

Амирханова Жанерке Талгатқызы

Лактобактериялардың биологиялық қасиеттеріне тағамдық талшықтардың әсерін зерттеу

«6D060700 – Биология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесіне іздену үшін ұсынылған диссертациясына

АННОТАЦИЯ

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Қазіргі уақытта Қазақстан нарығында денсаулыққа пайдасы туралы мәлімделген биологиялық қасиеттері бойынша белсенді сүтқышқылды бактериялар штаммдары мен тағамдық талшықтар қосылған отандық және шетелдік сүтқышқылды өнімдері мен пробиотиктердің саны көп. Синбиотикалық препараттар мен функционалды тамақ өнімдерінің тиімділігі ең алдымен олардың құрамына кіретін сүтқышқылды бактерияларының әртүрлі штаммдарының биологиялық қасиеттеріне байланысты. Мұндай өнімдер мен препараттарға арналған бастапқы дақылдардың негізгі құрамдас бөліктерінің бірі сүтқышқылды таяқшалар (лактобацилла) мен макроорганизмге нақты оң әсері дәлелденген және ас қорыту жолдарының қалыпты микрофлорасының санын және оның биологиялық белсенділігін арттыратын пребиотикалық заттар болып табылады.

Сүтқышқылды таяқшалар адамдардың шырышты қабығының қалыпты микробиотасының басқа өкілдерімен бірге ағзаны инфекцияға қарсы қорғауда және макроорганизмнің колонизацияға төзімділігін қалыптастыруда шешуші рөл атқарады. Заманауи биомедициналық тәжірибеде оларды дербестендірілген медицина әдістері ретінде қолдануға болады, сүтқышқылды таяқшалардың пробиотикалық дақылдары науқастың патогендік микрофлорасына қарсы антимикробтық белсенділікті көрсетеді, антагонизм процесін ынталандырады және патогенді микроорганизмдер олардың өсімін тежемейді. Сонымен қатар, сүтқышқылды таяқшаларының пайдалы қасиеттері олардың биоүлбір қалыптастыру қабілеті болып табылады, бұл олардың қоршаған орта жағдайларына төтеп беруге мүмкіндік береді және олардың популяциясының колонизациялануына және сақталуына әкеледі. Заманауи түсініктерге сәйкес, биоүлбір деп бір-бірімен беткі қабатпен бекінген және олар синтездеген жасушадан тыс полимерлі заттардан (полисахаридтер мен ақуыздардан) тұратын матрицаға бекітілген микроорганизмдер қауымдастығын айтады. Сүтқышқылды таяқшалар сияқты пробиотикалық бактериялардың биоүлбір түзуі пайдалы қасиет болып саналады, өйткені ол патогенді бактериялардың колонизациясын болдырмай, жасуша-иесінің шырышты қабатында колонизациялануына және ұзақ сақталуына ықпал етеді.

Лактобактериялар түзетін биоүлбірдің қорғаныштық қызметінің ғылыми негізделген феномені Қазақстан Республикасы үшін басым болып табылады, себебі медицина, фармацевтика, тамақ және ауыл шаруашылығы салаларында пайдалануының келешегі зор.

Осыған байланысты, қолдан дәстүрлі тәсілмен өндірілген табиғи сүтқышқылды этноөнімдерден отандық бәсекеге қабілетті бастапқы дақылдарды іздеу, бөліп алу және оның пробиотикалық қасиеттерін зерттеу нәтижелі, себебі бұл зерттеулер микроағзалар коллекциясындағы микробиологиялық ресурстардың сапасын арттыру мақсатында, елдің қажеттіліктері үшін дақылдар штаммдарының тұрақты көзі ретінде пробиотикалық дақылдардың табиғи генетикалық төзімді штаммдарын алудың тиімді жолы болып табылады.

Синбиотикалық препараттарды және сүтқышқылды өнімдерін өндіру кезінде бастапқы дақылдардың өсуіне, көбеюіне және биологиялық қасиеттеріне пребиотикалық заттардың әсерін ескеру қажет. Қазіргі уақытта бастапқы дақылдар мен пребиотикалық заттарды таңдау негізінен эмпирикалық жолмен жүзеге асырылады, оның негізінде жылдар бойы жинақталған тәжірибе жатыр.

Осыған байланысты, генетикалық төзімді, отандық бәсекеге қабілетті бастапқы дақылдардың оның ішінде пребиотикалық субстанциялардың олардың биологиялық қасиеттеріне әсерін зерттеу өзекті және осы диссертацияны жоспарлау мен жүзеге асыруда зерттеудің басымдықтарын анықтады.

Зерттеу мақсаты – тағамдық талшықтардың лактобактериялардың биологиялық қасиеттеріне әсерін зерттеу (*in vitro*).

Мақсатқа жету үшін келесі міндеттер қарастырылды:

1. Қарағанды облысының әртүрлі аймақтарынан қолдан дәстүрлі тәсілмен өндірілген сүтқышқылды этноөнімдерден сүтқышқылды таяқшалардың таза дақылдарын бөліп алу және идентификациялау, экзополисахаридтерді синтездеуге қабілетті сүтқышқылды таяқшаларының изоляттарын іріктеу.

2. Сүтқышқылды таяқшалардың биоүлбір қалыптастыру қабілетін, микробқа қарсы белсенділік спектрін бағалау және лазерлік түсіру микродиссекциясы арқылы биоүлбірдегі лактобактерия жасушаларының морфологиясын зерттеу.

3. Еритін және ерімейтін тағамдық талшықтардың лактобацилла изоляттарының өсуіне әсерін зерттеу, еритін және ерімейтін тағамдық талшықтар қосылған қоректік ортада сақталған лактобацилла изоляттарының тіршілікке қабілеттілігін анықтау.

4. Лактобацилла изоляттарының адгезиялық қасиеттерін анықтау. Сүтқышқылды таяқшалардың ортаның төмен рН мәндеріне төзімділігін бағалау.

5. Атомды-күштік микроскопия көмегімен микродақылдандыру әдісін қолдану арқылы модификацияланған қоректік ортада сүтқышқылды лактобациллалардың биоүлбір түзетін қасиеттерін зерттеу.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Қарағанды облысының әртүрлі аймақтарынан қолдан дәстүрлі тәсілмен өндірілген сүтқышқылды этноөнімдерден экзополисахаридтерді синтездейтін, отандық бәсекеге қабілетті сүтқышқылды таяқшалардың бастапқы дақылдарының топтамасы құрылды.

Алғаш рет лазерлік түсіру микродисекция әдісі сүтқышқылды таяқшалардың биоүлбір түзу қасиеттерін зерттеу үшін қолданылды.

Сүтқышқылды таяқшаларының адгезиялық қасиеттеріне еритін және ерімейтін тағамдық талшықтардың әсері туралы жаңа тәжірибелік мәліметтер алынды: инулиннің әсері – МАИ $14,2 \pm 0,39$, пектиннің әсері- МАИ $13,1 \pm 0,43$, зығыр клетчаткасының әсері- МАИ $19,4 \pm 0,37$, зығыр тұқымының әсері МАИ - $17,5 \pm 0,27$.

Ерімейтін тағамдық талшыққа микроорганизмдердің адгезиялану индексінің (МАИ) жоғарғы көрсеткішін көрсеткен *Lh13* изолятының жасушалары зығыр клетчаткасына аутоагрегациялануы (жасушаның шоғыр (агрегаттар) түзу қабілеті) және зығыр тұқымына когезиялануы (жасуша жабысуы) байқалды, бұл құбылыс лазерлік микродисекция әдісі арқылы алынған суреттерде дәлелденді. Агрегация және когезия биоүлбірдің қалыптасуын ынталандырады.

Атомды-күштік микроскопты қолдана отырып, алғаш рет тағамдық талшық қосылған модификацияланған ортада дақылдандырылған биоүлбір беткейінің бұдырлығының айырмашылығы анықталды.

Нәтижелердің теориялық және практикалық маңыздылығы

Жүргізілген зерттеулердің нәтижелері теориялық және эксперименттік маңыздылығын растайды, экзополисахарид түзетін лактобактерияларды анықтай отырып, белсенді биологиялық қасиеттері бар изоляттардың коллекциясы құрылды (*Авторлық құқықпен қорғалатын объектілерге құқықтардың мемлекеттік тізілімге мәліметтерді енгізу туралы куәлік №8863 17 наурыз 2020 ж., оқу процесіне енгізілді (оқу процесіне енгізу актісі, Қосымша 2)*): микробқа қарсы белсенділік спектрі, қоректік ортаның төмен рН мәндеріне сүтқышқылды таяқшаларының төзімділігі, биоүлбір түзуші белсенділік, адгезиялық қасиеттерге тағамдық талшықтардың әсері анықталды.

Алынған нәтижелер микробиологияның, сондай-ақ тәжірибелік, тағамдық және ветеринарлық микробиологияның дамуы үшін маңызды, сүтқышқылды таяқшаларын кең практикалық қолдану мен одан әрі зерттеудің келешегін ашады.

КеАҚ академик Е.А. Бөкетов атындағы Қарағанды университетіндегі биология-география факультетінің және КеАҚ Қарағанды медицина университетіндегі биомедицина кафедрасының микроорганизмдер коллекциясы 34 сүтқышқылды таяқшалар изолятымен толықтырылды: *Lactobacillus helveticus* түрінің алты изоляты (*Lh-13, Lh-14, Lh-15, Lh-17, Lh-20, Lh-22*), *Lacticaseibacillus rhamnosus* түрінің жеті изоляты (*Lrh-1, Lrh-1/1, Lrh-2э, Lrh-3э, Lrh-24, Lrh-39, Lrh-40*), *Lactiplantibacillus plantarum* түрінің үш изоляты (*Lpl-2/1, Lpl-5, Lpl-89*), *Lacticaseibacillus paracasei* түрінің он изоляты (*Lpc-4, Lpc-5/1, Lpc-28, Lpc-32, Lpc-34, Lpc-35, Lpc-36, Lpc-38, Lpc-37, Lpc-48*), *Limosilactobacillus fermentum* түрінің үш изоляты (*Lf-18, Lf-38/1, Lf -81*), *Lactobacillus acidophilus* түрінің үш изоляты (*Lac-50, Lac-52, Lac-79*), *Lactobacillus delbrueckii* түрінің екі изоляты (*Lacd-53, Lacd-54*).

Алынған деректердің негізінде пробиотикалық дақылдар атласы құрылды *Авторлық құқықпен қорғалатын объектілерге құқықтардың мемлекеттік*

тізілімге мәліметтерді енгізу туралы куәлік №30964 9 желтоқса 2022 ж.), зерттеу нәтижелері өндіріске енгізілді ЖСШ «Нәтиже» Сүт Фабрикасы» (өндіріске енгізу актісі Қосымша 3).

Сүтқышқылды таяқшаларының коллекциялық дақылдарын тағамдық талшықтармен толықтырылған ферментативтік ортада сақтаудың жаңа тәсілі ұсынылды (Авторлық құқықпен қорғалатын объектілерге құқықтардың мемлекеттік тізілімге мәліметтерді енгізу туралы куәлік №35559 11 мамыр 2023 ж.).

Зерттеуді орындау барысында лактобактерия морфологиясын және олардың биоөлбір түзуші қасиеттерін лазерлік түсіру микродиссекцияда зерттеу кезінде сынама дайындаудың жаңа тәсілі әзірленді (Авторлық құқықпен қорғалатын объектілерге құқықтардың мемлекеттік тізілімге мәліметтерді енгізу туралы куәлік №23592 14 ақпан 2022 ж., КеАҚ «ҚМУ» биомедицина кафедрасының оқу процесіне енгізілді (оқу процесіне енгізу актісі Қосымша 2), пайдалы модель патенті N 8042 05.05.23 ж.).

Зерттеу объектісі. Зерттеу жұмысында Қарағанды облысының әртүрлі аймақтарынан қолдан дәстүрлі тәсілмен өндірілген сүтқышқылды өнімдерден бөлініп алынған сүтқышқылды таяқшалар атауы (кесте 2.1 № 1-7), эталонды/бақылау штаммдар (Кесте 2.1. № 8-10) атауы, АТСС (*American Type Culture Collection*) американдық типтік коллекциялық штаммдар (Кесте 2. № 1-4) атауы, коммерциялық тағамдық талшықтар (кесте 2.3) қолданылды.

Кесте 2.1 - Зерттеу нысаны

№	Микроағзаның атауы	Изолятты бөліп алу көзі
1	<i>Lactobacillus helveticus</i> (6 изолят)	Қолдан дәстүрлі тәсілмен өндірілген сүтқышқылды этноөнімдер
2	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (7 изолят)	
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (3 изолят)	
4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (10 изолят)	
5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (3 изолят)	
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (3 изолят)	
7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (2 изолят)	
8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> V300	Ұлттық биоресурстық орталығы Бүкілресейлік өнеркәсіптік микроорганизмдер жинағы – «Курчатов институты» ҒЗО
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
10	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 86	

Кесте 2.2 - Тест-штаммдар

№	Микроағзаның атауы	Микробиом зертханасы, Өмір туралы ғылымдар орталығы, "National Laboratory Astana" ЖМ, Назарбаев университеті
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Микробиом зертханасы, Өмір туралы ғылымдар орталығы, "National Laboratory Astana" ЖМ, Назарбаев университеті
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
3	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	
4	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	

Кесте 2.3 - Тағамдық талшықтар

Атауы	Техникалық шарттары
Инулин	ТШ 9164-030-00493534-2007
Пектин	ТШ 10.963.2.27
Зығыр клетчаткасы	ТШ 19009841.005-2011
Зығыр тұқымы	ТШ 9198-130-80324188-15

Зерттеу әдістері

Микробиологиялық зерттеу әдістері:

- зерттелген үлгілерден сынама алу, сүтқышқылды таяқшаларының таза дақылын бөліп алу, морфологиялық қасиеттерін зерттеу (сериялық сұйылту әдісі, Грам әдісімен бояу, сәулелі микроскопия);
- сүтқышқылды таяқшалардың дақылдық (бактериологиялық әдіс) және биохимиялық қасиеттерін зерттеу (сахаролитикалық қасиетін анықтау, каталазаға тест, қышқыл түзу қасиетін анықтау);
- *MALDI-TOF* масс-спектрометрия әдісі арқылы бөліп алынған сүтқышқылды таяқшаларды идентификациялау;
- экзополисахарид түзетін сүтқышқылды таяқшаларды анықтауға тест қою.
- полистирол планшетінде лактобактерия изоляттарының биоүлбір қалыптастыру қасиеттерін зерттеу (*O'Toole әдісі, зертханалық робот TecanEVolizer100 (Tecan)*);
- лазерлік түсіру микродиссекциясы көмегімен биоүлбір құрамындағы лактобактериялардың морфологиялық қасиетін зерттеу;
- бөлініп алынған лактобактерия изоляттарының қоректік ортаның төмен рН көрсеткіштеріне төзімділігін анықтау;
- антимикробтық белсенділік спектрін анықтау (қайтымсыз антагонизм әдісі);
- 1,5% инулиннің, 1% пектиннің, 15% зығыр клетчаткасының, 10% зығыр тұқымының сүтқышқылды изоляттарының көбею қарқындылығына әсері (бактериологиялық әдіс, тағамдық талшықтар қосылған қоректік ортада дақылдандыру);
- тағамдық талшықтар қосылған ферментативтік ортада сақталған сүтқышқылды таяқша дақылдарының тіршілікке қабілеттілігін зерттеу (Кох әдісі);
- адгезиялық белсенділігін анықтау (буккальді эпителиоциттерді қолдану);
- атомды-күштік микроскоп көмегімен микродақылдандыру әдісін қолдану арқылы модификацияланған қоректік ортада сүтқышқылды лактобациллалардың биоүлбір түзетін қасиеттерін зерттеу.

Статистикалық талдау: Зерттеуден алынған мәліметтерді өңдеу MS Offis Excel 2010 және Statistica версия 8.0. бағдарламасы арқылы жүзеге асты. Нәтижелер орташа арифметикалық және оның стандартты қателігі ($M \pm m$) түрінде ұсынылған. Бақылау мен үлгілер арасындағы әртүрлі мәндерді талдау

үшін Стьюденттің t-критерийі қолданылды, айырмашылықтар $p < 0,05$ кезінде статистикалық маңызды деп саналды. Зерттеудің деректерін статистикалық өңдеу және оларды интерпритациялау үшін Пирсонның корреляция коэффициенті, Спирменнің рангтік корреляциясы, Даннет критерийі, регрессия теңдеуі қолданылды.

Қорғауға шығарылатын негізгі жағдайлар

1. Сүтқышқылды этноөнімдерден 34 (100%) сүтқышқылды таяқшаларының изоляттары бөлініп алынды, ақуыз профильдерін масс-спектрометриялық талдау әдісі арқылы сүтқышқылды таяқшаларының түрлері анықталды: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*. Экзополисахарид синтездеу қабілетін фенотиптік түрде растайтын лактобациллаларға скрининг жүргізілді.

2. Сүтқышқылды таяқшалардың биоүлбір түзетін қабілеттері және олардың тест-штамдарға қарсы антагонизмі анықталды. Биоүлбірдегі лактобактериялардың микро- және макроколонияларының морфологиясы алғаш рет лазерлік түсіру микродисекцияда зерттелді.

3. Сүтқышқылды дақылдарды бір ай қоректік ортада сақтау кезінде "өзін-өзі сақтау" процесі функциясын ерімейтін тағамдық талшықтар орындайды, бұл дақылдандыру тәжірибелерінде дәлелденді, еритін (инулин, пектин) және ерімейтін тағамдық талшықтарға (зығыр талшықтары, зығыр тұқымдары) сүтқышқылды изоляттардың талғамалы әсері бар екені байқалды. Тағамдық талшықтар қоректік ортаның құрамына қосылған кезде сүтқышқылды дақылдардың сақталу мерзімі ұзартылатыны анықталды.

4. Сүтқышқылды таяқшалардың буккальді эпителиоциттерге адгезиялық қасиеттері айқындалды. Агрегация және когезия процестері сүтқышқылды таяқшалардың метаболизміне әсер етеді және оларды қоректік ортаның төменгі рН мәндеріне төзімділігін арттырады.

5. Атомды-күштік микроскопындағы зерттеулер 15% зығыр талшығы қосылған модификацияланған ортада дақылдандырылған және зығыр талшығы қосылмаған ортада дақылдандырылған биоүлбірдегі лактобактерия жасушаларының кедір-бұдырлығы әртүрлі болатындығын көрсетті, бұл биоүлбірдің қалыптасу барысындағы қалыңдығына байланысты (биоүлбірдің қалыңдығы (нм) неғұрлым үлкен болса, соғұрлым кедір-бұдыр болады).

Қорғауға ұсынылған ғылыми жұмыстың жасалуына диссертанттың қосқан жеке үлесі. Диссертант диссертациялық зерттеу жұмысының барлық кезеңдерінде қатысты: тақырып бойынша әдебиетке шолу, зерттеу объектісін таңдау, зерттеу дизайнын жасау, сынама алу, тасымалдау, зертханада микробиологиялық зерттеулер жүргізу, алынған нәтижелерді талдау, оларды интерпритациялау, статистикалық өңдеу, алынған нәтижелерді қорытындылау, тұжырымдау. Басылымдарға материалдарды дайындау, жазу және өңдеу. Автордың жұмысқа қосқан жеке үлесі 90%.

Диссертацияның құрылымы мен көлемі. Диссертациялық жұмыс 147 мәтіндік бетте жазылды, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды, 272 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады, құрамында 23 сурет, 20 кесте және 5 қосымша бар.

Жұмысты апробациялау және жарияланымдар. Диссертациялық жұмыстың негізгі мазмұны баспадан шыққан 9 ғылыми еңбектерде көрсетілген, соның ішінде 2 мақала Scopus базасындағы халықаралық журналда; 3 мақала ҚР Ғылым және жоғары білім министрлігінің ғылым және жоғарғы білім саласын бақылау комитеті ұсынған басылымдарда; 1 мақала ҚР Президенті Іс Басқармасының Медициналық орталығының хабаршысы (2019 ж) басылымында; 3 мақала халықаралық ғылыми-практикалық конференцияда жарияланды: «Биология мен экологияның өзекті мәселелері» (Қарағанды 2018 ж.), «Ғылым, білім және өндіріс интеграциясы - ұлттық жоспарды жүзеге асырудың негізі» (Қарағанды, 2019 ж); «Фараби әлемі» (Алматы, 2020 ж.) және зерттеу нәтижелері бойынша 2 әдістемелік нұсқаулық қазақ, орыс тілінде жарық көрді және 2 оқу процесіне енгізу актісі (КеАҚ «ҚМУ» биомедицина кафедрасының оқу процесіне және КеАҚ академик Е.А. Бөкетов атындағы Қарағанды университетінің зоология кафедрасында) енгізілді, 1 өндіріске енгізу актісі (ЖСШ «Нәтиже» Сүт Фабрикасы»), 4 авторлық құқықпен қорғалатын объектілерге құқықтардың мемлекеттік тізілімге мәліметтерді енгізу туралы куәлік, 1 пайдалы модель патенті.