

## BİOLOGİYA

УДК 517.63

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ БЕЛКОВ  
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙС.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ, Н.А.АБДУЛЛАЕВА,  
Н.Ф.АБДУЛЛАЕВА, А.А.КУЛИЕВ*Бакинский Государственный Университет*  
*sahib66@rambler.ru*

*Методом электрофореза изучены периферические белки разных видов молочнокислых бактерий, идентифицированных на основе их морфо-физиологических и биохимических признаков. Показано, что набор периферических белков каждого отдельного вида имеет индивидуальный характер и коренным образом отличается от таковой других видов. Обсуждается возможность применения этих показателей для упрощения трудоемких процедур идентификации микроорганизмов.*

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, периферические белки, идентификация

Молочнокислые бактерии (МКБ) обладают широким спектром биологической активности. Будучи пробиотиками они являются важным компонентом резидентной микробиоты человека и животных, обладают антагонистической активностью против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также в отношении родственных штаммов и других видов, снижают содержание холестерина в крови, синтезируют витамины и другие биологически активные субстанции, играют незаменимую роль при формировании кисломолочных и ферментированных мясных, рыбных и растительных продуктов [1-2, 4-7].

Идентификация МКБ является неотъемлемой частью микробиологических исследований. Она является очень трудоемкой работой и, в зависимости от цели идентификации микроорганизмов на уровне рода или вида, включает в себе различные физические (микроскопирование), биохимические (окрашивание по Грамму, слежение за сбраживанием суб-

стратов и образованием пигмента), физиологические (слежение за ростом при различных экстремальных условиях) и молекулярные (выделение и очистка ДНК, рестрикция ее на фрагменты и их амплификация, секвенция продуктов амплификации и т.д.) манипуляции [3, 9].

Целью настоящих исследований явилась сравнительное электрофоретическое исследование периферических белков разных видов молочнокислых бактерий, идентифицированных на основе их морфо-физиологических и биохимических признаков.

### **Экспериментальная часть**

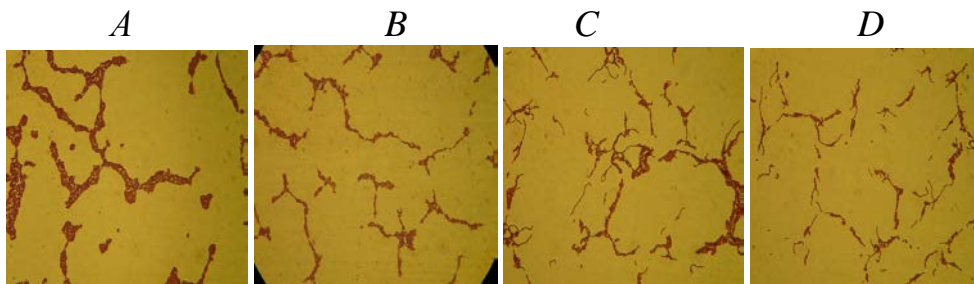
*Изолирование и идентификация МКБ.* МКБ изолировали из двух образцов сыра домашнего изготовления. Первый образец был приобретен из пос. Говсаны. Из этого образца изолировали три бактериоциногенного штамма - BN ATS5w, BN ATS7w, BN ATS 8w. Из второго, Шекинского образца сыра мы изолировали штамм FAZ16m.

Идентификацию выделенных культур осуществляли по ранее описанной методике [8]. Морфофизиологические и биохимические признаки активных штаммов установлены на основе методических указаний Sharpe [9].

*Сбор и электрофорез экстраполярных белков.* В стерильных условиях штаммы были засеяны на МРС-агаре и были культивированы в течение 48 ч в термостате при 37<sup>0</sup>С. Для очистки клеток от примесей образовавшиеся колонии собирали в пробирку с 10 мл фосфатным буфером (1.5M, pH7.0), их размешивали и отделяли в центрифуге при 4000g/ 10 мин. Эту процедуру повторяли трижды. Собранные клетки перенесли в 5 мл того же буфера с добавлением 1M KCl. После двухчасовой инкубации, с целью отделения клеток, суспензию центрифугировали при 4000g/ 10 мин. Осадок выбрасывали. Собранные белки были концентрированы в 10 раз. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле с концентрацией акриламида 16.5%. В качестве белков-стандартов использовали маркерные белки с низкими молекулярными массами (от 1.06 до 26.60 кДа) (Sigma). Сила тока в крупнопористом геле составила 10мА, а мелкопористом - 20 мА.

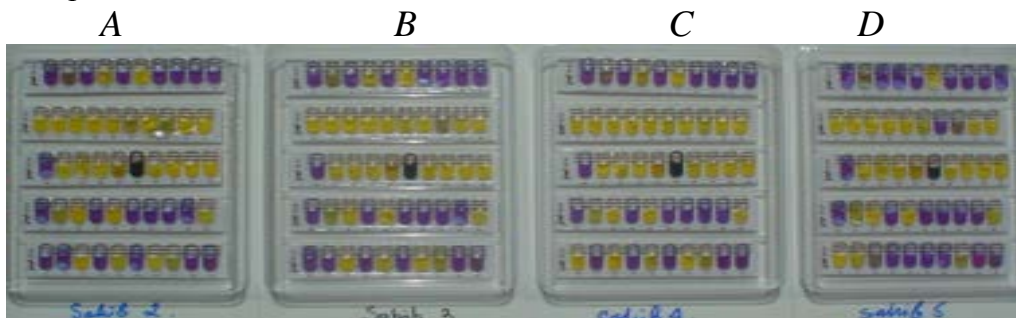
### **Результаты и их обсуждение**

Микроскопирование изолированных штаммов выявило, что они имеют палочковидную форму (рис.1). Бациллы оказались грамположительными, каталазо-отрицательными и неподвижными бактериями. Они не образовали спор. Будучи факультативными анаэробами, все изолированные штаммы росли при температуре 15, 30, 37 и 45<sup>0</sup>С. Перечисленные фенотипические признаки изолированных штаммов свидетельствуют о том, что они относятся к роду *Lactobacillus*.



**Рис.1.** Фотография активных штаммов лактобацилл, изолированных из сырных образцов Азербайджана. А, В и С – BN ATS 5w, BN ATS 7w и BN ATS 8w, соответственно. D – FAZ16m

Для дальнейшей идентификации изолированных МКБ уже на видовом уровне мы использовали метод «API-теста». Результаты отражены на рис. 2. Из этого рисунка видно, что перечень сбраживаемых субстратов первых трех штаммов (А, В и С) являются идентичными и не отличается друг от друга. На четвертом изображении, которое соответствует штамму D, на втором и пятом ряду отчетливо видно различия от предыдущих трех изображений.

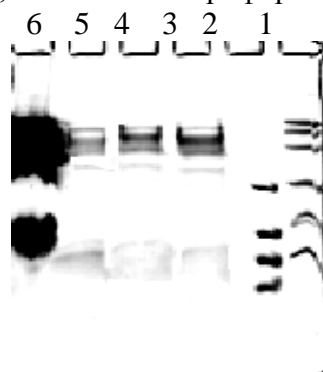


**Рис.2.** Результаты API - теста для фенотипической идентификации штаммов лактобацилл, изолированных из азербайджанских кисломолочных продуктов. А, В и С – BN ATS 5w, BN ATS 7w и BN ATS 8w, соответственно. D – FAZ16m

По вышеперечисленным фенотипическим признакам и результатам «API-теста», штаммы BN ATS 5w, BN ATS 7w и BN ATS 8w идентифицировались как *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei*, а штамм FAZ 16m - *Lactobacillus rhamnosus*.

Для уточнения полученных результатов идентификации на видовом уровне, с помощью ионной силы хлористого калия (1М) мы собирали электрополярных белков клеточной мембраны этих штаммов и анализировали их методом электрофореза. Зимограммы этих анализов отражены на рис. 3. Как видно из этого рисунка состав белковых фракций штаммов – *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w, BN ATS 7w и BN ATS 8w оказались идентичными и существенно отличались от таковой другого

штамма - *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m. Отличие выражается как в составе белковых фракций, так и их электрофоретической подвижности.



**Рис.3.** Зимограмма периферических белков, локализованных на внешней стороне клеточной мембраны активных лактобацилл, изолированных из кисломолочных продуктов Азербайджана. 1 и 2 – маркерные белки, 2,3,4 – белки штаммов *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w, BN ATS 7w и BN ATS 8w, соответственно, 6 – белки штамма *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m

Таким образом, электрофоретические исследования такого рода могут дать дополнительные информации на молекулярном уровне для уточнения результатов фенотипической идентификации изученных микроорганизмов. С помощью таких анализов возможно найти белковых маркеров, характерных для каждого вида и значительно упростить процесс идентификации в целом. Необходимо отметить, что такой подход к решению проблем данного типа применяется впервые. Для окончательного подтверждения правдивости данной гипотезы и применения их в конкретных целях требуется много дополнительных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975, 359 с.
2. Хавкин А.И. Молочнокислые бактерии и здоровье ребёнка. Московский НИИ педиатрии и детской хирургии // Частные вопросы педиатрии, 2007, т. 9, № 1, с. 4-24
3. Axelsson L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology // In: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd Rev. and Exp. Ed., New York: Marcel Dekker Inc., 2004, p.1-66
4. Aymerich M. A review: Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Associated with Meat Products // J. Food Science and Technology International, 1998, v. 4, № 3, p. 141-158
5. Benno Y., He F., Hosoda M. et al. Effects of *Lactobacillus* GG Yogurt on Human Intestinal Microecology in Japanese Subjects // Nutrition Today, 1996, v.31, p.9-11
6. Blom H., Mortvedt C. Anti-Microbial Substances Produced by food Associated Microorganisms // Biochemical Society Transactions, 1991, v.19, p.694-698
7. Caplice E., Fitzgerald G. Food Fermentation: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation // International Journal of Food Microbiology, 1999, v.50, p.131-149
8. Gulahmadov S., Batdorj B., Dalgalarondo M. et al. Characterization of Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) from Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Azer-

- baijani Dairy Products // Europe Food Rec. Techn. Springer Verlag, 2006, №224, p.338-345
9. Sharpe M., Fryer T., Smith D. In "Identification Methods for Microbiologists" Part A.B.M. Gibbs, F.A. Skinner (Eds). New-York, Acad. Press. 1996, 419 p.

## **SÜD TURŞUSU BAKTERİYALARININ İDENTİFİKASİYASI ÜÇÜN PERİFERİK ZÜLALLARIN MÜQAYİSƏLİ TƏDQIQI**

**S.Q.GÜLƏHMƏDOV, N.A.ABDULLAYEVA,  
N.F.ABDULLAYEVA, A.Ə.QULİYEV**

### **XÜLASƏ**

Morfo-fizioloji və biokimyəvi əlamətlərinə görə identifikasiya edilmiş müxtəlif növ süd turşusu bakteriyalarının ekstrapolyar periferik zülallarının elektroforetik tədqiqi həyata keçirilmişdir. Göstərilmişdir ki, hər bir fərdi növ üçün məxsusi periferik zülal dəsti mövcuddur və bu dəst digər növlərin analoji dəstindən köklü surətdə fərqlənir. Bu göstəricilərin mikroorqanizmlərin identifikasiyası kimi uzun və yorucu prosedurların sadələşdirilməsi üçün istifadəsinin mümkünlüyü müzakirə edilir.

**Açar sözlər:** süd turşusu bakteriyası, periferik zülallar, identifikasiya

## **COMPARATIVE STUDY OF THE PERIPHERAL PROTEINS FOR THE IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA**

**S.G.GULAHMADOV, N.A.ABDULLAYEVA,  
N.F.ABDULLAYEVA, A.A.GULİYEV**

### **SUMMARY**

The peripheral proteins of different species of lactic acid bacteria, identified on the basis of their morphological, physiological and biochemical characteristics were studied by the method of electrophoresis. It was shown that the set of peripheral proteins of each type has its own unique character and is fundamentally different from that of other species. The possibility of using these parameters to simplify time-consuming procedures for the identification of microorganisms was discussed.

**Key words:** lactic acid bacteria, peripheral proteins, identification

*Поступила в редакцию: 20.10.2014 г.*

*Подписано к печати: 05.11.2014 г.*