

ХООРМОГНООС ЯЛГАСАН СҮҮНХҮЧЛИЙН БАКТЕРИЙН УУРАГ ЗАДЛАХ ИДЭВХИЙН СУДАЛГАА

Э.Ууганцэцэг^{1*}, Б. Батжаргал², Б. Очирхуяг²

1-Мал аж ахуй, биотехнологийн сургууль, ХААИС,
2-Байгалийн Ухааны салбар, МУИС,

*Email: uerdenebold@mul.s.edu.mn

ХУРААНГУЙ:

Уламжлалт аргаар бэлтгэсэн ингэний хоормогны 25 дээжнээс сүүнхүчлийн бактерийн 112 цэвэр өсгөвөр ялган тэдгээрийн уураг задлах идэвхийг судлан тогтоолоо. Сүүнхүчлийн бактериас ялгарах уураг задлагч ферментүүдийн үйлчлэлээр шингэн сүүнд явагдах уургийн задралын дүнд үүсч буй NH_2 бүлгийн ОРА (o-phthaldialdehyde) урвалжтай өгөх өнгөт нэгдлийн гэрлийн шингээлтийн эрчимийг 340 нм-т хэмжих замаар ялгасан өсгөврүүдийн уураг задлах идэвхийг тодорхойлсон. Ялгасан өсгөврүүдийн 33 нь буюу 29.46% нь уураг задлах идэвх үзүүлсэний 18 нь буюу 16% нь уураг задлах идэвх өндөртэй гарсан. Эдгээр 18 өсгөврийн эсийн гаднах уураг задлагч энзимүүдийн нөлөөгөөр шингэн сүүнд явагдах уургийн задралын зэрэг 4.2 ± 0.4 - 14 ± 0.4 % байв.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: цэвэр өсгөвөр, уургийн задрал, гэрлийн шингээлт, долгионы урт

ОРШИЛ:

Сүүнхүчлийн бактериуд нь байгаль дээр өргөн тархсан бичил биетэн бөгөөд бүх төрлийн исгэлэн хүнсний бүтээгдэхүүнд өргөн агуулагддаг. Хэдийгээр сүүнхүчлийн бактери нь уураг задлах идэвх багатай боловч сүүнд үржих явцдаа сүүний уургийг гидролизд оруулан төрөл бүрийн биоидэвхит пептидүүдийг үүсгэдэг. Сүүний уургийн задралын дүнд үүсэх биоидэвхит пептидүүд нь дархлаа дэмжих, цусны даралт бууруулах, бактерийн эсрэг үйлчлэх, исэлдэлтийн эсрэг идэвх үзүүлэх зэрэг биологийн олон чухал үйлчлэл үзүүлдэг. Биоидэвхит пептидүүд нь эх уургийнхаа бүрэлдэхүүнд байхдаа идэвхгүй нуугдмал хэлбэртэй байх бөгөөд сүү боловсруулах технологийн процессын явцад хөрөнгөний

бүрэлдэхүүн дэх сүүнхүчлийн бактерийн уураг задлагч ферментийн нөлөөгөөр мөн хүний хоол боловсруулах ферментийн үйлчлэлээр эх уургаасаа тасран чөлөөлөгддөг. Сүүний уураг болон сүүний уургийн гаралтай пептидүүд нь хүнс тэжээлийн ач холбогдолтойн зэрэгцээ хүний эрүүл мэндийг дэмжих үйлчлэлтэй болох нь нэгэнт тогтоогдсон [1,2]. Уураг задлах идэвхтэй сүүнхүчлийн бактерийн талаарх судалгааны ажлууд нь үндсэндээ сүүний уургийн гаралтай биоидэвхит пептидүүдийн судалгаатай нягт уялдсан байдаг бөгөөд *Lb.helveticus* болон *Ent.faecium*, *Ent.faecalis* төрлийн сүүнхүчлийн бактериуд уураг задлах идэвх өндөртэй, мөн коккуудтай харьцуулахад сүүнхүчлийн савханцарууд нь уураг задлах идэвх өндөртэй

болох нь тогтоогдсон байдаг [4-9]. Манай оронд дээрх чиглэлээр хийгдсэн судалгааны ажлууд хомс байгааг харгалзан өөрийн орны уламжлалт сүүн бүтээгдэхүүн болох хоормогноос уураг задлах идэвх бүхий сүүнхүчлийн бактерийн цэвэр өсгөврүүдийг ялган тодорхойлох, эдгээр өсгөврүүдийн уураг задлах идэвхийг судлан

тогтоох, мөн эдгээр өсгөврүүдийг ашиглан ингэний сүүний казейн уургийг гидролизд оруулан задралын дүнд үүсэх пептидүүдийн антиоксидант болон ангиотензин хувиргагч ферментийг саатуулах идэвхийг судлан тогтоох зорилгоор энэхүү ажлыг гүйцэтгэлээ.

СУДАЛГААНЫ МАТЕРИАЛ, АРГА ЗҮЙ:

Судалгааны материал, бодис урвалж: 2015 оны намар Баянхонгор, Дундговь аймгуудаас бэлтгэсэн хоормогны 25 дээжийг судалгааны үндсэн материал болгон ашигласан. MRS broth, MRS agar, M17 broth, Bacterial Agar тэжээлт орчингууд болон OPA (o-phthaldialdehyde) урвалжийн бодисууд нь Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) компаниас нийлүүлэгдсэн байсан. Ялгасан өсгөврүүдийн уураг задлах идэвхийг тодорхойлох арга зүй: Neilsen.P.M, Petersen. D нарын боловсруулсан “Improved method for determining food protein degree of hydrolysis” (2001) аргыг ашиглан шингэн сүүнд явагдах уургийн задралын эрчимийг тодорхойлсон. 0.1 гр L-серин аминхүчлийг 100 мл ионгүйжүүлсэн усанд уусган стандарт болгон ашигласан. Ингэхдээ хөлдөөн хадгалсан цэвэр өсгөврүүдээс тохирох шингэн тэжээлт орчинд сэргээн, сэргээсэн өсгөврүүдээс тосгүйжүүлсэн шингэн сүүнд эзэлхүүний 1%-иар тооцож тарин 30⁰с хэмд 18-22 цаг тогтвортой өсөлтийн фаз хүртэл нь өсгөвөрлөсөн. Ферментаци явагдсан шингэн сүүнээс 100 мл авч 750 мл OPA урвалж нэмэн тасалгааны хэмд 2 минут инкубацлаад уусмалын гэрлийн шингээлтийг спектрофотометр (Perkin-Elmer Lambda Bio UV/VIS Spectrometer, Norwalk, CT, USA) багаж ашиглан 340 нм-д хэмжих замаар гүйцэтгэсэн.

Шингэн сүүнд явагдах уургийн задралын зэргийг доорх томъёогоор тооцсон.

$$\text{Серин-NH}_2 = (\text{OD}_{\text{дээж}} - \text{OD}_{\text{yc}}) / (\text{OD}_{\text{серин}} - \text{OD}_{\text{yc}}) \times 0.915 \text{ meqv L}^{-1} \times \text{S} \times \text{D} / (\text{P} / \text{V})$$

Энд: серин-NH₂=meqv серин-NH₂ гр⁻¹ уураг, S=1 литрт шилжүүлсэн дээжийн эзэлхүүн, D=шингэрүүлэлтийн зэрэг, P=дээжинд агуулагдах уургийн агууламж, V=шинжилгээнд авсан дээжийн эзэлхүүн

$$\text{Уургийн задралын зэрэг} \% = h / h_{\text{tot}} \times 100\%$$

Энд: h=(серин-NH₂ - β)/α meqv гр⁻¹ уураг, α, β, h_{tot} нь шингэн сүүний хувьд тогтмол үзүүлэлт бөгөөд Neilsen.P.M нарын тодорхойлсоноор α=0.4, β=1.0, h_{tot}=8.8 байдаг [3].

Ялгасан өсгөврүүдийн ангилалзүй тодорхойлох арга зүй: Ялгасан өсгөврүүдийн геномын ДНХ-г Fast Prep арга (45x2x6.0 speed) ашиглан ялгасан. pa forward: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG, pH reverse: AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA праймер ашиглан 95⁰С 3 min, (94⁰С 30 сек, 62.5⁰С 20 сек, 72⁰С 30 сек)х25 удаа давтах, 72⁰С 5 мин горимоор ПГУ явуулсан. Нуклеотидын дарааллыг ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ба 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) багаж ашиглан тогтоосон. Нуклеотидын дарааллыг NCBI Blast программд оруулан ангилалзүйн тодорхойлолтыг гаргасан.

СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН:

Цэвэр өсгөвөр ялгасан дүн: 1 мл хоормогны дээжийг 9 мл Ренгерийн уусмалтай холих замаар аравтын шингэрүүлэг хийн 10⁻⁶ шингэрүүлэг бүрээс 100 мкл авч MRS agar, M17 agar тэжээлт орчинд тарьж 30⁰с хэмд 48 цаг өсгөвөрлөсөн. Ургасан колонуудаас колони өнгө, хүрээний зах, хэмжээ зэрэг морфологи үзүүлэлтээр эрс ялгаатай колонуудаас сонгон Грам +, каталаза сөрөг колонуудыг streak plating аргаар тохирох хатуу тэжээлт орчин дээр 3-4 удаа шилжүүлэн

татаж цэвэршүүлсэн. Эдгээрт микроскопын шинжилгээ хийн эсийн хэлбэр болон цэвэршилтийг шалган 60% (v/v) глицерол бүхий тохирох шингэн орчинд шилжүүлэн -80⁰с хэмд хөлдөөн хадгалсан. Хөлдөөн хадгалсан өсгөврүүдээс тохирох шингэн тэжээлт орчинд (MRS болон M17 broth) сэргээн судалгаанд ашигласан. *Өсгөврүүдийн эсийн гаднах (extracellular) уураг задлагч ферментийн үйлчлэлээр шингэн сүүнд явагдах уургийн*

задралын зэргийг тодорхойлсон дүн: Нийт өсгөврүүдийн хувьд шингэн сүүнд ургах эрчим сайтай байсан бөгөөд уураг задлах идэвхтэй болох нь тогтоогдсон 33 өсгөврийн хувьд уураг задлах чадвар нь хугацаанаас хамаарч байсан. Бүгд өсгөвөрлөлтийн эхэн үе буюу эхний 6 цаг хүртэлх хугацаанд уураг задлах идэвх үзүүлээгүй бөгөөд цаашид өсгөвөрлөлтийн хугацааны туршид уургийн задралын зэрэг нь тогтвортой нэмэгдэж байсан. Шингэн сүүнд өсгөвөрлөх үед уургийн задралын эрчим өндөртэй байсан 18

өсгөврийг сонгон тэдний ангилалзүйн судалгааг 16s РНХ генийн нуклеотидийн дарааллыг тогтоох ПГУ-ын аргаар судлан тогтоосон. Ингэхэд *Lb.paracasei* (6 өсгөвөр), *Lb.casei* (4 өсгөвөр), *Lb.helveticus* (3 өсгөвөр) *Lb.plantarum* (2 өсгөвөр), *Ent.faecium* (2 өсгөвөр), *Leu.lactis* (1өсгөвөр), *Lb.hilgardii* (1 өсгөвөр), *Lb.bucheri* (1өсгөвөр) тодорхойлогдсон. Хамгийн өндөр уураг задлах идэвх үзүүлсэн 7 өсгөврийг сонгон тэдгээрийн өсгөвөрлөлтийн үеийн үндсэн үзүүлэлтийг хүснэгт 1-д нэгтгэн харуулав.

Хүснэгт 1.

Сонгогдсон өсгөврүүдийн шингэн сүүнд өсгөвөрлөх үеийн үндсэн үзүүлэлтүүд

Өсгөврийн нэр, тэмдэглэгээ	Өсгөвөрлөлтийн хугацаа, цаг	pH	Уургийн задралын зэрэг,%	Эсийн тоо, cfu mL ⁻¹
<i>Ent.faecium</i> , N-1D1	36	6.2	7.1±0.7	1.6x10 ⁹
<i>Ent.faecium</i> , N-1D3	36	5.9	7.0±0.5	3.9x10 ⁹
<i>Lb.paracasei</i> , 0-1323	24	5.8	8.5±0.5	1.4x10 ⁸
<i>Lb.plantarum</i> , 0-623	24	5.6	9.0±0.4	6.4x10 ⁸
<i>Lb.casei</i> , 0-112	24	4.2	7.2±0.4	3.2x10 ⁹
<i>Lb.helveticus</i> , N-522	24	4.9	14±0.4	7.1x10 ⁸
<i>Lb.helveticus</i> , N-222	36	5.4	12±1.3	1.4x10 ⁹

Сонгогдсон өсгөврүүдийн нэгж эзэлхүүн дэх эсийн тооны өсөлт болон рН-н утгаас харахад өсгөврүүд нь шингэн сүүнд ургах эрчим сайтай байна. Уураг задлах идэвх өндөртэй гарсан 7

өсгөврийн шингэн сүүнд өсгөвөрлөх явц дах уургийн задралын зэрэг хугацаанаас хэрхэн хамаарч байгааг график 1-д үзүүлэв.

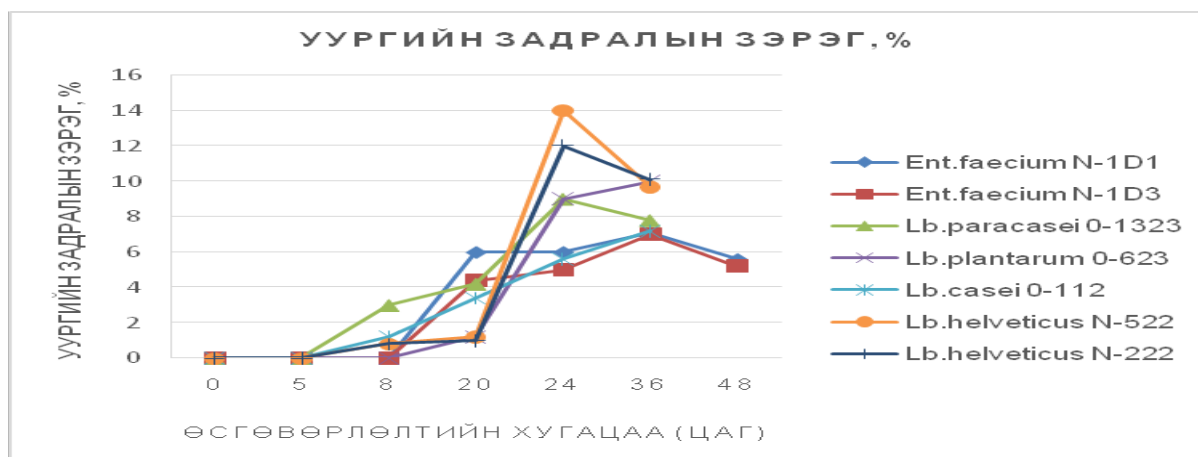


График 1. Уургийн задралын зэрэг, өсгөвөрлөлтийн хугацааны хамаарал

Нийт өсгөврүүдийн хувьд өсгөвөрлөлтийн эхний 6 цаг хүртэлх адаптацийн хугацаанд уураг задлах идэвх үзүүлээгүй. *Lactobacillus* төрлийн өсгөврүүдийн хувьд уураг задлах идэвх нь адаптацийн хугацааны дараанаас аажим нэмэгдэн тогтвортой өсөлтийн фазад хүрсэн

хугацаа буюу 20-24 цагийн хооронд хамгийн эрчимтэй нэмэгдэж байсан. *Enterococcus* төрлийн өсгөврийн уураг задлах идэвх нь 8-20 цагийн хооронд огцом нэмэгдэн, 20-24 цагийн хооронд тогтмолжин, 24-36 цагийн хооронд жигд хэмжээгээр өсч байсан.

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ:

Сүүнхүчлийн бактерийн уураг задлах идэвхийн талаар хийгдсэн судалгааны ажлууд нь уургийн задралын дүнд үүсэх тунгалаг хүрээг хэмжих, эсийн дотоод (intracellular) дахь уураг задлагч ферментийн идэвхийг cell free супернатант дээр Proteinase fluorescent detection kit ашиглан тодорхойлох, сүүний уургийн задралын дүнд үүсэх чөлөөт NH₂ бүлгийн ОРА урвалжтай өгөх өнгөт нэгдлийн гэрэл шингээлтийн эрчимийг хэмжих зэрэг арга зүйгээр хийгдсэн байдаг. Судалгааны ажлуудын хувьд хэрэглэгдсэн арга зүйн хувьд ялгаатайн зэрэгцээ гарсан үр дүн нь харилцан адилгүй арга хэлбэрээр илэрхийлэгдсэн байгаа тул нэгтгэн дүгнэж харьцуулахад хүндрэлтэй байна. Гэвч эдгээр ажлуудын үр дүнг нэгтгэн дүгнэвэл сүүнхүчлийн бактерийн уураг задлах идэвх нь түүний омгоос хамаарсан нилээд онцлог шинж чанар бөгөөд *Lactobacilli* болон *Leuconostoc* төрлийн сүүнхүчлийн бактериуд нь *Lactococci* болон *Bifidobacterium* төрөлтэй харьцуулахад уураг задлах идэвх өндөртэй, өсгөвөрлөж буй орчинд азотын эх үүсвэр болгон чөлөөт аминхүчил болон аминдэмүүд нэмэх нь сүүнхүчлийн бактериудын уураг задлах идэвхийг нэмэгдүүлдэг гэсэн судалгааны үр дүнгүүд байна. [4-9] Хоормогноос ялгасан сүүнхүчлийн

бактериуд нь шингэн сүүний уургийг задлах идэвхийн хувьд харьцангуй нэгэн жигд өндөр буюу 4.2±0.4 - 14±0.4 % идэвх үзүүлж байна. Энэ нь Pihlanto. A нарын Финляндын Ingman Foods компаний үйлдвэрлэлийн хөрөнгөний бүрэлдэхүүн дэх сүүнхүчлийн бактерийн цэвэр өсгөврүүдийг шингэн сүүнд 24-44 цаг өсгөвөрлөх үеийн 1.2-14.4 % уураг задлах идэвхийн хэмжээг тодорхойлсон судалгааны дүнтэй ойролцоо байна. [10] Мөн ишлэлд дурьдагдсан судлаачдын хийсэн судалгаагаар *Lb. helveticus*, *Lb. plantarium* төрлийн сүүнхүчлийн бактериуд нь уураг задлах идэвх өндөртэй гэж гарсан байдаг. [9, 1]) Бидний судалгаагаар *Lb. Plantarium 0-623*, *Lb. helveticus N-522*, *N-222* өсгөврүүд нь харьцангуй өндөр буюу 9.0±0.4-14±0.4 % уургийн задралын зэрэг үзүүлсэн нь эдгээр судлаачдын үр дүнтэй ижил байлаа. Цаашид уураг задлах идэвх өндөртэй эдгээр өсгөврүүдийн ингэний сүүний казеин уургийг задлах чадвар болон казеины задралын дүнд үүсэх пептидүүдийн исэлдэлтийн эсрэг идэвх болон ангиотензин хувиргагч ферментийг дарангуйлах шинж чанарыг судлан тогтоох шаардлагатай.

ДҮГНЭЛТ:

1. Ялгасан нийт 112 өсгөврийн 33 нь буюу 29.46% нь уураг задлах идэвх үзүүлсэний 18 нь буюу 16% нь уураг задлах идэвх өндөртэй байв.
2. Хоормогноос ялгасан уураг задлах идэвхтэй сүүнхүчлийн бактериудийн эсийн гаднах уураг задлагч энзимүүдийн нөлөөгөөр шингэн сүүнд явагдах уургийн задралын зэрэг 4.2±0.4 - 14±0.4 % байна.

ТАЛАРХАЛ:

Энэхүү судалгааг гүйцэтгэх боломж олгосон “Finnish Government Scholarship Pool” тэтгэлэгт хөтөлбөр болон Финляндын Байгалийн Нөөц

Судлалын Хүрээлэнгийн Хүнс-Биотехнологийн судалгааны төвийн лабораторийн хамт олонд талархал илэрхийлье.

АШИГЛАСАН ХЭВЛЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

1. Pihlanto. A et al. (2003) Bioactive peptides and proteins. *Adv. Food Nutr.* 47. 176-275
2. Donkor. O et al. (2007) Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait.* 87. 21-38
3. Neilsen. P.M et al. (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci.* 66, 642-646
4. Shihata. A et al. (2000) Proteolytic profiles of yoghurt and probiotic bacteria. *Int Dairy J.* 10, 401-408
5. Law. J et al. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Review article. *Int Dairy J.* 7. 1-11

6. Atanasova. J et al. (2014) Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk. *J Biotech.* 28. 1073-1078
7. Maryam. M et al. (2013) The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. *Int J Dairy Tech.* 66. 279-285
8. El-Ghaish et al. (2010) Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *J Food Tech.* 230. 635-643
9. Kholif. A et al. (2011) Evaluation of proteolytic activity of some dairy lactobacilli. *World J Dairy.* 6. 21-26
10. Pihlanto. A et al. (2010) Angio-tensin converting enzyme inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int Dairy J.* 20. 3-10

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED CAMEL MILK “KHOORMOG”

With this survey, we aimed to determine the extracellular proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from fermented camel milk “khoormog”. We have isolated 112 lactic acid bacterial strains from 25 khoormog samples, which were collected from 2 different regions from Mongolia. Extracellular proteolytic activity of isolated lactic acid bacterial strains were determined by Method for determining Food protein degree of hydrolysis. Totally 33 strains (29.46%) have proteolytic activity and 18 strains (16%) was highly proteolytic. While the protein degree of hydrolysis fluctuated between the range of 4.2 ± 0.4 - $14\pm 0.4\%$.