливали в резервуар разведенный вирус в объеме 5 мл и выдержали 15 мин до полного распыления вируса. Заражение телят вирусом ПГ-3 КРС проводилось освеженным на культуре клеток ПТ материалом 5 пассажа штамма «Белорусский» (от 29.12.1993 г.). После заражения каждый теленок содержался отдельно в изолированном боксе в течение 14 суток.

За весь период эксперимента подопытные животные в карантине имели свободный доступ к воде и корму.

При использовании подопытных животных для научно-исследовательских работ были строго соблюдены нормы биоэтики, согласно международным правилам и руководству по уходу и использованию лабораторных животных [26-29], а протокол эксперимента был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных RIBSP Комитета по науке Министерства образования и науки Республики Казахстан (номера разрешений: KZ0522/013).

Во время опыта за животными устанавливали наблюдение, регулярно фиксируя клинические проявления характерные для ПГ-3 КРС. В течение всего периода опыта ежедневно регистрировалось общее состояние, клинические признаки, аппетит и температура тела. У заболевших животных отобрали назальные смывы для выявления наличия вируса ПГ-3 КРС в реакции гемагглютинации (РГА) согласно методике [30]. В конце опыта у животных отбирали сыворотки крови для проверки формирования вируснейтрализующих антител к вирусу ПГ-3 КРС.

1.4. Лиофилизация вируса ПГ-3 КРС

После вышеописанной работы к наработанной вирусосодержащей суспензии добавляли защитную питательную среду, состоящую из 5% пептона и 3% сахарозы в конечных концентрациях в соотношении 1:1, разливали по ампулам и высушивали. После сушки проверяли биологическую активность и хранили в коллекции с биологической активностью 7,25 I_g ТЦД₅₀/мл для дальнейшего исследования.

Результаты и обсуждение

2.1 Определение остаточной инфекционной активности и освежение патогенного вируса ПГ-3 КРС

Остаточная инфекционная активность двух образцов штамма «Белорусский» определена в культуре клеток ПТ и наработана вирусосодержащая суспензия с последующей проверкой ее патогенных свойств. Биологическая активность после освежения была определена по наличию характерных ЦПД в монослое культуры клеток. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Инфекционная активность образцов штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС в культуре клеток ПТ

Образцы штамма вируса ПГ-3 КРС	Исходный остаточный титр образцов штамма после хранения, lg ТЦД ₅₀ /мл	Инфекционная активность образцов штамма после освежения в культуре клеток		
		4-пассаж	5-пассаж	6-пассаж
Образец №1 от 29.12.1993г.	5,83±0,08	6,87± 0,17	7,33± 0,14	н.и.
Образец №2 от 12.03.2003г.	6,00±0,14	н.и.	7,12± 0,17	7,16± 0,38
Примечания: «н.и.» - не исследовано				

Как видно из данных таблицы 1, инфекционная активность исследуемых образцов штамма «Белорусский» несмотря на длительность хранения сохранилась довольно в высоких титрах (5,83±0,08 lg ТЦД₅₀/мл образца 29.12.1993 г. и 6,00±0,14 lg ТЦД₅₀/мл образца от 12.03.2003 г.). При проведении последовательных пассажей материалов титрования их титр к 5–6 пассажному уровню повысился до (7,12± 0,17) и (7,33± 0,14) lg ТЦД₅₀/мл.

2.2. Проверка патогенных свойств освеженного штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС на телятах.

Для проверки патогенных свойств штамма нами выбран вирусный материал 5 пассажа образца от 29.12.1993 г. изготовления, показавший более высокую инфекционную активность в культуре клеток (7,33±0,14 lg ТЦД₅₀/мл). Патогенные свойства штамма вируса ПГ-3 КРС проверяли на 4-х телятах 4-6 месячного возраста, одного из которых использовали в качестве контроля.

Наблюдение и учет результатов заражения проводились в течение всего периода опыта. За период наблюдения за инфицированными животными клинические признаки болезни наблюдались у одного теленка начиная с 3 суточного срока. При этом отмечено повышение температуры тела до +39,7 °С (рисунок 2В), потеря аппетита и истечение из носа (рисунок 2А) и глаз (рисунок 2Б). С 4-х суток эти клинические признаки болезни отмечались у остальных инфицированных телят с повышением температуры тела до +41,2 °С. Клинические признаки болезни у заболевших животных наблюдались в течение 10-11 суток.

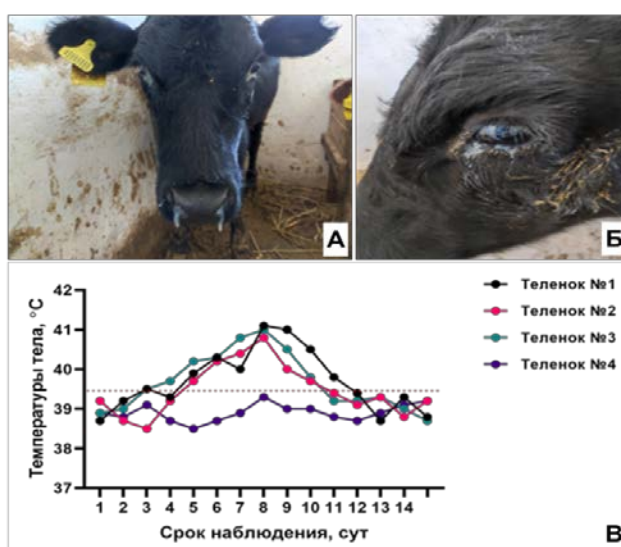


Рисунок 2 – Результаты изучения патогенности вируса ПГ-3 на естественно восприимчивых животных. А – истечение из носа; Б – истечение из глаз; В - температурная реакция животных, инфицированных штаммом «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС

С 11-12 сут. телята начали выздоравливать и их общее состояние стало удовлетворительным. На 7 сутки у заболевших телят отбирали назальные смывы для выявления наличия вируса ПГ-3 КРС в РГА и на 14 сутки - сыворотки крови для проверки наличия вируснейтрализующих антител к вирусу ПГ-3 КРС. Результаты исследований в РГА и РН представлены в таблице 2.

Таблица-2. Результаты вирусологических исследований телят, инфицированных вирусом ПГ-3 КРС

Номер теленка	Гемагглютинирующая активность вируса в РГА	Титр вируснейтрализующих антител	
		до заражения, 0 сут	после заражения, 14 сут
I	1:8	0	1:64
II	1:32	0	1:256
III	1:16	0	1:128
IV (контрольный)	0	0	0

Как видно из данных таблицы 2, в крови у всех испытуемых телят до заражения отсутствуют вируснейтрализующие антитела к вирусу ПГ-3 КРС. Проверка сыворотки крови, полученная на 14 сутки после заражения, подтвердила наличие вируснейтрализующих антител у инфицированных животных в титрах 1:64-1:256. Также пробы смывов носовой полости, отобранные на 7 сутки у инфицированных телят, показали в РГА гемагглютинацию в титрах 1:8-1:32, что подтверждает присутствие вируса в организме инфицированных животных. Результаты анализа контрольного теленка показали серонегативность к исследуемому вирусу.

После подтверждения патогенности вируса в ВСС добавили в равном объеме защитную среду и лиофилизировали, так как при лиофилизации влажность из материала удаляется без нарушения нативной структуры белков, резко замедляются или прекращаются биохимические реакции, в результате чего они становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия и сохраняют первоначальные свойства в течение длительного периода хранения [31].

Вирус ПГ-3 КРС одно из давно известных и наиболее серьезных заболеваний крупного рогатого скота, которое нанесло серьезный экономический ущерб животноводству во всем мире [32]. Несмотря на широкую распространённость в популяциях КРС, в настоящее время данная недооцененная эндемичная инфекция чаще всего встречается у телят с плохим пассивным иммунитетом или распавшимися материнскими антителами.

Для ПГ-3 КРС характерно стопроцентное заболевание всего поголовья в течение 1-2 недель. Инкубационный период болезни составляет 1-5 дней. Передача возбудителя осуществляется воздушно-капельным, контактным, фекально-оральным и половым путями. Факторами передачи возбудителя являются молоко больных восприимчивых животных, сперма, корма, вода, подстилка, инвентарь и иные материально-технические средства, контаминированные возбудителем [33].

По данным литературных источников, чувствительными к вирусу ПГ-3 КРС считаются такие культуры клеток, как диплоидные культуры клеток легкого (ЛЭК) и почки эмбриона (ПЭК) коровы, перевиваемые линии почки молодого бычка (MDBK), почки теленка (ПТ) и первичная культура клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК) [23]. В нашем эксперименте нами была использована культура клеток ПТ – как наиболее чувствительная к данному вирусу. Культивирование вируса ПГ-3 КРС в культуре клеток ПТ вызывало ярко выраженные признаки ЦПД – формирование симпластов, удлинение клеток с образованием пустот через 48 часов и максимальное ЦПД через 72 часа после заражения. Инфекционный титр вируса достигал максимальных значений – до 10^7 ТЦД₅₀/мл. Уровень репродукции вируса ПГ-3 КРС свидетельствовал о высокой чувствительности культуры клеток ПТ к этому возбудителю. Аналогичные результаты были получены в исследованиях,

проведенных авторами в культуре клеток легкого плода КРС [34]. Многие члены семейства *Paramyxoviridae* могут вызывать этот тип морфологических изменений в культивируемых клетках, но степень образования синцитии зависит от типа клеток. Специфические изменения в монослое характеризуются вакуолизацией, гранулированием симпластов, возникающих на месте слияния нескольких клеток, формированием синцитий с несколькими ядрами (малые) и формированием большие – с несколькими десятками ядер [35].

В некоторых зарубежных литературных источниках опасно, что заражение вирусом ПГ-3 КРС проводили посредством аэрозолизации, а в двух других испытаниях вакцинировали как интраназально, так и интратрахеально [36-38]. Выполнение этих трех методов отличается тем, что они аналогичны процессу естественного заражения. Также клинические признаки после заражения схожи с естественными симптомами данного заболевания. В том числе преимущество метода инфицирования посредством аэрозолизации заключается в удобстве выполнения и эффективности, так как он основан на дисперсном распылении на сверхмалые частицы ВСС, которое дает возможность проникать во все отделы дыхательной системы. В связи с этим, нами был выбран данный метод заражения для проведения опыта на животных.

Обычно клинические проявления, такие как состоящее из лихорадки, выделений из слизистых оболочек и сухого кашля, частично сопровождаются с местными иммунодепрессивными эффектами. Инфекция ПГ-3 КРС часто осложняется коинфекцией другими респираторными вирусами и бактериями, следовательно, является важным компонентом энзоотической пневмонии у телят и комплекса респираторных заболеваний КРС на откормочных площадках. Так как исследуемый вирус чаще поражает дыхательную систему, при вскрытии удастся выявить пораженные бронхи и легкие у павших животных, как было показано авторами [39]. Активную инфекцию можно диагностировать путем выделения вируса из носовых мазков. Время отбора проб имеет решающее значение для получения окончательных результатов диагностических тестов [20].

Как известно, на длительность сохранения штаммами микроорганизмов своих иммунобиологических свойств влияют такие факторы как агрегатное состояние биоматериала, температура их хранения, состав стабилизирующей среды и др. Испытанные нами образцы штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС были изготовлены в 1993 и 2003 гг., т.е. 30 и 20 лет назад с добавлением защитных и питательных сред, в состав которых входят 5 % пептона и 3 % сахарозы в конечной концентрации и хранились при минус 40 °С, что позволило довольно хорошо сохранить основные биологические свойства штамма за длительный период хранения.

С целью дальнейшего хранения штамма в ВСС добавляли защитную среду, указанную в паспорте, и штамм высушивали отработанным методом лиофильной сушки. Качество лиофильной сушки оценивали по следующим основным показателям, таким как: растворимость препарата (1-2 мин); остаточная влажность (не превышающая 1-3%) и целостность ампулы; характерная структура высушенного материала; рН среды; сохранение биологической активности, специфичности и других свойств, как указано в источнике [40].

После оценки качества освеженного и высушенного образца штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС ампулы в количестве 30 шт. заложили на хранение в коллекцию микроорганизмов.

Заключение

Результаты проведенных работ по проверке остаточной биологической активности штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС в культуре клеток и патогенных свойств на восприимчивых животных показали, что испытанные образцы штамма за период хранения (в течение 20, 30 лет) сохранили свои биологические свойства, что свидетельствует об эффективности использованной защитной среды и условий хранения. Полученные

результаты исследования позволяют хранить штамм вируса парагриппа-3 без освежения не менее 20 лет.

Благодарности

Авторы выражают благодарность к А.А. Ашимовой и К.С. Исламову за помощь в проведении научно-исследовательской работы.

Литература:

- 1 Branche, A. R., & Falsey, A. R. (2016). Parainfluenza Virus Infection. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 37(4), 538–554. (<https://doi.org/10.1055/s-0036-1584798>)
- 2 Henrickson K. J. (2003). Parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 242–264. (<https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>)
- 3 Spilki, F. R. (2016) 'Bovine parainfluenza virus type 3.', CABI Books. CABI International. (<https://doi.org/10.1079/9781780644172.009>)
- 4 Glezen, W. P., Frank, A. L., Taber, L. H., & Kasel, J. A. (1984). Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *The Journal of infectious diseases*, 150(6), 851–857. (<https://doi.org/10.1093/infdis/150.6.851>)
- 5 Glezen, W. P., Loda, F. A., Clyde, W. A., Jr, Senior, R. J., Sheaffer, C. I., Conley, W. G., & Denny, F. W. (1971). Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *The Journal of pediatrics*, 78(3), 397–406. ([https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(71\)80218-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(71)80218-4))
- 6 Henrickson, K. J., Kuhn, S. M., & Savatski, L. L. (1994). Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 18(5), 770–779. (<https://doi.org/10.1093/clinids/18.5.770>)
- 7 Marx, A., Török, T. J., Holman, R. C., Clarke, M. J., & Anderson, L. J. (1997). Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *The Journal of infectious diseases*, 176(6), 1423–1427. (<https://doi.org/10.1086/514137>)
- 8 Denny, F. W., Murphy, T. F., Clyde, W. A., Jr, Collier, A. M., & Henderson, F. W. (1983). Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics*, 71(6), 871–876
- 9 [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://www.ivami.com/en/molecular-veterinary-microbiology/5548-bovine-parainfluenza-type-3-pi3-molecular-diagnosis-rt-pcr>)
- 10 Muftuoglu, B., Kurucay, H. N., Elhag, A. E., Yildirim, S., Cicek-Yildiz, Y., Tamer, C., Ozan, E., Sahna, K. C., Yildirim, Y., Albayrak, H., Okur-Gumusova, S., & Yazici, Z. (2021). A serosurvey for bovine respirovirus 3 in Turkish domestic ruminants: The first comparison study of A and C genotypes. *Veterinary medicine and science*, 7(5), 1625–1632. (<https://doi.org/10.1002/vms3.534>)
- 11 Figueroa-Chávez, D., Segura-Correa, J. C., García-Márquez, L. J., Pescador-Rubio, A., & Valdivia-Flores, A. G. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Tropical animal health and production*, 44(7), 1417–1421. (<https://doi.org/10.1007/s11250-012-0081-9>)
- 12 Gueriche, A., Galiullin, A. K., Gumerov, V. G., Karimullina, I. G., & Shaeva, A. Y. (2020). The etiological role of the parainfluenza-3 virus in the respiratory pathology of young cattle // *BIO Web of Conferences*. – Vol.17. –e.00080. (<https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700080>)
- 13 Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., & Harasawa, R. (2013). Prevalence of antibodies against Parainfluenza virus type 3, Respiratory syncytial virus and bovine Herpesvirus type 1 in sheep from Northern Prefectures of Japan. *Veterinaria italiana*, 49(3), 285–289. (<https://doi.org/10.12834/VetIt.0810.01>)
- 14 Intisar, K. S., Ali, Y. H., Khalafalla, A. I., Rahman, M. E., & Amin, A. S. (2010). Respiratory infection of camels associated with parainfluenza virus 3 in Sudan. *Journal of virological methods*, 163(1), 82–86. (<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.017>)
- 15 Maidana, S. S., Lomonaco, P. M., Combessies, G., Craig, M. I., Diodati, J., Rodriguez, D., Parreño, V., Zabal, O., Konrad, J. L., Crudelli, G., Mauroy, A., Thiry, E., & Romera, S. A. (2012). Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC veterinary research*, 8, 83. (<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-83>)
- 16 Ren Y, Chen X, Tang C, Yue H. First Isolation and Characteristics of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 from Yaks. *Pathogens*. 2022; 11(9):962. (<https://doi.org/10.3390/pathogens11090962>)

- 17 Yener, Z., Sağlam, Y. S., Timurkaan, N., & Ilhan, F. (2005). Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 52(6), 268–271. (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00724.x>)
- 18 Fulton R. W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Animal health research reviews*, 10(2), 131–139. (<https://doi.org/10.1017/S146625230999017X>)
- 19 Woolums AR. The bronchopneumonias (respiratory disease complex of cattle, sheep, and goats) // In: Smith BL, ed. *Large Animal Internal Medicine*, 5th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier. – 2015. – p.584–603.
- 20 Ellis J. A. (2010). Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 26(3), 575–593. (<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.002>)
- 21 Griffin D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 13(3), 367–377. ([https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30302-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30302-9))
- 22 Сюрин В.Н., Иванова Г.А. Титрование вирусов. // в книге Сюрин В.Н., Иванова Г.А. *Руководство по ветеринарной вирусологии* // М. Изд-во «Колос». – 1965. 687.с:141-144
- 23 Leal É, Liu C, Zhao Z, Deng Y, Villanova F, Liang L, Li J, Cui S. Isolation of a Divergent Strain of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (BPIV3) Infecting Cattle in China. *Viruses*. 2019; 11(6):489. (<https://doi.org/10.3390/v11060489>)
- 24 Ширококов В. П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студ. высш. мед. учеб. заведений. – М. : Винница Нова Книга, 2015. – 262 с.
- 25 Научно-производственный журнал «Ветеринария» КолосС, 2003.№11. – 12с.
- 26 [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>)
- 27 Reinhardt W., Reinhardt A. W. Comfortable quarters for cattle in research institutions. 2002 // *Comfort rooms for laboratory animals*, 9th ed. Washington: Institute for Animal Welfare. – p.89-95
- 28 Cattle: Good Management Practices, 1st ed. 2008. RSPCA, Division of Animal Research. Available at; as of August 6, 2010
- 29 [Электрон.ресурс]. - URL: (www.rspca.org.uk/servlet/BlobServer?blobtable=RSPCABlob&blobcol=urloblob&blobkey=id&blobwhere=1220375292149&blobheader=application/pdf)
- 30 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://studref.com/437125/agropromyshlennost/reaktsiya_gemagglutinatsii#389)
- 31 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologi_cheskikh-preparatov/)
- 32 Miles D. G. (2009). Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD). *Animal health research reviews*, 10(2), 101–103. (<https://doi.org/10.1017/S1466252309990090>)
- 33 [Электрон.ресурс]. - URL: (http://www.rsn-kld.ru/news/paragripp_3_krupnogo_rogatogo_skota/)
- 34 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://i.moscow/patents/ru2515915c1_20140520)
- 35 [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://repo.vsavm.by/handle/123456789/5603>)
- 36 Tsai, K. S., & Thomson, R. G. (1975). Bovine parainfluenza type 3 virus infection: ultrastructural aspects of viral pathogenesis in the bovine respiratory tract // *Infection and immunity*. – Vol.11(4). – p.783–803. (<https://doi.org/10.1128/iai.11.4.783-803.1975>)
- 37 Xue, W., Ellis, J., Mattick, D., Smith, L., Brady, R., & Trigo, E. (2010). Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine*, 28(22), 3784–3792. (<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.043>)
- 38 Peters, A. R., Thevasagayam, S. J., Wiseman, A., & Salt, J. S. (2004). Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive veterinary medicine*, 66(1-4), 63–77. (<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.08.001>)
- 39 Baghezza, S., Mamache, B., Bennoune, O., & Ghougal, K. (2021). Pathological study and detection of Bovine parainfluenza 3 virus in pneumonic sheep lungs using direct immunofluorescence

antibody technique. Comparative clinical pathology, 30(2), 301–310. (<https://doi.org/10.1007/s00580-021-03211-6>)

40 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologicheskikh-preparatov/)

Д.И. МҰЗАРАП¹, Ш.Т. ТАБЫС¹, Н.А. СӘРСЕНҚҰЛОВА¹, М.К. КЕНЖЕБАЕВА¹,
М.М.МАНБЕТАЛИЕВ¹, А.К. НАХАНОВ¹, К.Д. ЖУГУНИСОВ¹, О. ЭРГАНИШ²

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, қта.

Гвардейский, Қазақстан

²Сельчук университеті, Конья, Түркия

*e-mail: m.dias00@mail.ru

ЖАСУША ӨСІНДІСІНДЕ ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ПАРАГРИПП-3 ВИРУЛЕНТТІ ШТАММЫН ЖАҢАРТУ ЖӘНЕ СЕЗІМТАЛ ЖАНУАРЛАРДА ПАТОГЕНДІК ҚАСИЕТТЕРІН ТЕКСЕРУ

Түйін

Штаммдардың жарамдылығын, әрі олардың құнды қасиеттерін сақтау – алғашқы зерттеулерден бастап оларды әртүрлі биопрепараттар өндірісінде қолдануға дейінгі микроорганизмдермен кез-келген зерттеу жұмыстарының маңызды алғышарты болып табылады. Осыған байланысты, ұсынылған мақалада ПТ жасуша өсінділерінде ірі қара малдың парагрипп-3 (ПГ-3) сынды жұқпалы ауру штаммын жаңарту және табиғи сезімтал жануарлардағы оның патогендік қасиеттерін зерттеу нәтижелері келтірілген. Жасуша өсіндісінде вирусты жаңарту нәтижесінде штамм үлгілерінің инфекциялық белсенділігі $6,87 \pm 0,17$ және $7,33 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/мл аралығын қамтыды. Жануарларда жаңартылған штаммның патогенділігін бағалау барысында жұқтырған бұзаулардың 3-9 тәулік аралығында дене температурасының 41,2°C-қа дейін жоғарылауы мен тәбеттің төмендеуі, сондай-ақ мұрын мен көздің ағуы сынды клиникалық белгілері байқалды. Әрі қарай, вирусологиялық және серологиялық зерттеулер нәтижесінде бұзаулардан алынған мұрын сынамалары мен қан сарысуларында вирустың анықталуы және 1:64-тен 1:256-ға дейінгі титрлерде вирусты бейтараптандыратын антиденелердің түзілуі расталды. Жүргізілген жұмыстардан кейін вирустық суспензия лиофилизацияланып, одан әрі зерттеулер жүргізу үшін коллекцияға қойылды.

Кілтгі сөздер: ІҚМ ПГ-3 вирусы, штамм жаңарту, клиникалық белгілері, қорғаныш ортасы; лиофилизацияланған ампулалар.

IRSTI 34.25.01

D.I. MUZARAP¹, Sh.T. TABYS¹, N.A. SARSENKULOVA¹, M.K. KENZHEBAEVA¹,
M.M.MAMBETALIEV¹, A.K. NAKHANOV¹, K.D. ZHUGUNISSOV¹, O. ERGANIS²

¹Research institute for biological safety problems Gvardeyskiy, Kazakhstan

²Selcuk University, Konya, Turkey

*e-mail: m.dias00@mail.ru

REFRESHMENT OF A VIRULENT STRAIN OF BOVINE PARAINFLUENZA-3 VIRUS IN CELL CULTURE AND DETERMINATION OF PATHOGENIC PROPERTIES IN CALVES

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.11

Abstract

Maintaining strains in working condition and preserving their valuable properties are important conditions for almost any work with microorganisms – from primary study to their use in the production of

various biological products. In this regard, this article presents the results of a study on the refreshment of a strain of one of such infectious diseases as bovine parainfluenza-3 virus (BPIV-3) in calf kidney (CK) cell culture and study the pathogenic properties of the strain on naturally susceptible animals. As a result of virus refreshment in cell culture, the infectious titer of strain samples ranged from 6.87 ± 0.17 to 7.33 ± 0.14 lg TCID₅₀/ml. When studying the pathogenicity of the refreshed strain in animals, it was found that calves infected with the refreshed virus from 3 to 9 days had an increase in body temperature to 41.2 °C was observed and pronounced symptoms were noted, such as loss of appetite, as well as leakage from the nose and eyes. Further, virological and serological studies of nasal swabs and blood serums taken from calves confirmed the presence of the virus and the formation of virusneutralizing antibodies was found in titers from 1:64 to 1:256. After the work carried out, the viral suspension was lyophilized for further storage and research.

Keywords: bovine parainfluenza-3 virus, cell culture, strain refreshment, calves; clinical signs, protective environment; lyophilized vials.

Bovine parainfluenza-3 (BPIV-3) viruses are single-stranded RNA viruses with a shell that belong to the *Paramyxoviridae* family, the *Orthoparamyxovirinae* subfamily, the genus *Respirovirus*, the species *Bovine respirovirus-3* [1,2]. The causative agent of this disease consists of seven proteins and has a genome with negative polarity consisting of 15,000 nucleotides in length [3]. This disease is widespread in many countries and is a lipid-coated virus with glycoprotein spicules with hemoagglutinating and hemolytic activity [9]. Parainfluenza-3 viruses bind and replicate in ciliated epithelial cells of the upper and lower respiratory tracts and are associated with a wide range of diseases, and the degree of infection correlates with the affected site [4-7]. Sometimes respiratory manifestations include apnea, bradycardia, mumps, respiratory distress syndrome and rarely disseminated infection [8].

The BPIV-3 causes serious respiratory infections in ungulates and can cause disease alone or in combination with other pathogens, mainly viruses, bacteria and mycoplasmas [10]. Antibodies to BPIV-3 have been detected in almost 80% of dairy and beef cattle, which may demonstrate the widespread spread of the virus [11].

The BPIV-3 was first identified in the United States in 1959, when the virus was isolated from nasal swabs of calves with symptoms such as lack of appetite, cough, nasal discharge, other respiratory signs, fever, lacrimation and conjunctivitis [12]. Although BPIV-3 is usually found in cattle, cases of infection of small ruminants, buffaloes, yaks, camels, horses, pigs, dogs and monkeys, as well as humans have been reported [13-17]. Morbidity and mortality may be higher in cases of co-infection with other pathogens, since immunosuppression is an important role of respiratory viral pathogens of cattle [18,19]. BPIV-3 mainly affects cattle aged two to six months, probably due to a decrease in passive maternal immunity of the animal, although several outbreaks have been reported in more young animals [20]. Moreover, additional stresses caused by a more severe climate in many countries, along with the accumulation of treatment costs, low head growth rates and a decrease in the cost of carcasses, cause significant economic damage to dairy and meat farms, amounting to approximately \$ 1 billion per year [21].

The collection of microorganisms of the Research Institute for Biological Safety Problems of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan stores and supports pathogens of a number of infections used to develop preventive and diagnostic tools against dangerous infections in order to ensure biological safety on the territory of the Republic of Kazakhstan. These museum strains of microorganisms are periodically checked for residual biological activity, and, if necessary, refreshed on sensitive cultivation systems.

In this regard, the purpose of our research is to check the residual infectious activity and preserve the pathogenic properties of samples of the BPIV-3 strain during the storage period in the collection.

Materials and methods of research

1.1. Virus and cell culture

For the research, 2 samples of the Belarusian strain of the BPIV-3 isolated from cattle were used, stored in a collection for 30 and 20 years (1993 and 2003 of manufacture). The test samples of the virus strain were stored in a freeze-dried state under vacuum with a protective medium consisting of 5% peptone and 3% sucrose. To refresh them and determine their infectious activity, according to passport data, a primary trypsinized culture of calf kidney cells was used. The cell culture was grown in a DMEM nutrient medium containing 10% fetal blood serum of cattle. Determination of their residual infectious activity was carried out according to the method [22].

1.2. Refreshment of the pathogenic BPIV-3

To refresh the studied virus, samples of the Belarusian strain were obtained according to the generally accepted method [16, 23] in calf kidney cell culture. To determine the infectious activity of the obtained viral suspensions, dilutions were prepared starting from 10^{-1} to 10^{-8} in 3 replicates and poured into 96-well culture plates with a monolayer of calf kidney cell culture.

1.3. Experiments in calves and bioethics

To assess the pathogenic properties of the strain, we conducted experiments on target animals in special rooms-vivariums that meet the conditions of biological safety (ABSL-2) for the environment and personnel. Before the experiment, 4 heads of 4-6 months old calves seronegative to the BPIV-3 were selected. The seronegativity of cattle to this virus was determined in the serum neutralization test (SNT) with a constant dose of the virus and different dilutions of the studied blood serum, according to the method [24,25]. Before the start of the experiment, the animals were quarantined for 14 days.

The infection was carried out using an inhalation device (FLEXINEB E3 2020 MODEL INHALER) as shown in Figure 1.



Figure 1 - Aerosol infection of calves with BPIV-3 virulent virus using an inhaler.

For infection, the above-mentioned special inhaler was put on the animals' muzzle, diluted virus in a volume of 5 ml was poured into the tank and kept for 15 minutes until the virus was completely sprayed. Infection of calves with the BPIV-3 was carried out with the material of passage 5 of the Belorussian strain refreshed on calf kidney cell culture (dated 12/29/1993). After infection, each calf was kept separately in isolated boxes for 14 days.

During the entire period of the experiment, the experimental animals in quarantine had free access to water and feed.

When using experimental animals for scientific research, the norms of bioethics were strictly observed, according to international rules and guidelines for the care and use of laboratory animals

[26-29], and the experimental protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the RIBSP of the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (permit numbers: KZ0522/013).

During the experiment, the animals were monitored, regularly recording clinical manifestations characteristic of BPIV-3. During the entire period of the experiment, the general condition, clinical signs, appetite and body temperature were recorded daily. Nasal flushes were taken from diseased animals to detect the presence of the BPIV-3 in the hemagglutination assay (HA) according to the method [30]. At the end of the experiment, blood serums were taken from animals to check the formation of virus neutralizing antibodies to the BPIV-3.

1.4. Lyophilization of BPIV-3 virus

After the above work, a protective medium consisting of 5% peptone and 3% sucrose in final concentrations in a ratio of 1:1 was added to the accumulated viral suspension, poured into ampoules and dried. After drying, the infectious activity was checked and stored in a collection with a infectious activity of $7.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ for further studies.

Results and discussion

2.1 Determination of residual infectious activity and refreshment of the pathogenic BPIV-3

The residual infectious activity of two samples of the Belarusian strains were determined in the culture of calf kidney cells and a viral suspension was developed with subsequent verification of its pathogenic properties. The infectious activity after refreshment was determined by the presence of characteristic CPE in the monolayer of cell culture. The results of the experiment are presented in Table 1.

Table 1 – Infectious activity of samples of the Belarusian strain of the BPIV-3 in calf kidney cell culture

Samples of the BPIV-3 virus strain	Initial residual titer of strain samples after storage, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	Infectious activity of strain samples after refreshment in cell culture		
		4-passage	5-passage	6-passage
Sample No. 1 of 29.12.1993	$5,83 \pm 0,08$	$6,87 \pm 0,17$	$7,33 \pm 0,14$	NT
Sample No. 2 dated 12.03.2003	$6,00 \pm 0,14$	NT	$7,12 \pm 0,17$	$7,16 \pm 0,38$
Notes: "NT" - not tested				

As seen from the data in Table 1, the infectious activity of the studied samples of the Belarusian strain, despite the duration of storage, remained quite high titers ($5.83 \pm 0.08 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ of the sample on 29.12.1993 and $6.00 \pm 0.14 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ of the sample from 12.03.2003). When carrying out successive passages of titration materials, their titers to 5-6 passage the level increased to (7.12 ± 0.17) and (7.33 ± 0.14) $\lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

2.2. Determination the pathogenic properties of the refreshed BPIV-3 Belarusian strain on calves

To test the pathogenic properties of the strain, it was selected the viral material of the 5th passage of the sample from 29.12.1993, which showed higher infectious activity in cell culture ($7.33 \pm 0.14 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$). The pathogenic properties of the BPIV-3 were tested on 4 calves 4-6 months old. At the same time, one of them was used as a control calf (Table-2).

Monitoring and recording of the results of infection was carried out during the entire period of the experiment. During the period of observation of infected animals, clinical signs of the disease were observed in one calf starting from day 3. At the same time, an increase in body temperature to $39.7 \text{ }^\circ\text{C}$ was noted (Fig. 2C), loss of appetite and discharge from the nose (Fig. 2A) and eyes (Fig. 2B). These clinical signs of the disease were observed in the remaining infected calves with an increase in body temperature to $41.2 \text{ }^\circ\text{C}$, at 4th days. Clinical signs in diseased animals were observed for 10-11 days.

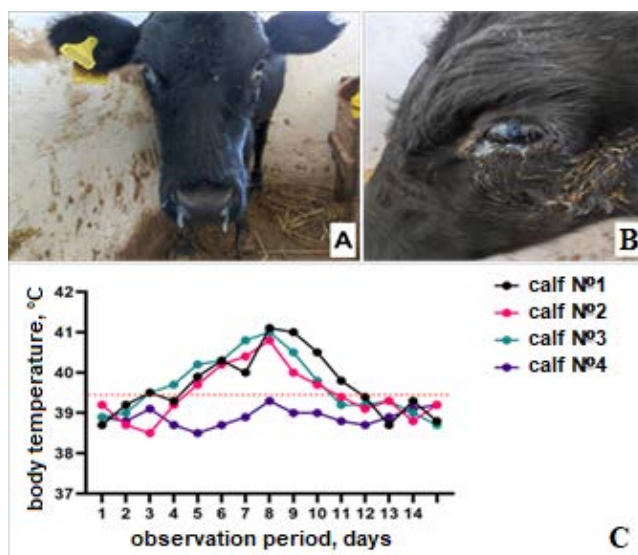


Figure 2 – Results of studying the pathogenicity of the BPIV-3 in naturally susceptible animals. A – discharge from the nose; B – discharge from the eyes; C - temperature reaction of animals infected with the BPIV-3 Belarusian strain

From 11-12 days the calves began to recover and their general condition became satisfactory. On day 7, nasal flushes were taken from sick calves to detect the presence of the BPIV-3 in the HA and on day 14, blood to check for the presence of virusneutralizing antibodies to the BPIV-3. The results of studies in HA and SRT are presented in Table 2.

Table-2. Results of virological studies on the calves infected with BPIV-3

Calf number	Hemagglutinating activity of the virus in HA	Titer of virus neutralizing antibodies	
		before infection, 0 days	after infection, 14 days
I	1:8	0	1:64
II	1:32	0	1:256
III	1:16	0	1:128
IV (control)	0	0	0

As can be seen from the data in Table 2, there are no virus neutralizing antibodies to the BPIV-3 in the blood sera samples of all tested calves before infection. Blood sera obtained on day 14 after infection, and tested in terms of virus neutralizing antibodies6 and found at the titers 1:64-1:256 by VNT. Also, samples of nasal cavity flushes taken for 7 days. HA was shown in the titers 1:8-1:32, which confirms the presence of the virus in the body of infected animals. The control calf, which was not given the virus, was seronegative with VNT.

After confirmation of the pathogenicity of the virus, an equal amount of protective medium was added to the viral suspension and lyophilized, since during lyophilization, moisture is removed from the material without disturbing the native structure of proteins, biochemical reactions are sharply slowed down or stopped, as a result of which they become more resistant to external factors and retain their original properties for a long period of storage [31].

The BPIV-3 is one of the long-known and most serious diseases of cattle, which has caused serious economic damage to animal husbandry worldwide [32]. Despite the widespread prevalence in cattle populations, this underestimated endemic infection is most often found in calves with poor passive or decayed maternal antibodies.

BPIV-3 are characterized by one hundred percent disease of the entire livestock within 1-2 weeks. The incubation period of the disease is 1-5 days. Transmission of the pathogen is carried

out by airborne droplets, contact, fecal-oral and sexual routes. The factors of transmission of the pathogen are milk of susceptible animals, semen, feed, water, bedding, inventory and other material and technical means contaminated with the pathogen [33].

According to literature sources, such cell cultures as diploid lung cell cultures and embryo kidney of cow, transplanted kidney lines of young bull (MDBK), calf kidney and primary lung cell culture of cow embryo are considered sensitive to the BPIV-3 [23]. In our experiment, we used a culture of calf kidney cells – as the most sensitive to this virus. The cultivation of the BPIV-3 in the culture of calf kidney cells caused pronounced signs of CPE – the formation of symplasts, elongation of cells with the formation of voids after 48 hours and maximum CPE 72 hours after infection. The infectious titer of the virus reached maximum values – up to 10^7 TCID₅₀/ml. The reproduction level of the BPIV-3 testified to the high sensitivity of the calf kidney cell culture to this pathogen. Similar results were obtained in studies conducted by the authors in the culture of fetal lung cells of cattle [34]. Many members of the Paramyxoviridae family can cause this type of morphological changes in cultured cells, but the degree of syncytium formation depends on the cell type. Specific changes in the monolayer are characterized by vacuolization, granulation of symplasts arising at the site of fusion of several cells by the formation of syncytia with several nuclei (small) and large – with several dozen nuclei [35].

In some literature sources, infection with the BPIV-3 was carried out by means of aerosolization, and in the other two trials they were vaccinated both intranasally and intratracheal [36-38]. The implementation of these three methods differs in that they are similar to the process of natural infection. The clinical signs after infection are similar to the natural symptoms of this disease. In particular, the advantage of the method of infection by aerosolization lies in the convenience of implementation and efficiency, since it is based on dispersed spraying on ultra-small particles of virus-containing suspension, which makes it possible to penetrate into all parts of the respiratory system. In this regard, we have chosen this method of infection for conducting experiments on animals.

Usually, clinical manifestations, consisting of fever, mucosal secretions and dry cough, are partially accompanied with local immunosuppressive effects. Infection of BPIV-3 is often complicated by coinfection with other respiratory viruses and bacteria, therefore, it is an important component of enzootic pneumonia in calves and a complex of respiratory diseases of cattle in feedlots. Since the studied virus more often affects the respiratory system, during autopsy it is possible to detect empty bronchi and lungs in fallen animals, as was shown by the authors [39]. An active infection can be diagnosed by isolating the virus from nasal smears. The sampling time is crucial for obtaining the final results of diagnostic tests [20].

As is known, factors such as the aggregate state of the biomaterial, their storage temperature, the composition of the stabilizing medium, etc. influence the duration of preservation of their immunobiological properties by strains of microorganisms. The samples of the Belarusian strain of the BPIV-3 tested by us were manufactured in 1993 and 2003, i.e. 30 and 20 years ago with the addition of protective media of 5% peptone and 3% sucrose in the final concentration and stored at minus 40 °C, which made it possible to preserve the basic biological properties of the strain fairly well for a long time storage period.

For the purpose of further storage of the strain, the protective medium specified in the passport was added to the virus-containing suspension and dried by the spent method of freeze drying. The quality of freeze drying was assessed by the following main indicators such as: solubility of the preparation (1-2 min); residual moisture (not exceeding 1-3%) and integrity of the ampoule; characteristic structure of the dried material; pH of the medium; preservation of biological activity, specificity and other properties as indicated in the source [40].

After assessing the quality of the refreshed and dried sample of the Belarusian strain of the BPIV-3, ampoules in the amount of 30 pcs. were deposited in the collection of microorganisms.

Conclusion

The results of the work carried out to check the residual infectious activity of the Belarusian strain of the BPIV-3 in cell culture and pathogenic properties on susceptible animals showed that the tested samples of the strain during the storage period (for 20, 30 years) they have retained their biological properties, which indicates the effectiveness of the protective environment used and the storage condition. The obtained results of the study allow storing the strain of the parainfluenza-3 virus without lighting for at least 20 years.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to A.A. Ashimova and K.S. Islamov for their help in carrying out research work.

References:

- 1 Branche, A. R., & Falsey, A. R. (2016). Parainfluenza Virus Infection. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 37(4), 538–554. (<https://doi.org/10.1055/s-0036-1584798>)
- 2 Henrickson K. J. (2003). Parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 242–264. (<https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>)
- 3 Spilki, F. R. (2016) ‘Bovine parainfluenza virus type 3.’, CABI Books. CABI International. (<https://doi.org/10.1079/9781780644172.009>)
- 4 Glezen, W. P., Frank, A. L., Taber, L. H., & Kasel, J. A. (1984). Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *The Journal of infectious diseases*, 150(6), 851–857. (<https://doi.org/10.1093/infdis/150.6.851>)
- 5 Glezen, W. P., Loda, F. A., Clyde, W. A., Jr, Senior, R. J., Sheaffer, C. I., Conley, W. G., & Denny, F. W. (1971). Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *The Journal of pediatrics*, 78(3), 397–406. ([https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(71\)80218-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(71)80218-4))
- 6 Henrickson, K. J., Kuhn, S. M., & Savatski, L. L. (1994). Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 18(5), 770–779. (<https://doi.org/10.1093/clinids/18.5.770>)
- 7 Marx, A., Török, T. J., Holman, R. C., Clarke, M. J., & Anderson, L. J. (1997). Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *The Journal of infectious diseases*, 176(6), 1423–1427. (<https://doi.org/10.1086/514137>)
- 8 Denny, F. W., Murphy, T. F., Clyde, W. A., Jr, Collier, A. M., & Henderson, F. W. (1983). Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics*, 71(6), 871–876.
- 9 [Electronic resource]. - URL: (<https://www.ivami.com/en/molecular-veterinary-microbiology/5548-bovine-parainfluenza-type-3-pi3-molecular-diagnosis-rt-pcr>)
- 10 Muftuoglu, B., Kurucay, H. N., Elhag, A. E., Yildirim, S., Cicek-Yildiz, Y., Tamer, C., Ozan, E., Sahna, K. C., Yildirim, Y., Albayrak, H., Okur-Gumusova, S., & Yazici, Z. (2021). A serosurvey for bovine respirovirus 3 in Turkish domestic ruminants: The first comparison study of A and C genotypes. *Veterinary medicine and science*, 7(5), 1625–1632. (<https://doi.org/10.1002/vms3.534>)
- 11 Figueroa-Chávez, D., Segura-Correa, J. C., García-Márquez, L. J., Pescador-Rubio, A., & Valdivia-Flores, A. G. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Tropical animal health and production*, 44(7), 1417–1421. (<https://doi.org/10.1007/s11250-012-0081-9>)
- 12 Gueriche, A., Galiullin, A. K., Gumerov, V. G., Karimullina, I. G., & Shaeva, A. Y. (2020). The etiological role of the parainfluenza-3 virus in the respiratory pathology of young cattle // *BIO Web of Conferences*. – Vol.17. –e.00080. (<https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700080>)
- 13 Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., & Harasawa, R. (2013). Prevalence of antibodies against Parainfluenza virus type 3, Respiratory syncytial virus and bovine Herpesvirus type 1 in sheep from Northern Prefectures of Japan. *Veterinaria italiana*, 49(3), 285–289. (<https://doi.org/10.12834/VetIt.0810.01>)

- 14 Intisar, K. S., Ali, Y. H., Khalafalla, A. I., Rahman, M. E., & Amin, A. S. (2010). Respiratory infection of camels associated with parainfluenza virus 3 in Sudan. *Journal of virological methods*, 163(1), 82–86. (<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.017>)
- 15 Maidana, S. S., Lomonaco, P. M., Combessies, G., Craig, M. I., Diodati, J., Rodriguez, D., Parreño, V., Zabal, O., Konrad, J. L., Crudelli, G., Mauroy, A., Thiry, E., & Romera, S. A. (2012). Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC veterinary research*, 8, 83. (<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-83>)
- 16 Ren Y, Chen X, Tang C, Yue H. First Isolation and Characteristics of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 from Yaks. *Pathogens*. 2022; 11(9):962. (<https://doi.org/10.3390/pathogens11090962>)
- 17 Yener, Z., Sağlam, Y. S., Timurkaan, N., & İlhan, F. (2005). Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 52(6), 268–271. (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00724.x>)
- 18 Fulton R. W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Animal health research reviews*, 10(2), 131–139. (<https://doi.org/10.1017/S146625230999017X>)
- 19 Woolums AR. The bronchopneumonias (respiratory disease complex of cattle, sheep, and goats) // In: Smith BL, ed. *Large Animal Internal Medicine*, 5th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier. – 2015. – p.584–603.
- 20 Ellis J. A. (2010). Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 26(3), 575–593. (<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.002>)
- 21 Griffin D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 13(3), 367–377. ([https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30302-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30302-9))
- 22 Syurin V.N., Ivanova G.A. Titrovanie virusov. // v knige Syurin V.N., Ivanov G.A. Rukovodstvo po veterinarnoj virusologii // M. Izd-vo «Kolos». – 1965. 687.p:141-144.
- 23 Leal É, Liu C, Zhao Z, Deng Y, Villanova F, Liang L, Li J, Cui S. Isolation of a Divergent Strain of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (BPIV3) Infecting Cattle in China. *Viruses*. 2019; 11(6):489. (<https://doi.org/10.3390/v11060489>)
- 24 Shirobokov V. P. Medicinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: uchebnik dlya stud. vyssh. med. ucheb. zavedenij. – M. : Vinnica Nova Kniga., 2015. – p.262
- 25 Nauchno-proizvodstvennyj zhurnal "Veterinary" KolosS, 2003. No.11. – p.12
- 26 [Elektron.resurs]. - URL: (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>)
- 27 Reinhardt W., Reinhardt A. W. Comfortable quarters for cattle in research institutions. 2002 // *Comfort rooms for laboratory animals*, 9th ed. Washington: Institute for Animal Welfare. – p.89-95
- 28 *Cattle: Good Management Practices*, 1st ed. 2008. RSPCA, Division of Animal Research. Available at; as of August 6, 2010
- 29 [Elektron.resurs]. - URL: (www.rspca.org.uk/servlet/BlobServer?blobtable=RSPCABlob&blobcol=urloblob&blobkey=id&blobwhere=1220375292149&blobheader=application/pdf)
- 30 [Elektron.resurs]. - URL: (https://studref.com/437125/agropromyshlennost/reaktsiya_gemagglyutinatsii#389)
- 31 [Elektron.resurs]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologi_cheskikh-preparatov/)
- 32 Miles D. G. (2009). Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD). *Animal health research reviews*, 10(2), 101–103. (<https://doi.org/10.1017/S1466252309990090>)
- 33 [Elektron.resurs]. - URL: (http://www.rsn-kld.ru/news/paragripp_-3_krupnogo_rogatogo_skota/)
- 34 [Elektron.resurs]. - URL: (https://i.moscow/patents/ru2515915c1_20140520)
- 35 [Elektron.resurs]. - URL: (<https://repo.vsavm.by/handle/123456789/5603>)
- 36 Tsai, K. S., & Thomson, R. G. (1975). Bovine parainfluenza type 3 virus infection: ultrastructural aspects of viral pathogenesis in the bovine respiratory tract // *Infection and immunity*. – Vol.11(4). – p.783–803. (<https://doi.org/10.1128/iai.11.4.783-803.1975>)

37 Xue, W., Ellis, J., Mattick, D., Smith, L., Brady, R., & Trigo, E. (2010). Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine*, 28(22), 3784–3792. (<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.043>)

38 Peters, A. R., Thevasagayam, S. J., Wiseman, A., & Salt, J. S. (2004). Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive veterinary medicine*, 66(1-4), 63–77. (<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.08.001>)

39 Baghezza, S., Mamache, B., Bennoune, O., & Ghougal, K. (2021). Pathological study and detection of Bovine parainfluenza 3 virus in pneumonic sheep lungs using direct immunofluorescence antibody technique. *Comparative clinical pathology*, 30(2), 301–310. (<https://doi.org/10.1007/s00580-021-03211-6>)

40 [Elektron.resurs]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologicheskikh-preparatov/)

МРНТИ: 34.27.19

Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹, Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.А. МОМБЕКОВА¹, Б.Б. БАЙМАХАНОВА¹, А.С. БАЛГИМБАЕВА^{1*},
Д.А. ТЛЕУБЕКОВА¹, М.А. АҚЫЛОВА², А.Х. СЕРИКОВА², Ш.Ж. ДАУРЕНБЕКОВА³,
Т.Д. ДООЛОТКЕЛЬДИЕВА⁴, Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА¹

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

²Центральная клиническая больница, Алматы, Казахстан

³Жетысуский университет им. И. Жансугурова, Талдыкорган, Казахстан

⁴Кыргызко-Турецкий Университет Манас, Бишкек, Кыргызстан

*e-mail: imv_rk@list.ru

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ АКТИНОМИЦЕТОВ ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ КАЗАХСТАНА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12

Аннотация

Повсеместно применяемая антибиотикотерапия имеет ряд негативных последствий, одно из которых проявляется в формировании множественной резистентности микроорганизмов к еще недавно успешно применяемым лекарственным средствам. Отсутствие новых классов антибиотиков в сочетании с повышенной устойчивостью к ним возбудителей инфекций требует незамедлительного скрининга новых природных соединений, имеющих новые мишени и механизмы действия и способных заменить лекарственные препараты, теряющие свою эффективность. Актинобактерии представляют собой многочисленный источник новых и жизненно важных биоактивных метаболитов для фармацевтического применения. В статье приводятся результаты исследования антибактериальных свойств изолятов актиномицетов, выделенных из засоленных почв и соленых озер Казахстана. 111 (16,6 %) изолятов экстремофильных актиномицетов проявили антибактериальные свойства против изученных грамположительных (*S. aureus*, MRSA) и 14 (2,1%) изолятов - против грамотрицательных (*E. coli*) тест-микроорганизмов. 12 изолятов (10,6%) экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами обладали широким спектром действия и были активны одновременно к грамположительным (*S. aureus*) и к грамотрицательным (*E. coli*) условно-патогенным возбудителям инфекций. Изоляты экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами в экстремальных условиях роста отобраны для дальнейших исследований, как перспективные продуценты новых природных соединений для медицины.

Ключевые слова: актиномицеты, антибиотики, антибактериальные свойства, спектр действия, условно-патогенные бактерии.

Устойчивость микроорганизмов является причиной интенсификации поиска новых антибактериальных агентов, как эффективного пути преодоления этого явления [1-3]. Актинобактерии представляют собой многочисленный источник новых и жизненно важных биоактивных метаболитов для фармацевтического применения [4]. Существует постоянный интерес к поиску новых природных биологически активных продуктов, необходимых для развития инновационной биотехнологии и фармакологии [5-8].

В последнее время выдвигается предпосылка, что разнообразие актиномицетов в малоизученных необычных средах существования может увеличить перспективы открытия новых соединений с потенциальной активностью, которые могут преодолеть множественную лекарственную устойчивость и быть перспективными для лечения хронических заболеваний, рака, вирусных инфекций [9-13]. Поэтому, экстремальные среды обитания микроорганизмов в настоящее время считаются наиболее интересными для биотехнологических исследований и рассматриваются как богатый источник новых специализированных метаболитов. Однако, исследования по скринингу природных антибиотиков из экстремальных сред обитания показали, что из этих источников

выделяются в большом количестве актиномицеты с нейтрофильными свойствами, которые могут являться хорошо изученными продуцентами известных природных антибиотиков. Многие актиномицеты обладают наборами кластеров биосинтетических генов BGC, кодирующих пути производства ценных вторичных метаболитов, которые могут включаться в работу только при определенных условиях. Недавние геномные подходы показали, что один штамм *Streptomyces* может иметь в среднем от 30 до 50 кластеров BGC, которые могут составлять 8–10% его генома [14, 15]. Это демонстрирует, насколько сложным является современный скрининг новых природных антибиотиков и как часто он может быть нерезультативным, даже при использовании необычных экстремальных источников.

Разработанная нами новая скрининговая программа, основанная на классификации актиномицетов в естественных условиях роста, позволяет исследователям сконцентрировать свои усилия на изучении штаммов, которые принадлежат к определенным группам [16]. Кроме того, она дает возможность создать условия для целенаправленной экспрессии «молчащих» генов биосинтеза новых фармацевтически ценных веществ с использованием определенных природных факторов.

Целью данной работы было исследование антибактериальных свойств актиномицетов, выделенных из необычных экосистем Казахстана в экстремальных условиях роста (соленость и pH) в соответствии с разработанной нами новой скрининговой программой.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись 667 изолятов экстремофильных актиномицетов, выделенных из экстремальных экосистем Северного, Западного и Южного Казахстана (солончаков, солонцов, ризосферы солеустойчивых растений, соленых озер).

Для определения антибактериальной активности изоляты экстремофильных актиномицетов культивировали на 3-х вариантах модифицированного агара Беннета (№1, 2, 3) при температуре 28-29°C в течение 10 суток в термостате Binder.

Состав вариантов модифицированного агара Беннета, (%):

Среда № 1: глюкоза - 0,2; дрожжевой экстракт – 0,1; пептон - 0,2; агар – 2,0; pH 7,2;

Среда № 2: глюкоза – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,1; пептон – 0,2; NaCl – 3,5; агар – 2,0; pH 7,2;

Среда № 3: глюкоза – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,1; пептон – 0,2; NaHCO₃ – 0,35; агар – 2,0; pH 9,0.

Для изучения антибактериальных свойств изолятов в качестве тест-микроорганизмов в исследование были взяты клинические штаммы грамположительных (*Staphylococcus aureus* № 228) и грамотрицательных (*Escherichia coli* № 603) условно-патогенных возбудителей инфекций с лекарственной устойчивостью. *S. aureus* № 228 – клинический метициллинрезистентный штамм, устойчивый к бета-лактамам, *E. coli* № 603 – клинический штамм, устойчивый к бета-лактамам и сульфаниламидам.

Отбор клинических штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Escherichia coli* (ESBL) с различными типами резистентности проведен на базе АО «Центральная клиническая больница», г. Алматы. Идентификация клинических штаммов условно-патогенных возбудителей инфекций и определение их резистентности к лекарственным препаратам выполнены на автоматическом бактериологическом анализаторе “MINI API” фирмы “BIO MERIEUX”.

Антибактериальную активность определяли методом диффузии в агар (агаровых блоков) на питательном агаре фирмы Hi-Media. Для оценки антагонистических свойств, с помощью стандартного бура (d=7 мм), готовили агаровые блоки культур экстремофильных актиномицетов, выросших на 3 вариантах модифицированного агара Беннета. Затем агаровые блоки помещали в чашки Петри с питательным агаром, засеянном глубинным ростом тест-микроорганизмами (КОЕ 10⁶/мл). В качестве контроля использовали

стерильные чистые питательные среды. Диаметр зон подавления роста бактериальных тест-микроорганизмов измеряли после инкубирования при температуре 37°C в течение 24 часов. Все исследования выполняли в трех повторностях.

Все данные (три повтора) подвергали статистическому анализу, который проводили с использованием пакета программ «Statistica 10.0» [17]. Статистический анализ проводили путем расчета средних значений и стандартных отклонений результатов. Все статистические результаты с $P < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Изучены антибактериальные свойства 667 изолятов экстремофильных актиномицетов в отношении клинических штаммов грамположительных (*S. aureus* № 228) и грамотрицательных (*E. coli* № 603) условно-патогенных возбудителей инфекций с лекарственной устойчивостью. Полученные данные по антибактериальным свойствам экстремофильных актиномицетов представлены в таблице 1 и на рисунках 1–4. В таблице приведены данные по изолятам, проявляющим антибактериальную активность в экстремальных условиях.

Таблица 1 – Антагонистические свойства экстремофильных актиномицетов в отношении грамположительных (*S. aureus* № 228) и грамотрицательных (*E. coli* № 603) клинических условно-патогенных возбудителей инфекций

Порядковый номер	Номер штамма	Диаметр зоны подавления роста тест-микроорганизма, мм		
		Среда № 1	Среда № 2	Среда № 3
1	2	3	4	5
1	2/4/1	16,3±0,5/0	12,6±0,1/0	15,1±0,5/0
2	2/5/4	12,4±0,7/0	12,0±0,4/0	15,9±0,2/0
3	1/11/1	0	15,4±0,7/0	0
4	1/11/5	0	16,1±0,1/0	12,3±0,5/0
5	1/15/3	20,2±0,2/0	20,4±0,2/20,3±0,5	20,4±0,3/15,8±0,1
6	1/15/7	0	20,6±0,4/0	нет роста
7	2/15/1	0	22,0±0,5/23,4±0,7	0
8	2/15/2	0	0/25,3±0,7	0
9	2/15/4	20,6±0,8/0	17,3±0,8/0	12,0±0,4/0
10	2/15/5	17,4±0,6/0	20,5±0,9/0	10,7±0,2/0
11	3/15/1	нет роста	11,3±0,7/0	15,2±0,3/0
12	1/16/2	15,2±0,6/0	20,5±1,0/0	11,0±0,1/0
13	2/16/3	17,3±0,5/17±0,1	25,7±0,5/14,0±0,3	15,4±0,5/0
14	3/16/1	нет роста	30,4±0,5/25,2±0,6	20,1±0,5/10,6±0,1
15	2/18/1	15,9±0,1/0	25,6±0,5/0	17,3±0,1/0
16	2/20/1	10,2±0,5/0	17,2±0,8/0	0
17	1/21/1	19,4±0,1/0	22,2±0,2/0	0
18	1/21/4	15,2±0,3/0	15,1±0,1/0	20,0±0,3/0
19	1/21/6	17,8±1,5/0	22,4±0,1/0	18,7±0,2/0
20	2/21/2	20,3±0,5/0	11,0±0,2/0	0
21	2/21/3	12,0±0,1/0	18,5±0,5/0	0
22	2/22/1	15,5±0,2/0	20,4±0,1/0	15,2±0,1/0
23	2/22/2	20,1±0,1/0	22,6±0,8/0	15,4±0,7/0
24	3/22/3	15,1±0,7/0	15,0±0,4/0	14,8±1,0/0
25	2/23/3	20,6±0,7/0	25,1±0,2/0	30,7±0,5/0
26	1/26/6	15,4±0,1/23,5±0,1	0/15,3±0,4	0/12,1±0,2
27	2/27/2	23,3±0,2/0	0	15,8±0,1/0
28	2/29/2	25,7±0,1/0	25,2±1,3/0	15,4±0,9/0
29	2/29/3	20,3±0,1/20,4±1,2	17,1±0,6/16,5±0,3	13,1±0,1/18,7±0,5
30	2/29/5	20,3±0,5/20,6±0,4	24,0±0,1/22,4±0,5	20,6±1,5/20,9±0,1
31	2/31/1	12,4±1,1/0	16,3±0,1/0	0

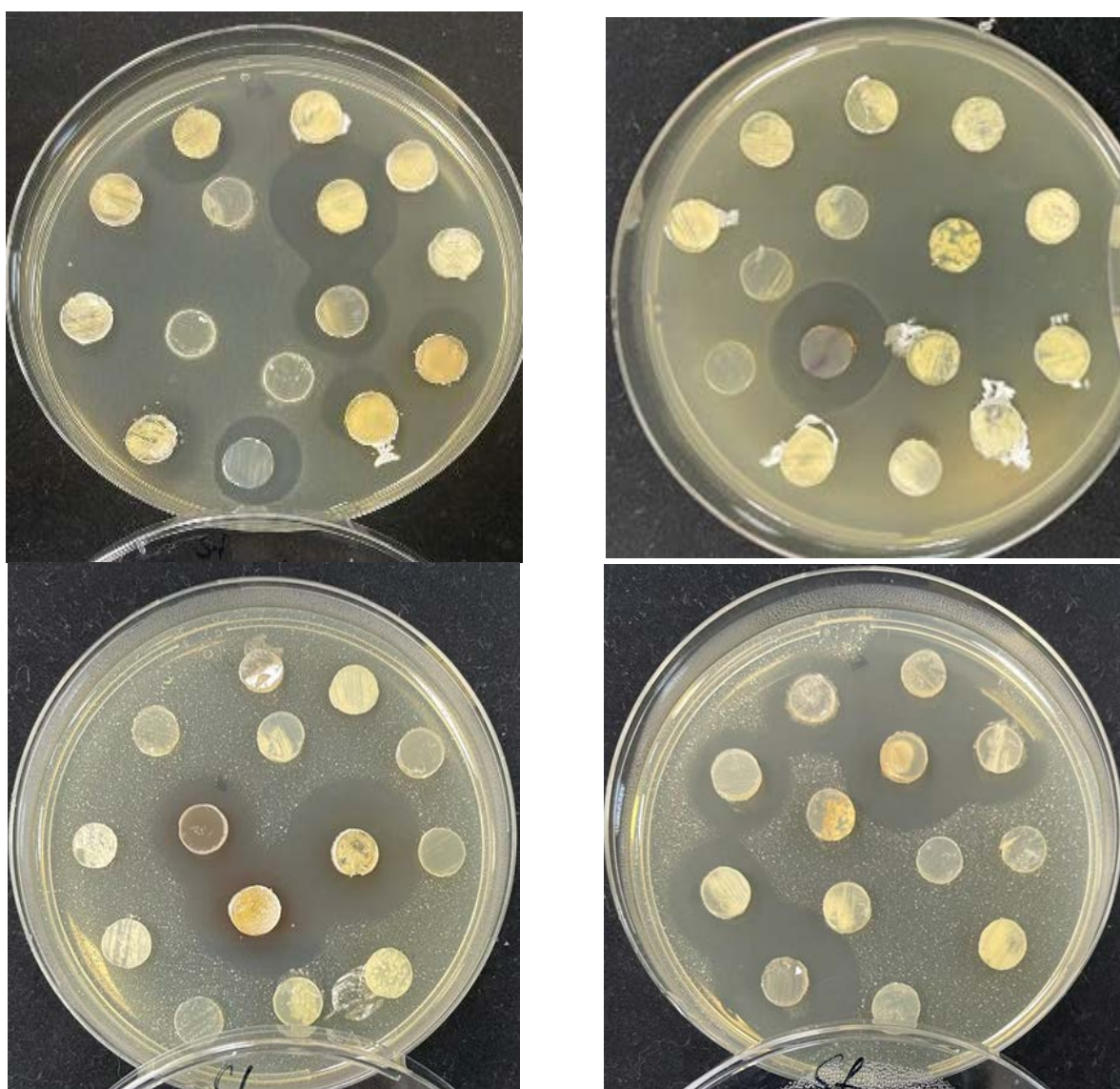
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
32	3/31/1	20,7±0,2/0	20,1±1,3/0	20,5±1,4/0
33	2/33/4	19,5±0,1/0	10,0±0,5/0	0
34	2/33/5	22,4±0,4/0	25,1±0,1/0	25,5±0,1/0
35	1/34/3	15,2±0,8/0	30,3±0,5/0	0
36	3/34/1	нет роста	0	22,4±0,2/0
37	1/37/1	28,0±1,0/28,3±0,5	25,5±0,2/25,3±0,1	15,7±0,4/16,0±0,3
38	1/37/2	25,0±1,5/0	30,4±0,5/0	25,8±0,1/0
39	1/37/3	20,1±0,2/0	20,3±0,5/17,5±0,1	15,3±0,4/0
40	1/37/7	12,4±0,1/0	19,9±0,2/0	12,6±0,5/0
41	2/37/4	0	0/25,5±0,1	0/11,0±0,5
42	3/37/1	0	14,6±0,1/0	0
43	2/38/1	0	нет роста	15,4±0,7/0
44	2/39/3	20,0±0,3/0	30,4±0,2/0	20,3±0,2/0
45	3/39/1	0	0	15,0±0,1/0
46	1/40/2	0	12,5±0,5/0	0
47	2/49/2	0	12,8±0,4/0	0
48	3/50/5	0	0	15,2±0,3/0
49	1/51/1	10,2±0,1/0	10,2±0,4/0	30,3±1,1/15,4±0,7
50	2/51/1	0	0	15,3±0,7/0
51	1/51/5	15,5±0,5/0	0	11,4±0,2/0
52	2/51/2	0	0	17,8±0,1/0
53	2/51/3	0	11,6±0,5/0	20,5±1,0/15,1±0,1
54	2/53/1	15,0±0,1/0	20,4±1,5/0	0
55	2/54/1	15,0±0,2/0	15,3±0,1/0	0
56	2/55/1	0	13,3±0,1/0	15,2±0,5/0
57	3/55/1	10,3±0,1/0	17,9±0,5/0	0
58	1/58/1	0	15,4±0,1/0	нет роста
59	3/58/3	0	12,0±0,5/0	15,2±0,1/0
60	1/59/3	15,7±0,1/0	15,5±0,2/0	нет роста
61	2/59/1	0	19,3±0,5/0	12,5±0,1/0
62	2/59/4	15,4±0,7/0	18,8±1,5/0	нет роста
63	3/59/1	15,2±0,1/0	17,2±0,1/0	нет роста
64	3/59/2	10,0±0,0/0	12,3±0,9/0	нет роста
65	1/60/2	25,4±0,6/0	25,7±1,5/0	нет роста
66	1/60/4	12,0±0,3/0	18,6±0,2/0	нет роста
67	2/60/3	23,3±0,5/0	25,6±0,1/0	18,5±0,1/0
68	3/60/1	25,4±0,1/0	25,5±0,2/0	нет роста
69	3/66/1	22,6±0,2/0	15,2±0,1/0	17,3±0,5/0
70	1/67/1	0	17,1±0,4/0	13,0±0,1/0
71	3/67/1	0	30,6±1,5/0	12,4±0,5/0
72	2/69/1	27,9±1,5/0	25,2±0,2/0	20,5±0,3/0
73	2/69/2	14,3±0,1/0	12,1±0,5/0	12,1±0,1/0
74	2/69/5	13,0±0,5/0	12,4±0,5/0	12,3±0,4/0
75	3/72/2	12,3±0,5/0	12,2±0,2/0	0
76	1/73/1	0	0	16,2±0,7/0
77	3/73/1	12,0±0,1/0	10,1±0,1/0	нет роста
78	1/75/3	25,3±0,2/0	25,3±1,3/0	0
79	1/75/5	25,4±1,5/0	20,7±0,5/0	20,6±0,1/0
80	1/75/6	18,7±0,5/0	25,6±0,5/0	нет роста
81	1/76/1	12,4±0,4/0	21,5±0,2/0	нет роста
82	2/76/2	12,1±0,4/0	13,6±0,1/0	0
83	3/77/1	12,4±0,2/0	15,0±0,2/0	нет роста

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
84	1/78/2	20,6±1,9/0	20,4±0,1/0	20,7±1,2/0
85	1/79/1	0	0	18,3±0,6/0
86	1/79/2	12,7±0,5/0	11,3±0,2/0	12,5±0,8/0
87	1/79/4	12,0±0,4/0	15,8±0,3/0	12,6±0,8/0
88	1/79/8	0	0	15,3±0,5/0
89	3/79/5	0	0	25,2±0,7/0
90	1/88/1	25,2±0,1/0	20,9±0,5/0	нет роста
91	1/89/1	15,1±0,7/0	15,3±0,1/0	нет роста
92	2/89/2	0	20,4±0,2/0	30,1±0,2/0
93	1/92/2	20,6±0,4/0	25,2±0,1/0	0
94	1/93/1	25,3±0,2/0	20,5±0,2/0	25,8±0,9/0
95	3/94/2	0	0	20,1±1,0/15,1±0,4

Примечание: в числителе – диаметр зоны подавления роста *S. aureus* № 228, в знаменателе – диаметр зоны подавления роста *E. coli* № 603, 0 – активность отсутствует



Рисунки 1–4 - Антагонистические свойства экстремофильных актиномицетов в отношении *S. aureus* № 228 (MRSA)

Принято считать, что галофильные актиномицеты в будущем станут ценным ресурсом для новых продуктов, представляющих промышленный интерес, включая противомикробные, цитотоксические, нейротоксические, антимиотические, противовирусные и противоопухолевые препараты [10]. Из экстремальных условий уже описаны различные биоактивные метаболиты, такие как пиростатины, салиноспорамиды, абиссомицины, триоксакарцин А, гутингимицин, споролиды, мариномицины, гималамицины, диазепиномицин, хелхинолин, ладжолламицин, тетродотоксин, мехерчармицины, цианримицины и другие.

Изучение антагонизма экстремофильных актиномицетов различными исследователями показывает разнообразие антибактериальные свойства, как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных условно-патогенных возбудителей инфекций. В ходе исследований по открытию новых природных продуктов из экстремофильных актиномицетов были получены новые линейные поликетиды и актинополиспорины А, В и С из галофильного актиномицета *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600 [18]. Из галофильного актиномицета *Nocardiosis gilva* YIM 90087 выделены и охарактеризованы *n*-терфенилы с противогрибковой, антибактериальной и антиоксидантной активностью [19]. Описан новый антибиотик антрацимицин, который вырабатывается актиномицетами морского происхождения в солевой среде [20]. Антимикробный хинолиновый алкалоид был выделен из нового галофильного актиномицета *Nocardiosis terrae* YIM 90022 [21]. 18 видов рода *Streptomyces* выделены из засоленных экосистем Непала, 12 изолятов проявили антибактериальную активность против бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL), продуцируемых *E. coli* [22]. Новые антибиотики, такие как хиникомидин и ладжолламицин, обнаружены у галофильных и галотолерантных видов актиномицетов [10]. *Streptomyces* spp. AJ8, выделенный из донных отложений солеварен в Индии, обладал сильным антагонистическим действием против *S. aureus*, *A. hydrophila* и *C. albicans* [23]. Из солончака на юге Индии изолирован штамм *Streptomyces* VITSVK5 spp., образующий биологически активное вещество из группы пирролидинов с высокой активностью в отношении *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. fumigatus* и *A. niger* [24]. Четыре изолята *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flaveous*, *Streptomyces plicatus*, и *Streptomyces griseoruber*, выделенные из засоленных и щелочных почв Египта, показали высокие антимикробные антагонистические свойства [25].

Полученные нами данные так же, как и данные литературы, демонстрируют разнообразие антибактериальных свойств экстремофильных актиномицетов из необычных экосистем Казахстана. Анализ полученных нами результатов показал, что 111 (16,6 %) изолятов экстремофильных актиномицетов проявили антибактериальные свойства против изученных грамположительных (*S. aureus* № 228) и 14 (2,1%) изолятов - против грамотрицательных (*E. coli* № 603) тест-микроорганизмов. Изоляты экстремофильных актиномицетов проявили антибактериальную активность в экстремальных условиях роста, что свидетельствует об их перспективности для дальнейшего исследования.

Наиболее высокую активность в экстремальных условиях роста против *S. aureus* № 228 проявили изоляты №№ 3/16/1, 1/34/3, 1/37/2, 2/39/3, 1/51/1, 3/67/1, 2/89/2 (диаметр зоны подавления роста - до 30,1±0,2 мм), против *E. coli* № 603 – изоляты №№ 2/15/2, 3/16/1, 1/37/1, 2/37/4 (диаметр зоны подавления роста - до 25,5±0,1 мм).

99 изолятов (87,6%) актиномицетов из 113 изолятов с обнаруженной антибактериальной активностью имели узкий спектр антагонистического действия против грамположительных тест-микроорганизмов (*S. aureus* № 228) и только 2 изолята (1,8%) проявили узкий спектр действия к грамотрицательным условно-патогенным бактериям (*E. coli* № 603). 12 изолятов (10,6%) экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами обладали широким спектром антибактериального действия и были активны одновременно к грамположительным (*S. aureus* № 228) и к грамотрицательным (*E. coli* № 603) условно-патогенным возбудителям инфекций.

11 изолятов актиномицетов проявили активность только в экстремальных условиях роста (при росте, как на среде 2 с 3,5% NaCl, pH 7,0 так и в щелочных условиях – при росте на среде 3 с 0,35% NaHCO₃, pH 9,0): №№ 1/11/5, 3/15/1, 3/16/1, 2/37/4, 2/51/3, 2/55/1, 3/58/3, 2/59/1, 1/67/1, 3/67/1, 2/89/2. Изоляты №№ 2/51/3 и 2/89/2 проявили в экстремальных условиях роста высокую антибактериальную активность в отношении грамположительных условно-патогенных бактерий (*S. aureus* № 228, MRSA), активность также наиболее выражена в щелочных условиях роста - диаметр зоны подавления роста – 20,5±1,0-30,1±0,2 мм. Изолят № 2/37/4 имел узкий спектр действия против грамотрицательных бактерий, диаметр зоны подавления роста *E. coli* № 603 на среде 2 составил 25,5±0,1 мм. Изолят № 3/16/1 проявил широкий спектр действия с высоким уровнем активности только в экстремальных условиях роста – при росте на среде 2 (3,5% NaCl) зона подавления роста *S. aureus* № 228 составляла 30,4±0,5 мм, *E. coli* № 603 – 25,2±0,6 мм.

18 изолятов актиномицетов проявили антибактериальную активность при росте только в одной экстремальной среде: №№ 1/11/1, 2/15/1, 2/15/2, 1/15/7, 3/37/1, 1/40/2, 2/49/2, 1/58/1 - на среде 2; №№ 3/34/1, 3/39/1, 3/50/5, 2/51/1, 2/51/2, 1/73/1, 1/79/1, 1/79/8, 3/79/5, 3/94/2 - на среде 3. Изолят № 2/15/2 имеет узкий спектр действия в отношении грамотрицательных тест-микроорганизмов (*E. coli* № 603), активность выявлена при росте на среде 2 – диаметр зоны подавления роста – 25,3±0,7 мм. Высокую активность в отношении грамположительных бактерий на среде 2 проявил изолят № 1/15/7 - диаметр зоны подавления роста – 20,6±0,4 мм (*S. aureus* № 228). Изолят № 3/79/5 проявил самую высокую активность на среде 3 - диаметр зоны подавления роста 25,2±0,7 мм (*S. aureus* № 228). Изолят № 2/15/1 проявил широкий спектр антибактериального действия на среде 2, диаметр зоны подавления роста *S. aureus* № 228 – 22,0±0,5 мм, *E. coli* № 603 – 23,4±0,7 мм.

Полученные результаты соотносятся с данными литературы по активности актиномицетов, выделенных из экстремальных экосистем различных зон Земли. Из солевара (Джайпур, Индия) выделены изоляты актиномицетов, проявившие активность против *S. aureus* (диаметр зоны подавления роста – 15±0,57 - 35±0,88 мм) [26]. Изоляты актиномицетов, полученные из солончаковых почв Марокко [27], проявили активность при росте на среде Беннета против *S. aureus* (диаметр зоны подавления роста – 20,3±0,5 мм), *E. coli* (13±1 мм). 21 изолятов, полученных из образца засушливой почвы Южной Африки проявили активность против *S. aureus* с зонами ингибирования от 16 до 40 мм, против *E. coli* (ToIC) (7 изолятов) с зонами ингибирования 12-20 мм [28]. 8 изолятов, выделенных из из засоленной почвы Алжира продемонстрировали противомикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, диаметр зон подавления роста варьировал от 16 до 45 мм [29].

Заключение

Из экстремальных экосистем Казахстана выделены 667 изолятов гало-, алкалофильных, а также толерантных к солям и pH экстремофильных актиномицетов, которые обладают потенциальной возможностью синтезировать новые природные продукты для медицины. Для 113 изолятов экстремофильных актиномицетов, выделенных из Северного, Западного и Южного Казахстана, установлено наличие антибактериальных свойств: 111 изолятов проявили активность против клинического штамма *S. aureus* № 228 (MRSA), 14 изолятов экстремофильных актиномицетов - против клинического штамма *E. coli* № 603. Наряду с узким спектром антибактериального действия большинства штаммов экстремофильных актиномицетов, 12 изолятов обладали широким спектром действия и были активны одновременно к грамположительным (*S. aureus* № 228) и к грамотрицательным (*E. coli* № 603) условно-патогенным возбудителям инфекций. Изоляты экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами в экстремальных условиях роста отобраны для дальнейших исследований, как перспективные продуценты новых природных соединений для медицины.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Комитета Науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP14869253).

Литература:

- 1 Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 2017, 34(10):1203–1232 (doi: 10.1039/c7np00026j)
- 2 Fair R.J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Med. Chem.* 2014, 6:25–64 (doi: 10.4137/PMC.S14459)
- 3 Butler, M. S., Blaskovich, M. A., and Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot.* 2013, 66, 571–591. doi: 10.1038/ja.2013.86
- 4 Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* 2009, 62:5–16 (doi: 10.1038/ja.2008.16)
- 5 Katz L., Baltz R.H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 43:155–176 (doi: 10.1007/s10295-015-1723-5)
- 6 Krug D., Muller R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2014, 31:768–783 (doi: 10.1039/c3np70127a)
- 7 Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nature Rev. Microbiol.* 2003, 1:65–70 (doi: 10.1038/nrmicro727)
- 8 Tulp M., Bohlin L. Rediscovery of known natural compounds: nuisance or goldmine? *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13:5274–5282 (doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.067)
- 9 Peraud O., Biggs J. S., Huguen R. W., Light A. R., Concepcion G. P., et al. Microhabitats within venomous cone snails contain diverse Actinobacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 2009, 75:6820–6826 (doi: 10.1128/AEM.01238-09)
- 10 Hamed J., Mohammadipanah F., Ventosa A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles.* 2013, 17:1–13 (doi: 10.1007/s00792-012-0493-5)
- 11 Jose P. A., Sivakala K. K., Jebakumar S. R. D. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06. *Int. J. Microbiol.* 2013:526260. (doi: 10.1155/2013/526260)
- 12 Yuan M., Yu Y., Li H.-R., Dong N., Zhang, X.-H. Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the Arctic Ocean. *Mar. Drugs.* 2014, 12:1281–1297 (doi: 10.3390/md12031281)
- 13 Треножникова Л.П., Баймаханова Г.Б., Балгимбаева А.С., Баймаханова Б.Б., Смирнова И.Э., Файзулина Э.Р., Спанкулова Г.А., Татаркина Л.Г., Момбекова Г.А., Елубаева А.Е., Айткельдиева С.А., Глеубекова Д.А. Биотехнологический потенциал экстремофильных актиномицетов для медицины и стратегии его открытия. *Микробиология және вирусология.* 2021, 4(35):4–26. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2021.04.01>)
- 14 Baltz R.H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 44:573–588 (doi: 10.1007/s10295-016-1815-x)
- 15 Aigle B., Lautru S., Spitteller D., Dickschat J.S., Challis G.L., Leblond P., Pernodet J.L. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 41:251–263 (doi: 10.1007/s10295-013-1379-y)
- 16 Trenzchnikova L., Azizan A. Discovery of Actinomycetes from Extreme Environments with Potential to Produce Novel Antibiotics. *Cent. Asian J. Glob. Health.* 2018, 7(1):337 (doi: 10.5195/CAJGH.2018.337)
- 17 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Горячая линия-Телеком. 2016; 288 с.
- 18 Zhao L.X., Huang S.X., Tang S.K., Jiang C.L., Duan Y., Beutler J.A., et al. Actinopolysporins A–C and Tubercidin as a Pcd4 stabilizer from the halophilic actinomycete *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600. *Nat. Prod.* 2011, 74(9):1990–1995 (doi: 10.1021/np200603g)
- 19 Tian S.Z., Pu X., Luo G., Zhao L.X., Xu L.H., Li W.J., et al. Isolation and characterization of new p-Terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardopsis gilva* YIM 90087. *J. Agr. Food Chem.* 2013, 61(12):3006–3012 (doi: 10.1021/jf400718w)

20 Jang K.H., Nam S.J., Locke J.B., Kauffman C.A., Beatty D.S., Paul L.A., et al. Anthracimycin, a potent Anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, 52(30):7822–7824 (doi: 10.1002/anie.201302749)

21 Tian S., Yang Y., Liu K., Xiong Z., Xu L., Zhao L. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardiosis terrae* YIM 90022. *Nat. Prod. Res.* 2014, 28(5):344–346 (doi: 10.1080/14786419.2013.858341)

22 Khadayat K., Sherpa D.D., Malla K.P., Shrestha S., Rana N., Marasini B.P., Khanal S., Rayamajhee B., Bhattarai B.R., Parajuli N. Molecular Identification and Antimicrobial Potential of *Streptomyces* Species from Nepalese Soil. *Int. J. Microbiol.* 2020:8817467 (doi: 10.1155/2020/8817467)

23 Jenifer J.S.C.A., Donio M.B.S., Michaelbabu M., et al. Haloalkaliphilic *Streptomyces* spp. AJ8 isolated from solar salt works and its' pharmacological potential. *AMB Expr.* 2015, 5(1):143 (doi: 10.1186/s13568-015-0143-2)

24 Saurav K., Kannabiran K. In vitro activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. against fungal and bacterial human pathogens. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2012, 29(1):29-33 (doi: 10.1016/j.riam.2011.06.008)

25 Hozzein W.N., Ali M.I., Ahmad M.S. Antimicrobial activities of some alkaliphilic and alkaline-resistant microorganisms isolated from Wadi Araba, the eastern desert of Egypt. *J. Life Sci.* 2013, 10(4):1823-1828 (<https://www.researchgate.net/publication/288289450>)

26 Jose P.A., Jebakumar S.R. Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Front. Microbiol.* 2013, 10;4:190 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00190)

27 El Karkouri A., Assou S.A., El Hassouni M. Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. *Pan Afr. Med. J.* 2019, 29;33:329 (doi: 10.11604/pamj.2019.33.329.19018)

28 Charousová I., Medo J., Hleba L., Císarová M., Javoreková S. Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2019, 55. (doi: 10.1590/s2175-97902019000217249)

29 Belkacem I., Hakim D., Ramzi S. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Saline Soil Samples with Antimicrobial Activities against Microbial Pathogens. *South Asia J. of Experivental Biology.* 2023, 13(2):114-124 (doi: [https://doi.org/10.38150/sajeb.13\(2\).p114-124](https://doi.org/10.38150/sajeb.13(2).p114-124))

Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹, Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.А. МОМБЕКОВА¹, Б.Б. БАЙМАХАНОВА¹, А.С. БАЛГИМБАЕВА^{1*},
Д.А. ТЛЕУБЕКОВА¹, М.А. АҚЫЛОВА², А.Х. СЕРИКОВА², Ш.Ж. ДАУРЕНБЕКОВА³,
Т.Д. ДООЛОТКЕЛЬДИЕВА⁴, Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА¹

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

²Орталық клиникалық больница, Алматы, Қазақстан

³І. Жансүгіров атындағы жетісу университеті, Талдықорған, Қазақстан

⁴Қырғыз-Түрік «Манас» университеті, Бішкек, Қырғызстан

*e-mail: imv_rk@list.ru

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ЭКСТРЕМАЛЬДІ ЖЕРЛЕРІНДЕ МЕКЕНДЕЙТІН АКТИНОМИЦЕТТЕРДІҢ АНТИБАКТЕРИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Кеңінен қолданылатын антибиотикалық терапия бірқатар жағымсыз салдарға ие, олардың бірі микроорганизмдердің жақында сәтті қолданылған препараттарға көп төзімділігін қалыптастыруда көрінеді. Антибиотиктердің жаңа кластарының болмауы, оларға жұқпалы қоздырғыштардың төзімділігінің жоғарылауымен бірге жаңа мақсаттары мен әсер ету механизмдері бар және тиімділігін жоғалтатын препараттарды алмастыра алатын жаңа табиғи қосылыстарды дереу тексеруді талап етеді. Фармацевтикада қолдану үшін актинобактериялар жаңа және өмірлік маңызды биологиялық белсенді метаболиттердің көптеген көзі болып табылады. Мақалада Қазақстанның тұзды топырақтарынан және көлдер бөлінген актиномицеттер изоляттарының бактерияға қарсы қасиеттерін зерттеу нәтижелері берілген. Экстремофильді актиномицеттердің

зерттеген кезде 111 (16,6%) изоляттары грам-оң (*S. aureus*, MRSA) және 14 (2,1%) изоляттары грам-теріс (*E. coli*) сынамалы микроорганизмдерге қарсы антибактериялық қасиеттер көрсетті. Бактерияға қарсы қасиеттері бар экстремофильді актиномицеттердің 12 изоляттары (10,6%) белсенділіктің кең спектріне ие болды және шартты-патогенді жұқпалы ауруды қоздырғыш грам-оң (*S. aureus*) және грам-теріс (*E. coli*) микроорганизмдерге қарсы бір мезгілде белсенді болды. Медицина үшін жаңа табиғи қосылыстардың перспективті продуценттері ретінде одан әрі зерттеу үшін экстремалды өсу жағдайында бактерияға қарсы қасиеттері бар экстремофильді актиномицеттердің изоляттары таңдалды.

Кілтті сөздер: актиномицеттер, антибиотиктер, бактерияға қарсы қасиеттер, әсер ету спектрі, шартты-патогенді бактериялар.

IRSTI: 34.27.19

G.B. BAIMAKHANOVA¹, E.R. FAIZULINA¹, L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOVA¹,
G.A. MOMBEKOVA¹, B.B. BAIMAKHANOVA¹, A.S. BALGIMBAYEVA^{1*},
D.A. TLEUBEKOVA¹, M.A. AKYLOVA², A.H. SERIKOVA², Sh.Zh. DAURENBEKOVA³,
T.D. DOOLOTKELDIEVA⁴, L.P. TRENOZHNIKOVA¹

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

²Central Clinical Hospital, Almaty, Kazakhstan

³I. Zhansugurova Zhetysu University, Taldykorgan, Kazakhstan

⁴Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek, Kyrgyzstan

*e-mail: imv_rk@list.ru

STUDY OF ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF ACTINOMYCETES FROM EXTREME HABITATS OF KAZAKHSTAN

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12

Abstract

The widely applied antibiotic therapy has a variety of negative consequences, one of which is manifested in the formation of multiple resistance of microorganisms to recently successfully applied drugs. The lack of new classes of antibiotics combined with increased resistance to them by infectious agents requires immediate screening of new natural compounds that have new targets and mechanisms of action and can replace drugs that are losing their effectiveness. Actinobacteria represent a numerous source of new and vital bioactive metabolites for pharmaceutical use. The article presents the results of a study of the antibacterial properties of actinomycete isolates isolated from saline soils and saline lakes of Kazakhstan. 111 (16.6%) isolates of extremophilic actinomycetes showed antibacterial properties against the studied gram-positive (*S. aureus*, MRSA) and 14 (2.1%) isolates - against gram-negative (*E. coli*) test microorganisms. 12 isolates (10.6%) of extremophilic actinomycetes with antibacterial properties had a wide spectrum of activity and were active simultaneously against gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli*) opportunistic pathogens. Isolates of extremophilic actinomycetes with antibacterial properties under extreme growth conditions were selected for further research as promising producers of new natural compounds for medical applications.

Keywords: actinomycetes, antibiotics, antibacterial properties, spectrum of action, opportunistic bacteria.

The resistance of microorganisms is the reason for the intensification of the search for new antibacterial agents as an effective way to overcome this phenomenon [1-3]. Actinobacteria represent a numerous source of new and vital bioactive metabolites for pharmaceutical use [4]. There is a constant interest in the search for new natural biologically active products necessary for the development of innovative biotechnology and pharmacology [5-8].

Recently, it has been hypothesised that the diversity of actinomycetes in poorly studied unusual environments may increase the prospects for the discovery of new compounds with

potential activity that can overcome multidrug resistance and be promising for the treatment of chronic diseases, cancer, and viral infections [9-13]. Therefore, extreme microbial habitats are currently considered the most interesting for biotechnological research and are regarded as a rich source of new specialized metabolites. However, studies on the screening of natural antibiotics from extreme habitats have shown that actinomycetes with neutrophilic properties, which may be well-studied producers of known natural antibiotics, are isolated in large numbers from these sources. Many actinomycetes possess sets of BGC biosynthetic gene clusters encoding pathways for the production of valuable secondary metabolites that can only be switched on under specific conditions. Recent genomic approaches have shown that a single *Streptomyces* strain can have an average of 30 to 50 BGC clusters, which can account for 8-10% of its genome [14, 15]. This demonstrates how difficult modern screening for new natural antibiotics can be and how often it can yield inconclusive results, even when using unusual and extreme sources.

The new screening program we have developed, based on the classification of actinomycetes under natural growth conditions, allows researchers to focus their efforts on studying strains that belong to specific groups [16]. Additionally, it provides an opportunity to create conditions for the targeted expression of "silent" genes responsible for biosynthesizing new pharmaceutically valuable substances using certain natural factors.

The aim of this work was to study the antibacterial properties of actinomycetes isolated from unusual ecosystems in Kazakhstan under extreme growth conditions, including salinity and pH, in accordance with our newly developed screening program.

Materials and methods of research

The objects of the study were 667 isolates of extremophilic actinomycetes obtained from extremal ecosystems of Northern, Western and Southern Kazakhstan (salt marshes, solonchaks, rhizosphere of salt-tolerant plants, saline lakes).

To determine the antibacterial activity, isolates of extremophilic actinomycetes were cultivated on 3 versions of modified Bennett agar (№№ 1, 2, 3) at a temperature of 28–29°C for 10 days in a Binder thermostat.

Composition of variants of modified Bennett agar, (%):

Medium № 1: glucose - 0.2; yeast extract - 0.1; peptone - 0.2; agar - 2.0; pH 7.2;

Medium № 2: glucose - 0.2; yeast extract - 0.1; peptone - 0.2; NaCl - 3.5; agar - 2.0; pH 7.2;

Medium № 3: glucose - 0.2; yeast extract - 0.1; peptone - 0.2; NaHCO₃ - 0.35; agar - 2.0; pH 9.0.

"To study the antibacterial properties of isolates, we used clinical strains of gram-positive (*Staphylococcus aureus*, strain № 228) and gram-negative (*Escherichia coli*, strain № 603) opportunistic pathogens with drug resistance. *Staphylococcus aureus* strain № 228 is a clinical methicillin-resistant strain resistant to beta-lactams, while *Escherichia coli* strain № 603 is a clinical strain resistant to beta-lactams and sulfonamides.

The selection of these clinical strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* (ESBL) with different types of resistance was carried out at the JSC Central Clinical Hospital in Almaty. The identification of clinical strains of opportunistic pathogens and the determination of their drug resistance were performed using an automatic bacteriological analyzer, "MINI API," manufactured by the company "BIO MERIEUX."

Antibacterial activity was determined using the agar diffusion method (agar blocks) on Hi-Media nutrient agar. To evaluate antagonistic properties, agar blocks of cultures of extremophilic actinomycetes grown on three variants of modified Bennett's agar were prepared using a standard drill (d=7 mm). These agar blocks were then placed in Petri dishes with nutrient agar seeded with deep growth test microorganisms (CFU 10⁶/ml). Sterile pure nutrient media were used as a control. The diameter of the growth suppression zones of bacterial test microorganisms was measured after incubation at 37°C for 24 hours. All studies were performed in triplicate.

All data (from three repetitions) underwent statistical analysis using the software package "Statistica 10.0" [17]. Statistical analysis involved calculating the mean values and standard deviations of the results. Results with a P-value < 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion

The antibacterial properties of 667 isolates of extremophilic actinomycetes against clinical strains of gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) opportunistic pathogens with drug resistance were studied. The data obtained on the antibacterial properties of extremophilic actinomycetes are presented in Table 1 and in Figures 1–4. The table shows data on isolates exhibiting antibacterial activity under extreme conditions.

Table 1 - Antagonistic properties of extremophilic actinomycetes against gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) clinical opportunistic pathogens

Serial number	Isolate number	Diameter of the growth inhibition zone of the test-microorganism, mm		
		Medium № 1	Medium № 2	Medium № 3
1	2	3	4	5
1	2/4/1	16,3±0,5/0	12,6±0,1/0	15,1±0,5/0
2	2/5/4	12,4±0,7/0	12,0±0,4/0	15,9±0,2/0
3	1/11/1	0	15,4±0,7/0	0
4	1/11/5	0	16,1±0,1/0	12,3±0,5/0
5	1/15/3	20,2±0,2/0	20,4±0,2/20,3±0,5	20,4±0,3/15,8±0,1
6	1/15/7	0	20,6±0,4/0	no growth
7	2/15/1	0	22,0±0,5/23,4±0,7	0
8	2/15/2	0	0/25,3±0,7	0
9	2/15/4	20,6±0,8/0	17,3±0,8/0	12,0±0,4/0
10	2/15/5	17,4±0,6/0	20,5±0,9/0	10,7±0,2/0
11	3/15/1	no growth	11,3±0,7/0	15,2±0,3/0
12	1/16/2	15,2±0,6/0	20,5±1,0/0	11,0±0,1/0
13	2/16/3	17,3±0,5/17±0,1	25,7±0,5/14,0±0,3	15,4±0,5/0
14	3/16/1	no growth	30,4±0,5/25,2±0,6	20,1±0,5/10,6±0,1
15	2/18/1	15,9±0,1/0	25,6±0,5/0	17,3±0,1/0
16	2/20/1	10,2±0,5/0	17,2±0,8/0	0
17	1/21/1	19,4±0,1/0	22,2±0,2/0	0
18	1/21/4	15,2±0,3/0	15,1±0,1/0	20,0±0,3/0
19	1/21/6	17,8±1,5/0	22,4±0,1/0	18,7±0,2/0
20	2/21/2	20,3±0,5/0	11,0±0,2/0	0
21	2/21/3	12,0±0,1/0	18,5±0,5/0	0
22	2/22/1	15,5±0,2/0	20,4±0,1/0	15,2±0,1/0
23	2/22/2	20,1±0,1/0	22,6±0,8/0	15,4±0,7/0
24	3/22/3	15,1±0,7/0	15,0±0,4/0	14,8±1,0/0
25	2/23/3	20,6±0,7/0	25,1±0,2/0	30,7±0,5/0
26	1/26/6	15,4±0,1/23,5±0,1	0/15,3±0,4	0/12,1±0,2
27	2/27/2	23,3±0,2/0	0	15,8±0,1/0
28	2/29/2	25,7±0,1/0	25,2±1,3/0	15,4±0,9/0
29	2/29/3	20,3±0,1/20,4±1,2	17,1±0,6/16,5±0,3	13,1±0,1/18,7±0,5
30	2/29/5	20,3±0,5/20,6±0,4	24,0±0,1/22,4±0,5	20,6±1,5/20,9±0,1
31	2/31/1	12,4±1,1/0	16,3±0,1/0	0
32	3/31/1	20,7±0,2/0	20,1±1,3/0	20,5±1,4/0
33	2/33/4	19,5±0,1/0	10,0±0,5/0	0
34	2/33/5	22,4±0,4/0	25,1±0,1/0	25,5±0,1/0
35	1/34/3	15,2±0,8/0	30,3±0,5/0	0
36	3/34/1	no growth	0	22,4±0,2/0

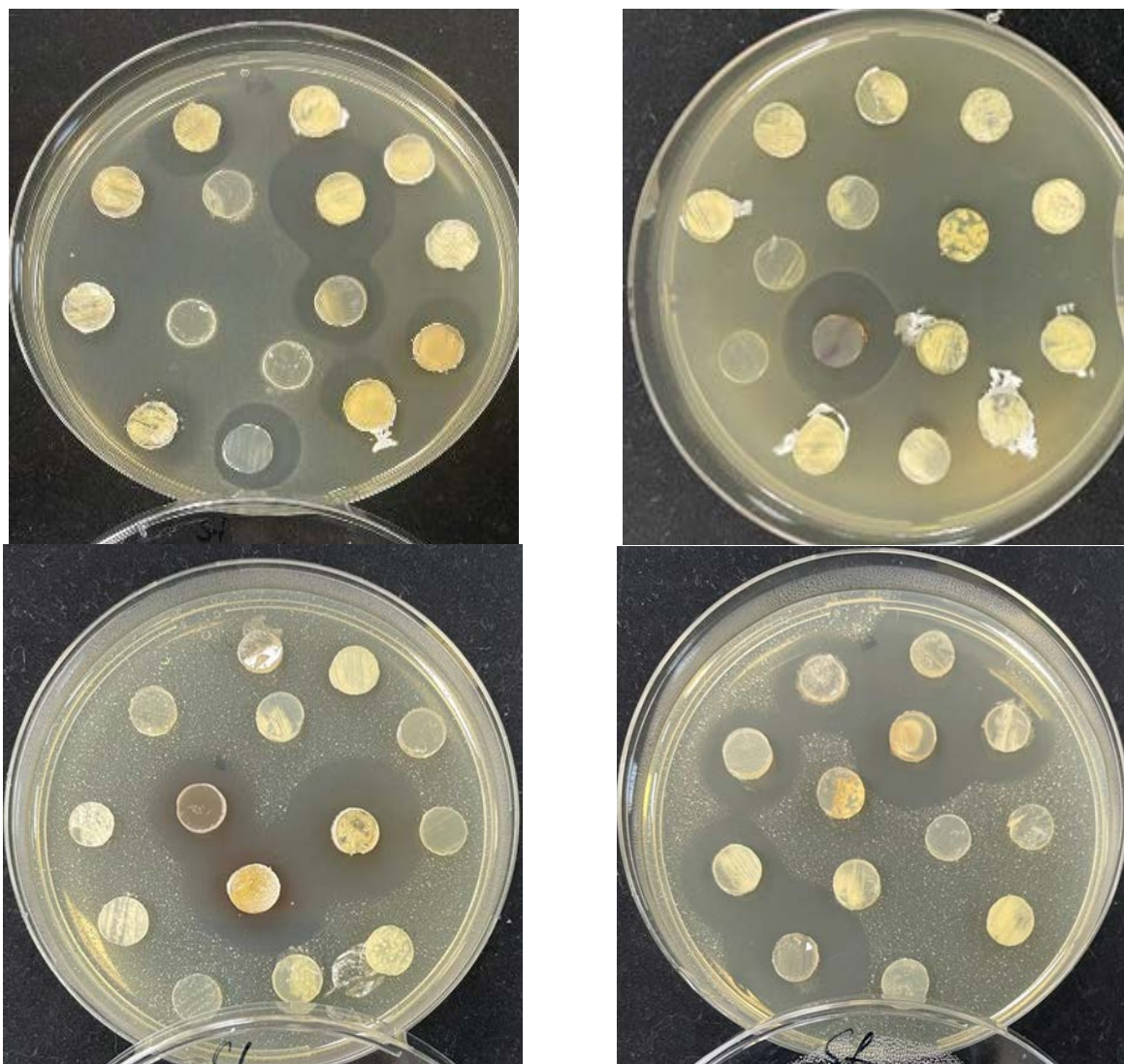
Table 1 continued

1	2	2	4	5
37	1/37/1	28,0±1,0/28,3±0,5	25,5±0,2/25,3±0,1	15,7±0,4/16,0±0,3
38	1/37/2	25,0±1,5/0	30,4±0,5/0	25,8±0,1/0
39	1/37/3	20,1±0,2/0	20,3±0,5/17,5±0,1	15,3±0,4/0
40	1/37/7	12,4±0,1/0	19,9±0,2/0	12,6±0,5/0
41	2/37/4	0	0/25,5±0,1	0/11,0±0,5
42	3/37/1	0	14,6±0,1/0	0
43	2/38/1	0	no growth	15,4±0,7/0
44	2/39/3	20,0±0,3/0	30,4±0,2/0	20,3±0,2/0
45	3/39/1	0	0	15,0±0,1/0
46	1/40/2	0	12,5±0,5/0	0
47	2/49/2	0	12,8±0,4/0	0
48	3/50/5	0	0	15,2±0,3/0
49	1/51/1	10,2±0,1/0	10,2±0,4/0	30,3±1,1/15,4±0,7
50	2/51/1	0	0	15,3±0,7/0
51	1/51/5	15,5±0,5/0	0	11,4±0,2/0
52	2/51/2	0	0	17,8±0,1/0
53	2/51/3	0	11,6±0,5/0	20,5±1,0/15,1±0,1
54	2/53/1	15,0±0,1/0	20,4±1,5/0	0
55	2/54/1	15,0±0,2/0	15,3±0,1/0	0
56	2/55/1	0	13,3±0,1/0	15,2±0,5/0
57	3/55/1	10,3±0,1/0	17,9±0,5/0	0
58	1/58/1	0	15,4±0,1/0	no growth
59	3/58/3	0	12,0±0,5/0	15,2±0,1/0
60	1/59/3	15,7±0,1/0	15,5±0,2/0	no growth
61	2/59/1	0	19,3±0,5/0	12,5±0,1/0
62	2/59/4	15,4±0,7/0	18,8±1,5/0	no growth
63	3/59/1	15,2±0,1/0	17,2±0,1/0	no growth
64	3/59/2	10,0±0,0/0	12,3±0,9/0	no growth
65	1/60/2	25,4±0,6/0	25,7±1,5/0	no growth
66	1/60/4	12,0±0,3/0	18,6±0,2/0	no growth
67	2/60/3	23,3±0,5/0	25,6±0,1/0	18,5±0,1/0
68	3/60/1	25,4±0,1/0	25,5±0,2/0	no growth
69	3/66/1	22,6±0,2/0	15,2±0,1/0	17,3±0,5/0
70	1/67/1	0	17,1±0,4/0	13,0±0,1/0
71	3/67/1	0	30,6±1,5/0	12,4±0,5/0
72	2/69/1	27,9±1,5/0	25,2±0,2/0	20,5±0,3/0
73	2/69/2	14,3±0,1/0	12,1±0,5/0	12,1±0,1/0
74	2/69/5	13,0±0,5/0	12,4±0,5/0	12,3±0,4/0
75	3/72/2	12,3±0,5/0	12,2±0,2/0	0
76	1/73/1	0	0	16,2±0,7/0
77	3/73/1	12,0±0,1/0	10,1±0,1/0	no growth
78	1/75/3	25,3±0,2/0	25,3±1,3/0	0
79	1/75/5	25,4±1,5/0	20,7±0,5/0	20,6±0,1/0
80	1/75/6	18,7±0,5/0	25,6±0,5/0	no growth
81	1/76/1	12,4±0,4/0	21,5±0,2/0	no growth
82	2/76/2	12,1±0,4/0	13,6±0,1/0	0
83	3/77/1	12,4±0,2/0	15,0±0,2/0	no growth
84	1/78/2	20,6±1,9/0	20,4±0,1/0	20,7±1,2/0
85	1/79/1	0	0	18,3±0,6/0
86	1/79/2	12,7±0,5/0	11,3±0,2/0	12,5±0,8/0
87	1/79/4	12,0±0,4/0	15,8±0,3/0	12,6±0,8/0

Table 1 continued

1	2	3	4	5
88	1/79/8	0	0	15,3±0,5/0
89	3/79/5	0	0	25,2±0,7/0
90	1/88/1	25,2±0,1/0	20,9±0,5/0	no growth
91	1/89/1	15,1±0,7/0	15,3±0,1/0	no growth
92	2/89/2	0	20,4±0,2/0	30,1±0,2/0
93	1/92/2	20,6±0,4/0	25,2±0,1/0	0
94	1/93/1	25,3±0,2/0	20,5±0,2/0	25,8±0,9/0
95	3/94/2	0	0	20,1±1,0/15,1±0,4

Note: the numerator is the diameter of the growth inhibition zone of *S. aureus* № 228, the denominator is the diameter of the growth inhibition zone of *E. coli* № 603, 0 - no activity



Figures 1-4 - Antagonistic properties of extremophilic actinomycetes against *S. aureus* № 228 (MRSA)

It is generally accepted that halophilic actinomycetes in the future will become a valuable resource for new products of industrial interest, including antimicrobial, cytotoxic, neurotoxic, antimitotic, antiviral, and anticancer drugs [10]. From extreme conditions, various bioactive metabolites have already been described, such as pyrostatins, salinosporamides, abyssomycins, trioxacarin A, gutingimicin, sporolids, marinomycins, himalamycins, diazepinomycin, helquinoline, lajollamycin, tetrodotoxin, mechercharmucins, cyanrimycins, and others.

The study of the antagonism of extremophilic actinomycetes by various researchers shows a variety of antibacterial properties, both in relation to gram-positive and gram-negative opportunistic pathogens. In the course of research on the discovery of new natural products from extremophilic actinomycetes, new linear polyketides and actinopolysporins A, B, and C were obtained from the halophilic actinomycete *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600 [18]. P-terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activity were isolated and characterized from the halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087 [19]. A new antibiotic, anthracymycin, is described, which is produced by actinomycetes of marine origin in a salt medium [20]. An antimicrobial quinoline alkaloid was isolated from a new halophilic actinomycete *Nocardiopsis terrae* YIM 90022 [21]. Eighteen species of the genus *Streptomyces* were isolated from the saline ecosystems of Nepal, and 12 isolates showed antibacterial activity against extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced by *E. coli* [22]. New antibiotics, such as quinicomycin and lajollamycin, have been found in halophilic and halotolerant species of actinomycetes [10]. *Streptomyces* spp. AJ8, isolated from the bottom sediments of salt pans in India, had a strong antagonistic effect against *S. aureus*, *A. hydrophila*, and *C. albicans* [23]. A strain of *Streptomyces* VITSVK5 spp., which forms a biologically active substance from the pyrrolidine group with high activity against *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, and *A. niger*, was isolated from a salt marsh in southern India [24]. Four isolates of *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flaveous*, *Streptomyces plicatus*, and *Streptomyces griseoruber* isolated from saline and alkaline soils of Egypt showed high antimicrobial antagonistic properties [25].

Our data, as well as literature data, demonstrate the diversity of antibacterial properties of extremophilic actinomycetes from unusual ecosystems of Kazakhstan. Analysis of our data showed that 111 (16.6%) isolates of extremophilic actinomycetes showed antibacterial properties against the studied gram-positive (*S. aureus* № 228) and 14 (2.1%) isolates - against gram-negative (*E. coli* № 603) test-microorganisms. Isolates of extremophilic actinomycetes showed antibacterial activity under extreme growth conditions, which indicates their promise for further research.

Isolates №№ 3/16/1, 1/34/3, 1/37/2, 2/39/3, 1/51/1, 3/67/1, 2/89/2 showed the highest activity under extreme growth conditions against *S. aureus* № 228 (inhibition zone diameter - up to 30,1±0,2 mm), against *E. coli* № 603 - isolates №№ 2/15/2, 3/16/1, 1/37/1, 2/37/4 (diameter of the zone of growth suppression - up to 25,5±0,1 mm).

99 isolates (87.6%) of actinomycetes out of 113 isolates with detected antibacterial activity had a narrow spectrum of antagonistic action against gram-positive test microorganisms (*S. aureus* № 228) and only 2 isolates (1.8%) showed a narrow spectrum of action against gram-negative opportunistic bacteria (*E. coli* № 603). 12 isolates (10.6%) of extremophilic actinomycetes with antibacterial properties had a wide spectrum of antibacterial action and were active simultaneously against gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) opportunistic pathogens.

11 isolates of actinomycetes showed activity only under extreme growth conditions (when growing both on medium 2 with 3.5% NaCl, pH 7.0 and in alkaline conditions - when growing on medium 3 with 0.35% NaHCO₃, pH 9,0): №№ 1/11/5, 3/15/1, 3/16/1, 2/37/4, 2/51/3, 2/55/1, 3/58/3, 2/59/1, 1/67/1, 3/67/1, 2/89/2. Isolates № 2/51/3 and 2/89/2 showed high antibacterial activity against gram-positive opportunistic bacteria (*S. aureus* № 228, MRSA) under extreme growth conditions; activity was also most pronounced under alkaline growth conditions - zone diameter growth suppression - 20,5±1,0-30,1±0,2 mm. Isolate № 2/37/4 had a narrow spectrum of action against gram-negative bacteria, the diameter of the zone of inhibition of growth of *E. coli* № 603 on medium 2 was 25,5±0,1 mm. Isolate № 3/16/1 showed a wide spectrum of activity with a high level of activity only under extreme growth conditions: when growing on medium 2 (3.5% NaCl), the growth inhibition zone of *S. aureus* № 228 was 30,4±0,5 mm, *E. coli* № 603 - 25,2±0,6 mm.

18 isolates of actinomycetes showed antibacterial activity when growing in only one extreme medium: №№ 1/11/1, 2/15/1, 2/15/2, 1/15/7, 3/37/1, 1/40/2, 2/49/2, 1/58/1 - on medium 2; №№ 3/34/1, 3/39/1, 3/50/5, 2/51/1, 2/51/2, 1/73/1, 1/79/1, 1/79/8, 3/79/5, 3/94/2 - on medium 3. Isolate

№ 2/15/2 has a narrow spectrum of action against gram-negative test microorganisms (*E. coli* № 603), activity was detected when growing on medium 2 - diameter zones of growth inhibition - $25,3 \pm 0,7$ mm. High activity against gram-positive bacteria on medium 2 was shown by isolate № 1/15/7 - the diameter of the growth inhibition zone was $20,6 \pm 0,4$ mm (*S. aureus* № 228). Isolate № 3/79/5 showed the highest activity on medium 3 - the diameter of the growth inhibition zone was $25,2 \pm 0,7$ mm (*S. aureus* № 228). Isolate № 2/15/1 showed a wide spectrum of antibacterial action on medium 2, the diameter of the growth inhibition zone for *S. aureus* № 228 – $22,0 \pm 0,5$ mm, *E. coli* № 603 – $23,4 \pm 0,7$ mm.

The obtained results are consistent with literature data regarding the activity of actinomycetes isolated from extreme ecosystems across various regions of the Earth. Actinomycete isolates obtained from saltworks in Jaipur, India, exhibited activity against *S. aureus*, with growth inhibition zones ranging from 15 ± 0.57 to 35 ± 0.88 mm [26]. Actinomycete isolates from saline soils in Morocco also demonstrated activity when grown on Bennett's medium, with growth inhibition zone diameters of 20.3 ± 0.5 mm against *S. aureus* and 13 ± 1 mm against *E. coli* [27]. In another study, 21 isolates obtained from arid soil in South Africa showed activity against *S. aureus*, with inhibition zones ranging from 16 to 40 mm, and against *E. coli* (ToIC) (7 isolates) with inhibition zones of 12-20 mm [28]. Additionally, eight isolates obtained from saline soil in Algeria exhibited antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, with growth inhibition zone diameters ranging from 16 to 45 mm [29].

Conclusion

From the extremal ecosystems of Kazakhstan, we isolated 667 strains of halo-, alkaliphilic, salt- and pH-tolerant extremophilic actinomycetes with the potential to synthesize new natural products for medicine. Among 113 isolates of extremophilic actinomycetes obtained from Northern, Western, and Southern Kazakhstan, we identified antibacterial properties: 111 isolates exhibited activity against the clinical strain of *S. aureus* № 228 (MRSA), and 14 isolates of extremophilic actinomycetes showed activity against the clinical strain of *E. coli* № 603. While most strains of extremophilic actinomycetes displayed a narrow spectrum of antibacterial activity, 12 isolates exhibited a broad spectrum of activity, actively inhibiting both gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) opportunistic pathogens. We selected these extremophilic actinomycete isolates with antibacterial properties under extreme growth conditions for further research as promising producers of new natural compounds for medical applications.

Funding

The work was supported by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher education of the Republic of Kazakhstan (grant № AP14869253).

References:

- 1 Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. Nat. Prod. Rep. 2017, 34(10):1203–1232 (doi: 10.1039/c7np00026j)
- 2 Fair R.J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect. Med. Chem. 2014, 6:25–64 (doi: 10.4137/PMC.S14459)
- 3 Butler, M. S., Blaskovich, M. A., and Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. J. Antibiot. 2013, 66, 571–591. (doi: 10.1038/ja.2013.86)
- 4 Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J. Antibiot. 2009, 62:5–16 (doi: 10.1038/ja.2008.16)
- 5 Katz L., Baltz R.H. Natural product discovery: past, present, and future. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2016, 43:155–176 (doi: 10.1007/s10295-015-1723-5)
- 6 Krug D., Muller R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. Nat. Prod. Rep. 2014, 31:768–783 (doi: 10.1039/c3np70127a)
- 7 Walsh C. Where will new antibiotics come from? Nature Rev. Microbiol. 2003, 1:65–70 (doi: 10.1038/nrmicro727)

- 8 Tulp M., Bohlin L. Rediscovery of known natural compounds: nuisance or goldmine? *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13:5274–5282 (doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.067)
- 9 Peraud O., Biggs J. S., Hughen R. W., Light A. R., Concepcion G. P., et al. Microhabitats within venomous cone snails contain diverse Actinobacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 2009, 75:6820–6826 (doi: 10.1128/AEM.01238-09)
- 10 Hamedi J., Mohammadipanah F., Ventosa A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles.* 2013, 17:1–13 (doi: 10.1007/s00792-012-0493-5)
- 11 Jose P. A., Sivakala K. K., Jebakumar S. R. D. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06. *Int. J. Microbiol.* 2013:526260. (doi: 10.1155/2013/526260)
- 12 Yuan M., Yu Y., Li H.-R., Dong N., Zhang, X.-H. Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the Arctic Ocean. *Mar. Drugs.* 2014, 12:1281–1297 (doi: 10.3390/md12031281)
- 13 Trenožnikova L.P., Bajmahanova G.B., Balgimbaeva A.S., Bajmahanova B.B., Smirnova I.Je., Fajzulina Je.R., Spankulova G.A., Tatarkina L.G., Mombekova G.A., Elubaeva A.E., Ajtkel'dieva S.A., Tleubekova D.A. Biotehnologičeskij potencial jekstremofil'nyh aktinomicetov dlja mediciny i strategii ego otkrytija. *Mikrobiologija zhəne virusologija.* 2021, 4(35):4–26. (<https://doi.org/10.53729/MVAS.2021.04.01>)
- 14 Baltz R.H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 44:573–588 (doi: 10.1007/s10295-016-1815-x)
- 15 Aigle B., Lautru S., Spitteller D., Dickschat J.S., Challis G.L., Leblond P., Pernodet J.L. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 41:251–263 (doi: 10.1007/s10295-013-1379-y)
- 16 Trenožnikova L., Azizan A. Discovery of Actinomycetes from Extreme Environments with Potential to Produce Novel Antibiotics. *Cent. Asian J. Glob. Health.* 2018, 7(1):337 (doi: 10.5195/CAJGH.2018.337)
- 17 Borovikov V.P. A popular introduction to modern data analysis in the STATISTICA system. Moscow: Hotline-Telecom. 2016; 288 p.
- 18 Zhao L.X., Huang S.X., Tang S.K., Jiang C.L., Duan Y., Beutler J.A., et al. Actinopolysporins A–C and Tubercidin as a Pcd4 stabilizer from the halophilic actinomycete *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600. *Nat. Prod.* 2011, 74(9):1990–1995 (doi: 10.1021/np200603g)
- 19 Tian S.Z., Pu X., Luo G., Zhao L.X., Xu L.H., Li W.J., et al. Isolation and characterization of new p-Terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. *J. Agr. Food Chem.* 2013, 61(12):3006–3012 (doi: 10.1021/jf400718w)
- 20 Jang K.H., Nam S.J., Locke J.B., Kauffman C.A., Beatty D.S., Paul L.A., et al. Anthracimycin, a potent Anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, 52(30):7822–7824 (doi: 10.1002/anie.201302749)
- 21 Tian S., Yang Y., Liu K., Xiong Z., Xu L., Zhao L. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardiopsis terrae* YIM 90022. *Nat. Prod. Res.* 2014, 28(5):344–346 (doi: 10.1080/14786419.2013.858341)
- 22 Khadayat K., Sherpa D.D., Malla K.P., Shrestha S., Rana N., Marasini B.P., Khanal S., Rayamajhee B., Bhattarai B.R., Parajuli N. Molecular Identification and Antimicrobial Potential of *Streptomyces* Species from Nepalese Soil. *Int. J. Microbiol.* 2020:8817467 (doi: 10.1155/2020/8817467)
- 23 Jenifer J.S.C.A., Donio M.B.S., Michaelbabu M., et al. Haloalkaliphilic *Streptomyces* spp. AJ8 isolated from solar salt works and its' pharmacological potential. *AMB Expr.* 2015, 5(1):143 (doi: 10.1186/s13568-015-0143-2)
- 24 Saurav K., Kannabiran K. In vitro activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. against fungal and bacterial human pathogens. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2012, 29(1):29–33 (doi: 10.1016/j.riam.2011.06.008)
- 25 Hozzein W.N., Ali M.I., Ahmad M.S. Antimicrobial activities of some alkaliphilic and alkaline-resistant microorganisms isolated from Wadi Araba, the eastern desert of Egypt. *J. Life Sci.* 2013, 10(4):1823–1828 (<https://www.researchgate.net/publication/288289450>)
- 26 Jose P.A., Jebakumar S.R. Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Front. Microbiol.* 2013, 10:4:190 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00190)

27 El Karkouri A., Assou S.A., El Hassouni M. Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. *Pan Afr. Med. J.* 2019, 29;33:329 (doi: 10.11604/pamj.2019.33.329.19018)

28 Charousová I., Medo J., Hleba L., Císarová M., Javoreková S. Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2019, 55. (doi: 10.1590/s2175-97902019000217249)

29 Belkacem I., Hakim D., Ramzi S. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Saline Soil Samples with Antimicrobial Activities against Microbial Pathogens. *South Asia J. of Experimental Biology.* 2023, 13(2):114-124 (doi: [https://doi.org/10.38150/sajeb.13\(2\).p114-124](https://doi.org/10.38150/sajeb.13(2).p114-124))

FTAMP: 62.09.39

Г.Д. ҰЛТАНБЕКОВА^{1*}, Қ.А. МУХАТАЕВА¹, А.І. ЖУСУПОВА¹, Ч.Д. ГЕЛАНИ²,
Н. ИБИШЕВА¹, А.С. НҰРМАХАНОВА¹, М.О. ЖАЛҒАСБАЕВА¹,
Ә.Ә. САҒЫНДЫҚОВА¹, Ж.Д. ДАСТАН¹

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

²Минданао мемлекеттік университеті - Илиган технологиялық институты, Илиган,
Филиппин

*e-mail: ultanbekova77@mail.ru

ҚАЗАҚСТАН ТЕРРИТОРИЯСЫНДА ӨСЕТІН ФАРМАФЛОРА *SALVIA AETHIOPIS* *L.*, *SALVIA STEPPOSA DESSHOST* ЖӘНЕ *SALVIA SCLAREA L.* ӨСІМДІКТЕРІНІҢ ЭНДОФИТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.13

Түйін

Эндофитті микроорганизмдердің кең таралуы жалпыға бірдей мойындалған факт болып табылады. Осы зерттеу аясында флора формасының бөліктерінен эндофитті микроорганизмдерді бөліп алу, олардың белсенділігін патогенді бактериялар және микромицеттерге қарсы бағалау жоспарлануда. Дәрілік өсімдіктердің *Salvia aethiopsis*, *Salvia stepposa Desshost* және *Salvia sclarea L.* Бөліктерінен бөліп алынған эндофитті микроорганизмдер белсенді екіншілік метаболиттер түзетін микроорганизмдердің көзі бола алады. Зерттеу жұмысының өзектілігі, фармакофлораның микробтық продуценттерінің әртүрлілігін зерттеп, патогенді бактерияларға және микромицеттерге белсенділігі жоғары эндофитті микроағзалардың продуценттерін іріктеу болып табылады.

Зерттеу жұмысында эндофитті микроорганизмдердің 45 изоляты оқшауланған, эндофитті микроорганизмдердің негізгі кездесетін орны тамырларда (42,2%), сабақтарында (33,4%), ал ең азы зерттелген бөлігі өсімдіктердің жапырақтарында (24,4%) кездесетіні зерттеу барысында тұрақталды.

Шалфей (*Salvia L.*) тектес дәрілік өсімдіктердің бөліктерінен оқшауланған эндофитті актиномицеттерді олардың патогендік микроорганизмдердің өсуін тежеу қабілеті бойынша скрининг жүргізілді, нәтижесінде *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* және *Fusarium oxysporum* өсуін тиімді тежейтін 2 N. A1 және N. A4 штамдары іріктелді. Өсудің тежелу аймағы 10,0 мм-ден 18,2 мм-ге дейін болды. Зерттелген эндофитті штаммдар *Actinomyces spp.* тұқымдасының өкілдері ретінде анықталды.

Кілтті сөздер: шалфей, эндофит, *Salvia stepposa Desshost*, *Salvia sclarea L.*, дәрілік өсімдіктер.

Қазақстанның фармакологиялық флорасында жоғары сатыдағы өсімдіктердің 6000-ға жуық түрі бар. Қазір Қазақстанда дәрілік өсімдіктердің қанша түрі өсетінін айту қиын, өйткені олардың тізімі жыл сайын толығып отырады. Қалай болғанда да, олардың кем дегенде 500 түрі бар, бірақ қазіргі уақытта тек 50 – ге жуық түрі ресми медицинада шикізат ретінде, ал 200-ге жуығы халық медицинасында қолданылады. Біздің республикамыздың аумақтары біркелкі жеткілікті зерттелмеген. Осыған байланысты біздің зерттеулеріміздің бастапқы кезеңі дәрілік өсімдіктердің эндофитті микроорганизмдері туралы ақпарат алу, олардың бактерияға және микромицетті саңырауқұлаққа қарсы қасиеттерін зерттеу болып табылады. Дәрілік заттарды дамыту үшін перспективалы эндофитті микроорганизмдердің штамдары Қазақстан Республикасының Ұлттық коллекциясында сақталады және ұлттық халықаралық патенттеуге жіберіледі.

Жаңа технологиялар негізінде бірқатар жаңа биотехнологиялық және фармацевтикалық өндірістерді құру Республикамыздың фармафлора ресурстарының бірегей әлеуетін неғұрлым толық пайдалануды талап етеді. ҚР Үкіметі дәрілік заттармен қамтамасыз ету саласындағы алға қойған басым міндеттердің бірі республиканың дәрілік заттарға қажеттілігін қамтамасыз ету үшін фармацевтика саласын дамыту, оның ішінде

микроорганизмдердің отандық дәрілік өндірушісі негізінде түпнұсқалы дәрілік субстанцияларды өндіру болып табылады. Қазіргі уақытта микробқа қарсы тұрақтылықтың өсу және таралу тенденциясы қоғамдық денсаулық сақтау саласындағы маңызды мәселе болып табылады, өйткені бұл өмірге қауіп төндіретін инфекцияларды емдеу қабілетімізге нұқсан келтіреді. Бұл мәселеге жауап ретінде Дүниежүзілік денсаулық сақтау ассамблеясы микробқа қарсы тұрақтылықпен күресу жөніндегі жаһандық іс-қимыл жоспарын қабылдады, оның мақсаты микробқа қарсы тиімді және қауіпсіз дәрі-дәрмектерге тұрақты қолжетімділікті қамтамасыз ету [1].

Биологиялық белсенді заттар, өсімдіктердің екінші реттік метаболиттері фармакологиялық өнеркәсіпте бактерицидтік және фунгицидтік препараттарды алуда және косметика мен тұрмыстық химияда өсімдік тектес препараттарды өндіруде маңызды рөл атқарады. Қазіргі уақытта өнеркәсіпте шалфей *Salvia aethiopsis*, *Salvia stepposa* Desshost және *Salvia sclarea* L. негізінде өсірілген препараттар қолданылады. Бұл тұрғыда Қазақстанның табиғи флорасының жергілікті түрлері және олармен түзілетін екінші реттік метаболиттері де жеткілікті зерттелмеген. Оларды зерттеу біздің еліміз үшін маңызды теориялық және практикалық мәнге ие, олар ішкі нарық пен экспортқа арналған биологиялық белсенді заттардың өзіндік ресурстық базасын құруға мүмкіндік береді.

Қазіргі медицинаның өзекті мәселелерінің бірі - патогендік микроорганизмдерде, вирустарда және оба клеткаларында қолданылатын дәрілерге тез пайда болатын төзімділік болып табылады. Осыған байланысты жаңа тиімді антибиотиктерді іздеу мәселесі үлкен маңызға ие, олардың негізгі көзі әртүрлі микроорганизмдер – актинобактериялар, бактериялар мен саңырауқұлақтар синтездейтін табиғи қосылыстар болып табылады. Антибиотиктерден басқа, витаминдерді, гормондарды, антиоксиданттарды, ферменттерді, өсу заттарын және амин қышқылдарын өндіруге қабілетті болып келеді. Соңғы зерттеулерге сәйкес, биологиялық белсенді заттардың продуценті ретінде микроорганизмдердің мүмкіндіктері таусылған жоқ деп айтуға толық негіз бар. Жаңа антибиотиктерді іздестіру және дамытудың маңызды кезеңдерінің бірі - табиғи ортада өсетін дәрілік өсімдіктерден екінші реттік метаболиттердің продуценттерін оқшаулау болып табылады. Эндофиттерді табиғи көздерден оқшаулау үшін дәстүрлі де, селективті де әртүрлі әдістер қолданылады. Микроорганизмдерді оқшаулаудың селективті әдістерінде қолданылатын тәсілдер, зерттелетін үлгіден оқшауланған прокариоттық дақылдардың таксономиялық әртүрлілігін арттыруға мүмкіндік береді. Соңғы кездері табиғи жағдайда өсетін, ксерофитті ортада өсуге бейімделген дәрілік өсімдіктер әлемдік нарықта жоғары сұранысқа ие болды. Практикалық қызығушылықты *Salvia aethiopsis* L., *Salvia stepposa* Desshost және *Salvia sclarea* L. биологиялық белсенді заттарға бай перспективалы дәрілік өсімдіктері тудырады. Өз кезегінде Қазақстанда өсетін осы топтағы өсімдіктердің түрлері жүйелі түрде жеткілікті зерттелмеген. Жаңа дәрі-дәрмектерді іздестіру барысында ғалымдар дәрілік өсімдіктердің таза фармацевтикалық препараттарға қолайлы балама болып табылатынын және уыттылығы төмен жаңа микробқа қарсы агенттердің көзі екенін, сонымен қатар синтетикалық химиялық заттардан туындаған жанама әсерлері жоқ екенін анықтады [2].

Қазіргі таңда микробқа қарсы препараттардың кең спектрі бар екінші реттік метаболиттері, яғни эндофитті микроорганизмдері тиімді қолдану туралы деректер өте өзекті. Сондықтан эндофитті микроорганизмдер биологиялық қосылыстары микробқа қарсы препараттардың жаңа түрлерін ашуға көбірек мүмкіндік береді. Осыған байланысты, ең алдымен, эндемиялық дәрілік өсімдіктерден бөліп алынған эндофитті микроорганизмдерді және оларды антибиотикалық препараттарды ашу үшін қолдануға зерттеулерді бағыттау маңызды. Жергілікті дәрілік табиғи субстраттарды пайдалану мүмкіндігі бәсекеге қабілетті жаңа дәрілік заттарды скринингтеу үшін үлкен мүмкіндіктер ашады, бұл Қазақстанның инновациялық фармацевтика өнеркәсібін дамыту үшін негіз бола алады. Қазіргі уақытта шалфейдің эндофитті микроорганизмдер популяциясына толық зерттелу жұмыстары жүргізілмеген, сонымен қатар олар биоалуантүрліліктің маңызды

құрамдас бөлігі мен микробқа қарсы қосылыстардың перспективалық көзі ретінде қызмет етеді. Бұл аспектіде зерттеудің негізгі бағытына айналған этноботаникалық тарихы бар өсімдіктердің эндофитті микроорганизмдері жан-жақты зерттеу өзекті [3-5]. Ұсынылып отырған зерттеу жұмысында дәрілік өсімдіктердің мүшелерінен бөлініп алынған эндофитті микроорганизмдер және олардың антибиотикалық белсенділігін анықтау негізгі мақсат болып табылады.

Дүние жүзінде *Salvia L.* тұқымдасының 900-ге жуық түрі бар, ал Қазақстан аумағында 29 түрі кездеседі [6, 7]. Сондай-ақ олардың арасында дәрілік, жемдік, техникалық және декоративтік өсімдіктер де бар. *Salvia L.* тұқымдас өсімдіктердің эфир майларының биологиялық белсенділігі негізгі компоненттердің біріккен әрекетіне байланысты. Деректерді, мамандандырылған әдебиеттерді талдау *Salvia Officinalis L.* эфир майының құрамдас бөлігі жеткілікті зерттелгенін және әртүрлі факторларға байланысты екенін көрсетеді: өсу жағдайлары, өсімдік шикізатын өндіру және сақтау технологиялары және т.б. [8, 9]. *Salvia L.* тұқымдасы эфир майларының, флавоноидтардың және терпеноидтардың бай көзі болып табылады [10-11]. Бұл тұқымдас антиоксидантты, патогенді микроорганизмдерге қарсы белсенділігімен танымал болып келеді [12,13]. *S. aethiopsis* гүлшоғырында 0,28%, ал жапырақтарында 0,2% эфир майы бар, оның негізгі құрамдас бөлігі терпендер болып келеді [14-15].

Осы зерттеу аясында өсімдік мүшелерінің бөліктерінен эндофитті микроорганизмдерді бөліп алу, олардан антибиотикалық заттар алу және олардың бактерияға қарсы белсенділігін бағалау жоспарлануда. Дәрілік өсімдіктерге жататын *Salvia aethiopsis L.*, *Salvia stepposa Desshost* және *Salvia sclarea L* бөліктерінің эндофитті микроорганизмдері белсенді екіншілік метаболиттер түзетін микроорганизмдердің көзі бола алады. Дәрілік өсімдіктерден эндофитті микроорганизмдердің антибиотиктерді өндіру қабілетін зерттеу олардың жер шарының әртүрлі аймақтарынан әртүрлілігі мен таралуын нақтырақ түсінуге және жаңа антибиотиктерге скринингтің жаңа әдістемелік тәсілдерін әзірлеуге мүмкіндік береді. Қазақстанда дәрілік өсімдіктерден алынған әртүрлі эндофитті микроорганизмдердің – жаңа антибиотиктерді өндірушілердің болуы ұсынылған жаңа скринингтік зерттеу әдісі үшін перспективалы болып табылады.

Әдеби көздерді қарастырсақ, жоғарғы таксондарға сәйкес эндофиттер келесідей бөлінеді: *Proteobacteria* – 54% (*Alfaproteobacteria* – 18%, *Beta-proteobacteria* – 10%, *Gamma-proteobacteria* – 26 %), *Actinomycetes* 20%, *Firmicutes* – 16%, *Bacteroidetes* – 6 %, *Archae* – 4 %. Соңғы молекулалық-генетикалық әдістердің қол жетімділігінің артуымен эндофиттік бактериялардың тізімі үнемі кеңейіп, эндофиттердің биоалуантүрлілігі туралы біліміміз үнемі толықтырылып отыратыны анық. Эндофитті бактериялар өсімдік ағзасының әртүрлі бөліктерінде: тамырларында да, өсімдіктердің ауа бөліктерінде де, гүлдері мен тұқымдарында да кездеседі. Эндофиттер планетаның кез-келген өсімдіктері мен географиялық нүктелерінде кездеседі. Ризосфералық РГРВ сияқты, эндофитті бактериялар да қабілетті: өсімдікті аурулардан қорғауды қамтамасыз етеді, нематодтарға қарсы антагонистік белсенділікке ие; азотты сіңіру, өсімдіктердің өсу реттегіштерін синтездеуі қабілеттеріне ие.

Эндофитті бактериялар өсімдік ішінде жасырын өмір сүре алады, ал стресс немесе экологиялық тепе-теңдік бұзылған кезде патогендік факторлар белсендірілуі мүмкін және жағдайға байланысты өсімдік ауырады немесе өзінің "жауын" жоя алатын қабілетіменде ерекшеленеді.

Зерттеу материалы мен әдістері

Зерттеу нысандары: өсімдік бөліктерінен оқшауланған эндофитті микроорганизмдер: ризосфера (тамыр), каулофера (сабақ), филлофера (жапырақ беті), анофера (гүлдер); эпиофиялық шалфей (*Salvia aethiopsis L.*), емен шалфейі (*Salvia nemorosa*) және мускат шалфейі (*Salvia sclarea*).

Зерттеу жұмысында *Lamiaceae* тұқымдасына жататын өсімдіктердің 3 түрі пайдаланылды: *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* Desshost және *Salvia sclarea* L. Халықаралық талаптар мен экспедиция жұмыстарына сәйкес Іле-Алатау ұлттық табиғи паркінің экожүйелерінен және оңтүстік Балхаш өңірінен этнофармафлораның табиғи субстраттарының үлгілері жиналды. Антибиотик продуценттерін зерттеуде белгілі селективті қоректік орталар пайдаланылды.

Жұмыс барысында 3 қоректік орта пайдаланылды. Гаузе ортасының залалсыздандыру шарттары: ағын суы; 1,0 еритін крахмал; 20,0 калий нитраты (KNO_3); 1,0 калий гидроортофосфаты (K_2HPO_4); 0,5 магний сульфаты ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$); 0,5 натрий хлориді ($NaCl$); 0,5 атм кезінде рН 7,0-7,5. (121 °C) - 15-20 мин.

Ет пептонды агар (ЕПА): ет суы - 1,0; натрий хлориді ($NaCl$) - 5,0; пептон - 10,0 1 атм. (121 °C) - 20 мин.; агар-агар - 20,0 рН 6,8-7,0

Чапека қоректік ортасы: құбыр суы - 1,0; натрий нитраты ($NaNO_3$) - 2,0; дикалий фосфаты (K_2HPO_4) - 1,0; магний сульфиті ($MgSO_4$) - 0,5; калий хлориді (KCl) - 0,5; темір сульфиті ($FeSO_4$) - 0,5; темір сульфиті ($FeSO_4$) - агар-агар іздері - 20,0 рН 6,8-7,0 1 атм. (121 °C) - 20 мин.

Зерттеу объектілері Қазақстан территориясында өсетін және іріктелген *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* Desshost және *Salvia sclarea* L дәрілік өсімдіктердің үш түрінен жинақтаушы микробтық культура әдісімен оқшауланған эндофитті актиномицеттер мен бактериялардың штаммдары бөліп алынады.

Зерттеу әдістерінің сипаттамасы: Зерттеу жұмысының мақсатына жету үшін *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* Desshost және *Salvia sclarea* L дәрілік өсімдіктердің эндофитті микроорганизмдеріне скрининг жүргізу, құрамын анықтау, осы мақсатта зертханалық тәжірибелерді жүргізу.

Ризосфералық үлгілерді алу тереңдігі 10-20 см болады. Үлгілер стерильді пластик контейнерлерге салынып, зертханаға тасымалданады және пайдаланылғанға дейін 4°C тоңазытқышта сақталады.

Дәрілік өсімдіктердің әртүрлі бөліктерінен микроорганизмдерді бөліп алу әдісі келесі жолмен жүзеге асырылады: өсімдіктің жапырақтары, сабақтары және тамырлары сумен, содан кейін зарарсыздандырылған бидистильденген сумен мұқият жуылады. Кептірілген үлгілерді 70% этанолға 30 секунд, содан кейін эпифитті изоляттарды жою үшін 2% натрий гипохлориті ерітіндісіне 2 минут бойы сіңіреді. Осыдан кейін ерітінді төгіліп, үлгілер 70% этил спиртіне 30 секундқа қайта батырып, үлгілерді бидистилденген сумен жуады, әрбір үлгіні скальпельмен сегменттерге кеседі. Кесілген өсімдік үлгілері қоректік агары бар Петри табақшаларына салынып, 32°C температурада 48 сағат бойы инкубацияланады [16].

Агарлы блоктар және диффузды әдісі арқылы оқшауланған актиномицеттердің антагонистік белсенділігі анықталды. Тест дақылдары ретінде Чапек агарында өскен микромицеттер және ЕПА ортасында дақылданған бактериялар қолданылды. Зерттелетін микроорганизмдер жақсы өскеннен кейін агарлы блоктары стерильді бурмен (7 мм) кесіледі, олар басқа Петри табақшасындағы тест дақылдары құйылған ортаға бір-бірінен бірдей қашықтықта агар бетіне орналастырылды. Бактериялардың өсу тежелу аймағының диаметрі 37°C температурада 48 сағат инкубациядан кейін анықталды. Ашытқы тәрізді және микромицеттердің өсуін тежеу аймағының диаметрі 5 тәулікте 28°C температурада өскен дақылдарда анықталады. Дақылды морфологиялық ерекшеліктерін: олардың морфологиялық (Грам бояуы, споралануы, қозғалғыштығы, жасуша пішіні) және биохимиялық сипаттамаларын (каталаза, оксидаза, амилаза белсенділігі және т.б.) анықтау әдістері қолданылды [17, 18]. Тест микроорганизмдер ретінде бактериялар, ашытқы тәрізді және микромицетті саңырауқұлақтардың түрлері пайдаланылады: *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* [19].

Нәтижелер және оларды талдау

Ризосфера және *Salvia L.* (шалфей) тұқымдасының дәрілік өсімдіктерінің бөліктерінің үлгілері алынды. Өсімдіктер мен ризосфераның сынамаларын жинау Іле-Алатау мемлекеттік ұлттық табиғи паркінің аумағында және Балхаш өңірінде жүргізілді. Ризосфера үлгілерінен және *Salvia L.* (шалфей) тұқымдас дәрілік өсімдіктердің үш түрінің жер үсті бөліктерінен эндофиттерді оқшауланды. Ризосфера мен өсімдіктердің жер бөліктерінің үлгілерімен егілген қоректік агар пластиналары морфологиялық тұрғыдан әртүрлі колонияларды көрсетті.

Salvia L. (шалфей) тұқымдасына жататын дәрілік өсімдіктердің үш түрінің ішінен: эпиофиялық шалфей (*Salvia aethiopsis L.*), емен шалфейі (*Salvia nemorosa*) және мускат шалфейі (*Salvia sclarea*) өсімдік мүшелерінен эндофитті микроорганизмдердің 45 изоляты бөліп алынды. Эндофитті микроорганизмдер өсімдік тамырларында ең көп колонизацияланғаны 1 кестеден көруге болады. Эндофитті микроорганизмдердің жиілігі тамырларда (42,2%) және ең аз мөлшері зерттелген өсімдіктердің жапырақтарында (24,4%) көрсетті.

Барлық оқшауланған изоляттардың 11 түрі Гаузе агарлы қоректі ортада өскен кезде актиномицеттерге тән көріністі көрсетті: тығыз, тығыз колониялар түзді, олар ортамен біріктірілген, субстратты мицелийін түзді. Кейбір изоляттар ортаға пигменттер бөлді. Барлық изоляттардың жасушалары грам оң боялған. Осылайша, оқшауланған изоляттардың морфологиялық сипаттамасы олардың актиномицеттердің қатарына жатқызуға мүмкіндік берді. ЕПА агарлы қоректі ортада өскен кезде 34 изоляттың көрінісі: колониялары тегіс, дөңгелек, мөлдір, дөңес, ылғалды колониялар түзіп, суда біркелкі бұлыңғырлықты тудырды, бұл қасиеттер олардың бактериялар қатарына жататындығын сипаттайды. Ыңғайлы болу үшін изоляттарды оқшауланған өсімдік түрінің бас әрпімен белгіленді (А - *Salvia aethiopsis L.*, N - *Salvia nemorosa*, S - *Salvia sclarea*), бас әріппен а - актиномицеттер және В-бактериялар және реттік нөмірмен белгіленді.

Кесте 1 – Шалфей (*Salvia L.*) тұқымдасының дәрілік өсімдіктерінде эндофитті микроорганизмдердің саны

№	Өсімдік атауы	Өсімдіктердің әртүрлі бөліктерінен оқшауланған эндофит изоляттарының саны			
		Тамыры (R)	Сабағы (S)	Жапырағы (L)	Барлығы
1	<i>Salvia aethiopsis L.</i>	8	8	6	22
2	<i>Salvia nemorosa</i>	7	4	3	14
3	<i>Salvia sclarea</i>	4	3	2	9

Актиномицеттердің антагонистік қасиеттерін зерттеу.

Антагонистік белсенділікті зерттеу дәрілік заттарды жиі контамирлейтін бактериялар мен саңырауқұлақтардың түрлеріне тексерілді: *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.



Сурет 1 - *Salvia L*-ден белсенді эндофитті актиномицеттермен *A. niger*, *F. oxysporum* патогендік тест штамдарының өсуін тежеу көрінісі

Микробқа қарсы потенциалы бар актиномицеттердің тиімді штамдарын таңдау үшін патогендік микроорганизмдер егілген қоректік ортаға штрих арқылы эндофитті актиномицеттерді егілді (1-сурет).

Зерттеуде А. А2, А. А4 және А. А5 эндофитті микроорганизмдердің үш окшауланған штамдары жоғарыда аталған патогендерге қарсы белсенділік көрсетпегені анықталды; А.А1, А. А3, Н. А3 штамдары тек бір патогенді микроорганизмге қарсы белсенділік көрсетті, А. А6, Н. А2 және С. А1 штамдары патогенді микроорганизмдердің екі түріне белсенділік көрсетті. Антагонистік белсенділіктің кең спектрін көрсететін ең тиімді штамдар N. А1 және N. А4 штамдары болды (2-кесте.)

Таблица 2 – Эндофитті актиномицеттердің белсенділігін патогенді тест микроағзаларға зерттеу

№	Штамм	Патогенді микроағзалар				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
эпифиттік шалфей (<i>Salvia aethiopsis L.</i>)						
1	А.А ₁	-	-	+	-	-
2	А.А ₂	-	-	-	-	-
3	А.А ₃	-	-	-	-	+
4	А.А ₄	-	-	-	-	-
5	А.А ₅	-	-	-	-	-
6	А.А ₆	-	-	+	-	+
емен шалфейі (<i>Salvia nemorosa</i>)						
1	N.А ₁	-	-	+	+	+
2	N.А ₂	-	+	-	-	+
3	N.А ₃	-	-	-	-	+
4	N.А ₄	-	+	+	+	-
мускат шалфейі (<i>Salvia sclarea</i>)						
1	S.А ₁	-	-	-	+	+

Ескерту: «+» – Бактерияға қарсы белсенділік тіркелген, «-» – Бактерияға қарсы белсенділік жоқ

Осылайша, патогендік бактериялар мен саңырауқұлақтарға қарсы антагонистік белсенділігі бар микробқа қарсы препараттардың тиімді продуценттері ретінде А. А6, N. А1, N. А2, N. А4, S. А1 штамдары іріктелді.

Нәтижелердің дәлелділігі, антагонистік белсенділігі бар штамдар 6, 7-кестелерде көрсетілген қоректік ортадағы агарға диффузия әдісімен және агар блокты әдісімен өсуді тежеу аймағы анықталып зерттелді (3, 4-сурет).

Кесте 3– Агарлы блок әдісі бойынша актиномицеттердің антагонистік белсенділігі

Штамдардың атауы	Өсуді тежеу аймағы, мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.A ₆	16,0±0,4	0	18,9,4±0,3	0	0
N.A ₁	12,4±0,3	0	16,0±0,5	13,7±0,8	0
N.A ₂	0	0	11,2±0,9	0	12,5±0,2
N.A ₄	10,0±0,6	0	0	17,0±0,4	15,3±0,7
S.A ₁	0	0	13,1±0,4	14,2±0,9	0

Актиномицеттердің әртүрлі изоляттарының әсерінен патогендік микроорганизмдердің өсуін тежеу аймақтары 10,0 мм-ден 20,4 мм-ге дейін өзгерді (3-сурет). Көптеген тест патогенді бактериялары мен саңырауқұлақтарына қарсы әсер ететін ең белсенді изоляттарға N. A1 және N. A4 штамдары жататындығы тұрақталды. N. A1 штаммы үш *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* және *Candida albicans* тест микробтарына қарсы антагонизмді көрсетті. Ал, N. A4 штаммы *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* өсуін тежеді.

Кесте 4 – Актиномицеттердің дақылды сұйықтықтарының антагонистік белсенділігі

Штамдардың атауы	Өсуді тежеу аймағы, мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.A ₆	18,4±0,3	0	20,4±0,5	0	0
N.A ₁	15,0±0,5	0	15,6±0,3	14,2 ±0,2	0
N.A ₂	0	0	13,7±0,4	0	14,7±0,3
N.A ₄	12,8±0,2	0	0	18,2±0,3	16,1±0,9
S.A ₁	0	0	14,3±0,5	16,4±0,2	0

Бактериялардың антагонистік қасиеттерін зерттеу. Бактериялардың антагонистік қасиеттерін зерттеу дәрілік заттарға контаминант бактериялар мен саңырауқұлақтардың бес түріне тексерілді: *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

Микробқа қарсы потенциалы бар эндофитті бактериялардың тиімді штамдарын таңдау үшін патогендік микроорганизмдері бар қоректік ортаға эндофитті бактериялар штрихпен себу арқылы анықталды (сурет 2).



Сурет 2 - *Salvia L* туысынан бөлініп алынған белсенді эндофитті бактериялардың *A. niger* патогендік тест дақылының өсуін тежегендегі көрінісі

Кесте 5 – Эндофитті бактерия штамдарының антагонисті белсендігі

Штамм атауы	Патогенді микроағзалар				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
эпиофиялық шалфей (<i>Salvia aethiopsis L.</i>)					
жапырақтан бөлініп алынған штамдар					
A.B ₃	-	+	-	-	+
A.B ₄	-	-	-	-	+
тамырдан бөлініп алынған штамдар					
A.B ₆	+	-	+	-	-
мускат шалфейі (<i>Salvia sclarea</i>)					
апырақтан бөлініп алынған штамдар					
S.B ₂	-	-	+	-	-
S.B ₄	+	-	+	-	+
тамырдан бөлініп алынған штамдар					
S.B ₅	-	-	-	-	+
S.B ₈	-	-	+	-	-
Ескерту: «+» – Бактерияға қарсы белсенділік тіркелген, «-» – Бактерияға қарсы белсенділік жоқ					

Зерттеу нәтижесінде шалфей (*Salvia L.*) тұқымдас дәрілік өсімдіктің үш түрінен оқшауланған эндофитті бактериялардың 27 штаммының антагонистік қасиеттері жоқ екендігі анықталды. Емен шалфейінен (*Salvia nemorosa*) оқшауланған эндофитті микроорганизмдердің барлық штамдары патогендік бактериялар мен саңырауқұлақтарға қарсы антагонистік белсенділікті көрсетпеді. Эфиопиялық шалфей мен мускат шалфейінен оқшауланған штамдардың антагонистік қасиеттері 5-кестеде көрсетілген.

Антагонистік қасиеттерді зерттеу нәтижесінде А. В3 штаммы (*Fusarium oxysporum* және *Aspergillus niger* өсуін тежеді), А. В6 штаммы (*Escherichia coli* және *Staphylococcus aureus* өсуін тежеді) және S. В4 штаммы (үш сынақ моделінің өсуін тежеді: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus Niger*). Осы штаммдарды одан әрі зерттеу өсу тежелу аймағын анықтау үшін қоректік ортадағы агарға диффузия әдісімен және блокты агар әдісімен зерттелді (6, 7-кестелер).

Кесте 6 – Агарлы блок әдісі бойынша бактериялардың антагонистік белсенділігі

Номер штамма	Өсуді тежеу аймағы, мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.B ₃	0	0	12,2±0,3	0	14,1±0,4
A.B ₆	11,4±0,6	15,8±0,2	0	0	0
S.B ₄	13,2±0,4	10,3±0,3	13,3±0,3	0	0

Кесте 7 – Диффузды әдіс бойынша дақылды сұйықтықтың антагонистік белсенділігі

Номер штамма	Өсуді тежеу аймағы, мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.B ₃	0	0	13,7±0,2	0	15,7±0,9
A.B ₆	12,4±0,4	16,1±0,4	0	0	0
S.B ₄	14,5±0,3	11,3±0,9	14,1±0,5	0	0



Сурет 3 - *Salvia L.*-ден белсенді эндофитті микроорганизмдерінің *A. niger*, *E. Coli* патогендік тест штамдарының өсуін тежеу аймағы

Бактериялардың әртүрлі изоляттарының әсерінен патогендік микроорганизмдердің өсуін тежеу аймақтары 10,3 мм-ден 16,1 мм-ге дейін өзгерді (3-сурет). Ең антагонистік белсенді изолят S. B4 штаммы болды, ол *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* және *Aspergillus niger* үш сынақ микробына қарсы бактерияға қарсы әсерін көрсетті. Қалған изоляттар бір немесе екі көп дәріге төзімді патогендерге қарсы антагонистік потенциалды көрсетті.

Қорытынды

Қорытындылай келе, Оңтүстік Қазақстан территориясында өсетін, дәрілік өсімдіктерінің үш түрінен: эпиофиялық шалфейдің (*Salvia aethiopis L.*), емен шалфейінің (*Salvia nemorosa*) және мускат шалфейінің (*Salvia sclarea*) оқшауланған эндофитті және ризосфералық микроорганизмдерінің антагонистік қасиеттері зерттелді, олар келешекте, антибиотиктер продуценттері ретінде перспективті болып табылады. Эндофитті микроорганизмдердің 45 изоляты оқшауланған, эндофитті микроорганизмдердің негізгі саны тамырларда (42,2%), сабақтарында (33,4%), ал ең азы зерттелген өсімдіктердің жапырақтарында (24,4%) кездесетіні зерттеу барысында тұрақталды.

Шалфей (*Salvia L.*) тектес дәрілік өсімдіктердің бөліктерінен оқшауланған эндофитті актиномицеттерді олардың патогендік микроорганизмдердің өсуін тежеу қабілеті бойынша іріктеу жүргізілді. *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* және *Fusarium oxysporum* өсуін тиімді тежейтін 2 N. A1 және N. A4 штамдары таңдалды. Өсудің тежелу аймағы 10,0 мм-ден 18,2 мм-ге дейін болды. Зерттелген эндофитті штаммдар *Actinomyces* тұқымдасының өкілдері ретінде анықталды. Шалфей (*Salvia L.*) тектес дәрілік өсімдіктердің бөліктерінен оқшауланған эндофитті бактерияларды олардың патогендік микроорганизмдердің өсуін тежеу қабілеті бойынша іріктеу жүргізілді. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* және *Aspergillus niger* өсуін тиімді тежейтін 1 S. B4 штаммы таңдалды. Өсудің тежелу аймағы 10,3 мм-ден 14,5 мм-ге дейін болды. Зерттелген эндофитті бактериалды штаммдар *Bacillus* тұқымының өкілі ретінде анықталды.

Әдебиеттер:

- 1 Шалфей: (*Salvia deserta* Schang. и *Salvia verticillata L.*) из Алтайского края/ Е.А. Королук, В. Кениг, А.В. Ткачев// Химия раст. сырья. 2002.С. 43-48 (http://web2.nioch.nsc.ru/terpenlab/publications/fulltexts/Korolyuk_salvia_2002.pdf)
- 2 Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013 // The Journal of Antibiotics. – 2013. – Vol. 66. – P. 571-591 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24002361/>)
- 3 Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии. Выявление микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2016, 5: 35-43 (<https://bmcjournal.ru/sites/default/files/private/bmfc-2016-04-04.pdf>)
- 4 Треножникова Л.П., Баймаханова Г.Б., Балгимбаева А.С., Баймаханова Б.Б., Смирнова И.Э., Файзулина Э.Р. Биотехнологический потенциал экстремофильных актиномицетов для медицины и

стратегии его открытия. *Микробиология және вирусология*, 2021, 4(35): 4-26 (<https://www.imv-journal.kz/index.php/mav/article/view/21>)

5 Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants // *Int. J. Integr. Biol.* – 2009. – Vol. 6 (3). – P. 112-124 (<https://www.researchgate.net/publication/44259458>)

6 Флора СССР Ленинград. *Систематический каталог сем. Злаковых*, 2011 г. 410 с. (https://www.studmed.ru/komarov-va-shishkin-bk-red-flora-sssr-tom-11_af7df04f540.html)

7 Флора Казахстана Алматы: "Ғылым", 2001. 280 с. (<https://www.twirpx.com/file/565728/>)

8 Farkas P. Composition of essential oils from the flowers and leaves of *Salvia sclarea* (Lamiaceae), cultivated in Slovak Republic. *Journal of Essential Oil Research.* – 2005. – Vol. 17. – P. 141–145 (https://www.researchgate.net/publication/232960436_)

9 Stancheva I., Geneva M., Hristozkova M., Boychinova M., Markovska Y. Essential oil variation of *Salvia officinalis* (L.) grown on heavy metals polluted soil. *Biotechnol. EQ* – 2009. – V. 23. –Special edition. – P. 373–376 (https://www.researchgate.net/publication/266469965_)

10 Al-Aboudi AMF, Abu Zarga MH, Abu-Irmaileh BE, Awwadi FF, Khanfar MA. Three new secoursadiene triterpenoids from *Salvia syriaca*. *Nat Prod Res.* -2015.Vol.29.-P.102–108 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5671917/>)

11 Hussain A., Adhikari A., Choudhary M.I, Ayatollahi S.A., Rahman A.. New adduct of abietane-type diterpene from *Salvia leriifolia*. *Nat Prod Res.* - 2016.- Vol.30. - Pp.1151–1156 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27266891/>)

12 Jassbi A., Eghtesadi F, Hazeri N, Ma'sumi H, Valizadeh J, Chandran JN, Schneider B, Baldwin IT. The roots of *Salvia rhytidea*. *Nat Prod Res.* - 2016. - Vol.7. - Pp.1–5. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27266560/>)

13 Salimikia I., Moridi Farimani M., Monsef-Esfahani H.R., Gohari A.R.. A new rearranged tricyclic abietane diterpenoid from *Salvia chloroleuca* Rech. f. & Allen. *Nat Prod Res.* -2016. - Vol.30. -P.120–124 (<https://doi: 10.22037/ijpr.2019.15429.13095>)

14 Dorman M. J., Bachmayer O. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. and Food Chem.* – 2004. – Vol. 52, N 4. – Pp. 762–770 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14969528/>)

15 Malafronte A., Piaz F.D., Cioffi G., Braca A., Leone A., Tommasia N.D. Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia aethiopsis*. *Nat Prod Res.* 2008. - Vol.3. -Pp.877–880 (<https://www.academia.edu/30056164/>)

16 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.:Из-во МГУ. 2004г. 598 с. (<https://e-library.sammu.uz/>)

17 Слюсар О.И. Разработка составов и технологии мягких лекарственных форм ранозаживляющего действия с левомецетином и метилурацилом: доктор. фарм. наук. Москва. 2002. -271 с. (<https://medical-diss.com/farmakologiya/>)

18 Гаузе Н.Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов. М.: «Наука», 1983. - 245 с. (<https://cyberleninka.ru/article/n/>)

19 Sharma D., Kaur T., Chadha B.S., Manhas R.K. Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Trop // J Pharm Res.* - 2011. - Vol.10. - P.801-808 (<https:// DOI:10.4314/tjpr.v10i6.14>)

Г.Д. УЛТАНБЕКОВА^{1*}, К.А. МУХАТАЕВА¹, А.И. ЖУСУПОВА¹, Ч.Д. ГЕЛАНИ²,
Н. ИБИШЕВА¹, А.С. НУРМАХАНОВА¹, М.О. ЖАЛГАСБАЕВА¹,
Ә. Ә. САГЫНДЫКОВА¹, Ж.Д. ДАСТАН¹

¹Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан

²Государственный университет Минданао - Технологический институт Илигана, Илиган,
Филиппины

*e-mail: ultanbekova77@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ ЭНДОФИТОВ РАСТЕНИЙ ФАРМАФЛОР *SALVIA AETHIOPIS L.*, *SALVIA STEPPOSA DESSHOST* И *SALVIA SCLAREA L.*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА

Аннотация

Повсеместное распространение эндофитных микроорганизмов является общепризнанным фактом. В рамках данного исследования планируется выделение эндофитных микроорганизмов из ризосферы и филосферы фармафлоры, оценка их активности против патогенных бактерий и микромицетов. Лекарственные растения *Salvia aethiopis*, *Salvia stepposa Desshost* и *Salvia sclarea L.* могут быть источником микроорганизмов, образующих активные вторичные метаболиты. Актуальность исследовательской работы заключается в изучении разнообразия микробных продуцентов фармакофлоры и отборе продуцентов эндофитных микроорганизмов, обладающих высокой активностью в отношении патогенных бактерий и микромицетов. В исследовательской работе выделено 45 изолятов эндофитных микроорганизмов, встречаемость эндофитных микроорганизмов в корнях - 42,2%, стеблях - 33,4%, а наименее - в листьях изученных растений - 24,4%. Был проведен скрининг эндофитных актиномицетов, выделенных из микрофлоры шалфея (*Salvia L.*), на предмет их способности ингибировать рост патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* и *Fusarium oxysporum* 2 N. A1 и N. A4. По активности ингибирования отобраны штаммы 2 N. A1 и N. A4., где зона задержки роста составляет от 10,0 мм до 18,2 мм. Изученные эндофитные штаммы идентифицированы как представители рода *Actinomyces spp.*

Ключевые слова: шалфей, эндофит, *Salvia stepposa Desshost*, *Salvia sclarea L.*, лекарственные растения.

IRSTI: 62.09.39

G.D. ULTANBEKOVA^{1*}, K.A. MUKHATAEVA¹, A.I. ZHUSUPOVA¹, Ch.D. GELANI²,
N. IBISHEVA¹, A.S. NURMAKHANOVA¹, M.O. ZHALGASBAEVA¹,
A.A. SAGYNDYKOVA¹, Zh.D. DASTAN¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²Mindanao State University - Iligan Institute of technology, Iligan, Philippines

*e-mail: ultanbekova77@mail.ru

A SURVEY OF ENDOPHYTES FROM THE KAZAKHSTANI SPECIES OF *SALVIA AETHIOPIS L.*, *SALVIA STEPPOSA DESSHOST* AND *SALVIA SCLAREA L.*

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.13

Abstract

The widespread distribution of endophytic microorganisms is a well-established phenomenon. This study aims to isolate endophytic microorganisms from various parts of selected plant species, extract bioactive compounds with antibiotic properties from them, and assess their efficacy against pathogenic bacteria and micromycetes. The medicinal plants *Salvia aethiopis*, *Salvia stepposa Desshost*, and *Salvia sclarea L.* are potential sources of endophytic microorganisms that produce bioactive secondary metabolites. The significance of this research lies in exploring the microbial diversity within the pharmacoflora and identifying endophytic microorganism strains with potent activity against pathogenic bacteria and micromycetes.

In this research, a total of 45 endophytic microorganism isolates were obtained. The investigation revealed that the primary locations of these endophytic microorganisms were found in the roots (42.2%), followed by the stems (33.4%), and the leaves of the studied plants had the lowest occurrence (24.4%).

Endophytic actinomycetes isolated from different parts of medicinal plants belonging to the *Salvia* L. genus were screened for their ability to inhibit the growth of pathogens. The results showed effective inhibition against *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, and *Fusarium oxysporum*, with strains N.A1 and N.A4 exhibiting significant inhibitory effects. The inhibition zones ranged from 10.0 mm to 18.2 mm. The endophytic strains investigated in this study were identified as members of the *Actinomyces* genus.

Keywords: salvia, endophyte, *Salvia stepposa* Desshost, *Salvia sclarea* L., medicinal plants, microorganisms.

The pharmacological flora of Kazakhstan encompasses approximately 6,000 species of higher plants. Due to ongoing discoveries, it is challenging to provide an exact count of medicinal plant species in Kazakhstan, as the list continues to expand each year. Nevertheless, there are believed to be at least 500 species, with approximately 50 species currently recognized as official medicinal raw materials and around 200 species utilized in traditional folk medicine. The exploration of our republic's territory remains incomplete. Therefore, the initial stage of our research aims to gather information on the endophytic microorganisms present in medicinal plants while examining their antibacterial and antifungal properties against micromycetes. Promising strains of endophytic microorganisms, with potential for the development of pharmaceuticals, are preserved in the National Collection of the Republic of Kazakhstan and serve as subjects for national and international patent applications.

The establishment of several new biotechnological and pharmaceutical enterprises based on novel technologies necessitates the comprehensive utilization of the remarkable potential offered by the resources of the Republic's pharmaceutical flora. A key objective outlined by the Government of the Republic of Kazakhstan in the realm of drug provision is the advancement of the pharmaceutical industry to meet the nation's medication requirements, including the production of original drug substances derived from domestic microorganism-based drug producers.

At present, the escalating prevalence of antimicrobial resistance represents a significant public health concern, as it jeopardizes our ability to effectively treat life-threatening infections. In response to this pressing challenge, the World Health Assembly has endorsed the Global Action Plan to Combat Antimicrobial Resistance. This strategic plan strives to ensure sustained access to effective and safe antimicrobial medications [1].

Biologically active substances and secondary metabolites of plants play a crucial role in the production of bactericidal and fungicidal preparations in the pharmaceutical industry, as well as in the formulation of herbal products in cosmetics and household chemistry. Currently, the industry primarily relies on cultivated preparations of *Salvia aethiopsis* sage, *Salvia stepposa* Desshost, and *Salvia sclarea* L. However, there remains an insufficient understanding of the local species of natural flora in Kazakhstan and the secondary metabolites they produce. The study of these species holds both theoretical and practical significance for our country, as it enables the creation of a domestic resource base of biologically active substances for the domestic market and export.

One of the pressing challenges in modern medicine is the rapid emergence of drug resistance among pathogenic microorganisms, viruses, and cancer cells. Consequently, the search for new effective antibiotics becomes of paramount importance, as they serve as the primary source of natural compounds synthesized by various microorganisms such as actinobacteria, bacteria, and fungi. These microorganisms not only produce antibiotics but also possess the capability to synthesize vitamins, hormones, antioxidants, enzymes, growth substances, and amino acids. Recent studies indicate that the potential of microorganisms as producers of biologically active substances is far from exhausted. An essential phase in the search for and development of new antibiotics involves isolating secondary metabolite producers from medicinal plants growing in their natural environments. Various methods, both traditional and selective, are employed to isolate endophytes from natural sources. The selective methods utilized in microbial isolation

enable an increased taxonomic diversity of prokaryotic cultures isolated from the examined samples. Medicinal plants that grow naturally and are adapted to xerophytic environments have recently gained significant demand in the global market. *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* Desshost, and *Salvia sclarea* L. are particularly promising medicinal plants known for their abundance of biologically active substances. However, the systematic study of plant species within this group, specifically those growing in Kazakhstan, remains insufficient.

In the pursuit of new drugs, researchers have discovered that medicinal plants offer a preferred alternative to pure pharmaceuticals, as they serve as a source of new antimicrobial agents with low toxicity and devoid of side effects associated with synthetic chemicals [2].

Currently, there is substantial relevance in exploring the effective utilization of secondary metabolites, particularly those produced by endophytic microorganisms, which possess a wide range of antimicrobial properties. These biological compounds present promising avenues for the discovery of novel types of antimicrobial agents. Consequently, it is essential to prioritize research on endophytic microorganisms isolated from endemic medicinal plants, with the aim of harnessing their potential for antibiotic discovery.

The utilization of local medicinal natural substrates presents significant opportunities for the screening of new and competitive medicines, which could serve as the foundation for the development of an innovative pharmaceutical industry in Kazakhstan. Currently, a comprehensive examination of endophytic microorganism populations within sage remains incomplete, despite their role as a vital component of biodiversity and a promising source of antimicrobial compounds. Therefore, comprehensive studies focusing on endophytic plant microorganisms, possessing an ethnobotanical history and serving as the primary focus of research [3-5], are highly relevant. The proposed research work aims to identify the endophytic microorganisms isolated from the organs of medicinal plants and evaluate their antibiotic activity.

Globally, the genus *Salvia* L. comprises approximately 900 species, with 29 species found in Kazakhstan [6, 7]. Among them, there are medicinal, fodder, technical, and ornamental plants. The biological activity of essential oils in the *Salvia* L. genus is attributed to the synergistic action of its primary components. The analysis of available data and specialized literature on *Salvia Officinalis* L. indicates that the essential oil components have been extensively studied and are influenced by various factors, such as growth conditions, production methods, and storage techniques for plant materials [8, 9]. The genus *Salvia* L. serves as a rich source of essential oils, flavonoids, and terpenoids [10-11]. Moreover, this genus is gaining recognition for its antioxidant activity against pathogens [12,13]. The inflorescences of *S. aethiopis* contain 0.28% essential oil, while the leaves contain 0.2% essential oil, primarily composed of terpenes [14-15].

This study aims to isolate endophytic microorganisms from specific plant organ parts, extract antibiotic substances from them, and assess their antibacterial activity. The investigation focuses on medicinal plants such as *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* Desshost, and *Salvia sclarea* L., as these plant species have the potential to harbor endophytic microorganisms capable of producing active secondary metabolites.

Exploring the ability of endophytic microorganisms to produce antibiotics from medicinal plants will contribute to a better understanding of their diversity and distribution across various regions worldwide. Additionally, this research will facilitate the development of new methodological approaches for screening and discovering novel antibiotics. The presence of diverse endophytic microorganisms from medicinal plants in Kazakhstan offers promising prospects for the proposed screening studies aimed at identifying new antibiotic producers through innovative methods.

If we consider the literature sources, endophytes can be categorized into different taxa as follows: *Proteobacteria* 54% (*Alphaproteobacteria* 18%, *Betaproteobacteria* 10%, *Gammaproteobacteria* 26%), *Actinomycetes* 20%, *Firmicutes* 16%, *Bacteroidetes* 6%, and *Archaea* 4% (Hardoim et al., 2015). It is evident that with the increasing availability of advanced molecular genetic methods, the list of endophytic bacteria is constantly expanding, leading to a continuous increase in our knowledge of endophyte biodiversity.

Endophytic bacteria can be found in various parts of the plant, including roots, above-ground plant parts, flowers, and seeds. They are present in vegetation across different geographical locations worldwide. Similar to rhizospheric plant growth-promoting bacteria (PGPB), endophytic bacteria possess several beneficial characteristics. These include providing plant protection against diseases, exhibiting antagonistic activity against nematodes, nitrogen absorption, and synthesis of plant growth regulators.

Endophytic bacteria can reside within the plant in a latent state, and pathogenic factors may be activated under stress or ecological imbalances. Depending on the circumstances, the plant may exhibit disease symptoms or exhibit altered abilities to combat such "precipitating" factors.

Materials and methods of research

The research focused on studying endophytic microorganisms isolated from various plant parts, including the rhizosphere (root), caulosphere (stem), phyllosphere (leaf surface), and anosphere (flowers). Specifically, the plant species investigated were Mediterranean sage (*Salvia aethiopis* L.), woodland sage (*Salvia nemorosa*), and clary sage (*Salvia sclarea*) belonging to the Lamiaceae family. Samples of natural substrates from the ethnopharmaflora of ecosystems in Ile-Alatau National Nature Park and the Southern Balkhash region were collected following international requirements and field expeditions.

Known selective nutrient media were employed in the study to assess the antibiotic-producing capabilities of the microorganisms. Three nutrient media were developed and used for the experiments.

Gauze medium: Tap water; 1.0 g soluble starch; 20.0 g; potassium nitrate (KNO_3); 1.0 g potassium hydroorthophosphate (K_2HPO_4); 0.5 g magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$); 0.5 g sodium chloride (NaCl); pH adjusted to 7.0-7.5; Disinfection: Sterilized at 121°C for 15-20 minutes.

Meat peptone agar: Meat water: 1.0 g; Sodium chloride (NaCl): 5.0 g; Peptone: 10.0 g; Agar-agar: 20.0 g; pH adjusted to 6.8-7.0; Sterilized at 121°C for 20 minutes.

Chapek's nutrient medium: Tap water: 1.0 g; Sodium nitrate ($NaNO_3$): 2.0 g; Dikalium phosphate (K_2HPO_4): 1.0 g; Magnesium sulfite ($MgSO_4$): 0.5 g; Potassium chloride (KCl): 0.5 g; Iron sulfite ($FeSO_4$): 0.5 g; Iron sulfite ($FeSO_4$)-trace; Agar-agar: 20.0 g; pH adjusted to 6.8-7.0; Sterilized at 121°C for 20 minutes.

The objects of research were *Salvia aethiopis* L. samples collected from Kazakhstan, as well as *Salvia stepposa* Desshost and *Salvia sclarea* L. The study focused on isolating endophytic actinomycetes and bacterial strains using the accumulative microbial culture method.

Description of Research Methods:

To fulfill the objectives of the research work on *Salvia aethiopis* L., *Salvia stepposa* Desshost, and *Salvia sclarea* L., various methods were employed, including screening of endophytic microorganisms of medicinal plants, determination of composition, and conducting laboratory experiments.

The rhizosphere soil samples were extracted from a depth of 10-20 cm. These samples were carefully placed in sterile plastic containers and transported to the laboratory for further analysis. To maintain their integrity, the samples were stored in a refrigerator at 4°C until they were ready for use.

The isolation of microorganisms from different parts of the medicinal plants involved a series of steps. The leaves, stems, and roots of the plants were first washed thoroughly with water and then with sterile bidistilled water to remove any external debris. Next, the dried samples were immersed in 70% ethanol for 30 seconds to eliminate surface microorganisms. Subsequently, they were treated with a 2% sodium hypochlorite solution for 2 minutes to further remove any remaining epiphytic isolates. After discarding the solution, the specimens were re-immersed in 70% ethanol for an additional 30 seconds, followed by a final wash with bidistilled water. Each specimen was then carefully cut into segments using a scalpel. These cut plant specimens were

placed on Petri dishes containing nutrient agar and incubated at 32°C for 48 hours to allow the growth of endophytic microorganisms [16].

The antagonistic activity of the isolated actinomycetes was assessed using the agar blocks and diffusion methods. Test cultures of micromycetes grown on Chapek agar and bacteria grown in EPA medium were utilized for this purpose. Once the microorganisms of interest had grown sufficiently, agar blocks with a sterile drill (7 mm) were carefully cut. These agar blocks were then placed on the agar surface of another Petri dish, with equal distances between them, alongside the test cultures.

By employing these methods, the antagonistic activity of the isolated actinomycetes and their effects on the test cultures could be evaluated effectively.

The diameter of the growth inhibition zone for bacteria was measured after 48 hours of incubation at 37°C. Similarly, the diameter of the growth inhibition zone for yeast-like and micromycete fungi was determined in cultures grown at 28°C for 5 days.

To analyze the morphological characteristics of the cultures, various methods were employed. Gram staining was performed to determine the cell wall composition and staining properties. Spore formation, motility, and cell shape were also examined to assess the morphological features of the cultures. In addition, biochemical tests such as catalase, oxidase, and amylase activity were conducted to determine the biochemical characteristics of the cultures [27].

Test microorganisms including *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger* were used for the experiments, representing bacteria, yeast-like fungi, and micromycete fungi [19].

Results and discussion

In this study, samples of rhizosphere and aboveground parts of medicinal plants from the *Salvia L.* genus were collected from the Ile-Alatau State National Nature Park and the Balkhash region. Endophytic microorganisms were isolated from these samples. Morphologically distinct colonies were observed on nutrient agar plates inoculated with rhizosphere and aboveground plant parts.

A total of 45 endophytic microorganism isolates were obtained from the three species of medicinal plants: Mediterranean sage (*Salvia aethiopis L.*), woodland sage (*Salvia nemorosa*), and clary sage (*Salvia sclarea*). The distribution of endophytic microorganisms in different plant organs is presented in Table 1. The highest colonization of endophytic microorganisms was observed in the roots of the studied plants (42.2%), followed by the leaves (24.4%).

Eleven species of all isolates exhibited a characteristic pattern of actinomycetes when grown on Gause agar medium. They formed dense, compact colonies that merged with the medium to form a substrate-mycelium. Some isolates also produced pigments in the medium. Gram staining revealed that all isolates exhibited gram-positive characteristics. Based on these morphological features, the isolates were classified as actinomycetes.

In the case of EPA agar nutrient medium, 34 isolates displayed distinct characteristics. They formed smooth, round, transparent, convex, and moist colonies that created a uniform blur in water. These properties are indicative of their classification as bacteria. For ease of identification, the isolates were labeled with a capital letter representing the corresponding plant species (A for *Salvia aethiopis L.*, N for *Salvia nemorosa*, S for *Salvia sclarea*), followed by a capital letter indicating whether they were actinomycetes (A) or bacteria (B), and finally assigned an ordinal number.

Table 1 – The number of endophytic microorganisms in medicinal plants of the *Salvia L* sage family

No.	The sage name	The number of endophyte isolates isolated from different plant parts			
		Root (R)	Stem (S)	Leaf (L)	Overall
1	<i>Salvia aethiopis L.</i>	8	8	6	22
2	<i>Salvia nemorosa</i>	7	4	3	14
3	<i>Salvia sclarea</i>	4	3	2	9

A survey of the antagonistic properties of actinomycetes.

The antagonistic activity of the actinomycetes was assessed by testing their ability to inhibit the growth of common bacterial and fungal species that are known to contaminate drugs, including *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger*. To identify actinomycete strains with potent antimicrobial properties, the endophytic actinomycetes were inoculated onto nutrient media that were previously inoculated with the pathogenic microorganisms. This setup allowed for the observation of any inhibitory effects exerted by the actinomycetes against the target pathogens (refer to Figure 1 for details).

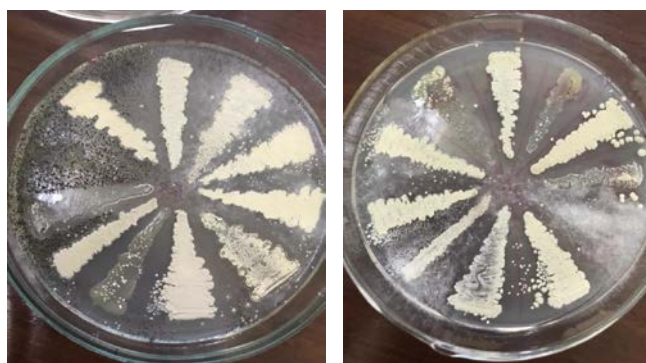


Figure 1 - Growth inhibition of active endophytic actinomycetes from *Salvia L* and *A. niger*, *F. oxysporum* testing pathogens

The research findings indicated that out of the isolated endophytic microorganism strains, namely A. A2, A. A4, and A. A5, none demonstrated activity against the mentioned pathogens. Strains A. A1, A. A3, and H. A3 exhibited activity against only one of the pathogens, while strains A. A6, H. A2, and C. A1 showed no activity against two of the pathogens but displayed activity against other pathogens. Notably, the most effective strains with a broad spectrum of antagonistic activity were N. A1 and N. A4, as shown in Table 2.

Thus, as effective producers of antimicrobial agents with antagonistic activity against pathogenic bacteria and fungi, the strains A. A6, N. A1, N. A2, N. A4, S. A1 were selected.

The validity of the results was confirmed by the detection and investigation of strains with antagonistic activity using the agar diffusion method and agar block method, as shown in Tables 6, 7 (Figure 3, 4).

Table 2 – Study of the activity of endophytic actinomycetes on pathogens

No.	Strains	Pathogenic microorganisms				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Mediterranean sage (<i>Salvia aethiopsis L.</i>)						
1	A.A ₁	-	-	+	-	-
2	A.A ₂	-	-	-	-	-
3	A.A ₃	-	-	-	-	+
4	A.A ₄	-	-	-	-	-
5	A.A ₅	-	-	-	-	-
6	A.A ₆	-	-	+	-	+
Woodland sage (<i>Salvia nemorosa</i>)						
1	N.A ₁	-	-	+	+	+
2	N.A ₂	-	+	-	-	+
3	N.A ₃	-	-	-	-	+
4	N.A ₄	-	+	+	+	-
Clary sage (<i>Salvia sclarea</i>)						
1	S.A ₁	-	-	-	+	+

Note: “+” stands for antibacterial activity, “-“ for the lack of antibacterial activity

Table 3 – Antagonistic activity of actinomycetes by the agar block method

Strains	Zone of inhibition, mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candidaalbicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.A ₆	16,0±0,4	0	18,9,4±0,3	0	0
N.A ₁	12,4±0,3	0	16,0±0,5	13,7±0,8	0
N.A ₂	0	0	11,2±0,9	0	12,5±0,2
N.A ₄	10,0±0,6	0	0	17,0±0,4	15,3±0,7
S.A ₁	0	0	13,1±0,4	14,2±0,9	0

Table 4 – Antagonistic activity of actinomycete culture fluids

Strains	Zone of inhibition, mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.A ₆	18,4±0,3	0	20,4±0,5	0	0
N.A ₁	15,0±0,5	0	15,6±0,3	14,2 ±0,2	0
N.A ₂	0	0	13,7±0,4	0	14,7±0,3
N.A ₄	12,8±0,2	0	0	18,2±0,3	16,1±0,9
S.A ₁	0	0	14,3±0,5	16,4±0,2	0

The inhibition zones of pathogenic microorganisms' growth, influenced by various actinomycete isolates, increased from 10.0 mm to 20.4 mm (Figure 3). Several tests have indicated that the most potent isolates exhibiting activity against pathogenic bacteria and fungi are N. A1 and N. A4 strains. These strains have been identified and classified accordingly. The N. A1 strain demonstrated antagonistic effects against three test microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, and *Candida albicans*. Similarly, the N. A4 strain inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Fusarium oxysporum*.

The antagonistic properties of bacteria were examined by testing five different species of bacteria and fungi, contaminated with drugs, namely: *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger*.

To identify effective strains of endophytic bacteria with antimicrobial potential, the endophytic bacteria were evaluated by streaking them on nutrient media containing pathogens (Figure 2).



Figure 2 - Growth inhibition of *A. niger* testing pathogens by active endophytic bacteria from the species of *Salvia L.*

The study showed that 27 strains of endophytic bacteria isolated from three species of the medicinal plant sage (*Salvia L.*) have no antagonistic properties. All strains of endophytic microorganisms isolated from woodland sage (*Salvia nemorosa*) showed no antagonistic activity against pathogenic bacteria and fungi. The antagonistic properties of strains isolated from Mediterranean sage and clary sage are shown in Table 5.

Table 5 – Antagonistic activity of endophytic bacteria strains

Strain	Pathogenic microorganisms				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Mediterranean sage (<i>Salvia aethiopsis</i> L.)					
The strains from leaves					
A.B ₃	-	+	-	-	+
A.B ₄	-	-	-	-	+
The strains from roots					
A.B ₆	+	-	+	-	-
Clary sage (<i>Salvia sclarea</i>)					
The strains from leaves					
S.B ₂	-	-	+	-	-
S.B ₄	+	-	+	-	+
The strains from roots					
S.B ₅	-	-	-	-	+
S.B ₈	-	-	+	-	-
Note: “+” stands for antibacterial activity, “-“ for the lack of antibacterial activity					

After investigating the antagonistic properties, it was found that strain A.B3 inhibited the growth of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger*. Similarly, strain A.B6 demonstrated inhibitory effects on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, while strain S.B4 suppressed the growth of three test organisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Aspergillus niger*. Subsequent studies on these strains involved diffusion on agar in nutrient media and the block agar method to determine the growth inhibition zone (Tables 6 and 7).

Table 6 – Antagonistic activity test of bacteria by the agar overlay technique

No. of strain	Zone of inhibition, mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.B ₃	0	0	12,2±0,3	0	14,1±0,4
A.B ₆	11,4±0,6	15,8±0,2	0	0	0
S.B ₄	13,2±0,4	10,3±0,3	13,3±0,3	0	0

Table 7 – Antagonistic activity test of the culture fluid by the diffusion method

No. of strain	Zone of inhibition, mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A.B ₃	0	0	13,7±0,2	0	15,7±0,9
A.B ₆	12,4±0,4	16,1±0,4	0	0	0
S.B ₄	14,5±0,3	11,3±0,9	14,1±0,5	0	0

The growth inhibition zones of pathogens changed from 10.3 mm to 16.1 mm under the influence of different bacterial isolates (Figure 3). Among them, strain S. B4 exhibited the highest antagonistic activity, displaying antibacterial effects against three test microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Aspergillus niger*. The remaining isolates demonstrated antagonistic potential against one or two multidrug-resistant pathogens.

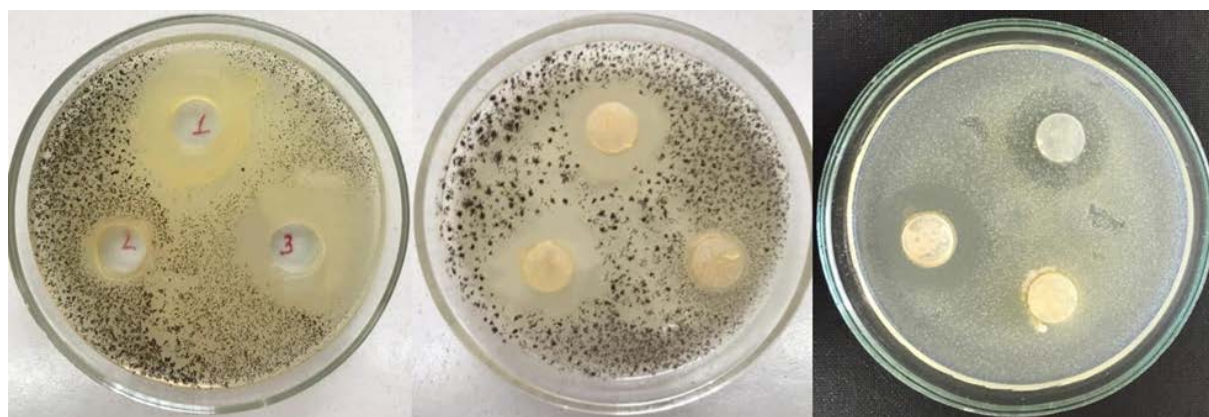


Figure 3 - Growth inhibition zone of *A. niger* testing pathogens by active endophytic microorganisms from *Salvia L.*

In conclusion, the antagonistic properties of endophytic and rhizosphere microorganisms, isolated from three species of medicinal plants in South Kazakhstan, were investigated. The species studied included Mediterranean sage (*Salvia aethiopis L.*), woodland sage (*Salvia nemorosa*), and clary sage (*Salvia sclarea*), which have potential as antibiotic producers in the future.

A total of 45 isolates of endophytic microorganisms were obtained, with the highest number of isolates found in the roots (42.2%), followed by stems (33.4%), and the lowest in the leaves of the studied plants (24.4%).

Endophytic actinomycetes were selected from sage (*Salvia L.*) based on their ability to inhibit the growth of pathogens. Two strains, N.A1 and N.A4, were found to effectively suppress the growth of *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, and *Fusarium oxysporum*. The inhibition zones ranged from 10.0 mm to 18.2 mm. These endophytic strains were identified as members of the genus *Actinomyces*.

Similarly, endophytic bacteria from sage (*Salvia L.*) were selected based on their ability to inhibit the growth of pathogens. Strain S.B4 was chosen as it effectively suppressed the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Aspergillus niger*. The growth inhibition zones ranged from 10.3 mm to 14.5 mm. The studied endophytic bacterial strains were identified as members of the genus *Bacillus*.

References:

- 1 Shalfej: (*Salvia deserta* Schang. i *Salvia verticillata L.*) iz Altajskogo kraja. E.A. Korolyuk, V. Kenig, A.V. Tkachev, *Himiya rast. syr'ya*. 2002, 43-48 (http://web2.nioch.nsc.ru/terpenlab/publications/fulltexts/Korolyuk_salvia_2002.pdf)
- 2 Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *The Journal of Antibiotics*, 2013, 66: 571-591 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24002361/>)
- 3 Yakovleva M.B., Nikitina Z.K. Skrining-metody v biotekhnologii. Vyyavlenie mikroorganizmov-producentov biologicheski aktivnyh veshchestv. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2016, 5: 35-43 (<https://bmpcjournal.ru/sites/default/files/private/bmfc-2016-04-04.pdf>)
- 4 Treznovnikova L.P., Baimakhanova G.B., Balgimbaeva A.S., Baimakhanova B.B., Smirnova I.E., Faizulina E.R. Biotekhnologicheskij potencial ekstremofil'nyh aktinomicetov dlya mediciny i strategii ego otkrytiya. *Mikrobiologiya zhane virusologiya*, 2021, 4(35): 4-26 (<https://www.imv-journal.kz/index.php/mav/article/view/21>)
- 5 Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants, *Int. J. Integr. Biol.*, 2009, 6(3): 112-124 (<https://www.researchgate.net/publication/44259458>)
- 6 Flora SSSR Leningrad. *Sistematicheskij katalog sem. Zlakovyh*, 2011, 410 (https://www.studmed.ru/komarov-va-shishkin-bk-red-flora-sssr-tom-11_af7df04f540.html)
- 7 Flora Kazahstana Almaty: "Fylym", 2001, 280 (<https://www.twirpx.com/file/565728/>)

- 8 Farkas P. Composition of essential oils from the flowers and leaves of *Salvia sclarea* (Lamiaceae), cultivated in Slovak Republic. *Journal of Essential Oil Research*, 2005, 17: 141–145 (<https://www.researchgate.net/publication/232960436>)
- 9 Stancheva I., Geneva M., Hristozkova M., Boychinova M., Markovska Y. Essential oil variation of *Salvia officinalis* (L.) grown on heavy metals polluted soil. *Biotechnol. EQ*, 2009, 23: 373–376 (<https://www.researchgate.net/publication/266469965>)
- 10 Al-Aboudi AMF, Abu Zarga MH, Abu-Irmaileh BE, Awwadi FF, Khanfar MA. Three new secoursadiene triterpenoids from *Salvia syriaca*. *Nat Prod Res.*, 2015, 29:102-108 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5671917/>)
- 11 Hussain A., Adhikari A., Choudhary M.I., Ayatollahi S.A., Rahman A.. New adduct of abietane-type diterpene from *Salvia leriifolia*. *Nat Prod Res.* - 2016.- Vol.30. - Pp.1151–1156 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27266891/>)
- 12 Jassbi A., Eghtesadi F, Hazeri N, Ma'sumi H, Valizadeh J, Chandran JN, Schneider B, Baldwin IT. The roots of *Salvia rhytidea*. *Nat Prod Res.*, 2016, 7: 1–5. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27266560/>)
- 13 Salimikia I., Moridi Farimani M., Monsef-Esfahani H.R., Gohari A.R.. A new rearranged tricyclic abietane diterpenoid from *Salvia chloroleuca* Rech. f. & Allen. *Nat Prod Res.*, 2016, 30:120–124 (<https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.15429.13095>)
- 14 Dorman M. J., Bachmayer O. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. and Food Chem.*, 2004, 52:4, 762–770 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14969528/>)
- 15 Malafronte A., Piaz F.D., Cioffi G., Braca A., Leone A., Tommasia N.D. Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia aethiopsis*. *Nat Prod Res.*, 2008, 3: 877–880 (<https://www.academia.edu/30056164/>)
- 16 Egorov N.S. Osnovy ucheniya ob antibiotikah. *M.:Iz-vo MGU*, 2004, 598 (<https://e-library.sammu.uz/>)
- 17 Slyusar O.I. Razrabotka sostavov i tekhnologii myagkih lekarstvennyh form ranozazhivlyayushchego dejstviya s levomicetinom i metiluracilom: *doktor. farm. nauk. Moskva*, 2002, 271 (<https://medical-diss.com/farmakologiya/>)
- 18 Gause N.F., Preobrazhenskaya T.P., Sveshnikova M.A., Terekhova L.P., Maksimova T.S. Opredelitel' aktinomicetov. *M.: «Nauka»*, 1983, 245 (<https://cyberleninka.ru/article/n/>)
- 19 Sharma D., Kaur T., Chadha B.S., Manhas R.K. Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Trop. J Pharm Res.*, 2011, 10: 801-808 ([https:// DOI:10.4314/tjpr.v10i6.14](https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i6.14))

FTAMP:34.27.19

Ж.А. ОРЫНБАЕВА^{1*}, З.Б. ТҰҢҒЫШБАЕВА¹, Н.Б. МОЛДАГУЛОВА²,
Д.К. КУЛЖАНОВА¹, Н.В. РУДАКОВ³

¹Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

²Экостандарт.kz, Астана, Қазақстан

³Омбы табиғи – ошақты инфекциялар ҒЗИ, Омбы, Ресей

*e-mail: jadi_astana@mail.ru

АДГЕЗИЯ ӘДІСІМЕН ПЕРСПЕКТИВТІ ПРОБИОТИКАЛЫҚ ШТАММДАРДЫ АЛУ

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14

Түйін

Зерттеудің мақсаты перспективті пробиотикалық штаммдарды үй жағдайында дайындалған: бие сүті, қымыз, шұбат, қатық, айран сүтқышқылды тағамдардан бөліп алу.

Пробиотикалық микроорганизмдердің адгезивті қасиеті асқазан-ішек шырышты қабығының эпителий жасушаларын байланыстыратын рецепторлар үшін патогенді және шірік бактериялармен бәсекелесу қабілеттілігі тексерілді. Белсенді 16 сүтқышқылды бактериялардың ішінен жоғары және орташа көрсеткіштерге ие 12 штаммы іріктеліп алынды. Bruker MALDI-TOF BIOTYPER жүйесі арқылы идентификациялау барысында олар *Lactobacillus* туыстығына жататын 7 түрі анықталды: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* және *L. acidophilus*. Анықталған 7 штаммның адгезивті белсенділігі жоғары дәрежені көрсетті.

Зерттеу нәтижесінде алынған белсенді штаммдардан пробиотикалық консорциум *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4 жиынтығы құрылды. Пробиотикалық консорциум алкогольді сусынмен зақымдалған ішкі ағза қуыс мүшелерін түзету үшін пробиотикалық өнім жасау үшін таңдалып алынды.

Кілтті сөздер: сүтқышқылды бактериялар, лактобактериялар, пробиотиктер, адгезивті белсенділік, штаммдар.

Ғылыми - зерттеу жұмыстың басты мақсаты алкогольді сусындармен зақымданған ішкі ағза қуыс мүшелеріне оң әсер ететін, болашақта пробиотикалық өнім алуда қолданылатын пробиотикалық перспективті штаммдар алу болып табылады.

Пробиотиктердің қазіргі заманауи тұжырымдамасы соңғы онжылдықта қарқынды дами бастады [1].

Қазіргі уақытта Қазақстан халқы, бүкіл әлем сияқты, дұрыс тамақтануға және пайдалы өнімдерді қолдану, оның ішінде құрамында пробиотиктер бар өнімдерді тұтынуға мүдделі. Осыған байланысты жаңа пробиотикалық микроорганизмдерді іздеуге бағытталған зерттеулер өзекті болып отыр. Ашытылған функционалды тағамдарды дайындау үшін пробиотикалық штаммдар ретінде анықталған және сипатталған микроорганизмдердің таза, өміршең штаммдары қолданылады [2].

Бүгінгі таңда пробиотиктерге тірі микроорганизмдерді жатқызамыз. Яғни, адамның негізгі микрофлорасының өкілдері ретінде асқазан-ішек жолына жеткілікті мөлшерде енген кезде белсенділігін, өміршеңдігін сақтайды және денсаулығына оң әсер етеді. Пробиотиктер ретінде бифидобактериялардың әртүрлі түрлері қолданылады (*Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*), лактобактериялар (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. gasseri*) және басқалары микроорганизмдер (*Lactococcus cremoris*, *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*). Генетикалық әртүрліліктің арқасында олар бір-бірінен қасиеттері бойынша айтарлықтай ерекшеленеді. Бұл ғылыми-зерттеу жұмысы пробиотиктерді медицина, өндіріс саласында, ауылшаруашылығындағы

өзекті мәселелерді шешу үшін жаңа перспективті биологиялық препараттарды құру мәселелеріне арналған [3]. Бірақ біздің зерттеу жұмысымыздың алға қойған тапсырмалары бойынша лактобактерия тұқымдастарының бактерияларын зерттеу болып табылады.

Пробиотикалық бактериялар әртүрлі механизмдерді, яғни соның ішінде микробқа қарсы байланыстардың, патогендік бактериялардың адгезиясының төмендеуі арқылы энтеропатогендерге қарсы қорғаныс рөлін атқарады [4].

Пробиотиктердің әсер ету механизмдеріне патогендік микроорганизмдердің бәсекелестігін жою, өсуін тежеу және иммундық модуляция жатады. Олар ішек эпителийіне жабыса алатын бактериялар болып табылғандықтан, асқазан-ішек жолында колониялары едәуір белсенді түрде болады да, осылайша симбионттар арасында айқын артықшылықтарға ие екенін көрсетеді. Ас қорыту жүйесіне енетін көптеген бактериялар асқазан сөлі мен өт ортасында тіршілігін жояды да, осы факторларға төзімді микроорганизмдер ретінде пробиотиктер айқын ерекшеліктерін көрсетеді. Шырышты қабықтың эпителийіне еніп, олар бәсекелестік ерекшелік деп аталатын процестің нәтижесінде патогендік микроорганизмдердің өсуін тежеуге қабілетті болып саналады. Тарихи тұрғыдан алғанда, бұл механизм пробиотиктерді емдік әсерге көрсететін негізгі механизм ретінде қарастырады [5-7]. Пробиотиктер үшін негіз ретінде саналатын микроорганизмдер келесідей талаптарға сай болуы тиіс: 1) патогенді және улы емес; 2) асқазан-ішек жолдарындағы қышқылдар мен өт қышқылдарына төзімді болу; 3) ішектің эпителий жасушаларына бекітілуі; 4) ішек жолы колонизациясы арқылы тез көбеюге; 5) ішекте метаболизмдену; 6) ішек нормофлорасын тұрақтандыру; 7) лиофилизацияланған препараттарды алу процессінде өміршеңдігін сақтауы [8].

Соңғы жылдары құрамында пробиотикалық бактериялары бар ашытылған өнімдердің пайдалы әсерінің ғылыми дәлелдерін алу мақсатында көптеген зерттеулер жүргізілді [9]. Лактобактериялардың асқазан-ішек жолдарының шырышты қабығының бетіне жабысуы сәтті колонизациялануының бастапқы сатыларының бірі болып саналады [10]. Зертханадағы адгезивті қабілетін зерттеу әдісі инвазияның алдын алуда шешуші рөл атқарады және ішек қоздырғыштарының колонизациясы мен бактериялардың бәсекеге қабілеттілігін анықтайды [11]. Адгезивті белсенділік әдісі - бұл бактериялық жасуша қабырғасының беткі компоненттері мен жасуша бетінің комплементарлы құрылымы арасындағы өзара әрекеттесу [12]. Зертханалық адгезивті белсенділікті анықтау әдісі потенциалды механизммен байланысты экзополисахаридтер, липидтер, көмірсулар, мембранамен байланысқан рецепторлар және нуклеин қышқылдары ферменттер өндірісі болып табылады [13]. Адам денсаулығына оң әсер беретін, зертханалық штаммдар ішек қуысындағы жасушалар эпителийіне жабысу қабілеті жоғары болғандықтан, патогенді микроорганизмдерден қорғай алатын қабілеті де жоғарылай түседі [14-15]. Адгезивті белсенділік әдісі - микроорганизмдердің кез-келген тығыз субстраттарды, соның ішінде адам мен жануарлар ұлпаларын колонизациялауын қамтамасыз ететін күрделі көп компонентті процесс. Бүгінгі күнде адгезивті белсенділікті зерттеу үшін организм иесінің жасушаларын *in vitro* және *in vivo* әдістер арқылы зерттеу ұсынылған. Алайда *in vivo* әдістері зертханалық жануарларды қолдану арқылы штаммдардың көп мөлшерін зерттеу үшін өте көп уақытты қажет ететінін, сонымен қатар қымбат және жарамсыз екендігін дәлелдеді. Осыған байланысты бактериялардың адгезивті белсенділігін анықтауда *in vitro* әдісін қолдану барысында жасушалар ретінде жиі эритроциттер қолданылады. Ал қалыпты микрофлораның маңызды функцияларының бірі болып, оның қорғаныс қасиеттерін анықтайтын колонизацияға төзімділік пен адгезия болып табылады [16].

Микроорганизм микрофлорасының тұрақтылығы мен қорғаныс қасиеттері көбінесе адгезивті қасиетке байланысты екенін атап өткен жөн. Адгезияның арқасында резиденттік микрофлора колонизацияға төзімділік қасиетін жүзеге асырады. Яғни, биотоптардың бөгде микроорганизмдермен қоныстануына жол бермейді және инфекциялық агенттерден қорғаныс тосқауылын жасайды. Басқаша айтқанда, адгезияның молекулалық механизмдері патогендік формалар үшін де, нормофлора өкілдері үшін де әмбебап болып табылады.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Таза культураларды бөліп алу

Ғылыми зерттеу жұмысына 16 сүтқышқылды культуралар Алматы және Астана қалаларындағы үй жағдайындағы сүт өнімдерден, яғни бие сүті, қымыз, қатық, шұбаттан бөлініп алынды. Сүтқышқылды бактерияларды өсіру үшін арнайы HiMedia фирмасының MRS қоректік ортасы қолданылды. Яғни, бөліп алынған культураларды микроаэрофильді жағдайда 37°C температурадағы (redLINE RI-53, Германия) термостатқа 48 сағатқа инкубацияға қойылды. Осы зерттеу жұмысының мақсатында қолданылатын әдіс халықаралық стандартқа (ISO 8261, Сүт және сүт өнімдері. Микробиологиялық зерттеулер үшін сынамаларды, бастапқы суспензияларды және ондық сұйылтуларды дайындау бойынша жалпы нұсқаулар) сәйкес болып табылады.

Жалпы бөлініп алынған, таза культуралар Bruker MALDI-TOF Biotyper жүйесін қолдану арқылы идентификациядан өткізілді. Maldi-TOF MS үлгілерінің дайындалуы келесідей болды: балғын жеке бір колонияны MSP 96 жылтыратылған болат нысанаға (Bruker Daltonik) тікелей ауыстырып кептірді. Әрі қарай 1 мл қаныққан *a*-супано-4-hydroxycinnamic acid (HCA) matrix solution ерітіндісімен жабылып, 50% ацетонитрилде - 2.5% трифторуксусты қышқылында (Bruker Daltonik) және бөлме температурасында кептірілді [17].

Зерттеу мақсаты бойынша әрбір бөлініп алынған микроорганизмдерге адгезивті белсенділігін анықтау әдісі жүргізілді. Микроорганизмдердің адгезивті белсенділік әдісі-микроорганизмдердің қатты беттерде және сезімтал жасушаларда адсорбциялану қабілеті бар деген мағынаны білдіреді. Жалпы культуралардың адгезиясын *in vitro* жүйесінде адамның 0 (1) (Rh+) формализацияланған эритроциттерінде В.Брилис әдістемесі бойынша зерттелді. Микроскопиялық зерттеу бойынша кем дегенде 5 көру өрісінде кемінде 100 эритроциттерді санау жұмысы жүргізілді. Адгезияның орташа көрсеткіші (АОК) бойынша адгезия коэффициенті анықталды. АОК бір эритроциттің бетіне бекітілген микробтардың орташа саны бойынша анықталып, 5 көру өрісіндегі барлық эритроциттер (кем дегенде 50 эритроцит) саны саналды. Адгезияның 0–ден 1,0-ге дейінгі АОК – нөлге тең, ал 1,01 –2,0 - төмен, 2,01-4,01 - орташа, 4,0-ден жоғары деп саналады. Қарастырылған эритроциттердің жалпы санынан эритроциттердің пайызы есептелді.

Адам эритроциттерінің суспензиясын дайындау.

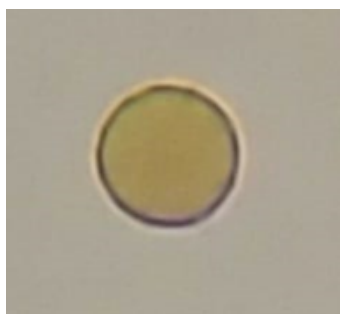
Адгезивті белсенділікті анықтау әдісін қолдану үшін (I) Rh+ топтағы (9 мл) адам қаны алынды. Алынған қанның салмағы 18,9609 г, ал дистилденген судың салмағы 18,9609 г етіп екі пробиркаға бірдей салмақта өлшеніп екі пробирка центрифуга ішіне қарама-қарсы қойылды. Тек эритроциттерді таза бөліп алу үшін 0,9% натрий хлорид ((NaCl) массалық үлесі ω (NaCl) \approx 0,9%) ерітіндісінің он есе көлемімен үш рет жуылып, 10 минут 1500 айналымда (Centrifuge CM-6M) центрифугалау әдісі арқылы сол ерітіндіде қайта суспензияланды. Қан үлгісінің үстінен сары су бөлініп, астыңғы бөлікте эритроциттер жиналды. Осылайша (I) Rh+ топтағы қан үлгісі тазаланып таза эритроцит алынды.

Адгезивті белсенділік әдісі бойынша 0,5 % эритроцит дайындалды. Ол үшін стерилденген 50 мл натрий хлорид ерітіндісі алынып, одан 0,250 мкл натрий хлорид ерітіндісін алып тастап, үстіне 250 мкл эритроцит құйып араластырылды. Дайын болған 0,5 % эритроцит ерітіндісімен штаммдарды енгізу жұмыстары жүргізілді.

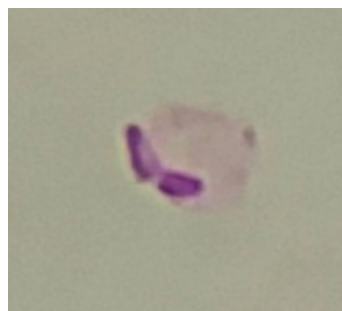
Әрі қарай реакцияға GT204-0096D сериядағы U-тәрізді иммунологиялық реакцияларға арналған қақпағы бар 96 саңлаулы плашка қолданылды. Плашканың саңлауларына дайындалған тұтас суспензия енгізіліп отырды. Плашкаға 0,250 мкл натрий хлорид ерітіндісін толтырып шығып, әр саңлауға енгізетін штаммдардың атаулары белгіленіп алынды. Титрлеу арқылы плашкадан 1:4, 1:6, 1:8, 1:16 етіп 0,25 мкл алып тасталынып отырды. Әрі қарай барлық плашканың саңлауларына 0,5 % эритроцит 0,25 мкл-дан енгізілді. Дайын болған эритроцит ерітінділері араласқан штаммдары бар плашканы 37°C температураға термостатқа 3 сағатқа, әрі қарай қалыпты температурадағы 4°C тоназытқышқа 24 сағатқа қойылды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

Бір тәуліктен соң плашкадағы штаммдардың 0,5% эритроцит ерітіндісімен әрекеттескен нәтижесі алынды. Зерттеу барысында адгезивті белсенділікті анықтау штаммдармен жұмыс істеу қиындықты тудырды. Себебі алынған нәтиже бойынша оларда 0,5% -дық эритроцит ерітіндісімен титірлегендегі эритроцит тұнбасы кейбір штаммдарда ағып кетіп отырды. Кейбір штаммдар (I) Rh+ топтағы қанмен араласқанда эритроцитке жабысып тұратындығын көрсетті. Сонымен қатар, зерттеуге PremiereE5 микроскопы арқылы микроскопиялық талдау жасалынды. Микроскопиялық талдауда эритроциттерді көру слайд әйнегі арқылы іске асырылды. Яғни, бұл әйнек белгілі бір қалыңдығы тегістелген жиегі бар 76 x 26 стандартты өлшемдегі шыны әйнек. Әдетте шынының беті тегіс және біркелкі қалыңдығы 1 мм болып келеді. Зерттеліп отырған үлгімен шыны арасында көпіршіктерінің болуына жол бермейді.



Сурет 1 – Боялмаған эритроцит



Сурет 2 – Сүтқышқылды бактериялар жабысқан эритроцит (S-106 штамы)

Сурет 1 - де боялмаған (I) Rh+ топ қанынан бөлініп алынған таза боялмаған эритроциттер берілген. Боялмаған эритроциттер зертханалық шыны әйнекке тамшуырман тамызу арқылы жасалып микроскопияда бақыланды. Ал сурет 2 – де эритроцитке сүтқышқылды бактериялар жабысқан (S-106 штамы) бейнесі берілген.

Яғни, S-106 штамы 0,5 % эритроцит ерітіндісімен әрекетке түскен кезде Фуксин ($C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$) бояуымен боялып микроскоп арқылы анықталды. Зерттеуге алынған 16 сүтқышқылды бактерияларды зерттей отырып, кесте 1-де жоғары, орташа, төмен жабысқақтық әсерлері бар штаммдар әртүрлі көрсеткіште анықталды. Және де зерттеу жұмыстың нәтижесін нақты анықтау мақсатында зерттеуге алынған барлық штаммдар адгезивті белсенділікке үш қайтара тексеріліп жасалынды.

Кесте 1 – Штаммдардың адгезивтілік көрсеткіштері

№	Штаммдардың атауы	Адгезияның орташа көрсеткіші (АОК)	Нәтижелері
1	2	3	4
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> S- 612	$4,0 \pm 1,6$	Жоғары
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> S- 106	$4,0 \pm 1,0$	Жоғары
3	<i>Lactobacillus brevis</i> S- 149	$2,1 \pm 0,5$	Орташа
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-74	$0,6 \pm 0,1$	Белсенділігі жоқ
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> S- 414	$4,0 \pm 1,8$	Жоғары
6	<i>Lactobacillus sakei</i> S-21	$2,8 \pm 1,5$	Орташа
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	$4,1 \pm 1,6$	Жоғары
8	<i>Lactobacillus lactis</i> S- 819	$1,0 \pm 1,0$	Әлсіз
9	<i>Lactobacillus fermentum</i> П1-5	$3,0 \pm 1,0$	Орташа
10	<i>Lactobacillus pentosus</i> S-805	$1,3 \pm 0,2$	Әлсіз
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-1	$4,5 \pm 1,4$	Жоғары

1- кесте жалғасы

1	2	3	4
12	<i>Lactobacillus brevis</i> S -2	4,2 ± 1,7	Жоғары
13	<i>Lactobacillus pentosus</i> S - 4	1,5 ± 0,25	Әлсіз
14	<i>Lactobacillus lactis</i> d-2	2,5 ± 1,0	Орташа
15	<i>Lactobacillus casei</i> d-3	2,0 ± 1,08	Орташа
16	<i>Lactobacillus fermentum</i> d-4	4,0 ± 1,4	Жоғары
Ескерту: АОК: 0-1,0 – белсенділігі жоқ; 1,0-2,0 -әлсіз; 2.01-4.01 -орташа; ≥ 4,0 - жоғары			

Штаммдардың адгезивтілігін зерттеу В. Брилис әдістемесі бойынша адамның 0 (1) (Rh+) тобының эритроциттерін *in vitro* арқылы жүргізілді. Нәтижесінде барлық штаммдар әртүрлі адгезивтілік қасиетін көрсетті. Бірақ, зерттеуге алынған 16 сүтқышқылды бактериялардың ішінен 7 штамм жоғары, 5 штамм орташа, 3 штамм әлсіз адгезивтілікті, ал 1 штамм белсенділігі жоқ екенін көрсетті. Барлық штаммдардың адгезияға көрсеткіштерінің мәндері 1 кестеде келтірілген.

Қорытынды

Зерттеу барысында алынған нәтижелерге сүйене отырып, сүтқышқылды өнімдерден бөлініп алынған штаммдардың адгезиясының өзгеруі бактериялардың өсу ортасына байланысты екендігі байқалады. Яғни, рН қышқылдық ортасының өзгеруі, температура және де т.б. байланысты. Және де бұл адамның микробты экологиясын зерттеу саласында зерттелген мәліметтермен, әдебиеттермен расталады. Адгезивтілік белсенділікті анықтау пробиотикалық штаммдардың әсерін бақылауда өте маңызды көрсеткіш болып табылады.

Зерттелген штаммдардың нәтижесінде алынған белсенді штаммдардан пробиотикалық консорциум (*Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4) жиынтығы құрылды.

Зерттеу барысында алынған нәтижелерге сүйенсек, асқазан-ішек жолдары микрофлорасын және алкогольді сусынмен зақымдалған ішкі ағза қуыс мүшелерін қалыпқа келтіруде тағамға белсенді қоспа ретінде қолдануға болатын бірегей консорциумды әзірлеу үшін мүмкіндік береді.

Әдебиеттер:

1 Lilly D.M., Stillwell R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 1965 Feb 12;147(3659):747-8 (doi: 10.1126/science.147.3659.747)

2 Латиф А.С., Сапарбекова А.А., Ахмедова З.Р., Калдыбекова Г.А., Кантуреева Г.О. *Saccharomyces cerevisiae* аборигенді штамдардың әртүрлі мәндеріне төзімділігіне және еріткіштерге деген микробты адгезиясын зерттеу. Микробиология және вирусология, №2 (41) 2023 (doi: 10.53729/MV-AS.2023. 02.14)

3 Mercenier A., Pavan S., Pot B. Probiotics as biotherapeutic agent: present knowledge and future prospects. Curr Pharm Des. 2013;9(2):175-91 (doi: 10.2174/1381612033392224)

4 Каночкина М.С., Фоменко И.А., Чернуха И.М., Машенцева Н.Г. Методы селекции пробиотических микроорганизмов с высокими адгезивными свойствами. Клиническое питание метаболизм 2023. Том 4, (1): 19-28 (doi.org/10.17816/clinutr321901)

5 Julio Plaza-Diaz, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Mercedes Gil-Campos, and Angel Gil Mechanisms of Action of Probiotics/ 2019 Jan; 10(Suppl 1): S49–S66 (doi: 10.1093/advances/nmy063)

6 Larsen N, Vogensen FK, Gøbel RJ, Michaelsen KF, Forssten SD, Lahtinen SJ, Jakobsen M. Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. Clin Nutr 2013 Dec;32(6):935-40 (doi: 10.1016/j.clnu.2013.02.007)

7 De la Fuente-Nunez, Meneguetti BT, Franco OL, Lu TK. Neuromicrobiology: how microbes influence the brain. ACS Chem Neurosci 2018 Feb 21;9(2):141-150 (doi: 10.1021/acschemneuro.7b00373)

8 Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Park YH. Probiotics and atopic dermatitis: an overview. Front Microbiol 2016 Apr 12;7:507 (doi: 10.3389/fmicb.2016.00507)

9 Саубенова М.Г., Олейникова Е.А., Чижаева А.В., Алыбаева А.Ж., Айтжанова А.А., Амангелді А.А., Потороко И.Ю. Микробиота человека и болезни цивилизации: в поисках выхода. Микробиология және вирусология №3 (38) 2022 (doi:10.53729/MV-AS.2022.03.01)

10 Keita Nishiyama., Makoto Sugiyama., Takao Mukai. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. Microorganisms 2016, 4, 34; (doi:10.3390/microorganisms4030034)

11 Du, Y., Li, H., Shao, J., Wu, T., Xu, W.L., Hu, X., Chen, J. Adhesion and colonization of the probiotic *Lactobacillus plantarum* HC-2 in the intestine of *Litopenaeus vannamei* are associated with bacterial surface proteins. Front. Microbiol. 2022 Apr 13;13:878874 (doi:10.3389/fmicb.2022.878874)

12 Alpe, D., Kuleasan, H. Determination of competition and adhesion abilities of lactic acid bacteria against gut pathogens in a whole-tissue model. Biosci. Microbiota. Food Health 2020, 39 (4), 250–25 (doi: 10.12938/bmfh.2020-033)

13 Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. PLoS ONE 2012, 7, e33188 (doi.org/10.1371/journal.pone.0033188)

14 Wang R., Jiang L., Zhang M., Zhao L., Hao Y.L., Guo H.Y., Sang Y., Zhang H. and Ren F.Z. The adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a human intestinal epithelial cell line requires s-layer proteins. Sci. Rep., 2017, 7, 44029 (doi: 10.1038/srep44029)

15 Sun Z.L., Huang L.H., Kong J., Hu S.M., Zhang X.W. and Kong W.T. In vitro evaluation of *Lactobacillus crispatus* K313 and K243: high-adhesion activity and anti-inflammatory effect on *Salmonella* braenderup infected intestinal epithelial cell. Vet. Microbiol., 2012 Sep 14;159(1-2):212-20 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.043)

16 Масирбаева А.Д., Сайфудин, Б.К. Амирашева А.Ш., Жантлесова С.Д., Ерденбекова М.Б., Талапбек Ш., Байсариева А.М. Клиническое применение пробиотиков и пребиотиков. Микробиология және вирусология №1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.04)

17 Абиатаева Г.К., Сармурзина З.С., Бисенова Г.Н., Мусабаева Б.К., Тултабаева Т.Ч. Профилактикалық мақсаттағы сусындарды әзірлеуге арналған пробиотикалық штаммдардың сипаттамасы. Микробиология және вирусология №4 (39) 2022 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)

Ж.А. ОРЫНБАЕВА^{1*}, З.Б. ТУНГУШБАЕВА¹, Н.Б. МОЛДАГУЛОВА²,
Д.К. КУЛЖАНОВА¹, Н.В. РУДАКОВ³

¹Казахский национальный педагогический университет им.Абая, Алматы, Казахстан

²Экостандарт.kz, Астана, Казахстан

³Омский НИИ природно-очаговых инфекций, Омск, Россия

*e-mail: jadi_astana@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МЕТОДОМ АДГЕЗИИ

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14

Аннотация

Целью исследования является выделение перспективных пробиотических штаммов из кисломолочных продуктов домашнего приготовления: кобыльего молока, кумыса, шубата, катыка, кефира.

Адгезивные свойства пробиотических микроорганизмов были проверены на способность слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта конкурировать с патогенными и гнилыми бактериями за рецепторы, связывающие эпителиальные клетки. Из 16 активных молочнокислых бактерий отобраны 12 штаммов с высокими и средними показателями. В ходе идентификации с помощью системы BIOTYPER Bruker MALDI-TOF были идентифицированы 7 видов, которые относятся к роду *Lactobacillus*: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* и *L. acidophilus*. 7 выявленных штаммов показали высокую степень адгезивной активности.

Из активных штаммов, полученных в результате исследования, был создан пробиотический консорциум *Lactobacillus paracasei* s-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2,

Lactobacillus fermentum d-4. Пробиотический консорциум был выбран для создания пробиотического продукта для коррекции полых органов внутреннего организма, поврежденных алкогольным напитком.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, лактобактерии, пробиотики, адгезивная активность, штаммы.

IRSTI: 34.27.19

Zh.A. ORYNBAYEVA^{1*}, Z.B. TUNGUSHBAEVA¹, N.B. MOLDAGULOVA²,
D.K. KULZHANOVA¹, N.V. RUDAKOV³

¹Kazakh National Pedagogical University named after Abai, Almaty, Kazakhstan

²Ecostandart.kz, Astana, Kazakhstan

³Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia

*To contact the author:jadi_astana@mail.ru

OBTAINING PROMISING PROBIOTIC STRAINS BY THE ADHESION METHOD

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14

Abstract

The aim of the study is to isolate promising probiotic strains from fermented dairy products of home-made: mare's milk, koumiss, shubat, katyk, kefir.

The adhesive properties of probiotic microorganisms were tested for the ability of the gastrointestinal mucosa to compete with pathogenic and rotten bacteria for receptors binding epithelial cells. 12 strains with high and average indicators were selected from 16 active lactic acid bacteria. During identification using the BIOTYPER Bruker MALDI-TOF system, 7 species that belong to the *Lactobacillus* family were identified: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*. 7 identified strains showed a high degree of adhesive activity.

The probiotic consortium *Lactobacillus paracasei s-612*, *Lactobacillus plantarum S-106*, *Lactobacillus plantarum S-414*, *Lactobacillus rhamnosus S-811*, *Lactobacillus acidophilus S-1*, *Lactobacillus brevis S-2*, *Lactobacillus fermentum d-4* was created from the active strains obtained as a result of the study. The probiotic Consortium was selected for creation of a probiotic product for the correction of hollow organs of the internal body damaged by an alcoholic beverage.

Keywords: lactic acid bacteria, lactobacilli, probiotics, adhesive activity, strains.

The main goal of the research work is to obtain promising strains of probiotics that have a positive effect on the internal organs of the cavity affected by alcoholic beverages, which will be used in the future in the production of probiotic products.

The current modern concept of probiotics began to develop rapidly in the last decade[1].

Currently, the people of Kazakhstan, like the rest of the world, are interested in proper nutrition and the use of healthy products, including the consumption of products containing probiotics. In this regard, research aimed at finding new probiotic microorganisms is becoming relevant. For the preparation of fermented functional foods, pure, viable strains of microorganisms identified and described as probiotic strains are used [2].

Today, we attribute live microorganisms to probiotics. That is, as representatives of the main human microflora, when entering the gastrointestinal tract in sufficient quantities, it retains activity, vitality and has a positive effect on health. Various types of bifidobacteria are used as probiotics (*Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*), lactobacilli (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. gasseri*) and other microorganisms (*Lactococcus cremoris*, *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*). Due to the genetic diversity, they differ significantly from each other in properties. This research work is devoted to the development of probiotics in the field of medicine, production, the creation of new promising biological drugs to solve pressing

problems in agriculture [3]. But according to the tasks set by our research work, it is the study of bacteria of the *Lactobacillus* family.

Probiotic bacteria play a protective role against enteropathogens by reducing various mechanisms, including antimicrobial bonds, adhesion of pathogenic bacteria [4].

The mechanisms of action of probiotics include the elimination of competition from pathogenic microorganisms, inhibition of growth, and immune modulation. Since they are bacteria that can attach to the intestinal epithelium, their colonies are quite active in the gastrointestinal tract and thus indicate that they have clear advantages between symbionts. Many bacteria that enter the digestive system destroy their life in the environment of gastric juice and bile, and probiotics show clear features as microorganisms resistant to these factors. Penetrating into the epithelium of the mucous membrane, they are considered capable of inhibiting the growth of pathogenic microorganisms as a result of a process called competitive specificity. Historically, this mechanism is considered as the main mechanism by which probiotics exhibit therapeutic effects [5-7]. Microorganisms that are considered the basis for probiotics must meet the following requirements: 1) non-pathogenic and toxic; 2) resistant to acids and bile acids in the gastrointestinal tract; 3) attachment to epithelial cells of the Intestine; 4) fast reproduction by colonization of the intestinal tract; 5) intestinal metabolization; 6) stabilization of intestinal normoflora; 7) preservation of viability in the process of obtaining lyophilized drugs [8].

In recent years, many studies have been conducted in order to obtain scientific evidence of the beneficial effect of fermented products containing probiotic bacteria [9]. The adhesion of lactobacilli to the surface of the gastrointestinal mucosa is considered one of the initial stages of successful colonization [10]. The method of studying adhesive capacity in the laboratory plays a key role in the Prevention of invasion and also determines the colonization of intestinal pathogens and the competitiveness of bacteria [11]. The adhesive activity method is the interaction between the surface components of the bacterial cell wall and the complementary structure of the cell surface [12]. The method for determining laboratory adhesive activity is the production of enzymes of exopolysaccharides, lipids, carbohydrates, membrane-bound receptors and nucleic acids associated with the potential mechanism [13]. As laboratory strains have a high ability to attach to the epithelium of cells in the intestinal cavity, which has a positive effect on human health, their ability to protect against pathogenic microorganisms is also increased [14-15]. The adhesive activity method is a complex multicomponent process that ensures that microorganisms colonize any dense substrates, including human and animal tissues. To date, it is proposed to study the cells of the host of an organism using in vitro and in vivo methods to study adhesive activity. However, in vivo methods have proven to be very time-consuming, as well as expensive and unsuitable, to study a large number of strains using laboratory animals. In this regard, in the process of using the in vitro method in determining the adhesive activity of bacteria, red blood cells are often used as cells. And one of the most important functions of normal microflora is resistance to colonization and adhesion, which determines its protective properties [16]

It should be noted that the stability and protective properties of the microflora of the microorganism largely depend on the adhesive property. Thanks to the adhesion, the resident microflora implements the property of resistance to colonization. That is, it prevents the settlement of biotopes by foreign microorganisms and creates a protective barrier against infectious agents. In other words, the molecular mechanisms of adhesion are universal for both pathogenic forms and representatives of normoflora.

Materials and methods of research

Separation of pure cultures

For research work, 16 lactic acid cultures were isolated from domestic dairy products in Almaty and Astana, namely mare's milk, kumys, katyk, shubat.

For the cultivation of lactic acid bacteria, a special MRS nutrient medium from HiMedia was used. That is, the extracted cultures were incubated for 48 hours on a thermostat at a temperature of 37°C (redLINE RI-53, Germany) in microaerophilic conditions. The method used for the

purpose of this research work is based on the international standard (ISO 8261, milk and dairy products. General guidelines for the preparation of samples, primary suspensions and decimal dilutions for microbiological research).

Total isolated, pure cultures were identified using the Bruker MALDI-TOF biotype system. The preparation of the Maldi-TOF MS samples was as follows: fresh dried an individual single colony with direct transfer to a polished steel target MSP 96 (Bruker Daltonik). Next, 1 ml of saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCA) was covered with matrix solution and dried in 50% acetonitrile -2.5% trifluoroxusic acid (Bruker Daltonik) and at room temperature [17].

For the purpose of the study, a method was carried out to determine the adhesive activity of each isolated microorganism. The method of adhesive activity of microorganisms means that microorganisms have the ability to adsorb on hard surfaces and sensitive cells. The adhesion of general cultures in 0 (1) (Rh+) formalinized human erythrocytes in the in vitro system was studied by the method of V. Brilis. According to a microscopic study, work was carried out to count at least 100 red blood cells in at least 5 visual fields. The adhesion coefficient according to the average adhesion indicator (AOC) is determined. AOC was determined by the average number of microbes attached to the surface of one erythrocyte, and the number of all erythrocytes (at least 50 erythrocytes) in the 5 field of view was counted. AOK of adhesion from 0 to 1.0 is considered zero, and 1.01 -2.0 is considered low, 2.01 - 4.01 is considered medium, and 4.0 is considered high. From the total number of red blood cells considered, the percentage of red blood cells was calculated.

Preparation of a suspension of human erythrocytes.

To use the method for determining adhesive activity, human blood of the (I) Rh+ Group (9 ml) was taken. The resulting blood weighed 18.9609 G, and the distilled water weighed 18.9609 G, and the two test tubes were placed opposite each other in a centrifuge, weighing the same weight. For pure red blood cells only, 0.9% Sodium Chloride ((NaCl) mass fraction ω (NaCl) \approx 0.9%) was washed three times with ten times the volume of the solution and re-suspended in the same solution by centrifugation method for 10 minutes at 1500 revolutions (Centrifuge CM-6m). Yellow water was released over the blood sample and red blood cells were collected in the underside. Thus, a blood sample of the (I) Rh+ group was cleaned and a pure erythrocyte was obtained.

According to the adhesive activity method, 0.5% erythrocyte was prepared. To do this, 50 ml of sterilized sodium chloride solution was taken, 0.250 ml of sodium chloride solution was removed from it and mixed with 250 ml of erythrocyte. Work was carried out on the introduction of strains with a prepared 0.5% erythrocyte solution.

Further, a 204-0096d Series U-shaped plate with a cap for immunological reactions was used for the reaction. A whole prepared suspension was inserted into the holes of the plashka. Fill the plate with 0.250 microns of sodium chloride solution and mark the names of the strains that are introduced into each hole. From the plashka by titration 1:4, 1:6, 1:8, 1:16 0.25 μ L was removed. Further, 0.5% erythrocytes of 0.25 μ L were injected into all the pores of the plashka. The prepared sheet with strains mixed with erythrocyte Solutions was placed in the thermostat at a temperature of 37 ° C for 3 hours, and then in the refrigerator at a normal temperature of 4 ° C for 24 hours.

Results and discussion

After a day, the results of 0.5% erythrocyte solution interaction of strains in the plashka were obtained. In the course of the study, the determination of adhesive activity caused difficulties in working with strains. Because according to the results obtained, erythrocyte sedimentation on titration with 0.5% erythrocyte solution was leaked in some strains. Some strains (I) have shown that Rh+ sticks to the erythrocyte when mixed with Group blood. In addition, the study was subjected to microscopic analysis using the Pgemiege5 microscope. In microscopic analysis, the vision of red blood cells was realized through a slide glass. That is, this glass is a glass of standard size 76 x 26 with a flattened edge of a certain thickness. Usually the glass surface is smooth and

has a uniform thickness of 1 mm. Prevents the presence of bubbles between the glass and the sample under study.

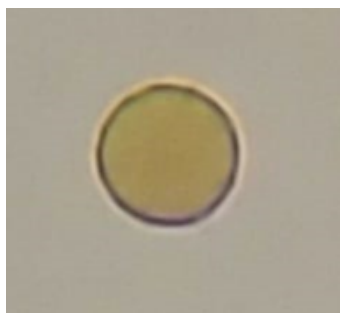


Figure 1 - unpainted erythrocyte

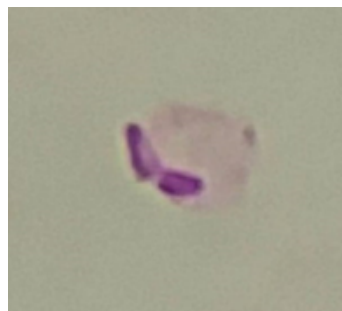


Figure 2 – Erythrocyte attached to lactic acid bacteria (S-106 strain)

Figure 1 shows pure unpainted red blood cells isolated from the blood of the unpainted (I) RH+ group. Unpainted red blood cells were made by dripping with a pipette into a laboratory glass and observed under microscopy. And Figure 2 shows an image of lactic acid bacteria attached to the erythrocyte (strain S-106).

That is, the S-106 strain was detected under a microscope by staining with Fuchsin (C₂₀H₁₉N₃•HCL) when exposed to 0.5% erythrocyte solution. By examining 16 lactic acid bacteria taken for the study, strains with high, medium, low stickiness effects were identified in Table 1 in a different indicator. In order to accurately determine the results of the study, all strains taken for the study were tested for adhesive activity in three rounds.

Table 1-indicators of adhesion of strains

№	Name of strains	Average adhesion index (AAI)	Results
1	<i>Lactobacillusparacasei</i> S- 612	4,0 ± 1,6	high
2	<i>Lactobacillusplantarum</i> S- 106	4,0 ± 1,0	high
3	<i>Lactobacillus brevis</i> S- 149	2,1 ± 0,5	moderate
4	<i>Lactobacillusplantarum</i> S-74	0,6± 0,1	no activity
5	<i>Lactobacillusplantarum</i> S- 414	4,0 ± 1,8	high
6	<i>Lactobacillussakei</i> S-21	2,8 ± 1,5	moderate
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	4,1 ± 1,6	high
8	<i>Lactobacilluslactis</i> S- 819	1,0 ± 1,0	weak
9	<i>Lactobacillusfermentum</i> III-5	3,0 ± 1,0	moderate
10	<i>Lactobacilluspentosus</i> S-805	1,3 ± 0,2	weak
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-1	4,5 ± 1,4	high
12	<i>Lactobacillusbrevis</i> S -2	4,2 ± 1,7	high
13	<i>Lactobacillus pentosus</i> S - 4	1,5 ± 0,25	weak
14	<i>Lactobacilluslactis</i> d-2	2,5 ± 1,0	moderate
15	<i>Lactobacilluscaseid</i> -3	2,0± 1,08	moderate
16	<i>Lactobacillusfermentum</i> d-4	4,0 ± 1,4	high

Note: AAI: 0-1.0 –no activity; 1.0-2.0-weak; 2.01 - 4.01-moderate; ≥ 4.0 - high.

The study of the adhesion of strains was carried out in vitro using erythrocytes of Group 0 (1) (Rh+) of a person according to the methodology of V. Brilis. As a result, all strains showed different adhesion properties. But, out of 16 lactic acid bacteria taken in the Study, 7 strains showed high, 5 strains showed moderate, 3 strains showed weak adhesion, and 1 strain showed no activity. The values of the adhesion indicators of all strains are presented in Table 1.

Conclusion

Based on the results obtained during the study, it is observed that the change in adhesion of strains isolated from lactic acid products depends on the growth environment of bacteria. That is, the pH depends on the change in the acidic environment, temperature, etc. And this is confirmed by the data and literature studied in the field of studying the microbial ecology of humans. Determination of adhesion activity is a very important indicator in the control of exposure to probiotic strains.

From the active strains obtained as a result of the studied strains, A Probiotic consortium (*Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4) was formed.

Based on the results obtained during the study, it is possible to develop a unique consortium that can be used as an active additive to food in the normalization of the microflora of the gastrointestinal tract and the internal organs of the cavity damaged by an alcoholic drink.

References:

- 1 Lilly D.M., Stillshhell R.H. Probiotics: Groshhth promoting factors produced by microorganisms. Science. 1965 Feb 12;147(3659):747-8(doi: 10.1126/science.147.3659.747)
- 2 Latif A.S., Saparbekova A.A., Ahmedova Z.R., Kaldybekova G., Kantureeva G.O. Saccharomyces cerevisiae aborigendi shtamdaydyң әrtырli мәnderine төзимdiligine zhәne eritkishterge degen mikroby adgeziyasyn zertteu. Mikrobiologija zhәne virusologija, №2 (41) 2023 (doi: 10.53729/MV-AS.2023. 02.14)
- 3 Mercenier A., Pavan S., Pot B. Probiotics as biotherapeutic agent: present khushhledge and future prospects. CurrPharmDes. 2013; 9(2):175-91(doi: 10.2174/1381612033392224)
- 4 Kanochkina M.S., Fomenko I.A., Chernuha I.M., Mashenceva N.G. Metody selekcii probioticheskikh mikroorganizmov s vysokimi adgezivnymi svojstvami. Klinicheskoe pitanie i metabolizm 2023. Tom 4, (1): 19-28 (doi.org/10.17816/clinutr321901)
- 5 Julio Plaza-Diaz, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Mercedes Gil-Campos, and Angel Gil Mechanisms of Action of Probiotics/ 2019 Jan; 10(Suppl 1): S49–S66 (doi: 10.1093/advances/nmy063)
- 6 Larsen N, Vogensen FK, Gøbel RJ, Michaelsen KF, Forssten SD, Lahtinen SJ, Jakobsen M. Effect of Lactobacillus salivarius Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. Clin Nutr 2013 Dec;32(6):935-40 (doi: 10.1016/j.clnu.2013.02.007)
- 7 De la Fuente-Nunez, Meneguetti BT, Franco OL, Lu TK. Neuromicrobiology: hosh microbes influence the brain. ACS Chem Neurosci 2018 Feb 21;9(2):141-150 (doi: 10.1021/acchemneuro.7b00373)
- 8 Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek ShhK, Park YH. Probiotics and atopic dermatitis: an overvieshh. Front Microbiol 2016 Apr 12;7:507 (doi: 10.3389/fmicb.2016.00507)
- 9 Saubenova M.G., Olejnikova E.A., Chizhaeva A.V., Alybaeva A.Zh., Ajtzhanova A.A., Amangeldi A.A., Potoroko I.Ju. Mikrobiota cheloveka i bolezni civilizacii: vpoiskah vyhoda. Mikrobiologija zhәne virusologija №3 (38) 2022 (doi:10.53729/MV-AS.2022.03.01)
- 10 Keita Nishijama., Makoto Sugijama., Takao Mukai. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. Microorganisms 2016, 4, 34; (doi:10.3390/microorganisms4030034)
- 11 Du, Y., Li, H., Shao, J., Shhu, T., Hu, Shh.L., Hu, H., Chen, J. Adhesion and colonization of the probiotic Lactobacillus plantarum HC-2in the intestine of Litopenaeus vannamei are associated shhith bacterial surface proteins. Front. Microbiol.2022 Apr 13;13:878874(doi:10.3389/fmicb.2022.878874)
- 12 Alpe, D., Kuleasan, H. Determination of competition and adhesion abilities of lactic acid bacteria against gut pathogens in ashhole-tissue model. Biosci.Microbiota. Food Health 2020, 39 (4), 250–25 (doi: 10.12938/bmfh.2020-033)
- 13 Vásjauetz, A., Forsgren, E., Fries, I., Pahton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C. Symbionts as major modulators of insecthealth: Lactic acid bacteria and honeybees. PLoS ONE 2012,7, e33188 (doi.org/10.1371/journal.pone.0033188)
- 14 Shhang R., Jiang. L., Zhang M., Zhao L., Hao Y.L., Guo H.Y., Sang Y., Zhang H. and Ren F.Z. The adhesion of Lactobacillus salivarius REN to a human intestinal epithelial cell line rejauires s-layerproteins, Sci. Rep., 2017,7, 44029 (doi: 10.1038/srep44029)
- 15 Sun Z.L., Huang L.H., Kong J., Hu S.M., Zhang H.Shh. and Kong Shh.T. In vitro evaluation of Lactobacillus crispatus K313 and K243: high-adhesion activity and anti-inflammatory effect on Salmonella

braenderup infected intestinal epithelial cell, *Vet. Microbiol.*, 2012 Sep 14;159(1-2):212-20 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.043)

16 Masirbaeva A.D., Sajfudin, B.K. Amirasheva A.Sh., Zhantlesova S.D., Erdenbekova M.B., Talapbek Sh., Bajsarieva A.M. Klinicheskoe primenenie probiotikov i prebiotikov. *Mikrobiologija zhəne virusologija* №1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.04)

17 Abitaeva G.K., Sarmurzina Z.S., Bisenova G.N., Musabaeva B.K., Tultabaeva T.Ch. Profilaktikalық мақсаттағы susyndardy əzirleuge arналған probiotikalық shtammdardың sipattamasy. *Mikrobiologija zhəne virusologija* №4 (39) 2022 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)

FTAMP: 68.37.29

Ұ.А. АБЫЛАЕВА, А.А. САРДАР, А.К. ТУРСУНОВА, Ш.М. ТУРБЕКОВА,
Г.Д. АБИШЕВА

Ж. Жиёмбаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми-зерттеу институты,
Алматы, Қазақстан
e-mail: ablay.ula@mail.ru

АЛМАТЫ ОБЛЫСЫ ЖАҒДАЙЫНДА *SOLANUM LYCOPERSICUM* (ҚЫЗАНАҚ) ОҚШАУЛАНҒАН ПАТОГЕНДІ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРДЫ ИЗОЛЯЦИЯЛАУ ЖӘНЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.15

Түйін

Solanum lycopersicum (қызанақ) - бүкіл әлемде тұтынылатын ең маңызды көкөніс дақылы. Оның өндірісін шектейтін негізгі факторлардың бірі саңырауқұлақ аурулары. Қоршаған ортаның белгілі бір абиотикалық және биотикалық факторларының, атап айтқанда зиянды микроорганизмдердің негізінде пайда болатын аурулар кешенінің дамуы жеміс өнімділігінің төмендеуіне әкеледі және қызанақтың жоғары және тұрақты өнімділігін алуға теріс әсер етеді. Қорғаныс шараларының негізі - ол көбінесе ауру қоздырғыштарының түрлік құрамы мен биологиялық ерекшеліктерін білуге негізделеді. Осыған сүйене отырып, қызанақты фитопатогендерден қорғау шараларын ұйымдастырып, аурудың дамуын шектеуге ықпал ететін ғылыми негізделген әдістерді қамтуы керек.

Зерттеу жұмысының өзектілігі – Алматы облысы Қарасай ауданы жағдайында қызанақ дақылының «Ламадор» сортында кездесетін *Fusarium*, *Alternaria* және *Aspergillus* туыстығына жататын саңырауқұлақтар класикалық және молекулалық-генетикалық әдістер арқылы түрлік құрамға дейін анықталды.

Мақалада *S. lycopersicum* дақылының саңырауқұлақ ауру қоздырғыштары баяндалған. Дақылдың негізгі аурулары: көшеттердің залалдануы, фузариоздық солу, қоңыр дақ, сақтау кезіндегі жемістердің шіруі. Ауру белгілері бар қызанақ үлгілерінен бөлініп алынған патогендерге морфологиялық-культуралдық қасиеттері бойынша фитопатологиялық және молекулалық-генетикалық зерттеулер жүргізіліп, түрге дейін идентификация жасалынды. Дәстүрлі микологиялық әдістерді бірлесіп қолдану нәтижесінде қызанақ дақылынан алынған 4 изоляттың ішінде *Fusarium* туыстығының 2 түрі: *Fusarium equiseti* және *Fusarium oxysporum* изоляттары, *Alternaria* туыстығынан: *Alternaria alternata*, *Aspergillus* туыстығынан: *Aspergillus flavus* анықталды.

Кілтті сөздер: ITS-аймақ, қызанақ, патоген, идентификация, праймер.

Қызанақ – әлемде ең көп тұтынатын көкөністердің бірі. Қызанақ өндіру қарқыны артуымен қатар өсірудің түрлі әдістері пайда болып, қазіргі уақытта әртүрлі экологиялық жағдайларда және үнемі жаңарып тұратын сорттар өсірілуде. Кең ауқымды эртартапандыру, өсімдік шаруашылығының күшеюі және әлемдік сауда жүйесі әсіресе жаңа аурулар пайда болған жерлерде фитосанитарлық жағдайды жақсартуға септігін тигізіп жатыр [1]. Қазіргі уақытта ауылшарушылығы дақылдарына 8,5 мыңға жуық ауру қоздырғыштары зиян келтіреді. Зиянды ағзалардың әсерінен жалпы өнім тапшылығы жыл сайын вегетациялық кезеңде орта есеппен 30-35% және дайын өнімді тасымалдау және сақтау кезеңінде 15-25% құрайды [2]. Қызанақ, бактериялар мен саңырауқұлақтардың дамуы үшін жақсы орта болып табылады, залалданған өнім ішінара немесе толық жарамсыз болады [3].

Біздің елімізде де ең көп таралған көкөніс дақылдарының бірі – қызанақ. Бұл оның жоғары өнімділігіне, пайдаланудың әртүрлілігіне, жоғары биологиялық құндылығына және өнімнің жоғары дәміне байланысты [4]. Елімізде қызанақ дақылы ашық және қорғалған танапта кеңінен өсіріледі. Соңғы жылдары қызанақ өнімділігінің төмендеуіне және жеміс сапасының нашарлауына саңырауқұлақ, вирустық және бактериялық ауру

қоздырғыштарының түрлерімен залалдануы әсер етті. Сонымен қатар климаттық жағдайлардың өзгеруі және түрлі зиянкестердің теріс әсері ықпал етіп отыр [5].

Қазіргі уақытта елімізде қызанақ өсірумен негізінен фермерлер мен жалға алушылар айналысады. Олардың көпшілігі фитосанитарлық нормалар мен талаптарды орындамайды, атап айтқанда, ауыспалы егісті сақтамайды, себу алдында тұқымдарды зарарсыздандырмайды. Мұның бәрі түрлі инфекциялардың жиналуына және аурулар, зиянкестер мен арамшөптердің кең таралуына ықпал етеді. Әсіресе, саңырауқұлақ аурулары айтарлықтай зиянды. Олардың ішінде ең көп таралған және зиянды түрлеріне фитофтороз, альтернариоз, фузариум және ботритиоз қоздырғыштары жатады. Бұл аурулар қызанақ жемістерінің сапасына айтарлықтай әсер етеді, оңай еритін көмірсулар, минералдар мөлшері азаяды, сонымен қатар адам денсаулығына зиянды органикалық қосылыстар жинақталады. Аталған ауру түрлерімен залалданған алқапта 50-60% өнімді жоғалтады [6]. Барлық патогенді аурулардың өзіндік ерекшеліктері бар. Ашық танап жағдайында бір агроэкологиялық аймақтағы патогендердің кешенді құрамы және зияндылық деңгейі әртүрлі болады. Осы жағдайда, қорғаныс шараларын жүргізу барысында қоздырғыштардың түрлік құрамы мен биологиялық ерекшеліктерін, олардың дамуына әсер ететін қоршаған орта факторларын білу маңызды. Сондықтан, қорғаныс шараларын уақытылы және тиімді жүргізу және халықаралық стандарттардың талаптарына сәйкес сапалы жоғары өнім алу үшін, аурулардың диагностикалық белгілерін, олардың қоздырғыштарының биоэкологиялық ерекшеліктерін жақсы меңгеру керек. Зерттеу жұмысының мақсаты Алматы облысы, Қарасай ауданында өсірілген қызанақ ауруларының қоздырғыштарының түрлік құрамын, олардың морфологиялық-культуралдық және молекулалық-генетикалық сипаттамаларын анықтау болды.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу жұмыстары зертханада және танаптық жағдайда жүргізілді. Танаптық кіші мөлдекті тәжірибе жұмыстары: ашық танапта көшетті көшіріп отырғызу, өсімдіктің өсуін бақылау, өнімді жинау – көкөніс шаруашылығы және бақша шаруашылығы туралы тәжірибелік іс әдістемесі (1992) және көкөніс дақылдарын мемлекеттік сорттық сынау әдістемесі (1985) бойынша жүргізілді.

Қызанақтың ауруларына есеп – оның тамырларын визуалды қарау және өнімдерін жинау барысында жүргізілді. Дақылдың саңырауқұлақ ауруларының түрлік құрамын зерттеу үшін бүкіл вегетациялық кезеңде залалдану белгілері бар үлгілер жиналды (жапырақтары, жемістері, жеміс түйіні, тамыры).

Зерттеу жұмыстары қызанақтың «Ламадор» сортына жүргізілді. Жұмыс барысында ауру қоздырғыштары және олардың түрлік құрамы анықталды. Аталмыш өсімдіктегі кездесетін фитопатогенді саңырауқұлақтардың түрлік құрамын анықтау үшін, стандартты әдістер қолданылды. Зертханалық жағдайда зақымдалған өсімдік үлгілеріне микробиологиялық талдау жүргізілді [7]. Қызанақтың сау және ауру тіндерінің (жапырақтары, сабақтары, жемістері) шекарасында ауру қоздырғыштарымен залалданған мүшелерінен ұсақ фрагменттері ағынды суда, содан кейін тазартылған суда мұқият жуылып, спиртте зарарсыздандырылды (бактериялардан зардап шеккен мүшелерден басқа), сүзгі қағазына (стерильді суға малынған) және картоптың декстрозды агарлы ортасына қойылды. Өскен колонияларға М.К. Хохряковтың әдістемесі бойынша 7-тәулікте микроскопиялық препарат жасалынды. Қызанақтың саңырауқұлақ ауруларының қоздырғыштарын өсіру үшін ең қолайлы қоректік орта болып: картопты агар (КА), картопты-декстрозды агар (КДА) және Чапек агары (ЧА) іріктелініп алынды.

Патогендердің конидиальды споралары биологиялық әдіспен (микроскоптың көмегімен) анықталды. Спора болмаған жағдайда зерттеу материалы жасанды қоректік ортаға егілді. Түр құрамын анықтау үшін отандық және шетелдік авторлардың анықтамалық құралдары пайдаланылды.

Молекулалық-генетикалық зерттеу бөлімі келесі кезеңдерден тұрады: жалпы ДНҚ-ны оқшаулау, ПТР бойынша амплификация, ПТР өнімін секвенирлеу, секвенирлеуден алынған нәтижелерді деректер қорындағы мәліметтермен салыстырмалы талдау (сәйкестендіру).

Оқшауланған саңырауқұлақтың таза культураларынан, ДНҚ-ны бөліп алу «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Ресей) реагентімен, өндірушілердің арнайы хаттамасы бойынша орындалды.

Оқшауланып алынған ДНҚ үлгілерін және амплификацияланған ПТР өнімдерін тексеру үшін агарозды геледегі электрофорез әдісі пайдаланылды. Оқшауланған ДНҚ-ны сапалы анықтау үшін үлгілер электрофорез үшін көлденең камерада этидий бромиді қосылған 1% агарозды геледе бөлінді. Эталон ретінде Generuler (Thermo Scientific, US) маркері қолданылды. Электрофорез нәтижелері геледі құжаттау жүйесі трансиллюминатор Quantum-ST 5 (Vilbert Lourmat) арқылы талданды.

ПТР талдау ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G '3) және кері ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC '3) праймерлері арқылы жүзеге асырылды [8]. ПТР реакциясына қажетті реагенттер қоспасында (25 мкл) 4 мкл HF буфері (Thermo scientific), 0,5 мкл дезоксирибонуклеозид трифосфаты (dntp) қоспасы, праймерлердің әрқайсысының 0,3 мкл қоспасы, ДНҚ полимераза ферменті Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific) 0,2 мкл және 2 мкл ДНҚ болды нысаны болды. Реакция SimpliAmp Thermo Cycler (Life Technologies Corporation) термоциклерінде келесі режимдері бойынша жүргізілді: бастапқы денатурация - 98°C, температурада 30 сек, 98°C – 10 сек, 60°- 20 сек және 72°C-30 соңғы ұзарту 72°C температурада 5 мин.

ПТР фрагменттерін бөгде қоспалардан тазарту «ExoSap IT™» реактивтерінің жиынтығын қолдану арқылы жүргізілді.

ITS аймақтың нуклеотидтер тізбегінің тікелей реттілігін анықтау Сенгер бойынша (Applied Biosystems, Genetic Analyzer 3500) секвенаторында жүзеге асырылды.

Секвенирлеуден алынған деректерді биоақпараттық талдау және гомологиялық нуклеотидтер тізбегін іздеу GenBank және Bold Systems ашық генетикалық деректер базасында жүргізілді [9-10].

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Аурудың зияндылығын төмендету үшін ауру қоздырғыштарының түрлік құрамын және биологиялық ерекшеліктерін білу қажет. Қызанақ дақылынан оқшауланған саңырауқұлақ қоздырғыштарының түрлік құрамы анықталды. Оларға саңырауқұлақтар түрінен *Alternaria*, *Fusarium*, аскомицет түрінен *Aspergillus* анықталды. Фитопатогендердің морфологиялық белгілерін анықтау картопты-декстрозды қоректік ортада жүргізілді.

Fusarium – колониялар үлпілдек, ақ түсті. Микроскоптық препарат нәтижесінде макро және микроконидиялар анықталды. Микроконидиялар 1-2 жасушалы, дөңгелек, сопақша, кейде сәл қисық. Макроконидиялардың пішіні – орақ, эллипс тәрізді. Шетіндегі жасуша сәл тарылған, доғал тәріздес. Макроконидиялардың әдетте 3-5 жасушалы. Өлшемдері: 20-60x4-7 мкм [11].

Alternaria – егін жинауға дейін және одан кейін ауылшаруашылық өнімдеріне, соның ішінде дәнді дақылдарға, жемістер мен көкөністерге зиян келтіретін саңырауқұлақтардың барлық жерде кездесетін бір түрі. *Alternaria* бірнеше түрі өсімдік патогенезінде маңызды рөл атқаратын фитотоксиндер және адамдар мен жануарларға зиянды болуы мүмкін микотоксиндер болып саналатын қайталама метаболиттерді шығаруға қабілетті [12].

Aspergillus – шамамен 300-ден астам анықталған зең түрлерінен тұратын саңырауқұлақтар тұқымдасы. *Aspergillus* әртүрлі қоршаған орталарда кездеседі, себебі ол ылғалдылығы жоғары ортада жақсы көбейеді. Саңырауқұлақ денесі мицелийден тұрады. Мицелий жұқа, түтікшелі, бозғылт түсті, кең тармақталған, жұқа қабырғалы гифалардан тұрады. Кейбір гифалар субстратта тармақталады, ал кейбіреулері қоректік ортадағы затты сіңіру үшін субстратқа еніп орналасады. Конидиялар ұсақ сфера тәрізді, бір жасушалы, бір

ядролы немесе көп ядролы, қара, қоңыр немесе сары-жасыл түсті болып келеді және ауа ағымдары арқылы таралады. Олар қолайлы субстратта өсіп, ұрық түтігін шығарады. Ұрық түтігі септумға айналады, тармақталып, мицелий түзеді [13].

Fusarium spp.



колонияның қоректік ортада өсуі



микроскоптық құрылымы

Alternaria spp.



колонияның қоректік ортада өсуі

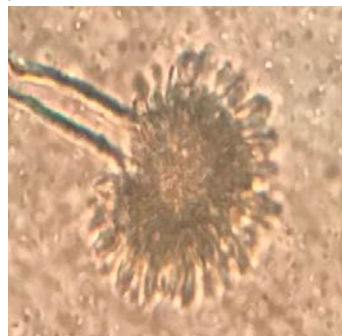


микроскоптық құрылымы

Aspergillus spp.



колонияның қоректік ортада өсуі



микроскоптық құрылымы

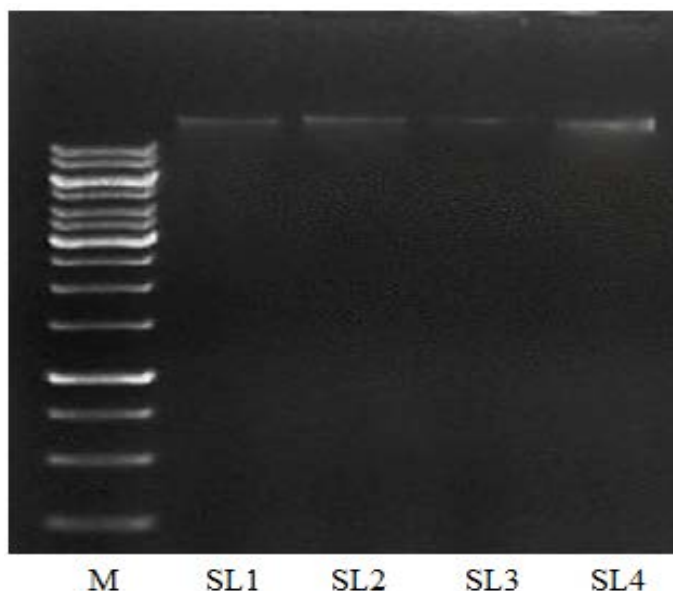
Сурет 1 – Картопты-декстрозды агар қоректік ортасында өсірілген саңырауқұлақтардың морфологиялық-микроскоптық ерекшеліктері

1-суретте көрсетілгендей, анықтамалық нұсқаулықтар бойынша анықтау кейде дәл бола бермейтіні белгілі. Осыған байланысты, бөлініп алынған фитопатогенді саңырауқұлақтарды түрге дейін анықтау үшін молекулалық-генетикалық әдістермен растау жүргізілді. Секвенирлеу әдісі арқылы қызанақ дақылы ауруларының қоздырғыштары *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* штамдарының нуклеотидтік тізбегі анықталды.

Келесі зерттеу жұмысы іріктеліп алынған саңырауқұлақтарды молекулалық-генетикалық идентификациялау бойынша жүргізілді. Кез-келген молекулалық-генетикалық зерттеулердің бастапқы кезеңі ДНҚ-ны бөліп алу болып табылады. Осыған

орай, зерттеу жұмысында мицелийлі саңырауқұлақтардан геномдық ДНҚ-ны оқшаулау бойынша жұмыс жасалынды.

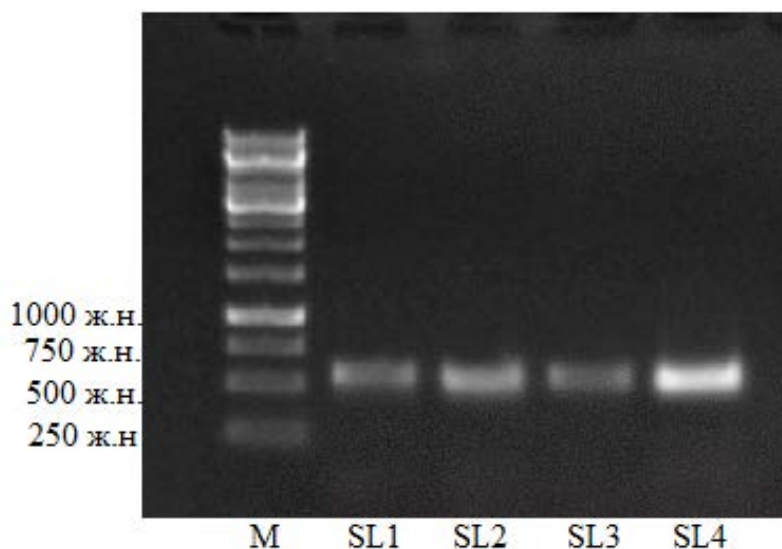
Бірінші кезеңде, ДНҚ бөліп алу үшін, «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Ресей) коммерциялық өндірушілер ұсынған хаттама бойынша жүргізілді. Зерттеулер нәтижесінде бұл хаттама мицелий саңырауқұлақтарынан ДНҚ-ны бөліп алу кезінде тиімді екендігі анықталды. Микромицеттердің ДНҚ оқшаулау нәтижелерін анықтау 1% агарозды геледегі электрофорез әдісі көмегімен жүргізілді. Осы коммерциялық жинақты пайдалану арқылы геномдық ДНҚ бөлініп алынды (Сурет 2).



Сурет 2 - Саңырауқұлақтардың ДНҚ электрофореграммасы

2-суретте көрсетілгендей, геномдық ДНҚ экстракциясының нәтижесі барлық үлгілерде оң болды.

ПТР жүргізу үшін гениң таксономиялық маңызды аймақтары транскрипцияланған ішкі аралық (ITS) факторы ITS 1/ITS4 әмбебап праймерлерінің көмегімен жүзеге асырылды. ПТР өнімдерін тексеру мақсатында 1% агарозды геледегі электрофореграмма жасалынды. Тізбектің күтілетін мөлшері-570 ж.н. (Сурет 3).



Сурет 3 - Изоляттардың ITS1/ITS4 праймерлерімен амплификациясы

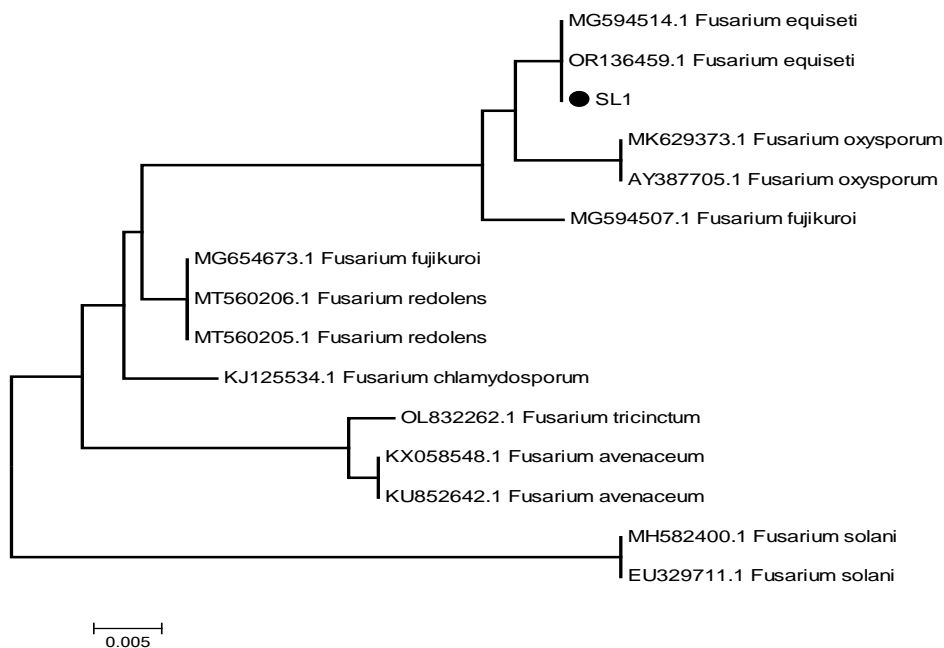
3-суретте көрсетілгендей, ITS1/ITS4 праймерлерімен амплификациялау нәтижесінде шамамен 570 ж.н. тұратын ДНҚ тізбектері алынды, бұл учаскенің өлшеміне сәйкес келеді.

ITS аймағының нуклеотидтер тізбегінің тікелей реттілігі (Applied Biosystems, Genetic Analyzer 3500) генетикалық анализаторында өндіруші компанияның ұсыныстарына сәйкес жүргізілді.

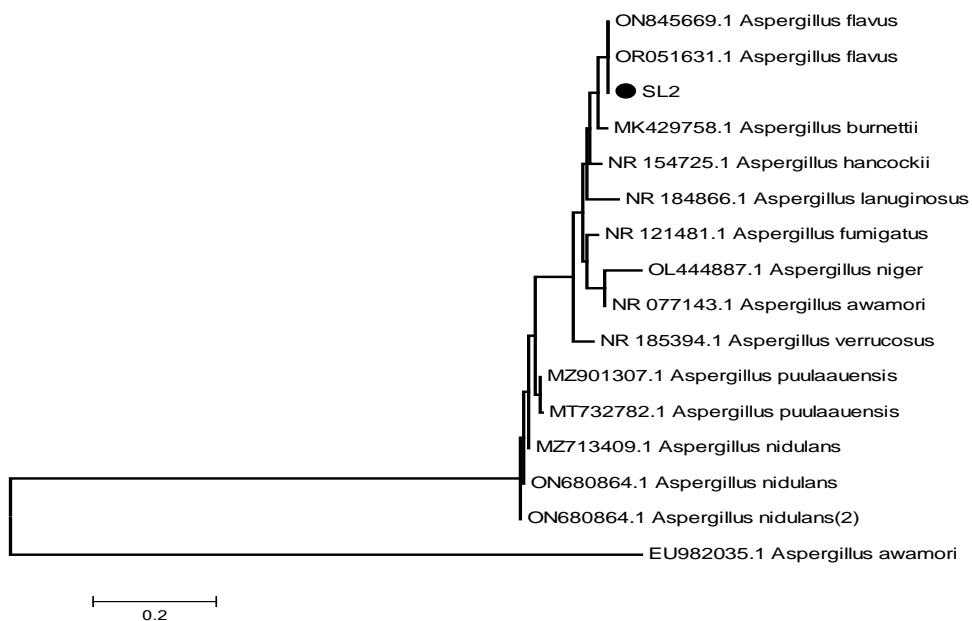
Алынған нуклеотидтер тізбегін GENE BANK дерекқорындағы қол жетімді тізбектермен салыстыру BLASTN бағдарламасы арқылы жүзеге асырылды.

Зерттелетін штамдарда ITS аймағын филогенетикалық талдау нәтижелері генетикалық қашықтықты есептеудің кластерлік әдісін Neighbor-Joining пайдалана отырып, MEGA7 бағдарламасында салынған филогенетикалық ағаштар түрінде ұсынылған.

А



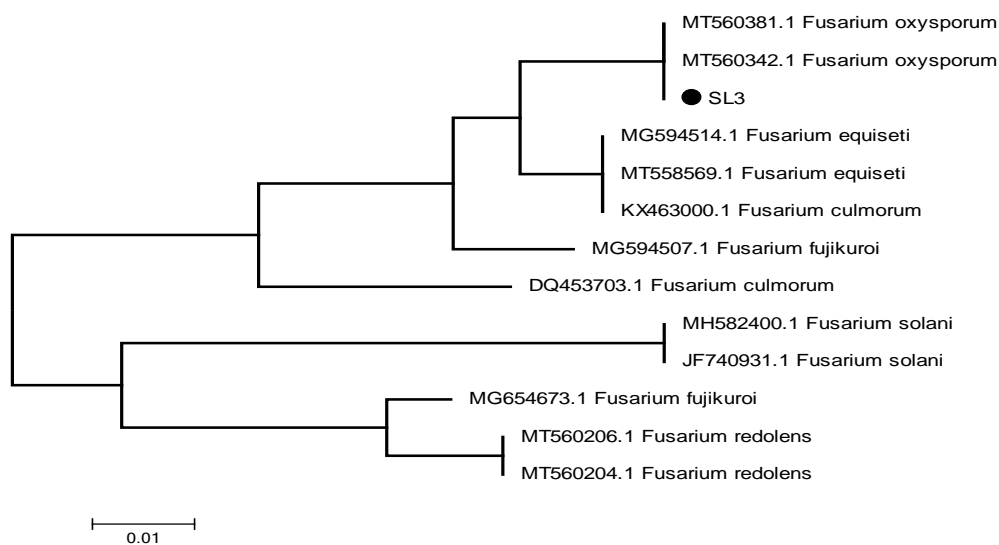
Б



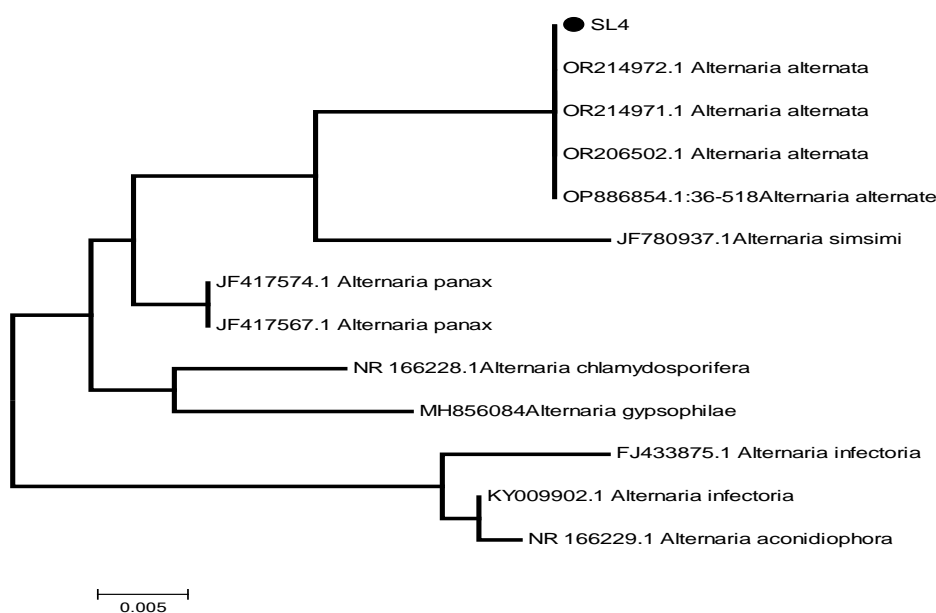
Сурет 4 - SL1 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 9 типтік штамдар тізбектері енгізілген (А). SL2 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 12 типтік штамдар тізбектері енгізілген (Б)

Жоғарыдағы суретте (сурет 4) көрсетілгендей, SL1 штамы *Fusarium equiseti* мен ал SL2 штамы *Aspergillus flavus* шатмдарының нуклеотидтік тізбектерімен бірегей тармақта байланысқанын көреміз.

А



Б



Сурет 5 - SL3 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 6 типтік штамдар тізбектері енгізілген (А). SL4 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 13 типтік штамдар тізбектері енгізілген (Б)

5-суретте SL3 штамына ең жақын *Fusarium oxysporum* екенін, сонымен бірге, SL4 штамының *Alternaria alternata* бір тармақта байланысқанын көруге болады.

Сонымен, филогенетикалық ағаш Neighbor-Joining (NJ) әдісін қолдану арқылы ITS учаскесі негізінде құрастырылды. Молекулалық-генетикалық талдау нәтижесі бойынша

штамдар төмендегідей идентификацияланды: SL1- *Fusarium equiseti*, SL2- *Aspergillus flavus*, SL3- *Fusarium oxysporum*, SL4- *Alternaria alternata*.

Қорытынды

Қызанақ (*Solanum lycopersicum*) – әлемдегі ең көп қолданысқа ие көкөніс болып табылады. Ылғалдылығы Құрамында судың мөлшері 94,5%, яғни жоғары болғандықтан, бұл көкөніс түрі түрлі ауру қоздырғыштарымен залалданады. Көптеген патогенді саңырауқұлақтар, қызанақ жемістерінің өнімділігі мен сапасына теріс әсер ететін болғандықтан, негізгі зерттеу нысаны болып табылады.

Қызанақ дақылдарының патогенді саңырауқұлақтар себебінен пайда болатын ауруларымен күрес шараларын жүргізу үшін, ең алдымен патогенді дұрыс анықтау маңызды. Осыған орай, Алматы облысы, Қарасай ауданында өсірілген «Ламадор» сортына жататын, ауру белгілері бар қызанақ дақылдарына дәстүрлі микологиялық және молекулалық-генетикалық әдістерді ұштастыра отырып зерттеу жүргіздік.

Жүргізілген зерттеулерге сәйкес, ауру белгілері бар дақылдардан саңырауқұлақтардың таза культуралары бөлініп алынып, дәстүрлі микологиялық әдістер арқылы морфологиялық-культуралдық қасиеттері сипатталды. Алайда, кейбір аурулардың сыртқы белгілері ұқсас болғандықтан, патогенді нақты анықтау қиынға соғады. Сол себепті, қазіргі уақытта молекулалық-генетикалық әдістерді пайдалану арқылы ауру қоздырғыштарды түрге дейін идентификациялау тиімді саналады. Зерттеу қорытындысы бойынша, қызанақ дақылдарының изоляттарының ішінен екі *Fusarium* түрі: *Fusarium equiseti* және *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* түрлері идентификацияланды.

Қаржыландыру

Зерттеулер ҚР АШМ 2021-2023 жж. 267 «Ғылымның және ғылыми зерттеулердің қолжетімділігін дамыту» бюджеттік бағдарламасының 101 «Ғылыми зерттеулердің және ісшаралар субъектілерін бағдарламалық нысаналы қаржыландыру» кіші бағдарламасы бойынша «Жеміс, көкөніс, дәнді, малазықтық, бұршақ дақылдары мен өсімдіктер карантинін қорғаудың кешенді жүйелерін әзірлеу және жетілдіру» МҚЖ жұмыс жоспарына сәйкес жүргізілді. Авторлар осы зерттеулерді жүргізуге көмектескені үшін әріптестеріне алғыс білдіреді.

Әдебиеттер:

1 Dominique Blanchard. *Tomato Diseases Identification, Biology and Control*. Second Edition, 2013. 415 P.

(https://books.google.kz/books?id=_Sc6_OjjXUC&printsec=frontcover&hl=ru&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

2 О. А. Паластрова. *Болезни томата и обоснование мер борьбы с ними в условиях Курганской области*: диссертация / - Курган : КГСХА, 2006. - 153 с. (<https://cyberleninka.ru/article/n/bolezni-tomata-i-obosnovanie-mer-borby-s-nimi-v-usloviyah-kurganskoy-oblasti/viewer>)

3 О. А. Паластрова, А. С. Степановских. *Защита томата от болезней в Зауралье* : моногр. / - Куртамыш : Куртамышская типография, 2007. - 136 с. - ISBN 978-5-98271-079-6 : 99.84 p

4 Исмаилова Э. Т. и др. *Морфологические и молекулярно-генетические характеристики возбудителей основных грибных болезней томатов, произрастающих в Алматинской области* // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2017. – С. 75 (chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://elibrary.kaznu.kz/wp-content/uploads/2021/06/vestnik-kaznu.-seriya-biologicheskaya_2017-1-70.pdf)

5 Смоляная Н.М. и др. *Видовой состав основных возбудителей болезней томата*. Сборник материалов Всероссийской (национальной) научно-практической конференции [Электронный ресурс]: материалы Всеросс. (национальной) науч.-практич. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения С. И. Леонтьева 2019 / – 488 с. (<https://agro.omgau.ru/nauka/sborniki-nauchnykh>)

statej/item/138-materialy-vserossijskoj-natsionalnoj-nauchno-prakticheskoy-konferentsii-posvyashchennoj-100-letiyu-so-dnya-rozhdeniya-s-i-leonteva.html)

6 Джаймурзина А.А., Карбозова Р.Д., Есжанов Т.К., Умираниева Ж.З. Система защиты томата от болезней на Юго-Востоке Казахстана // Земледелие, агрохимия, кормопроизводство, агроэкология, лесное хозяйство // Известия. – 2012. – № 3. – С. 21-24 (doi: 10.37884/1-2022/08)

7 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во Москва, 1976. – 307 с (https://studizba.com/files/show/djvu/2947-1-a-i-netrusov-m-a-egorov--praktikum-po.html)

8 White T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S.B. Lee, J.W. Taylor // PCR Protocol a Guide to Methods and Applications.- Academic Press.- 1990.- N.Y.- P.315-322 (https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics)

9 National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс].-URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov (дата обращения 30.11.22)

10 Barcode of life data system [Электронный ресурс].-URL: https://www.boldsystems.org(дата обращения 30.11.22)

11 *Fusarium solani*. Электронный ресурс: (https://www.pesticidy.ru/pathogens/Fusarium_solani)

12 A. Patriarca, G. Vaamonde, V.F. Pinto. *Alternaria*. Encyclopedia of Food Microbiology, 2017, Pages 14 (doi:10.1007/978-1-4939-6707-0_2)

13 *Aspergillus: Habitat, reproduction and importance*. Электронный ресурс: (https://www.biologydiscussion.com/fungi/aspergillus-habitat-reproduction-and-importance-ascomycotina/24000)

У.А. АБЫЛАЕВА, А.А. САРДАР, А.К. ТУРСУНОВА, Ш.М. ТУРБЕКОВА,
Г.Д. АБИШЕВА

Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина
растений им. Ж. Жиенбаева, Алматы, Казахстан
e-mail: ablay.ula@mail.ru

ИЗОЛИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *SOLANUM LYCOPERSICUM* (ТОМАТ) В УСЛОВИЯХ АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Аннотация

Solanum lycopersicum (томат) - самая важная овощная культура, потребляемая во всем мире. Одним из основных факторов, ограничивающих его производство, являются грибковые заболевания. Развитие комплекса болезней, возникающих на основе определенных абиотических и биотических факторов окружающей среды, в частности вредных микроорганизмов, приводит к снижению урожайности плодов и отрицательно сказывается на получении высокой и стабильной урожайности томата. В основе защитных мероприятий лежит знание видового состава и биологических особенностей возбудителей болезней. Исходя из этого, следует организовать мероприятия по защите томатов от фитопатогенов и включить научно обоснованные методы, способствующие ограничению развития болезни.

Актуальность исследовательской работы заключается в том, что в условиях Карасайского района Алматинской области грибы, относящиеся к родам *Fusarium*, *Alternaria* и *Aspergillus*, встречающиеся у сорта томата «Ламадор», были идентифицированы до видового состава с помощью классических и молекулярно – генетических методов.

В статье описаны возбудители грибковых заболеваний культуры *S. lycopersicum*. Основные болезни культуры: заражение рассады, фузариозное увядание, бурая пятнистость, гниль плодов при хранении. Были проведены фитопатологические и молекулярно-генетические исследования по морфологическим и культуральным свойствам патогенов, выделенных из образцов томата с признаками болезни, и проведена идентификация до вида. В результате совместного применения традиционных микологических методов из 4 изолятов, полученных из культуры томата, были идентифицированы 2 родственных вида *Fusarium* : *Fusarium equiseti* и *Fusarium oxysporum*, из

родственных видов *Alternaria* : *Alternaria alternata*, так же из родственных видов *Aspergillus*: *Aspergillus flavus*.

Ключевые слова: ITS-участок, томат, патоген, идентификация, праймер.

IRSTI: 68.37.29

U.A. ABYLAEVA, A.A. SARDAR, A.K. TURSUNOVA, Sh.M. TURBEKOVA,
G.D ABISHEVA

Kazakh Research Institute of plant protection and quarantine named after Zh. Zhiembayev,
Almaty, Kazakhstan
e-mail: ablay.ula@mail.ru

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI ISOLATED FROM *SOLANUM LYCOPERSICUM* (TOMATO) IN THE CONDITIONS OF THE ALMATY REGION

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.15

Abstract

Solanum lycopersicum (tomato) is the most important vegetable crop consumed worldwide. One of the main factors limiting its production are fungal diseases. The development of a complex of diseases arising on the basis of certain abiotic and biotic environmental factors, in particular harmful microorganisms, leads to a decrease in fruit yield and has a negative effect on obtaining a high and stable yield of tomatoes. The basis of protective measures is the knowledge of the species composition and biological characteristics of pathogens. Based on this, it is necessary to organize measures to protect tomatoes from phytopathogens and include scientifically based methods that contribute to limiting the development of the disease.

The relevance of the research work lies in the fact that in the conditions of the Karasai district of the Almaty region, fungi related to the *Fusarium*, *Alternaria* and *Aspergillus* found in the tomato variety "Lamador" were identified to the species composition using classical and molecular genetic methods.

The article describes the pathogens of fungal diseases of *S. lycopersicum* culture. The main diseases of the culture: infection of seedlings, fusarium wilting, brown spotting, rot of fruits during storage. Phytopathological and molecular genetic studies were carried out on the morphological and cultural properties of pathogens isolated from tomato samples with signs of the disease, and identification to the species was carried out. As a result of the joint application of traditional mycological methods, 2 related species of *Fusarium* were identified from 4 isolates obtained from tomato culture: *Fusarium equiseti* and *Fusarium oxysporum*, from related species of *Alternaria*: *Alternaria alternata*, as well as from related species of *Aspergillus*: *Aspergillus flavus*.

Keywords: ITS-region, tomato, pathogen, identification, primer.

Tomatoes are one of the most consumed vegetables in the world. Along with the increase in the rate of tomato production, various methods of cultivation appear, and currently varieties are grown in different environmental conditions and constantly updated. Large – scale diversification, increased crop production and the World Trade System contribute to improving phytosanitary conditions, especially in areas where new diseases have appeared [1]. Currently, about 8.5 thousand pathogens cause damage to agricultural crops. The total product deficit due to harmful organisms is on average 30-35% annually during the growing season and 15-25% during the transportation and storage period of finished products [2]. Tomatoes are a good substrate for the development of bacteria and fungi, the infested product becomes partially or completely unsuitable [3].

One of the most common vegetable crops in our country is tomatoes. This is due to its high yield, variety of use, high biological value and high taste of the product [4]. In the country, the tomato crop is widely grown in open and protected soil. In recent years, a decrease in tomato yield

and a deterioration in fruit quality has been affected by infestation with fungal, viral and bacterial pathogens. At the same time, changes in climatic conditions and the negative impact of various pests contribute [5].

Currently, the cultivation of tomatoes in the country is mainly carried out by farmers and tenants. Most of them do not comply with phytosanitary norms and requirements, in particular, do not observe crop rotation, do not disinfect seeds before sowing. All this contributes to the accumulation of various infections and the widespread spread of diseases, pests and weeds. Fungal diseases are especially harmful. Among them, the most common and harmful species include pathogens of late blight, alternariosis, fusarium and botrytis. These diseases significantly affect the quality of tomato fruits, the amount of easily soluble carbohydrates, minerals is reduced, as well as the accumulation of organic compounds harmful to human health. In the field infected with these types of diseases, 50-60% are productive [6]. All pathogenic diseases have their own characteristics. In the conditions of open soil, the complex composition of pathogens in one agroecological zone and the level of harmfulness will be different. In this case, in the process of carrying out protective measures, it is important to know the species composition and biological features of pathogens, environmental factors affecting their development. Therefore, for timely and effective implementation of protective measures and a high-quality tomato harvest in accordance with the requirements of international standards, it is necessary to better master the diagnostic signs of diseases, the bioecological features of their pathogens. The purpose of the research work was to determine the species composition of pathogens of tomato diseases grown in Karasay district, Almaty region, their morphological, cultural and molecular genetic characteristics.

Materials and methods of research

Research work was carried out in laboratory and field conditions. Field small-scale experimental work was carried out on: planting seedlings in open ground, plant growth control, harvesting - the methodology of experimental work on vegetable growing and horticulture (1992) and the methodology of State varietal testing of vegetable crops (1985).

The calculation of diseases of tomatoes was carried out in the process of visual inspection of the roots and harvesting of products [13]. To study the species composition of fungal diseases of tomatoes, samples with signs of infestation were collected during the entire growing season (leaves, fruits, fruit nodules, roots).

Research work was carried out on the tomato variety "Lamador". In the course of the work, pathogens and their species composition were identified. Standard methods were used to determine the species composition of phytopathogenic fungi found in this plant. Microbiological analysis of affected plant samples was carried out in laboratory conditions [7]. To determine the species composition of phytopathogenic fungi found in tomato plants, standard methods were used. At the border of healthy and diseased tissues of tomatoes (leaves, stems, fruits), small fragments of organs affected by pathogens were thoroughly washed in running water, then purified water, sterilized in alcohol (except for organs affected by bacteria), placed on filter paper (soaked in sterile water) and in a dextrose agaric medium of potatoes. The grown colonies were microscopy for 7 days according to the methodology of M. K. Khokhryakov. To determine the most suitable nutrient medium for growing pathogens of fungal diseases of tomatoes, the growth medium of colonies of phytopathogens was studied: potato (PA) and potato-dextrose (PDA) Agars, Chapeco Agar (Cha).

In the absence of spores, the research material was grafted onto an artificial nutrient medium. Reference tools of domestic and foreign authors were used to determine the species composition.

The Department of molecular genetic research consists of the following stages: isolation of common DNA, amplification by PCR, comparative analysis (identification) of the PCR product (sequencing), data obtained from sequencing with data from the database.

From pure fungal cultures, DNA extraction was carried out with a reagent "«Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Russia), according to a special protocol of manufacturers.

The method of electrophoresis in agarose gel was used to test isolated DNA samples and amplified PCR products. For qualitative determination of isolated DNA, the samples were separated in a 1% agarose gel with the addition of ethidium bromide in a horizontal chamber for electrophoresis. The generuler (Thermo Scientific, US) marker was used as a benchmark. The results of electrophoresis were analyzed using the gel documentation system transilluminator Quantum-ST 5 (Vilbert Lourmat).

PCR analysis was carried out using its 1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G '3) and reverse its 4 (5'tcc TCC GCT TAT TGA TAT GC' 3) primers [8]. In the mixture of reagents required for the PCR reaction (25 µL), there were 4 µL of HF buffer (Thermo scientific), 0.5 µL of deoxyribonucleoside triphosphate (dntp) mixture, 0.3 µL of each of the primers mixture, DNA polymerase enzyme Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific) 0.2 µL and 2 µL of DNA. The reaction was carried out in the Thermocycle SimpliAmp Thermo Cycler (Life Technologies Corporation) according to the following mode: initial denaturation - 98°C, temperature 30 sec, 98°C – 10 sec, 60°- 20 sec and final extension 72°C-30 for 5 min at 72°C.

Purification of PCR fragments from foreign impurities was carried out using a set of reagents "ExoSap IT™".

Determination of the direct sequence of nucleotide sequences of the its region was carried out in the Senger sequencer (Applied Biosystems , Genetic Analyzer 3500).

Bioinformatics analysis of data from sequencing and the search for homologous nucleotide sequences was carried out in the open genetic database GenBank and Bold Systems [9-10].

Results and discussion

To reduce the harmfulness of the disease, it is necessary to know the species composition and biological characteristics of pathogens. The species composition of fungal pathogens isolated from tomato plants has been established. They were identified by *Alternaria* from the type of immature fungi, *Fusarium*, *Aspergillus* from the type of ascomycetes. The determination of morphological signs of phytopathogens was carried out on a potato – dextrose nutrient medium.

Fusarium-colonies are fluffy, white in color. Macro and microconidia were detected under the microscope. Microconidia are 1-2-cell, rounded, Oval, sometimes slightly curved. The Shape of macronidias is sickle, elliptical. The cell at the edge is slightly narrowed, obtuse. Macroconidias are usually 3-5-cell. Dimensions: 20-60x4-7 microns [11].

Alternaria is a ubiquitous type of fungus that causes damage to agricultural products, including cereals, fruits, and vegetables, before and after harvesting. Several species of *Alternaria* are capable of producing secondary metabolites, which are considered phytotoxins that play an important role in plant pathogenesis and mycotoxins that can be harmful to humans and animals [12].

Aspergillus is a genus of fungi consisting of more than 300 identified mold species. *Aspergillus* is found in different environments because it reproduces well in environments with high humidity. The body of the fungus consists of mycelium. The mycelium consists of thin, tubular, pale colored, widely branched, thin-walled hyphae. Some hyphae branch out in the substrate, and some settle by penetrating the substrate to absorb the substance in the culture medium. Conidia are small spherical, unicellular, single-core or multi-core, black, brown or yellow-green in color. Conidia spread through air currents. They grow in a suitable substrate and produce a germ tube. The germ tube turns into a septum, branches and forms a mycelium [13].

Fusarium spp.

colony growth in a nutrient medium



microscopic structure

Alternaria spp.

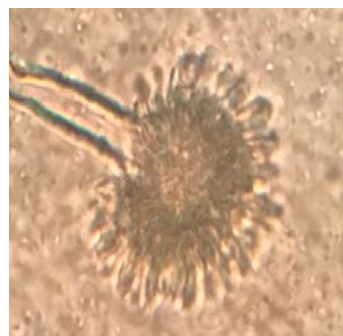
colony growth in a nutrient medium



microscopic structure

Aspergillus spp.

colony growth in a nutrient medium



microscopic structure

Figure 1-Morphological and microscopic features of mushrooms grown in a potato dextrose Agar nutrient medium

It is known that identification by determinants is sometimes not accurate, as shown in Figure 1. In this regard, confirmation was carried out by molecular genetic methods for the identification of isolated phytopathogenic fungi to the species. Using the sequencing method, the nucleotide sequence of *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* strains, the causative agents of tomato crop diseases, was determined.

The following research work was carried out on molecular genetic identification of selected fungi. The initial stage of any molecular genetic research is DNA sequencing. In this regard, in the research work, work was carried out to isolate genomic DNA from mycelial fungi.

At the first stage, work was carried out on the protocol proposed by commercial manufacturers of «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Russia) for DNA extraction. As a result of research, it was found that this protocol is effective in extracting DNA from mycelium fungi. Determination of the results of DNA isolation of micromycetes was carried out using the method of electrophoresis in 1% agarose gel. Using this commercial kit, genomic DNA was isolated (figure 2).

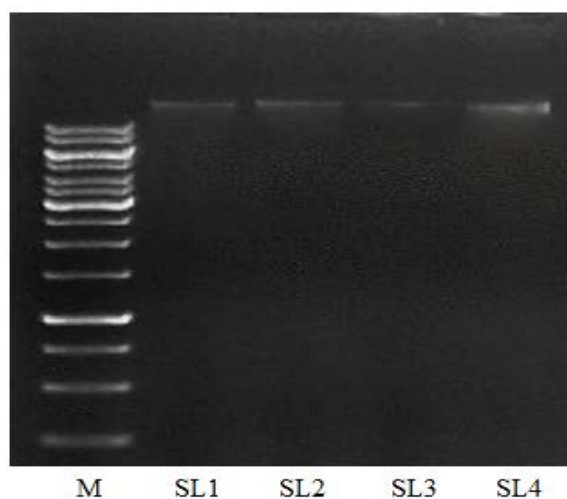


Figure 2 - DNA electrophoregram of fungi

The result of genomic DNA extraction was positive in all samples, as shown in Figure 2.

For PCR, taxonomically important regions of the gene were transcribed using the iits internal transcribed spacer (ITS) factor ITS 1/ITS4 universal primers. In order to test PCR products, an electrophoregram of 1% agarose gel was performed. The expected size of the amplicon is 570 b.p. (Figure 3).

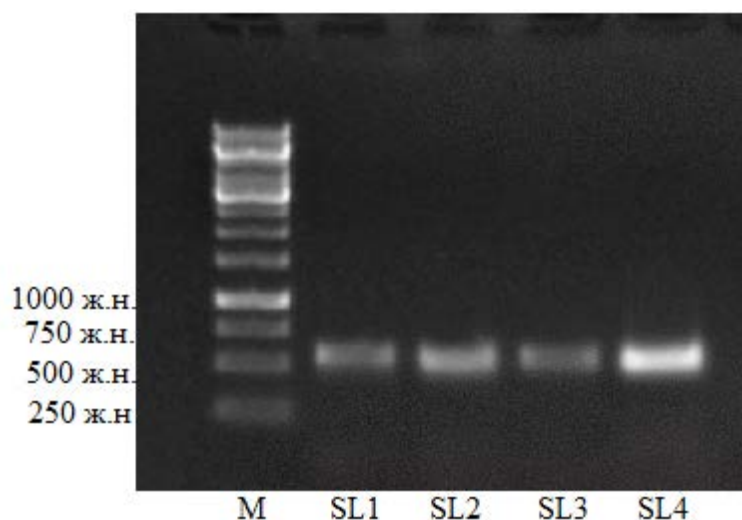


Figure 3 - amplification of isolates with ITS1/ITS4 primers

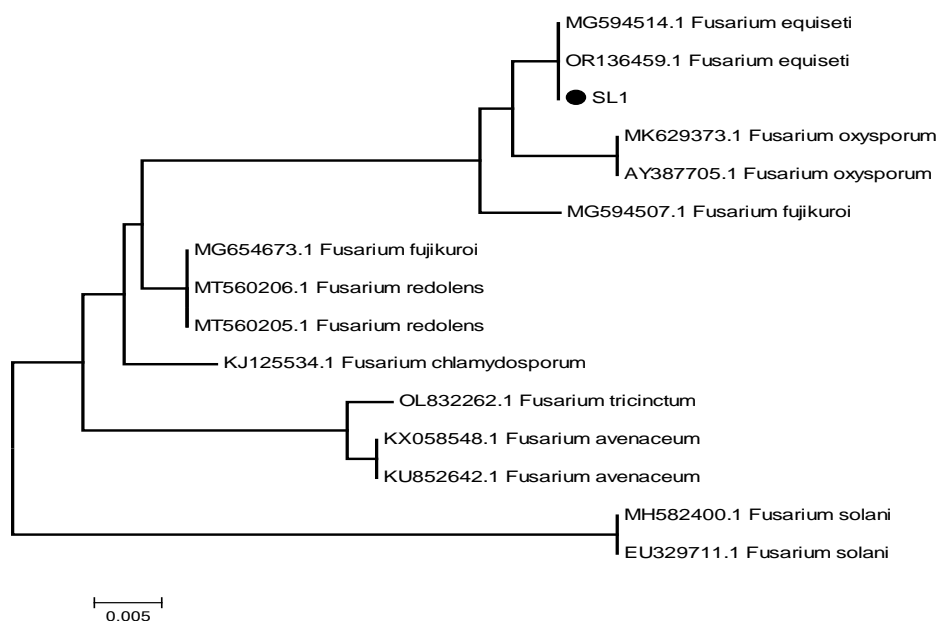
Amplification with ITS1/ITS4 primers, as shown in Figure 2, resulted in amplicons of about 570 b.p., which corresponds to the size of the site.

Direct sequencing of nucleotide sequences of the ITS region (Applied Biosystems, Genetic Analyzer 3500) was carried out in accordance with the recommendations of the manufacturing company.

Comparison of the obtained nucleotide sequences with the available sequences in the GENE BANK database was carried out using the BLASTN program.

The results of phylogenetic analysis of the ITS region in the studied strains are presented in the form of phylogenetic trees built in the MEGA7 program using Neighbor-Joining, a cluster method for calculating genetic distances.

A



B

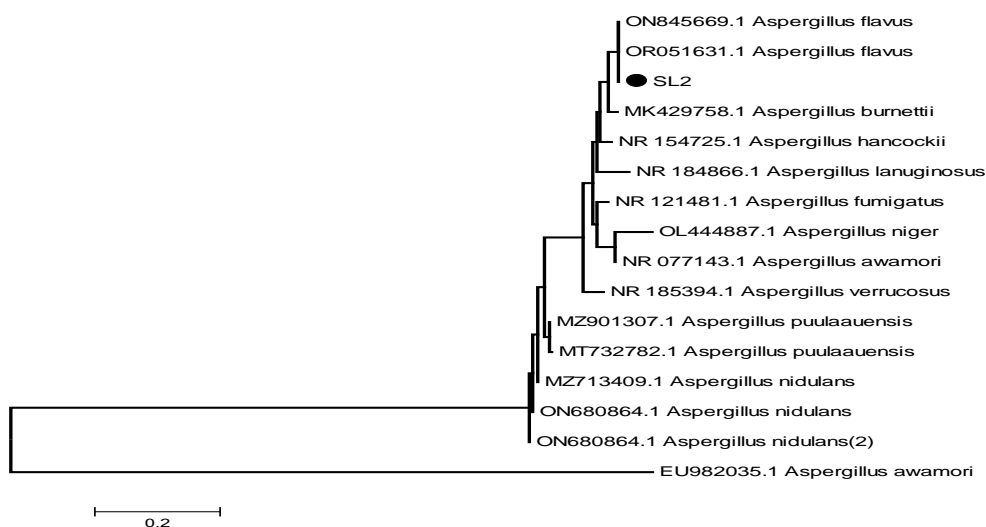
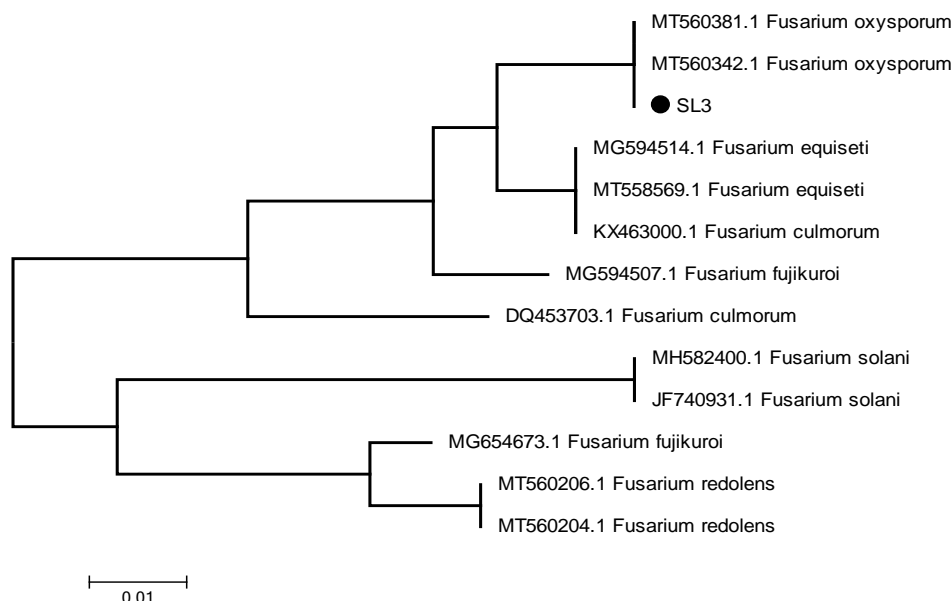


Figure 4-a phylogenetic tree built on the basis of the ITS region for the SL1 strain. The analysis included 9 typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (a). A phylogenetic tree built on the SL2 strain based on ITS site. The analysis included 12 typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (B)

As shown in the figure above (Figure 4), we see that the strain SL1 is linked in a unique branch to the nucleotide chains of the *Fusarium equiseti* and the strain SL2 to the shatms of *Aspergillus flavus*

A



B

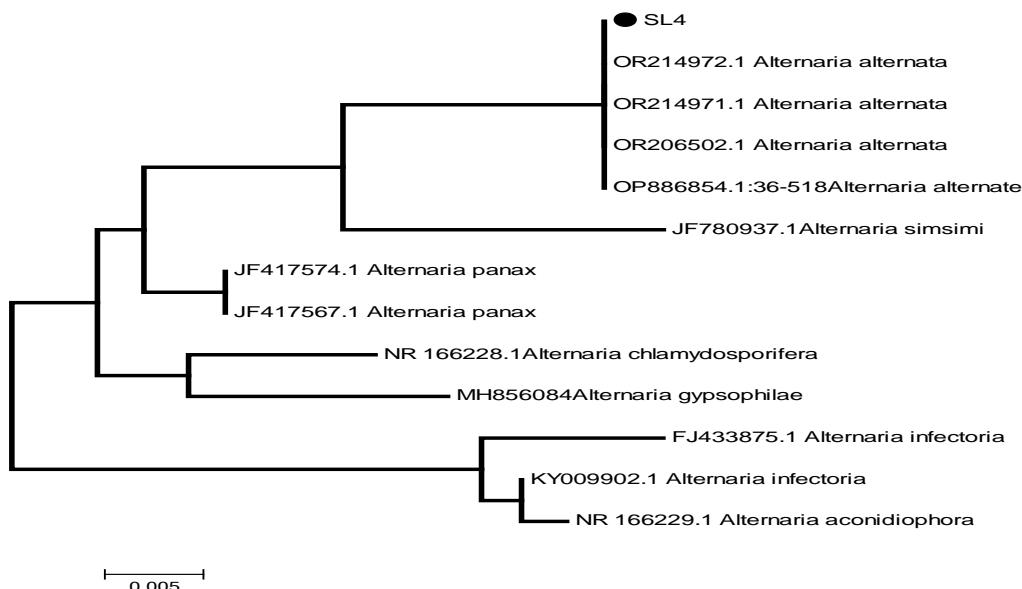


Figure 5-a phylogenetic tree built on the basis of the ITS site for the SL3 strain. The analysis included 6 Typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (A). A phylogenetic tree built on the SL4 strain based on ITS region. The analysis included 13 typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (B)

So, the phylogenetic tree was compiled on the basis of the ITS site using the Neighbor-Joining (NJ) method. According to the results of molecular genetic analysis, strains were identified as follows: SL1-*Fusarium equiseti*, SL2 - *Aspergillus flavus*, SL3 - *Fusarium oxysporum*, SL4 - *Alternaria alternata*.

Conclusion

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is the most widely used vegetable in the world. With a moisture content of 94.5%, that is, higher, this type of vegetable is infected with various pathogens. Many pathogenic fungi are the main object of study, as they are the main source of diseases that negatively affect the yield and quality of tomato fruits.

To carry out measures to combat diseases of tomato crops caused by pathogenic fungi, first of all, the correct identification of the pathogen is the most important event. In this regard, in our research work, we conducted a study of tomato crops with signs of the disease, combining traditional mycological and molecular genetic methods.

Tomato crops were carried out on tomato crops of the "Lamador" variety, grown in the Karasai District of the Almaty region. According to the conducted research, pure fungal cultures were isolated from tomato crops with signs of the disease and morphological and cultural properties of isolated isolates were described using traditional mycological methods. However, due to the fact that some diseases have similar external symptoms, it is difficult to accurately identify the pathogen. For this reason, it is currently considered effective to identify pathogens before the species through the use of molecular genetic methods. As a result of the study, two *Fusarium* species were identified among the isolates of the tomato crop: *Fusarium equiseti* and *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*.

Funding

The research was carried out in accordance with the work plan of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan 2021-2023. 267 under subprogram 101 "Program-targeted financing of subjects of scientific research and activities" of the budget program "Development of accessibility of science and scientific research" PTF "Development and improvement of integrated protection systems for fruit, vegetable, grain, fodder, legumes and plant quarantine". The authors thank their colleagues for their help in conducting these studies.

References:

- 1 Dominique Blanchard. *Tomato Diseases Identification, Biology and Control*. Second Edition, 2013. – 415 P. (https://books.google.kz/books?id=_Sc6_OjjXUC&printsec=frontcover&hl=ru&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- 2 O. A. Palastrova. *Bolezni tomata i obosnovanie mer bor'by s nimi v usloviyah Kurganskoy oblasti*: dissertacija / - Kurgan : KGSHA, 2006. - 153 s. (<https://cyberleninka.ru/article/n/bolezni-tomata-i-obosnovanie-mer-borby-s-nimi-v-usloviyah-kurganskoy-oblasti/viewer>)
- 3 O. A. Palastrova, A. S. Stepanovskih. *Zashhita tomata ot boleznej v Zaural'e* : monogr. / - Kurtamysh : Kurtamyshskaja tipografija, 2007. - 136 s. - ISBN 978-5-98271-079-6:99.8 (<http://www.dslib.net/fito-patologia/bolezni-tomata-i-obosnovanie-mer-borby-s-nimi-v-usloviyah-kurganskoy-oblasti.html>)
- 4 Ismailova Je. T. i dr. Morfologicheskie i molekulyarno-geneticheskie karakteristiki vzbuditelej osnovnyh gribnyh boleznej tomatov, proizrastajushih v Almatinskoy oblasti // *Vestnik KazNU, serija biologicheskaja*. – 2017. S.75 (chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://elibrary.kaznu.kz/wpcontent/uploads/2021/06/vestnik-kaznu.-seriya-biologicheskaya_2017-1-70.pdf)
- 5 Smoljanaja N.M. i dr. *Vidovoj sostav osnovnyh vzbuditelej boleznej tomata*. Sbornik materialov Vserossijskoj (nacional'noj) nauchno-prakticheskoy konferencii [Jelektronnyj resurs] : materialy Vseross. (nacional'noj) nauch.-praktich. konf., posvjashh. 100-letiju so dnja rozhdenija S. I. Leont'eva 2019 / – 488 s (<https://agro.omgau.ru/nauka/sborniki-nauchnykh-statej/item/138-materialy-vserossijskoj-natsionalnoj-nauchno-prakticheskoy-konferentsii-posvyashchennoj-100-letiyu-so-dnya-rozhdeniya-s-i-leonteva.html>)
- 6 Dzhajmurzina A.A., Karbozova R.D., Eszhanov T.K., Umiraliyeva Zh.Z. *Sistema zashhity tomata ot boleznej na Jugo-Vostoke Kazahstana* // *Zemledelie, agrohimiya, kormoproizvodstvo, agrojekologija, lesnoe hozjajstvo* // *Izvestija*. – 2012. – № 3. – S. 21-24 (doi: 10.37884/1-2022/08)
- 7 Egorov N.S. *Praktikum po mikrobiologii*. – M.: Izd-vo Moskva, 1976. – 307 s (<https://studizba.com/files/show/djvu/2947-1-a-i-netrusov-m-a-egorov--praktikum-po.html>)
- 8 White T.J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics* / T.J. White, T. Bruns, S.B. Lee, J.W. Taylor // *PCR Protocol a Guide to Methods and Applications*. - Academic Press. - 1990. - N.Y. - P.315-322 (https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics)

9 National Center for Biotechnology Information [Elektronnyj resurs].-URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (data obrashhenija 30.11.22)

10 Barcode of life data system [Elektronnyj resurs].-URL: <https://www.boldsystems.org>(data obrashhenija 30.11.22)

11 *Fusarium_solani*. Elektronnyj resurs: (https://www.pesticidy.ru/pathogens/Fusarium_solani)

12 A. Patriarca, G. Vaamonde, V.F. Pinto. *Alternaria*. Encyclopedia of Food Microbiology, 2017, Pages 14 (doi:10.1007/978-1-4939-6707-0_2)

13 *Aspergillus: Habitat, reproduction and importance*. Elektronnyj resurs: (<https://www.biologydiscussion.com/fungi/aspergillus-habitat-reproduction-and-importance-ascomycotina/24000>)

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.

ISSN 2304-585X



0 4



9

772304 585132