DOI: 10.26104/NNTIK.2022.32.95.004

Макамбай кызы А., Мажитова А.Т.

САЛТТЫК КЫМЫЗДАН МИКРООРГАНИЗМДЕРДИ БӨЛҮП АЛУУ ЖАНА ИДЕНТИФИКАЦИЯЛОО

Макамбай кызы А., Мажитова А.Т.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ТРАДИЦИОННОМ КУМЫСЕ

Makambai kyzy A., A. Mazhitova

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS IN TRADITIONAL KOUMISS

УДК: 579.8.06

Кымыз – сүт кычкыл бактериялары менен ачытки козу карындардын табигый аралаш ачыткысын колдонуу менен бээ сүтүнөн ачытылып жасалган бир аз алкоголдуу суусундук. Кымыз өндүрүүдө анын ачыткысы маанилүү компоненти болуп саналат жана жытына, даамына, ошондой эле адамдын ден соолугуна пайдалуу азык заттарына таасирин тийгизет, бирок жергиликтүү салттык кымыздын микрофлорасы жөнүндөгү изилдөөлөр жетишсиз. Изилдөөнүн максаты, салттык кымыздан микроорганизмдерди бөлүп алып, идентификациялоо жана алардын башка ферменттелген азыктарды өндүрүүдөгү келечегин изилдөө. Тиешелүү азык чөйрөдө өстүрүлгөн кымыз үлгүлөрүнөн ар кандай формага жана түскө ээ болгон 10 колония тандалып алынган. Морфологиялык өзгөчөлүктөрүнө жараша алардын ичинен төртөөсү ачытки козу карындар, калгандары бактерия болгондугу аныкталган. Углеводорду ачытуу моделдеринин негизинде бактериялар гомоферментативдик жана гетероферментативдик сүт кычкыл бактерияларына бөлүнгөн.

***Негизги сөздөр**: кымыз, сүт кычкыл бактериялар, ачытқы козу карындар, классификация.*

Кумыс – слабоалкогольный напиток из ферментированного кобыльего молока, полученный с использованием натуральной смешанной закваски из молочнокислых бактерий и дрожжей. Закваска является важным компонентом в производстве кумыса и влияет на аромат, вкус, а также полезные для здоровья человека питательные вещества, однако исследований микрофлоры местного традиционного кумыса недостаточно. Целью данного исследования было выделение и идентификация микрофлоры традиционных кумысов и перспективы их применения для производства ферментированных пищевых продуктов. Из образцов кумыса, выращенных на соответствующей питательной среде, отобрали 10 колоний разной формы и окраски. По морфологическим признакам четыре из них относятся дрожжам, остальные – бактериям. По характеру ферментации сахаров бактерии были разделены на гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии.

***Ключевые слова:** кумыс, молочнокислые бактерии, дрожжи, классификация.*

Koumiss is a slightly alcoholic fermented mare's milk beverage, obtained by using a natural mixed starter of lactic acid bacteria and yeasts. Starter is an important component of koumiss processing which can affect the aroma, taste, as well as the nutrients beneficial to human health, but few reports have examined the local traditional koumiss microflora. The purpose of this study was to isolate and identify the microflora of traditional koumiss and their application perspectives for the production of fermented foods. From the samples of koumiss grown on the appropriate nutrient medium, 10 colonies of different shapes and colors were selected. According to morphological features, four of them belong to yeast, the rest to bacteria. Based on sugar fermentation patterns, the bacteria were differentiated into homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria.

***Key words:** koumiss, lactic acid bacteria, yeast, classification.*

Киришүү. Кымыз – Орто Азиядагы көчмөн элдердин салттуу суусундугу. Бээ сүтүнөн ачылытып даярдалган бул суусундук Кыргызстан, Казахстан, Монголия жана Россиянын кээ бир региондорунда (Бурятия, Калмыкия жана Башкирия) аябай популярдуу болуп эсептелинет. Кымызда болжол менен 2% спирт, 0,5-1,5% сүт кислотасы, 2-4% сүт канты жана 2% май кармалат [1]. Ошондой эле кымыздын уникалдуу курамынан улам, терапевтикалык касиетке ээ болгондугу, кургак учук жана башка өпкө ооруларын дарылоодо колдонулгандыгы белгилүү [2].

Кымыз – ачытылган, жеңил спиртүү, кычкыл даамга ээ, адатта пастерленбеген жаңы бээнин сүтүнөн жасалган салттуу сүт суусундугу болуп эсептелинет [2]. Бээ сүтүнө ачытки (мурдагы жасалган кымыздын бир бөлүгү) кошулат да 22-25°С температурада мезгил мезгили менен бышылат. Кымыздын жетилүүсү үчүн 12-15 саат керектелет [1].

Ачытуу процесси микроорганизмдердин өсүүсүнүн натыйжасында, ар кандай субстраттардын баалуу азыктарга айландыруу процесси болуп саналат [4]. Кымызда ачытуу процесси симбиоздук мүнөзгө ээ жана эки түрдүү микроорганизмдердин б.а. сүт кычкыл бактерияларынын жана ачытки козу карындардын аракетинен көз каранды [1]. Натыйжада сүт кычкыл ачытуусу жана спирттик ачытуу ишке ашат [2]. Ачытуу же ферментация процессинде сүт кычкыл бактериялары сүт кантын сүт кислотасына жана башка органикалык кошундуларга, көмүр кычкыл газына, ал эми ачытки козу карындар лактозаны спиртке айлантышат [3].

Сүт кычкыл бактериялары тамак-аш технологиясында абдан маанилүү болуп эсептелинет, себеби алар табиятта кеңири тараган жана ар түрдүү чийки

азыктардын бузулуусун алдын алып, өндүрүштө кээ бир азыктардын жетилүүсүндө аябай чоң ролду ойнойт. Себеби, бүгүнкү күндө консервант катары эң көп колдонулган жана изилденген микроорганизмдер тобу – сүт кычкыл бактериялары, табигый түрдө тамак-аш азыктарында кездешет же таза культуралар катары ар кандай тамак-аш азыктарына кошулат [4].

Чийки азыкты сүт кычкыл бактериялардын жардамы менен ачытуу жана сактоо же консервалоо эң байыркы методдордун бири болуп саналат [5]. Түрдүү тамак-аш азыктарынын табигый микрофлорасында табылган же баштапкы культура катары колдонулган сүт кычкыл бактерияларынын азыкты бузуучу микроорганизмдерге же тамак-аш патогендерине каршы антагонисттик активдүүлүгүн көрсөткөнү белгилүү [6].

Кымыздын курамындагы сүт кычкыл бактерияларын изолирлөө жана идентификациялоо кымыздын сапатын жогорулатууга көп салымын кошот. Андан сырткары аныкталган микроорганизмдердин жардамында ферменттелген жаңы азык түрлөрүн өндүрүүгө мүмкүнчүлүк түзүлөт. Изилдөөнүн максаты, салттык кымыздын курамындагы сүт кычкыл бактерияларын жана ачыткы козу карындарын бөлүп алып, идентификациялоо жана алардын башка ферменттелген тамак-аш азыктарын өндүрүүдө колдонуу келечегин изилдөө.

Материал жана методдор. Сүт кычкыл бактерияларын изолирлөө үчүн материал катары салттык кымыз алынды. Кымыз салттык ыкма менен үй шартында жасалган жана алынып келген соң муздаткычта +4 ºC температурада сакталды.

Методдор. Үлгүнү суюлтуу даражасы. Суюлтуу суюктугу катары 0,85% жана 0,1% пептон камтыган стерилдүү физиологиялык эритмеси колдонулду. Үлгү 1 мл алынып ондук суюлтуу жасалды [4].

Кымыздын жалпы микробиологиялык анализи. Суюлтуу даражасы даярдалгандан соң тиешелүү азык чөйрөлөргө 0,1 мл алынып өстүрүү жүргүзүлдү. Жалпы аэробдук мезофилдик бактериялар 30-32 ºСта PCA (Plate Count Agar), энтеробактериялар 35-37 ºСта VRBD (Violet Red Bile Deksrose Agar), көк жана дрожждор 25 ºСта PDA (Potato Dektrose Agar), сүт кычкыл бактериялардын саны 30 ºСта MRS (de Man, Rogosa, Sharpe Agar) азык чөйрөлөрүндө өстүрүлдү.

Сүт кычкыл бактерияларын изолирлөө. Сүт кычкыл бактерияларын изолирлөө максатында, керектүү даражадагы суюлтуулардан Man, Rogosa жана Sharpe (MRS) агары азык чөйрсүнө жаюу методу колдонулду. Петри чөйчөкчөлөрү 30ºC температурада 24 саатка инкубакторго коюлду. Инкубациялык мезгил бүткөн соң, мүмкүн болушунча ар кандай форма жана түскө ээ болгон бактерия колониялары тандалып алынып, MRS агар азык чөйрөсүнө Петри чөйчөкчөлөрдө сызуу же чийме методу менен өстүрүлдү. Алынган таза бактерия культураларынын морфологиясы микроскопто каралды, ошондой эле Грам боео жана каталаза ферменти тести жасалды.

Грам боёо. Грам методу – микроорганизмдерди изилдөө үчүн боёо ыкмасы, ал бактерияларды клетка дубалынын биохимиялык касиеттерине жараша айырмалоого мүмкүндүк берет. Боео үчүн тазалоодон өткөн изоляттар MRS агар чөйрөсүндө сызуу ыкмасы менен кайра активацияланган жана 24 сааттан кийинки активдүү бактерия культуралары колдонулду.

Грам боёо үчүн таза айнекченин бетине бир тамчы дистирленген суу тамчылатылып, катуу азык чөйрөсүнүн бетинде өскөн бактерия колониясынан илмек менен алынып, аралаштырылды жана жайылды. Айнекче абада кургатылгандан кийин үч жолу жалындан өткөзүлүп фиксацияланды. Фиксациялангандан кийин алгач кристалл кызгылт көк менен боелду жана 1-2 мүнөт күтүлдү. Андан соң дистирленген суу менен жуулуп айнекченин бетине Люголь эритмеси тамчылатылып, жайылып 1мүнөт күтүлдү. Жуулгандан кийин 95% спиртте 10-15 секунд кармалды жана дистирленген суу менен кайра жуулду. Аягында суулуу карбол фуксин менен 30 секунд боелду жана кайрадан жуулуп айнекче абада кургатылды. Даяр айнекче микроскопто каралып чыкты жана пайда болгон түскө жараша баа берилди.

Каталаза ферментинин тести. Бул тест бактерияларда каталаза ферментинин бар же жок экенин көрсөтүүчү тест болуп эсептелинет жана каталаза ферментинин чөйрөдөгү суутек перекисин суу жана кычкылтекке бөлүү негизине таянат. Каталаза ферментинин тести үчүн азык чөйрөнүн бетиндеги бактерия колониясына 1 тамчы 3%дык H_2O_2 эритмеси тамчылатылды жана газ пайда болуусуна жараша оң жана терс деген жыйынтык чыгарылды.

Глюкозадан газ пайда кылуу тести. Сүт кычкыл бактерия изоляттарынын гомо- же гетероферментативдүүлүгүнө жараша бөлүү үчүн глюкозадан газ пайда кылуу тести аткарылды. Бул тест сүт кычкыл бактерияларынын классификациясында эң алгачкы кадам болуп саналат. MRS Agar азык чөйрөсүндө 24 сааттык активдүү культурасынан илмектин жардамы менен стерилдүү физиологиялык эритмеге өткөрүлүп, Mc Farland 3 кө ээ болгон бактерия тыгыздыгы алынды. Ал чөйрөдөн 0,1 мл алынып, цитрат камтыбаган Durham пробиркалары бар MRS суюк модификацияланган азык чөйрөсүнө куюлду жана 30 ºC 24 саат инкубацияланды. Инкубация мезгили бүткөн соң Durham пробиркаларында газ пайда болуусу бааланды.

9.6 pHтуу MRS суюк азык чөйрөсүндө өстүрүү анализи. Бул тест үчүн MRS Agar азык чөйрөсүндө 24 сааттык активдүү культурасынан илмектин жардамы менен стерилдүү физиологиялык эритмеге өткөрүлүп Mc Farland 3кө ээ болгон бактерия тыгыздыгы алынып колдонулду. 0,1 N HCl жана 0,1 N NaOH эритмелери менен pH маанилерин 9.6 га туура келгендей

кылып, MRS суюк азык чөйрөсү модификацияланды жана дярдалган изолят 0.1 мл кошулуп 30 ºC та 48 саат инкубацияланды. Инкубация аягында өсүүсү контролдонду жана пробиркаларда бүдөмүк пайда болуусуна жараша баа берилди.

6.5%дуу туздуу MRS суюк азык чөйрөсүндө өстүрүү анализи. Изоляттардын тузга болгон толеранттулугун аныктоо үчүн 6.5% NaCl концентарцияда даярдалган MRS суюк азык чөйрөсүндө 30 ºC та 48 саат инкубацияланды. Инкубация аягында өсүүсү контролдонду жана пробиркаларда бүдөмүк пайда болуусуна жараша баа берилди [4].

Жыйынтыктар. Кымыздын жалпы микробиологиялык анализинин жыйынтыктарына жараша жалпы аэробдук мезофилдик бактериялардын саны – $5.2x10^6$ КОЕ/мл, энтеробактериялардын саны <1 КОЕ/мл, көк жана ачыткы козу карындардын саны – $4.3x10^6$, сүт-кычкыл бактериялардын саны - $5.2x10^6$ КОЕ/мл болуп аныкталды. Алардан тандалып алынган 6 изолятка тийиштүү Грам боёо, микроскоптон изоляттын формасы, каталаза ферментинин тести, 9.6 рНтуу жана 6.5% туздуу суюк азык чөйрөсүндө өстүрүү, глюкозадан газ пайда кылуу анализдеринин жыйынтыгы таблица 1де берилди. Микроскоптон алардын морфологиясы каралганда К2, К4, К9, К10 ачыткы козу карындар болгондугу аныкталды. Ал эми К8 изоляты каталаза ферментинин тести боюнча оң натыйжа бергендиктен, ага андан кийинки таанылуу анализдери жасалган эмес. Себеби сүт кычкыл бактериялары үчүн каталаза ферментинин тести терс мааниге ээ болушу керек. Грам боео жыйынтыгында кызгылт көк бактериялар Грам оң, ал эми кызгылт болгон бактериялар Грам терс деген баа берилди.

Сүт кычкыл бактериялардын баары Грам оң, анаэробдук, микроаэрофилдик же аэротолеранттуу, каталаза терс, таякча же кокк формасында болуп саналат. Эң маанилүүсү алардын баары моносахарлардын жана негизги канттардын энергетикалык ферментациясынын натыйжалуу продукту катары сүт кислотасын чыгарышат [5]. Алынган натыйжага таянып, жогорудагы изоляттарды сүт кычкыл бактериялары деп айта алабыз.

1-таблица

№	Изолят номери	Сүт кычкыл бактерия колониясынын көрүнүшү	Бактерия морфологиясы	Каталаза ферментинин тести	Грам боёо боюнча	9.6 pH-туу азык чөйрөдө өстүрүү тести	6.5% туздуу азык чөйрөдө өстүрүү тести	глюкозадан газ пайда кылуу тести
1.	К1	орточо, ак, тоголок колония	бацилла	-	+	-	+	-
2.	К3	кичине, ак, тоголок колония	коккобацилла	-	+	-	+	+
3.	К5	өтө кичне, ак, тоголок колония	коккобацилла	-	+	-	-	-
4.	К6	кичине, ак, тоголок колония	коккобацилла	-	+	-	+	+
5.	К7	кичине, ак, тоголок колония	коккобацилла	-	+	-	+	+
6.	К8	кичине, ак, тоголок колония	кокк	+				

Морфологиялык жана физиологиялык өзгөчөлүктөрү бактерияларды классификациялоодо колдонулган негизги критерийлер болуп саналат. Сүт кычкыл бактерияларынын түрү боюнча бөлүүнүсү менен бирге негизинен кокк, кадимки таякча жана түз эмес формада таякча болуп үч ар түрдүү морфологиялык көрүнүүсү бар [6]. К1 кадимки таякча формага ээ, калгандары болсо түз же кадимки таякча формада эмес б.а. коккобациллалар.

Сүт-кычкыл бактериялары бир нече түрлөрдөн турганы менен ачытуу процессинин акыркы продуктусунун негизинде гомо- жана гетероферментативдүү болуп бөлүнөт. Гомоферментативдүүлөр глюкозаны ачытуунун негизги продуктусу катары колдонуп, сүт кислотасын бөлүп чыгарышат. Гетероферментативдүүлөр глюкозаны ачытуунун натыйжасында сүт кислотасынан тышкары бир катар продуттарды бөлүп чыгарышат, аларга CO_2, уксус кислотасы жана этанол кирет [7]. Газ пайда болуусу изоляттын глюкозадан CO_2 бөлүп чыгаруусу жана гетероферментативдүү группасына таандык болгонун, ал эми CO_2жоктугу гомоферментативдүү касиетке ээ болгонун көрсөттү. К3, К6, К7 газ пайда кылуу анализинде оң жыйынтыктарды бергени үчүн алар CO_2 бөлүп чыгарышты жана алар гетероферментативдүү сүт кычкыл бактериялары тобуна кирет деп айта алабыз. Ал эми К1 жана К5 изоляттар глюкозадан газ пайда кылган жок, ошол

себептен аларды гомоферментативдүү сүт кычкыл бактериялардын тобуна киргизе алабыз.

Адабияттар:

1. Danova S., Petrov K., Pavlov P., & Petrova, P. (2005). Isolation and characterization of Lactobacillus strains involved in koumiss fermentation. International Journal of Dairy Technology, 58(2), 100-105.
2. Bai L., & Ji S. (2017, January). Isolation and identification of lactic acid bacteria from koumiss in Eastern Inner Mongolia of China. In AIP Conference Proceedings (Vol. 1794, No. 1, p. 050005). AIP Publishing LLC.
3. Azam M., Mohsin M., Ijaz H., Tulain U.R., Ashraf M.A., Fayyaz, A., & Kamran, Q. (2017). Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 30(5).
4. Yildiz, H. (2011). Turşu ve zeytinlerden laktik asit bakterileri ile mayaların izolasyonu-identifikasyonu ve elde edilen izolatların bazı özelliklerinin belirlenmesi.
5. Wood B. J., & Holzapfel W.H.N. (Eds.). (1992). The genera of lactic acid bacteria (Vol. 2). Springer Science&Business Media.
6. Tabakoğlu C. (2010). Yöresel peynirlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanısı ve bazı gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin araştırılması (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
7. Carr F.J., Chill D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. Critical reviews in microbiology, 28(4), 281-370.