Национальная академия наук Кыргызской Республики

Институт биотехнологии

Диссертационный совет Д 03.12.022

На правах рукописи

**УДК 579.6(575.2)(043.3)**

**ТЫНЫБАЕВА ИНДИРА КАЖЫМУХАНОВНА**

**ИЗУЧЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *LACTOBACILLUS SPP.* НА ВОЗДЕЙСТВИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ**

03.01.06 - биотехнология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Бишкек-2014

Работа выполнена в ДГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» РГП «Национальный центр биотехнологии РК» Комитета науки Министерства Образования и Науки Республики Казахстан

|  |  |
| --- | --- |
| Научный руководитель: | доктор медицинских наук  Кушугулова Алмагуль Рахимберлиевна |
|  |  |
| Официальные оппоненты: | доктор ветеринарных наук, профессор  Керимжанова Бахытжан Фазылжановна |
|  |  |
|  | доктор биологических наук, профессор  Тулемисова Жанар Кенесовна |

Ведущая организация: Казахский агротехнический университет

им. С.Сейфуллина г. Астана

Защита состоится “27” июня 2014 года в 1400 часов на заседании диссертационного совета Д 03.12.022 при Институте биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: г. Бишкек, пр.Чуй 265, каб. 303.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Национальной академии наук Кыргызской Республики, г. Бишкек, пр. Чуй, 265-а

Автореферат разослан «27» мая 2014 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук Б.М. Худайбергенова

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** На сегодняшний день расширение отечественного производства для здорового питания населения, также обеспечение их безопасности и качества является значимым.

Молочнокислые бактерии широко применяются в качестве биопродуцентов в пищевой, молочной, медицинской промышленности*.* Также, при использовании в виде пищевых добавок предотвращают порчу продуктов питания и уменьшают опасность образования токсинов.

На сегодняшний день, *Lactobacillus* широко применяется в качестве биопродуцентов в пищевой, молочной, медицинской промышленности*.*

Обладающие пробиотическими свойствами некоторые разновидности лактобацилл, являются важными представителями желудочно-кишечного тракта. Наиболее известные виды этой группы классифицированы как *L. acidophilus, L.johnsonii*, *L. bulgaricus, L.helveticus, L. casei, L. paracasei.* Благодаря продукции органических кислот, перекисей и бактериоцинов, многие штаммы лактобацилл проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении патогенных и оппортунистических микроорганизмов. Из перечисленных молочнокислых бактерий *L.casei* является наиболее сильным антагонистом по отношению к кишечной и сенной палочкам, пиогенному микрококку, бактериям тифа и дизентерии. Лактобациллы устойчивы к предельным концентрациям желчи, фенола, высоким концентрациям NaCl, что имеет важное значение для успешного функционирования в кишечнике. Одним из биологических свойств молочнокислых бактерий является их способность продуцировать молочную кислоту. У гомоферментативных лактобацилл лактат составляет 90% всех продуктов брожения. У представителей гетероферментативных видов в качестве конечных продуктов также образуется молочная кислота и углекислый газ. Активное кислотообразование рассматривается как один из важных факторов антагонизма в отношении других видов микробов. Интерес к кислотообразованию бактерий объясняется их высокой значимостью для решения научных и практических задач микробиологии, биотехнологии. В настоящее время, механизмы кислотообразования связывают с деятельностью клеток во время роста и развития, и выделения ими в среду некоторых количеств органических кислот молочной и других (уксусной, муравьиной и т. д.), спиртов, перекисей и других метаболитов.

Адгезия патогенных микроорганизмов на клетках кишечного эпителия и кишечной слизи играет ключевую роль в патогенезе. В связи с этим, особое внимание уделяется подбору таких пробиотических штаммов, которые ингибировали бы адгезию патогенных микроорганизмов к тканям кишечника. А также, бактерии рода *Lactobacillus* усиливают гидролиз белков, сбраживают углеводы, омыляют жиры, препятствуют микробному декарбоксилированию пищевого гистидина и повышению количества гистамина.

В производственном процессе молочнокислые бактерии подвергаются различным стрессовым факторам: низкая температура, высокая температура. Изучение их биологических свойств, при воздействии различных стресс факторов микробиологическими методами, также современные перспективы применения молочнокислых бактерий генетическими методами является актуальным. Изучение их адгезивных и кислотообразующих активностей молекулярно-генетическими методами, включает уровень экспрессии генов, отвечающих за данный процесс. В этой ситуации, применение молекулярно-генетического метода ПЦР в режиме реального времени позволит сравнить рост культур после воздействия определенных стресс факторов и наличие соответствующих генов.

**Связь темы диссертации с крупными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями.** Работа выполнялась в лаборатории генетики и биохимии микроорганизмов ДГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» РГП «Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан» КН МОН РК в рамках утвержденной научной программы «Сохранение и пополнение новых штаммов микроорганизмов перспективных в биотехнологическом производстве» в 2007-2010 гг.

**Цель и основные задачи работы.** Целью настоящей работы является изучение реакции *L.casei* на воздействие стрессовых факторов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Типировать микроорганизмы относящиеся к *L.casei* с использованием мультилокусного сеиквенс-типирования (*fusA, ileS, lepA, leuS, pyrG, recA, recG*)

2.  Изучить пробиотические свойства *L.casei* в норме и при воздействии стресс факторов (желчный шок, холодовой шок, тепловой шок).

3. Изучить технологические характеристики  *L.casei* в норме и под воздействием стрессовых факторов (желчный шок, холодовой шок, тепловой шок).

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые,были определены ранее неизвестные сиквенс-типы, при идентификации бактерии *L.casei*. Это дало нам возможность охарактеризовать их как уникальных штаммов Казахстана. Изучены адгезивные свойства исследуемых культур, определена экспрессия их генов *mub* и *eft* в норме и при воздействии стресс факторов (желчный шок, холодовой шок, тепловой шок). Изучены пробиотические свойства исследуемых культур в норме и при воздействии стресс факторов (желчный шок, холодовой шок, тепловой шок).

**Практическая значимость полученных результатов.** Бактерии с высокой резистентностью к стресс факторам по результатам исследования, рекомендовать к использованию для приготовления полезных продуктов и пробиотических препаратов в производстве или для составления консорциума заквасок. Штаммы были переданы в национальный депозитарий РК.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Среди идентифицированных культур *L.casei* с помощью МЛСТ выявлены 18 уникальных штаммов Казахстана.
2. Изучены адгезивные свойства *L.casei* в в норме и при воздействии стресс факторов, определен уровень экспрессии генов mub, eft и проведен сравнительный анализ результатов.
3. Изучены пробиотические свойства и технологические характеристики *L.casei* в норме и под воздействием стресс факторов, определен уровень экспрессии генов *аro, ldh* и проведен сравнительный анализ результатов.

**Личный вклад соискателя.** Основные экспериментальные исследования, описание и обобщения полученных результатов работы выполнены автором самостоятельно.

**Апробация работы**. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на Республиканской научно–теоретической конференции «Сейфуллинские чтения - 3», посвященной 50 – летию основания КазГАТУ им. С. Сейфуллина (г.Астана, 2009) по теме «Влияние низкомолекулярных метаболитов на показатели кислотообразующей активности *Lactobacillus casei*», международной научной конференции молодых ученых «Наука и образование – 2008» (Астана, 2008) по теме «Мультилокусное сиквенс типирование пробиотических бактерий», международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2010» (Москва-2010) тема «Резистентность Lactobacillus spp. к желчному шоку», международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2011» (Москва-2011) тема «Резистентность к холодовому шоку *Lactobacillus»*.

**Полнота отражений результатов диссертации в публикациях.** Основные положения диссертационной работы опубликованы в 14 научных работах, из них 10 научных статей.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 102 страницах. Включает в себя 5 глав, состоящих из введения, литературного обзора, материалов и методов, собственных результатов, заключения, выводов. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 23 рисунками.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Глава 1.** В первой главе приведен обзор литературы по теме диссертации.

Лактобациллы **—** микроаэрофильные, грамположительные бактерии, не образующие спор и не продуцирующие каталазу. На основании продукции углекислоты из глюкозы, потребности в тиамине, ферментации фруктозы и продукции фруктозодифосфат-альдолазы они делятся на две группы: гомо- и гетероферментативные. Вопросы номенклатуры и таксономии бактерий рода *Lactobacillus* до настоящего времени окончательно не решены [Еремина И.А.,1999]. Лактобациллы входят в группу молочнокислых микроорганизмов, включающую представителей 11 родов: *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Camobacterium, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Oenococcus, Weissella* [Онищенко Г.Г.,2002]. Род *Lactobacillus* объединяет 56 видов, из которых 5 подразделяют на два и более подвидов [Еремина И.А.,1999].

Для некоторых молочнокислых бактерий показана способность к гемагглютинации эритроцитов, способность связывать маннозу, прикрепляться к компонентам кишечной слизи, связывать гликолипиды кишечного эпителия [Flahaut S. 1996, KilstrupM. 1997]. Адгезия молочнокис-лых бактерий к эпителиальным клеткам зависит от физиологического состояния бактерий, физико-химических условий, в том числе рН среды [Svensater G. 2000]. *Lactobacillus spp*. обладают высокой энергией кислотообразования, при развитии в молоке могут повышать кислотность до 300º Т и более. Молочнокислые стрептококки – менее активные кислотообразователи, предельная кислотность молока при развитии в нем только стрептококков не превышает 120º Т [Бредихин С.А. 2003].

**Глава 2.** Изложены материалы и методы исследования.

Объектами исследования служили 18 штаммов *L.casei* выделенных из кумыса, айрана, шубата, и являющихся уникальными, что было подтверждено с использованием метода мультилокусного сиквенс типирования(МЛСТ). В качестве сравнения использовались штаммы *L.fermentum*, *L.helveticus, L.casei, L.fermentum* ATCC 9338 из фонда Республиканской коллекции микроорганизмов Казахстана.

В работе были применены микробиологические, молекулярно-биологические методы. Математическую обработку результатов и графическое представление числовых экспериментальных данных осуществляли с помощью стандартного пакета статистических программ Microsoftoffice, Exсel и 0,6 версию программы Statistica.

**Глава 3. Результаты и обсуждение.**

**Идентификация *L. casei* изолятов с помощью метода мультилокусное секвенс-типирование.** Исследования, приведенные в данной главе выполнены на базе Научно-исследовательского института физико-химичес-кой медицины (г. Москва) под руководством Доктора Момыналиева К.Т.

В настоящей работе для определения географической принадлежности, генетической структуры*,* а также в целях классификации бактерии *L.casei* использовали метод мультилокусного сиквенс типирования (МЛСТ-MLST). Молекулярное типирование (сравнительная характеристика видов) бактериальных штаммов является главной задачей в микробиологии. Для проведения этой методики использовали 8 генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes). Гены домашнего хозяйства являются маркерами филогенетического родства, функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма.

**Определение сиквенс-типов представленных изолятов *L.casei.*** Бактерий с комбинацей аллелей определяют сиквенс-тип. Важнейшим преимуществом метода МЛСТ является наличие международной базы данных, позволяющей хранить информацию о всех известных сиквенс-типах, пополнять ее в режиме on-line и сравнивать собственные данные с данными независимо работающих лабораторий. База данных находится на сайте: [www.mlst.net](http://www.mlst.net/).

Для аллелей 8 генов представляют аллельный профиль, который определяет сиквенс-тип (СТ) каждого изолята. Для сравнительного анализа в базу данных сравнения были добавлены данные, описанные авторской группой Laure Diancourt, Virginie Passet, Christian Chervaux, Peggy Garault, Tamara Smokvina, Sylvain BrisseИнститута Пастер, Париж, Франция. В своем исследовании ученые описали 31 сиквенс-тип для штаммов *L.casei.* Для определения сиквенс-типов представленных изолятов, анализировалась совокупность аллелей elongation factor EF-2 (*fusA*), isoleucyl tRNA synthetase (*ileS*), GTP-binding protein LepA (*lepA*), leucyl-tRNA synthetase (*leuS*), CTP synthetase (*pyrG*), recombinase A (*recA*), ATP-dependent DNA helicase (*recG*) для каждого изолята. В результате проведенных нами исследований выявлено, что представленные изоляты *L.casei* формируют пять новых сиквенс-типов, не описанных ранее (рисунок 1).

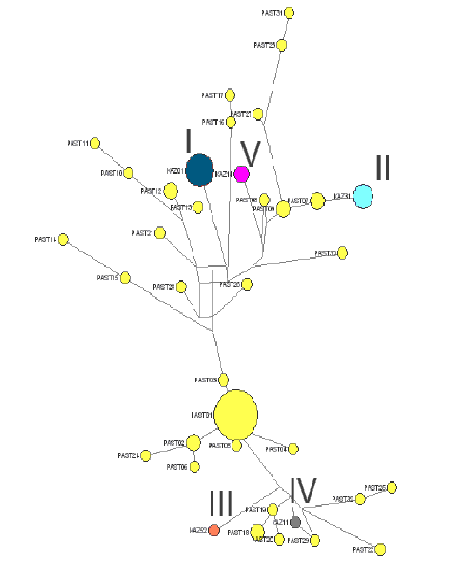


Рис. 1 Взаимоотношение новых сиквенс-типов (I-IV) предоставленных изолятов с сиквенс-типами *L.casei,* определенных ранее.

Данные изоляты *L. casei* разделили на пять сиквенс-типов (груп), причем они ранее не были описаны. Первая группа (I) формирующая новый сиквенс-тип состоит из изолятов: 17,6,5, 4, 3. Вторая группа (II) формирующая еще один новый сиквенс-тип состоит изолятов: 13, 20, 15, 16. Третью (III) и четвертую (IV) формируют изоляты:10, 18.Пятую группу, формирующую новый пятый сиквенс-тип составляют изоляты: 23, 11.

**Изучение характера изменений показателя кислотообразующей активности исследуемых культур.** Кислотность молока выражается в градусах Тернера – количеством мл 0,1 Н раствора едкого натра, необходимого для нейтрализации кислот, содержащихся в 100 мл молока. В колбочку отмеривают пипеткой 10 мл молока, 20 мл d H2O и 3 капли 1% спиртового раствора фенолфталеина. После взбалтывания смесь титруют 0,1 Н раствором едкого натра до появления слабо-розового окрашивания, не изменяющегося в течение минуты. Из рисунка 2 видно, показатель кислотообразующей активности у исследуемых штаммов изменяется одинаково: в первые 7 часов культивирования не происходит значительного повышения. Лаг-фаза (от англ. lag - запаздывание) период между посевом бактерий и началом размножения. Продолжительность лаг-фазы в среднем 4-5 ч.

В последующие 7-17 часы культивирования происходит значительное повышение показателя кислотообразования (экспоненциальная фаза роста). Фаза логарифмического  (экспоненциального) роста  является периодом интенсивного деления бактерий. Кроме того, следует отметить, диапазон показателей в среднем у исследуемых штаммов не имеет существенных различий.



Рис. 2 График изменения показателя кислотообразующей активности *Lactobacillus*

После 17 часов культивирования показатель кислотообразования не меняется, в некоторых случаях происходит снижение показателя кислотообразования. Данные соответствуют фазе отмирания - периода логарифмической гибели, переходящей в период уменьшения скорости отмирания бактерий.

**Изучение экспрессии генов лактатдегидрогеназы методом Real-Time PCR.** Процесс экспрессии генов включает ряд последовательных этапов: транскрипцию, процессинг РНК, трансляцию и сборку белковых комплексов. Регуляция экспрессии может происходить на каждом уровне из этих этапов.

Уровень активности гена чаще всего связан с количеством синтезируемой на нем мРНК, то есть с активностью фермента РНК-полимеразы. Существуют гены ферментов отвечающих за кислотообразующую активность молочнокислых бактерии. Кисилотообразующая активность после 5 часов инкубации культур при 37ºС, соответствует уровеню экспрессии гена лактатдегидргеназы.

На данном этапе исследования выявили уровень экспрессии генов 22 штаммов культур *Lactobacillus* с помощью анализа ПЦР в режиме реального времени. Для постановки ПЦР-РТ (реал тайм) использовали выделенные РНК*.* Для этой цели культуры выращивались (1 час) до оптической плотности (OD) 0,5-0,6 при нм. РНК из бактерии выделялись методом Хроминский – видоизмененный для молочнокислых бактерий. Наличие выделенных образцов РНК определяли электрофоретическим разделением в 1,5% агарозном геле.

С помощью метода real-time PCR изучили экспрессию генов лактатдегидрогеназы мРНК культур *Lactobacillus casei*.

Таблица 1 - Последовательность праймеров

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Название генов | Последовательности нуклеотидов | Концентрация |
| 1 | LDH 3 5 | GCTTGTTAAGATGTTTGAAGACG | 3,196o.u/ml (765nmol/ml)107 |
| 2 | LDH45 | CATATTGACCATCCATGTAAACG | 3,191 o.u/ml (755 nmol/ml) 108 |

В результате исследуемой работы, как видно из таблицы 2 уровень лактатдегидрогеназы мРНК исследуемых культур изменяется. Уровень экспрессии генов LDH соответствует показателям кислотообразующей активности.Оценивали уровень экспрессии генов методом 2 -ΔΔСt согласно составу мРНК. Статистическую обработку проводили с помощью программы 6.0-Statistica.

Таблица 2– Кислотность по Тернеру и уровень экспрессии генов культур *Lactobacillus casei*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Штаммы  *Lactobacillus casei* | Кислотность по0Т (5час) | Уровень экпрессии генов |
| *2-L.casei* | 200,15 | 2,2 |
| *3-L.casei* | 200,68 | 3,52 |
| *4-L.casei* | 220,87 | 2,99 |
| *5-L.casei* | 280,87 | 4,26 |
| *6-L.casei* | 320,54 | 3,12 |
| *7-L.casei* | 250,66 | 4,1 |
| *8-L.casei* | 321,21 | 3,15 |
| *9-L.casei* | 160,65 | 1,3 |
| *10-L.casei* | 290,84 | 2,87 |
| *11-L.casei* | 370,99 | 4,12 |
| *13-L.casei* | 340,41 | 4,91 |
| *15-L.casei* | 320,41 | 3,5 |
| *16-L.casei* | 36 | 4 |
| *17-L.casei* | 25 | 3,4 |
| *18-L.casei* | 30 | 3,65 |
| *19-L.casei* | 33 | 5,25 |
| *20-L.casei* | 23 | 2,66 |
| *23-L.casei* | 260,75 | 2,05 |
| Примечание: Показатели кислотообразующей активности представлены в градусах Тернера (0Т) - p≤0,001 | | |

В таблице 2 можно увидеть ксилотообразующую активность после 5 часов инкубации культур при 37ºС, соответственно уровень экспрессии гена лактатдегидргеназы.

**Моделирование желчного шока.** В результате было установлено, что у 5 культур *L. сasei*  имеется низкая резистентность к действию желчи, которая составила 0,02\*104- 0,1\*104 кл/мкл. Для 4 культур наблюдается средняя резистентность – 0,2\*104-1,2\*104 кл/мкл, а для 5 культур данный показатель составил 2,0\*104-20,0\*104 кл/мкл, что свидетельствует об их высокой резистентности. При этом показатели резистентности штаммов сравнения *L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и *L. helveticus* составляет 0,4\*104, 0,04\*104, 0,2\*104соответсвенно.

**Экспрессия гена** *ldh* **при воздеиствии желчного шока*L.casei*.** После воздействия желчного шока проводили экспрессию генов лактатдегидрогеназы (*ldh)* с использованием real-timePCR.

На данном этапе работы, при изучении экспресии генов, для праймера LDH была установлена температура 620 С. В результате, выяснили, что при сравнении с уровнем лактатдегидрогеназы при нормальных условиях, после воздействия желчного шока уровень лактатдегидрогеназы не меняется (рисунок 3).

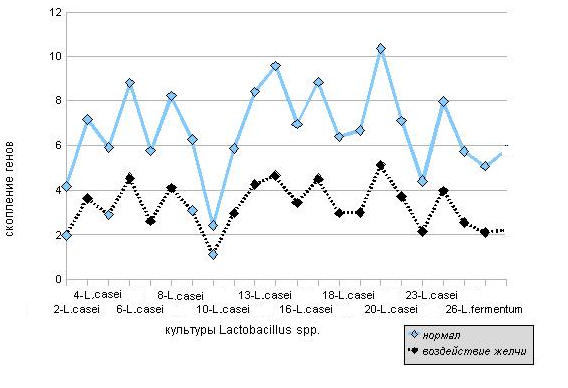


Рис. 3 *Lactobacillus spp.* (18 штамм *L. casei,* 3 контрольные штаммы - *L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и *L. helveticus*) уровень экспресии генов лактатдегидрогеназы при нормальных условиях и после желчного шока.

**Адгезивные свойства *L.casei* при воздеиствии желчного шока и в норме.** По уровню адгезии к эритроцитам в норме из 18 штаммов *L. сasei* 14 штаммов – высоко адгезивные, 4 штаммов – средне адгезивные. Контрольные штаммы: *L.fermentum* высоко адгезивные, *L.fermentum* ATCC 9338 и *L.helveticus* средне адгезивные.

Культуры часто подвергаются воздействию внешней среды - стресс факторов, дальнейшая работа заключается в изучении адгезивной активности после воздействия желчного шока.

Таблица 3- Адгезивная активность штаммов *L.сasei* и контрольных штаммов после воздействия желчного шока

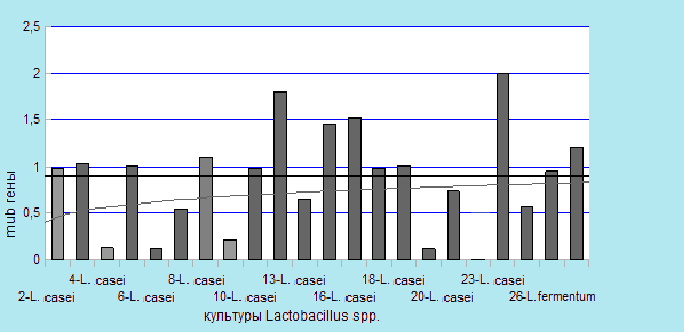
|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Штаммы | Разведение культур | | | |
| 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| *2-L.casei* | + | + | + | - |
| 3-*L.casei* | + | + | + | - |
| 4-*L.casei* | + | + | + | + |
| 5-*L.casei* | + | + | + | + |
| 6-*L.casei* | + | + | + | + |
| 7-*L.casei* | + | + | + | + |
| 8-*L.casei* | + | + | + | + |
| 9-*L.casei* | + | + | + | + |
| 10-*L.casei* | + | + | + | + |
| 11-*L.casei* | + | + | + | - |
| 13-*L.casei* | + | - | - | - |
| 15-*L.casei* | + | + | + | + |
| 16-*L.casei* | + | + | + | - |
| 17-*L.casei* | + | + | + | + |
| 18-*L.casei* | + | + | + | + |
| 19-*L.casei* | + | + | + | - |
| 20-*L.casei* | + | + | + | + |
| 23-*L.casei* | + | + | + | + |
| 24-*L.fermentum*ATCC 9338 | + | + | - | - |
| 26-*L.fermentum* | + | + | + | - |
| 27- *L.helveticus* | + | + | + | + |
| Примечания: 1. - «+» положительный рост; 2 - «» слабый рост; | | | | |

Как показано в таблице 3 после воздействия желчного шока адгезивная активность к эротрицитам из 18 штаммов *L. сasei* у 12 высоко показатель, у остальных 5 штаммов средний показатель, и один штамм низко адгезивный, и показатель адгезивности у контрольных штаммов *L.fermentum* высоко адгезивный, *L.helveticus* и *L.fermentum* ATCC 9338 средне адгезивные.

**Экспрессия генов *eft* и *mub* культур *L.casei* при воздействии желчного шока.** На ряду с моделированием желчного шока и экспресии генов лактатдегидрогеназы проводили экспрессию генов mucus adheson gene(*eft, mub)*с применением real-time PCR, при воздеиствии желчного шока в начальных этапах роста культур.

Последовательности праймеров использованных на данном этапе: mub 435r–ggttataaagttaacagcattgttc, f–gtaatcgtgttctacatatacatag, eftu 435f–ggtgctatcttagttgttgc, r–caaccaagtcgatcaattct.

Пробиотичекие бактерии защищают от патогенных бактерий адгезируясь к системе ЖКТ. По результатам исследований данной работы, после воздействия желчного шока по колчиественному определению экспрессия генов *mub* и *eft,* обнаружили, что скопление гена *mub* низкое. Если обратить внимание на ген *eft*, его скопление значительно больше (рисунок 4).



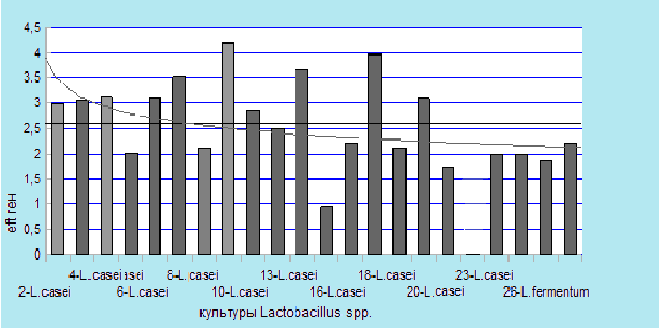


Рис. 4 Уровень экспрессии генов *mub* и *eft* штаммов *Lactobacillusspp.* (18 штаммов *L. casei,* 3 контрольные штаммы - *L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и *L. helveticus*) при воздействии желчного шока.

По рисунку 4 можно провести сравнительный анализ количественного уровня экспресии генов *mub* и *eft* штаммов *Lactobacillus casei* при воздействии желчного шока. И только один штамм *Lactobacillus casei 15* показал низко адгезивную активность. У этого штамма количественная корреляция гена *mub* средний показатель, а количественный показатель уровня гена *еft* ниже. Уровень экспресии гена *eft* других штаммов *Lactobacillus casei* показывает высокую адгезивную активность, и у контрольных штаммов активность адгеизии средняя.

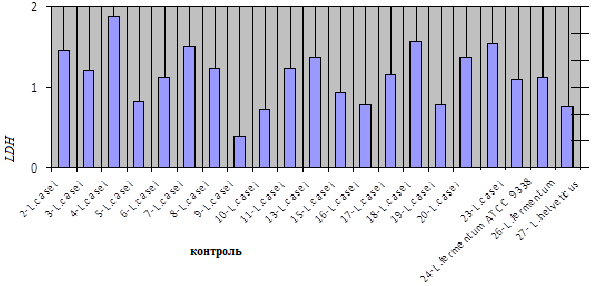
**Моделирование теплового шока.** Анализ результатов проводили, после инкубации культур при 370С 48 часов (Jaya Prasad, 2002). Эксперимент проводится в трех повторностях, по средним показателям отмечали резистентность культур.

По результатам исследования 6 культур *Lactobacillus casei* c низкой резистентной активностью к тепловому шоку, это 5- 0,1\*10 4кл/мкл. У 9 штаммов 0,2\*104-1,8\*10 4кл/мкл – средний показатель резистентности, у остальных 4 штаммах показатель составляет 2,0\*104-5,0\*104 кл/мкл, это показывает их наиболее высокую резистентную активность.

Также, показатель резистентности к тепловому шоку штаммов *L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и*L. helveticus* используемых в качестве контроля, соответственно составляет 1,4\*104, 0,5\*104, 1,5\*104. Это показывает среднюю резистентность контрольных культур к тепловому шоку.

**Изучение экспрессии гена лактатдегидрогеназа *L.casei* при воздействии теплового шока и в норме.** Наряду с моделированием желчного шока invitro проводили изучения экспрессии генов лактатдегидрогеназа (*ldh)* с применением real-time PCR.

Результаты изучения экспресии генa *ldh* при воздействии теплового шока сравнивали с результатами изучения экспресии генa *ldh* в норме. По итогам сравнительного анализа выяснили, что при воздействии теплового шока уровень гена *ldh* изменяется не значительно (рисунок 5).



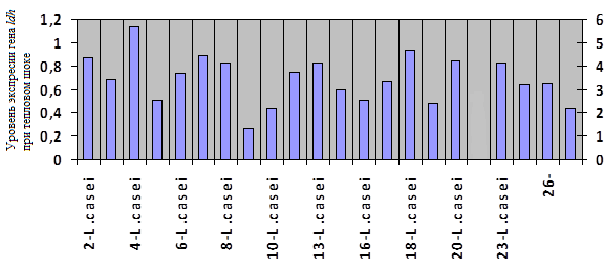


Рис. 5 Уровень экспресии гена лактатдегидрогеназа штаммов *Lactobacillusspp.* (18 штаммов *L. casei,* 3 контрольных штамма - *L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и *L. helveticus*) при воздействии теплового шока и в норме

**Определение органолептических свойств.** Культуры *Lactobacillus* были засеяны в обезжиренное молоко в пробирки. Органолептические свойства определяли после образования сгустка при 37°С. Сквашенное молоко имеет однородную, густую консистенцию. Вкус и запах - чистые кисломолочные (пригоревшего молока), сладковатым привкусом и запахом. Цвет равномерный по всей массе белый с кремовым оттенком.

В заключении, в пищевой промышленности при производстве кисломолочных продуктов молочнокислые бактерии проходят несколько обработок и подвергаются к различным стресс факторам. Одними из стресс факторов являются низкая и повышенная температуры.

**Изучение экспрессии гена *aro* (Aromatic aminotransferase) в норме и при воздействии теплового шока с применением метода Real-TimePCR.** Органолептические показатели кисломолочных продуктов в составе которых имеются МКБ влияют на ценность продукта, потому что возбуждая пищеварительный аппарат - процес пищеварения и работу секреторно-моторного аппетита влияет на обоняние человека.

Ген aromatic aminotransferase (*aro)*является одним из генов отвечающих за органолептические свойства (аромат). При выборе молочнокислых бактерий для использования в производстве запах является важным показателем.

На данном этапе исследовании для гена *ARO9* применяли программу с температурой отжига 500С и 45 циклами. Для изучения уровня экспрессии гена аromatic aminotransferase были подобраны праймеры:

*ARO9-R–*GGTTGGGAAGAGCTCCAGAGAT,

*ARO9-F–*ACGACAAGTTCATTTCTGACCGTT

В результате исследования уровень гена Aromatic aminotransferase мРНК не превышает нормы. При высоком кислотообразовании уровень мРНК одинаково с начальным уровнем штамма.

Таблица 4– уровень экспрессии гена *aro* штаммов *Lactobacillus* в норме и при воздействии теплового шока

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Штаммы *Lactobacillus casei* | Уровень экспрессии гена *aro* | Уровень экспрессии гена *aro* при воздействии теплового шока |
| 2-*L.casei* | 3,40 | 3,36 |
| 3-*L.casei* | 2,36 | 2,40 |
| 4-*L.casei* | 2,56 | 2,81 |
| 5-*L.casei* | 3,59 | 3,52 |
| 6-*L.casei* | 3,49 | 3,55 |
| 7-*L.casei* | 3,45 | 3,38 |
| 8-*L.casei* | 2,97 | 31 |
| 9-*L.casei* | 2,12 | 1,989 |
| 10-*L.casei* | 4,12 | 4,103 |
| 11-*L.casei* | 2,37 | 3,79 |
| 13-*L.casei* | 5,11 | 5 |
| 15-*L.casei* | 2,11 | 2,08 |
| 16-*L.casei* | 4,24 | 4,055 |
| 17-*L.casei* | 1,24 | 1,43 |
| 18-*L.casei* | 2,36 | 2,72 |
| 19-*L.casei* | 5,69 | 5,49 |
| 20-*L.casei* | 5,1 | 5,10 |
| 23-*L.casei* | 4,99 | 5,11 |
| 24-*L.fermentum*ATCC 9338 | 2,33 | 2,12 |
| 26-*L.fermentum* | 1,34 | 1,22 |
| 27- *L.helveticus* | 5,23 | 5,41 |
| Примечание - p≤0,001 | | |

Как видно из таблицы 4, в процессе данной работы пришли к выводу при воздействии тепловго шока и в норме накопление гена *aro* равномерно.

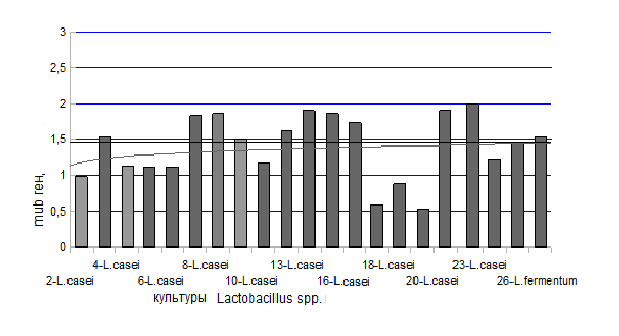
**Адгезивные свойства культур *L.casei* в норме и при воздействии теплового шока.** Как показано в таблице 5 по степени адгезии к эритроцитам при воздействии теплового шока из 18 штаммов *L. casei* 12 штамма оказались высоко адгезивными, 4 штамма средне адгезивными, 2 штамма низко адгезивными. В контрольных штаммах *L.helveticus* является высоко адгезивным, *L.fermentum* и *L.fermentum* ATCC 9338 средне адгезивные.

Таблица 5– Адгезивная активность *Lactobacillus*после воздействия теплового шока при 600С

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Штаммы | Разведение культур | | | |
| 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 |
| *2-L.casei* | + | + | - | - |
| 3-*L.casei* | + | + | - | - |
| 4-*L.casei* | + | + | - | - |
| 5-*L.casei* | + | + | + | + |
| 6-*L.casei* | + | + | + | + |
| 7-*L.casei* | + | + | + | + |
| 8-*L.casei* | + | + | + | + |
| 9-*L.casei* | + | + | + | + |
| 10-*L.casei* | + | + | + | + |
| 11-*L.casei* | + | - | - | - |
| 13-*L.casei* | + | - | - | - |
| 15-*L.casei* | + | + | + | + |
| 16-*L.casei* | + | + | + | + |
| 17-*L.casei* | + | + | + | + |
| 18-*L.casei* | + | + | + | + |
| 19-*L.casei* | + | + | - | - |
| 20-*L.casei* | + | + | + | + |
| 23-*L.casei* | + | + | + | + |
| 24-*L.fermentum*ATCC 9338 | + | + | - | - |
| 26-*L.fermentum* | + | + | + | - |
| 27- *L.helveticus* | + | - | - | - |
| Примечания: 1- «+» положительный рост; 2 - «» слабый рост; | | | | |

Уровень адгезии культур к эритроцитам в норме 14 штаммов *L. сasei* высоко адгезивные, 5 штаммов – средне адгезивные. Контрольные штаммы - *L.fermentum* является высоко адгезивным, *L.fermentum* ATCC 9338 и *L.helveticus* средне адгезивные. После воздействия 60ºС тепла 11 и 13-штаммы показали плохой результат – низкую адгезивную активность.

**Экспрессия генов *eft* и *mub L.casei* при воздействии теплового шока.** Последовательности праймеров: mub 435 r–ggttataaagttaacagcattgttc, f–gtaatcgtgttctacatatacatag, eftu 435 f–ggtgctatcttagttgttgc, r–caaccaagtcgatcaattct.



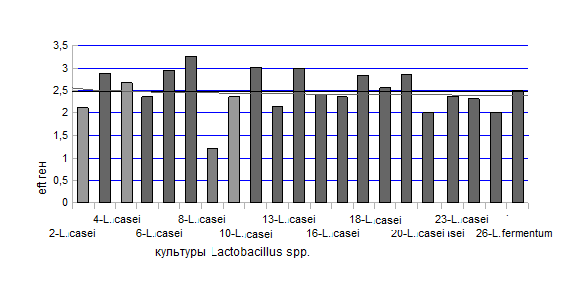


Рис. 6 Уровень экспресии генов *mub* и *eft* штаммов *Lactobacillusspp.* (18 штаммов *L.casei,* 3 контрольных штамма-*L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и *L. helveticus*)при воздействии теплового шока

Для данных праймеров в программе real-timePCR использовали температуру отжига 480 С. На рисунке 6, показано индукция генов *mub* и *eft* штаммов *Lactobacillus casei*. Количественный анализ показывает среднее число *Mub* гена, количественный анализ гена *Eft* незначительно привышает показателя гена *Mub.* Также, эти результаты схожи, и уровень экспрессии гена *Eft* только у одного штамма *Lactobacillus casei 15* меньше чем в остальных штаммах.

**Моделирование холодового шока.** Одним из стресс факторов воздействующих на микроорганизмы является холодовой шок. В производстве молочнокислые бактерий часто подвергаются к холодому шоку, в частности при транспортировке и хранении. Резкое понижение температуры при инокулировании культур бактерии, приводит к временной остановке их роста, затем они проходят определнный период адаптации и постепенно начинают расти.

В результате исследования выяснили, три культуры *Lactobacillus casei* с плохой резистентностью к холодовому шоку, КОЕ составляет после воздействия холодового шока 0,01- 0,1\*10 4кл/мкл. 12 культур показали среднюю резистентность - 0,2\*104-1,8\*10 4кл/мкл. У остальных 6 культур этот показатель составляет 2,0\*104-5,0\*104 кл/мкл, это показавыает их высокую резистентность. Также, контрольные штаммы *L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и *L. helveticus*показали среднюю резистентность 0,8\*104, 0,8\*104, 1,4\*104 соответственно.

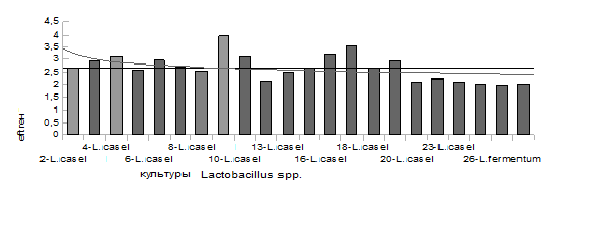
**Адгезивные свойтства *L.casei*при воздействии холодового шока.** Для пробиотических микроорганизмов является важным сохранение их функциональной характеристики. Адгезивная активность один из способностей пробиотических лактобацилл.

Таблица 6 - Показатели адгезивной активности *L. casei* и штаммов сравнения при воздействии холодового шока 50С

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Штаммы | Разведение культур | | | |
| 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| *2-L.casei* | + | + | - | - |
| 3-*L.casei* | + | + | + | + |
| 4-*L.casei* | + | + | + | + |
| 5-*L.casei* | + | + | + | + |
| 6-*L.casei* | + | + | + | + |
| 7-*L.casei* | + | + | + | + |
| 8-*L.casei* | + | + | + | - |
| 9-*L.casei* | + | + | - | - |
| 10-*L.casei* | + | + | + | + |
| 11-*L.casei* | + | + | + | - |
| 13-*L.casei* | + | + | + | - |
| 15-*L.casei* | + | + | + | + |
| 16-*L.casei* | + | + | + | - |
| 17-*L.casei* | + | + | + | + |
| 18-*L.casei* | + | + | + | - |
| 19-*L.casei* | + | + | + | - |
| 20-*L.casei* | + | + | + | + |
| 23-*L.casei* | + | + | - | - |
| 24- *L.fermentum*ATCC 9338 | + | + | - | - |
| 26-*L.fermentum* | + | + | + | - |
| 27- *L.helveticus* | + | + | - | - |
| Примечания: 1- «+» положительный рост; 2 - «» слабый рост; | | | | |

В таблице 6 видим адгезивную активность *L. casei* к эротрицитам при воздействии 50С холода. Из 19 штаммов *L.casei* высокоадгезивными оказались 9 штаммов, среднеадгезивными 6 штаммов и остальные 3 штамма с низкой адгезивным свойством. Контрольные штаммы *L.fermentum* среднеадгезивный, *L.fermentum* ATCC 9338 и *L.helveticus* низкоадгезивные*.*

**Экспрессия генов *eft* и*mubL.casei*при холодовом шоке с использованием real-time PCR.** Использовались гены mucus adheson gene (*mub, eft).* Если сравнить результатов количественного анализа экспрессии генов *mub* и *eft* при воздействии холодового шока с результатами предыдущих экспериментов, то видим наибольшее накопление *mub* генов при воздействии холодового шока. Уровень экспресси гена *eft* при воздействии холодового шока без изменении (рисунок 7).



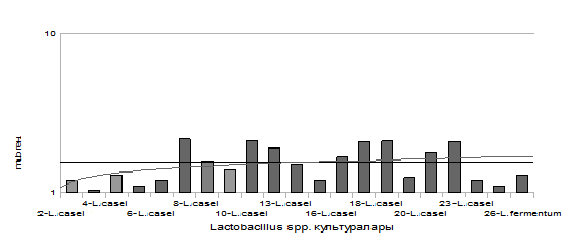


Рис. 7 Уровень экспресии генов *mub* и *eft* штаммов *Lactobacillusspp.* (18 штаммов *L.casei,* 3 контрольных штамма-*L. fermentum, L. fermentum* ATCC9338 и *L. helveticus*)при воздействии холодового шока

По графикам рисунка 7 можем провести сравнительный анализ между результатами воздействия теплового шока и холодового шока исследуемых штаммов. Если, выше описанный *L.casei-15* обладает низким уровнем экспресии гена *eft* при воздействии желчного шока, то при воздействии холодового шока показывает средний уровень экспресии того же гена. Уровень экспресии *Eft* гена других штаммов равномерно. Итак, при воздействии холодового шока у всех штаммах обнаружили индукцию *Eft* и *Mub* генов. Адгезивные свойства контрольных штаммов стабильно.

**Изучение экспрессии гена LDH культур *Lactobacillus* в норме и при воздействии холодового шока с применением Real-TimePCR.**

Показатель уровня экспресии гена *ldh* меньше показателей РНК в норме. При воздействии холодового шока разрушается индукция данного гена (таблица 7).

Таблица 7- Уровень экспресии гена *Ldh*штаммов*Lactobacilluscasei* в норме и при воздействии холодового шока

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Штаммы*Lactobacillus casei* | Уровень экспресии гена*Ldh* при холодовом шоке | Уровень экспресии гена*Ldh*в норме |
| 2-*L.casei* | 1,15 | 1,36 |
| 3-*L. casei* | 1,98 | 2,36 |
| 4-*L. casei* | 2,14 | 2,87 |
| 5-*L. casei* | 3,23 | 3,69 |
| 6-*L. casei* | 2,65 | 3,4 |
| 7-*L. casei* | 2,86 | 3,4 |
| 8-*L. casei* | 2,54 | 2,97 |
| 9-*L. casei* | 0,5 | 0,9 |
| 10-*L. casei* | 2,56 | 3,13 |
| 11-*L. casei* | 3 | 3,79 |
| 13-*L. casei* | 3,65 | 4,88 |
| 15-*L. casei* | 2,87 | 3,08 |
| 16-*L. casei* | 3,6 | 4,89 |
| 17-*L. casei* | 2 | 2,43 |
| 18-*L. casei* | 1,98 | 2,72 |
| 19-*L casei* | 3,6 | 5,14 |
| 20-*L. casei* | 39 | 5,66 |
| 23-*L. casei* | 3,9 | 5,45 |
| Примечание - p≤0,001 | | |

В результате исследования показатель уровня экспресии гена *ldh* меньше показателей РНК в норме. При воздействии холодового шока разрушается индукция данного гена (таблица 11???).

**Изучение экспрессии гена *aro* (Aromatic aminotransferase) культур *Lactobacillus* в норме и при воздействии холодового шока с применением Real-TimePCR.** Определение количественного анализа гена Aromatic aminotransferase *Lactobacillus casei* проводили с применением Real-Time PCR. В итоге уровень Aromatic aminotransferaseмРНК остался без изменении.

Таблица 8– уровень экспресии гена *aro* штаммов*Lactobacillus* в норме и при воздействии теплового шока

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Штаммы Lactobacillus casei | Уровень экспрессии гена *aro* | Уровень экспрессии гена *aro*при воздействии холодового шока |
| 2-*L.casei* | 3,40 | 3,14 |
| 3-*L.casei* | 2,36 | 2,65 |
| 4-*L.casei* | 2,56 | 2,32 |
| 5-*L.casei* | 3,596 | 3,87 |
| 6-*L.casei* | 3,49 | 3,46 |
| 7-*L.casei* | 3,45 | 3,22 |
| 8-*L.casei* | 2,97 | 3,11 |
| 9-*L.casei* | 2,12 | 3,96 |
| 10-*L.casei* | 4,12 | 3,89 |
| 11-*L.casei* | 2,37 | 2,84 |
| 13-*L.casei* | 5,11 | 5,1 |
| 15-*L.casei* | 2,11 | 2,55 |
| 16-*L.casei* | 4,24 | 4,01 |
| 17-*L.casei* | 1,24 | 1,33 |
| 18-*L.casei* | 2,36 | 2,45 |
| 19-*L.casei* | 5,69 | 5,23 |
| 20-*L.casei* | 5,1 | 5,35 |
| 23-*L.casei* | 4,99 | 5,01 |
| 24-*L.fermentum*ATCC 9338 | 2,33 | 2,1 |
| 26-*L.fermentum* | 1,34 | 1,65 |
| 27- *L.helveticus* | 5,23 | 5,14 |
| Примечание - p≤0,001 | | |

Как видно из таблицы 8 при холодовом шоке уровень экспрессии гена *aro* значительных изменеии не обнаружилив сравнении с уровнем экспресии гена в норме. Итак исследуемые культуры устойчивы к холодовому шоку.

ВЫВОДЫ

1. Описано 5 новых сиквенс -типов. Установлено, что метод мультилокусного сиквенс-типирования на основе анализа нуклеотидной последовательности генов домашнего хозяйства *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, *recG* обладает высокой дискриминационной способностью и позволяет дифференцировать близкородственные виды *Lactobacillus spp* с идентичностью до 100%.  На основе МЛСТ генов домашнего хозяйства доказана уникальность 18 штаммов *Lactobacillus casei*.

2. 18 штаммов *Lactobacillus casei* обладают выраженной резистентностью к стресс-факторам и проявляют высокие показатели адгезивной и кислотообразующей активности на фоне желчного, холодового и теплового стресс факторов:  на фоне желчного, теплового шоков скопление *eft* гена значительно больше чем у *mub* гена, а на фоне холодового шока можно увидить скопление *mub* гена, а показатель *eft* гена без изменении кислотообразующая активностьпо тернеру в среднем 200,15 после 5 часов инкубации культур при 37С, соответственно уровень экспрессии гена лактатдегидргеназы 2,2

3. Также, 18 штаммов *Lactobacillus casei,* обладают выраженной резистентностью к стресс-факторам и проявляют высокие показатели по генам экспрессии *aro* в норме и при воздействии теплового шока: максимальный показатель 5,115

**Список опубликованных работ по теме диссертации**

1. Мультилокусное сиквенс типирование пробиотических бактерий [Текст]/ Тыныбаева И.К. // Материалы международной научной конференции молодых ученых «Наука и образование — 2008» Астана, 2008.-с. 384–387.

2. Влияние низкомолекулярных метаболитов на показатели кислотообразую-щей активности Lactobacilluscasei [Текст] // Кулмамбетова Г.Н., Аликулов З.А., Кушугулова А.Р., Тыныбаева И.К. // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина. - г. Астана. - 2009. - №1(52). - C. 183-189.

3. Генотипирование *Lactobacillus casei* на основе анализа нуклеотидной последовательности GROEL, RPOB и RPLB[Текст] /Шевцов А.Б., Кушугулова А.Р., Кожахметов С.С., Тыныбаева И.К., Стоянова Л.Г. // Экология и промышленность России. РФ – 2010. – №9. – С. 38-41.

4. Identification of Phenotypically and Genotypically Related*Lactobacillus* Strains Based on Nucleotide Sequence Analysisof the *groEL, rpoB, rplB*, and *16S rRNA* Genes[Текст] /[A B Shevtsov](https://www.researchgate.net/researcher/71631003_A_B_Shevtsov), [A R Kushugulova](https://www.researchgate.net/researcher/28147235_A_R_Kushugulova), [I K Tynybaeva](https://www.researchgate.net/researcher/71289124_I_K_Tynybaeva), [S S Kozhakhmetov](https://www.researchgate.net/researcher/71563056_S_S_Kozhakhmetov), [A B Abzhalelov](https://www.researchgate.net/researcher/71656716_A_B_Abzhalelov), [K T Momynaliev](https://www.researchgate.net/researcher/71388201_K_T_Momynaliev), [L G Stoianova](https://www.researchgate.net/researcher/71596876_L_G_Stoianova),// Microbiology, RF. – 2011.- Vol. 80, No. 5, pp. 672–681.

5. Өт әсеріне *Lactobacillus spp.* бактерияларының резистенттілігін *in vitro* зерттеу[Текст] /Тыныбаева И.К.,Қушугулова А.Р., Муқанов Қ.Қ. // Исследователь-зерттеуші. Шымкент – 2010. - №7 (51) – с.7-12.

6.Стресс факторларының сүт қышқылды бактерияларына әсері [Текст] /Тыныбаева И.К.,Қушугулова А.Р., Шевцов А.Б., Муқанов Қ.Қ. // Исследователь-зерттеуші Шымкент–2010. - №7 (51) – с.12-20.

7. Определение полиморфизма гена *lipA* кодирующего липазу *Pseudomonas aeruginosa* [Текст] / Кожахметов С.С., Кирибаева А.К., Тыныбаева И.К., Алмагамбетов К.Х. *//* Астана медициналық журналы. - 2011. -№2 (64).–с. 134-137.

8.Экспрессия генов *Eft* и *Mub* культур*L.сasei* при воздействии желчного шока [Текст] // Тыныбаева И.К. / Известия НАН КР – 2012. - №2.-с.12

9. Изучение экспрессии гена *aro* (aromatic aminotransferase) в норме и при воздействии теплового шока с применением метода real-time pcr[Текст] // Тыныбаева И.К. // Известия НАН КР – 2012. - №2.-с.17

10.Разработка генетических методов систематики и оценка биоразнообразия Lactobacillus как ресурсосберегающего биотехнологического объекта[Текст] / Кушугулова А.Р.,Шевцов А.Б., Тыныбаева И.К., Кулмамбетова Г.Н., Рахимова С.Е., Раманкулов Е.М., Оралбаева. С.С., Кожахметов С.С., Куранов А.Б., Муканова А.У. // Материалы международной научной конференции «Астана Биотех 2008». - Астана, 2008 - С. 76.

11.Резистентность к холодовому шоку *lactobacillus*[Текст] / Тыныбаева И.К.// конференция Ломоносов-2011. -2011, с.-112

12. Скрининг лактобацилл в условиях стресса [Текст] /Тыныбаева И.К., Каирова М.Ж., Шайхин С.М. // конференция Ломоносов-2012.-2012, с.-219

13 Резистентность Lactobacillus spp. к желчному шоку [Текст]/ Тыныбаева И.К. //“Ломоносов-2010”.-2010, с.-329

14 The biodiversity of Lactobacillus spp by the method of molecular genetic analysis [Текст] /Kushugulova A.R., Shevcov A.B., Kuranov A.B., Zholdybaeva E.V., Seydalina A.B., Oralbaeva S.S., Kozhakhmetov S.S., Kulmambetova G.H., Rachimova S.E., Tynybaeva I.K., Ramankulov E.M // International congress EUROMEDICA.- Hannover, 4-5 June, 2009.- С.52

РЕЗЮМЕ

**Тыныбаева Индира Кажымухановна**

**Изучение резистентности *Lactobacillus spp.* на воздействие стрессовых факторов**

**диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**03.01.06 - биотехнология**

*Ключевые слова*: *Lactobacillus casei,* мультилокусное сиквенс типирование, желчный шок, тепловой шок, холодовой шок, ген.

*Объекты исследования:*18 штаммов *L.casei* выделенных из кумыса, айрана, шубата, и являющихся уникальными, что было подтверждено с использованием метода мультилокусного секвенс типирования(МЛСТ). В качестве сравнения использовались штаммы *L.fermentum*, *L.helveticus, L.casei, L.fermentum* ATCC 9338 из фонда Республиканской коллекции микроорганизмов Казахстана.

*Целью исследования* является изучение реакции *L.casei* на воздействие стрессовых факторов.

*Методы исследования:* Для достижения поставленной цели в работе были применены микробиологические, молекулярно-биологические методы. Математическую обработку результатов и графическое представление числовых экспериментальных данных осуществляли с помощью стандартного пакета статистических программ Microsoft office, Exсel и 0,6 версию программы Statistica.

*Полученные результаты и научная новизна:*Описано 5 новых сиквенс типов. На основе МЛСТ генов домашнего хозяйства доказана уникальность 18 (*fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, *recG*) штаммов *Lactobacillus casei*.  18 штаммов *Lactobacillus casei* обладают выраженной резистентностью к стресс-факторам и проявляют высокие показатели адгезивной и кислотообразующей активности на фоне желчного, холодового и теплового стресс факторов:  на фоне желчного, теплового шоков скопление *eft* гена значительно больше чем у *mub* гена, а на фоне холодового шока можно увидить скопление *mub* гена, а показатель *eft* гена без изменении кислотообразующая активностьпо тернеру в среднем  после 5 часов инкубации культур при 37С, соответственно уровень экспрессии гена лактатдегидргеназыТакже, 18 штаммов *Lactobacillus casei,* обладают выраженной резистентностью к стресс-факторам и проявляют высокие показатели по генам экспрессии *aro* в норме и при воздействии теплового шока: максимальный показатель Впервые,были определены ранее неизвестные сиквенс-типы, при идентификации бактерии *L.casei*. Это дало нам возможность охарактеризовать их как уникальных штаммов Казахстана. Изучены адгезивные свойства исследуемых культур, определена экспрессия их генов *mub* и *eft* в норме и при воздействии стресс факторов (желчный шок, холодовой шок, тепловой шок). Изучены пробиотические свойства исследуемых культур в норме и при воздействии стресс факторов (желчный шок, холодовой шок, тепловой шок).

*Практическая значимость:*Бактерии с высокой резистентностью к стресс факторам по результатам исследования, рекомендовать к использованию для приготовления полезных продуктов и пробиотических препаратов в производстве или для составления консорциума заквасок.Штаммы были переданы в национальный депозитарий Республики Казахстан.

*Область применения* – биотехнология.

**Тыныбаева Индира Кажымухановнын**

**“Стресс факторлорунун таасирине тийгизген *Lactobacillus spp.* резистенттигинизилдөө”деген темада биология илиминин кандидаты илимий даражага ээ болуу үчүн 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча жазган диссертациясына**

**КОРУТУНДУ**

*Түйүндү сөздөр*: *Lactobacilluscasei,* типтештирүүнүн мультилокустук сиквенси, өт шогу, жылуулук шок, муздактан шок, ген.

*Изилдөө объектиси:* Уникалдуулугу типтештирүүнүн мультилокустук секвенс ыкмасын (МЛСТ) колдонуу менен такталган кымыздан, айрандан, шубаттан бөлүнүп алынган *L.casei 18* штаммы изилдөөнүн объекттери болду. Казакстандын Микроорганизмдердин республикалык коллекциясынын фондунан алынган *L.fermentum*, *L.helveticus, L.casei, L.fermentum*ATCC 9338 штаммдары салыштыруу үчүн колдонулду.

*Изилдөөнүн максаты:*Стрессфакторлорунун таасирине *L.caseiдин* реакциясын изилдөө болуп саналат.

*Изилдөөыкмалары:* Коюлган максатка жетүү үчүн иште микробиологиялык, молекулярдык-биологиялык ыкмалар колдонулду. Жыйынтыктарды математикалык жактан иштеп чыгуу жана эксперименталдык сандык маалыматтарды графика түрүндө көрсөтүү Microsoft office, Exсel 0,6 (Statistica программасынын версиясы) статистикалык программаларынын стандарттык пакетинин жардамы менен жүргүзүлдү.

*Алынган жыйынтык жана илимий жаңылыгы:* жаңы сиквенс типтер сүрөттөлдү. Үй-чарбачылыгынын(*fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, *recG* ) гендерин типтештирүүнүн мультилокустук секвенс ыкмасынын негизинде *Lactobacillus casei*дин 18 штаммынын уникалдуулугу далилденген. *Lactobacillus caseiдин 18* штаммыстресс-факторлорго карата көрүнөө резистенттүүлүккө ээ жана өт, муздак жана жылуу стресс факторлорунун фонунда адгезивдик жана кычкылдык жаратуучу жигердүүлүктүн жогорку көрсөткүчтөрүн көрсөтөт: өт, жылуулук фонунда *eft* генинин топтолушу *mub* генине караганда бир кыйла көп, ал эми муздак шоктун фонунда *mub* генинин топтолушун көрүүгө болот, а *eft* генинин көрсөткүчтөрү өзгөрүүсүз калган. кычкылдык жаратуучу жигердүүлүгү тернер боюнча культураларды 370С температурада 5 саат инкубациялоодон кийин орто эсеп менен 200,15, демек лактатдегидргеназ генинин экспрессиясынын деңгээли 2,2Ошондой эле, *Lactobacillus caseiдин 18* штаммыстресс-факторлорго карата көрүнөө резистенттүүлүккө ээ жана жылуулук шок таасиринде да нормадагы *aro* экспрессиягендери боюнча жогору көрсөткүчтөрдү көрсөтүшөт: максималдуу көрсөткүч 5,115Биринчи жолу, *L.casei* бактериясын идентификациялоодо мурда белгисиз сиквенс-типтери аныкталган. Бул бизге аларды Казакстандын уникалдуу штаммдары катары мүнөздөөгө мүмкүндүк берди. Изилденип жаткан культуралардын адгезивдик касиеттери изилденди, алардын гендеринин экспрессиясы аныкталды, стресс факторлордун (өт шогу, муздак шок, жылуу шок) таасиринде да *mub* жана *eft* нормада.

*Практикалык мааниси:* Изилдөөнүн жыйынтыктары боюнча стресс факторлорго жогору резистентүү бактериялар пайдалуу азыктарды жана пробиотикалык препараттарды өндүрүштө даярдоо үчүн же уюткулардын консорциумун түзүү үчүн колдонууга сунушталсын. Штаммдар КР улуттук депозиториине өткөрүлүп берилди.

*Колдонуу тармагы* – биотехнология.

RESUME

**Tynybayeva Indira Kazhymukhanovna**

**Study of resistance for Lactobacillus spp. on   impact to stress factors**

**The dissertation for seeking the degree of Candidate of BiologySciences**

**03.01.06 – biotechnology**

*Keywords:Lactobacillus casei,* multilocus sequence typing, bile shock, heat shock, cold shock, gene.

*Objects:* 18 strains *L.casei* isolated from kumys, ayran, shubat and are unique, which was confirmed using the multilocus Sequence Typing (MLST). As a comparison used strains L.fermentum, L.helveticus, L.casei, L.fermentum ATCC 9338 from Republican Fund of Kazakhstan collection of microorganisms.

*The aim:* to study reaction *L.casei* the effect of stressors.

*Methods:*To achieve this goal in the work were applied microbiological, molecular biological methods. Mathematical treatment of the results of numerical and graphical representation of the experimental data was performed using a standard statistical software package Microsoft office, Exel and 0.6 version of the program Statistica.

*Results and novelty of study:*Described 5 a new Sequence types. Found that the method of multilocus typing Sequence based analysis of the nucleotide sequence of housekeeping genes *fusA, ileS, lepA, leuS, pyrG, recA, recG,* has a high discriminatory power and allows us to differentiate closely related species Lactobacillus spp with 100% identity. On the basis of MLST housekeeping genes proved uniqueness 18 strains of Lactobacillus casei. 18 strains of *Lactobacillus casei* have expressed resistance to stressors and exhibit high performance adhesive and acid-forming activity in gall, cold and heat stress factors: on the gall and thermal stress eft gene cluster significantly more than the mub gene, and on the cold shock can we see cluster of mub gene, and eft indicator gene without changing. Acid-forming activity Turner averaged 200,15after 5 hours of incubation at 37 °C respectively cultures *LDH* gene expression 2,2Also, 18 strains of *Lactobacillus casei*, have expressed resistance to stressors and exhibit high levels of expression of genes aro in normal and when exposed to heat shock: the maximum rate of 5,115Firstly, have been identified previously unknown sequence-types when identifying bacteria L.casei. This enabled us to characterize them as unique strains of Kazakhstan. Studied the adhesive properties of the strains and determined their gene expression mub, eft in norm and under the influence of stress factors (bile shock, cold shock, heat shock). Studied probiotic properties of strains in normal and exposure to stress factors (bile shock, cold shock, heat shock).

*Practiceal significance:*Bacteria with high resistance to stress factors of the study, recommend to use for cooking healthy foods and probiotics in the manufacture or preparation of a consortium starters. Strains were transferred to the National Depository of Kazakhstan.

*Scope* - biotechnology.