

АНАЛИЗ МИКРОФЛОРЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЕРБЛЮЖЬЕГО МОЛОКА И ПРОДУКТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

ANALYSIS OF THE COMPOSITION AND FUNCTIONAL PROBIOTIC PROPERTIES OF MICROFLORA OF CAMEL MILK AND PRODUCTS BASED ON IT

**A. Kudaibergenova
S. Akhmetsadykova
N. Begdildaeva
N. Akhmetsadykov**

Summary. Camel milk is widely used as a food product in many countries of Asia and Africa for many centuries, both fermented and fresh, is a source of a number of macro- and microelements, has a unique fatty acid composition and a specific beneficial microflora. Shubat — fermented camel milk, an ancient drink of nomads, has historically been used in the same way for preventive, therapeutic purposes. Especially with gastritis, diseases of the gastrointestinal tract, coughing attacks, restoration of strength after diseases. Assessment of the activity of lactic acid bacteria against a number of pathogens is gaining relevance, along with the tendency to refuse to use antibiotic drugs in food production. With food, the transfer of resistant pathogenic strains into the human body is possible, which can lead to the appearance of uncontrolled and non-treatable diseases. In particular, an increase in antibiotic resistance was observed in such pathogenic test strains as: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*. The article carries out comparative work on the methods and results of the isolation and identification of the microflora of camel milk, the analysis of microflora, as well as the study of its functional probiotic properties. The study of probiotic bacteria in order to create probiotic preparations for veterinary medicine is reasonable and effective both for normalizing the microflora of young animals and birds, and for the prevention of diseases caused by pathogens.

Keywords: camel milk, microflora, lactic acid bacteria, probiotic properties, antagonistic activity.

Кудайбергенова Алия Камаловна

Докторант, Казахский национальный университет
им. Аль-Фараби Алматы, Казахстан
alia93.20@mail.ru

Ахметсадыкова Шынар Нурлановна

PhD, Научно-производственное предприятие
«Антиген», Алматинская область, Казахстан
shynar.akhmetsadykova@gmail.com

Бегдильдаева Назерке Жумановна

Докторант, Алматинский Технологический
Университет, Алматы, Казахстан
nzhumankyzy@mail.ru

Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович

Д.вет.н., профессор, президент, Научно-
производственное предприятие «Антиген», Алматы,
Казахстан
nurlan.akhmetsadykov@gmail.com

Аннотация. Верблюжье молоко широко используется в качестве продукта питания во многих странах Азии и Африки на протяжении веков, как в ферментированном, так и в свежем виде, является источником ряда макро- и микроэлементов, обладает уникальным жирно-кислотным составом и специфической полезной микрофлорой. Шубат — ферментированное верблюжье молоко, древний напиток кочевников, исторически использовался так же и в профилактических, терапевтических целях. Особенно при гастритах, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, приступах кашля, восстановлении сил после перенесенных заболеваний. Оценка активности молочнокислых бактерий в отношении ряда патогенов, приобретает свою актуальность, наряду с тенденцией отказа использования антибиотических препаратов в производстве пищевой продукции. С пищевыми продуктами возможен перенос устойчивых патогенных штаммов в организм человека, что может привести к появлению неконтролируемых и не поддающихся лечению заболеваний. Рост антибиотикорезистентности наблюдался у таких патогенных тест-штаммов, как: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*. В статье проводится сравнительная работа по методам и результатам выделения и идентификации микрофлоры верблюжьего молока, анализу микрофлоры, а так же изучению ее функциональных пробиотических свойств. Изучение пробиотических бактерий с целью создания пробиотических препаратов для ветеринарии, является обоснованным и эффективным как для нормализации микрофлоры молодняка и птиц, так и для профилактики заболеваний, вызванных патогенами.

Ключевые слова: верблюжье молоко, микрофлора, молочнокислые бактерии, пробиотические свойства, антагонистическая активность.

Введение

Верблюжье молоко и ферментированные продукты на его основе, рассматриваются как стратегически ценный пищевой продукт, особенно в странах засушливого климата. Помимо этого, оно является источником для выделения потенциальных пробиотических штаммов, которые могут использоваться в производстве пробиотических препаратов как для животноводства, так и для людей. По биохимическим показателям верблюжье молоко обладает, богатым белковым составом, обогащенным лизоцимами и лактоферринами, витаминами, макро и микроминералами, такими как цинк, медь и железо и высоким содержанием длинноцепочечных жирных кислот, таких как миристиновая, миристолеиновая, пальмитиновая, пальмитолеиновая, стеариновая, олеиновая, и линолевая [6]. Бактерицидные свойства верблюжьего молока представлены содержанием лактопероксидаз, лизоцимов, а так же лактоферринов. Лактоферрины — железосодержащие белки, обладающие бактерицидным и противовирусным качеством, даже в отношении вируса гепатита В. Количество лактоферринов в верблюьем молоке и их эффективность выше, нежели чем в коровьем. По целебным свойствам имеются данные о пользе ферментированного верблюжьего молока (шубата) в отношении орто- и парамиксовирусов, предположительно из-за содержания сиаловых конъюгатов и продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий (МКБ) [4]. Изучение пробиотических свойств микроорганизмов, на сегодняшний день получило широкое распространение, но не утратило актуальности. Препараты на основе МКБ используются для лечения и профилактики заболеваний, связанных с разнообразными формами нарушения состава нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта благодаря их антагонистической способности воздействия на патогенные микроорганизмы.

МКБ — представляют собой группу неспоровых, грамположительных бактерий, производящих молочную кислоту в качестве основного продукта ферментации. Наиболее широкоизвестны среди них, представители родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*. Пробиотики определяются как жизнеспособные микроорганизмы, которые могут оказывать различное благотворное влияние на хозяина при приеме внутрь определенной концентрации. Среди полезных эффектов пробиотиков можно выделить их антипатогенное, антиканцерогенное и антимуtagenное действие, а так же удаление избыточного холестерина и облегчение симптомов непереносимости лактозы [11]. Пробиотики, применяются для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и сельскохозяйственных животных, с целью профилактики дисбактериозов, вызванных такими патогенными микроорга-

низмами, как: *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и другими [15].

Задача данной статьи заключается в сравнении выделенной микрофлоры верблюжьего молока, изучении ее функциональных пробиотических свойств, а также сопоставлении экспериментальных данных полученных из отдаленных друг от друга регионов с различными климатическими местностями обитания.

Материалы и методы исследования Согласно множественным исследованиям, первый этап — это выделение молочнокислых бактерий. Проводят его путем разведения молока растворе NaCl (8,5 г/л) и последующих разведений до 10^{-8} . Далее осуществляют посев на чашки Петри с плотными селективными питательными средами для лактобацилл. По окончании инкубации, отбирают морфологически подходящие колонии для дальнейших тестов [5,9,12]. Предпочтительная среда для выращивания МКБ поддерживающая их хороший рост — MRS. Содержит полисорбат TWIN-80, ацетат, магний, марганец, которые действуют как специфические факторы роста МКБ, а так же богатую питательную основу [9].

Выращенные культуры МКБ на селективных средах, проходят морфологический скрининг, который включает описание формы, размеров, окраску по граму. Штаммы МКБ должны быть круглыми, неспорообразующими, грамположительными, каталазно- и оксидазно-отрицательными факультативными анаэробами [5,9,12].

Видовая идентификация микроорганизмов осуществляется при помощи изучения полимеразно-цепной реакции, с предварительной экстракцией ДНК методом рРНК-16S [12]. Суть, которого заключается в филогенетической классификации штамма. Ген рРНК-16S используется в качестве стандарта для классификации и идентификации микроорганизмов.

Далее проводится ряд анализов на изучение пробиотического потенциала МКБ. Оцениваются физико-химические свойства, такие как жизнеспособность в температурных условиях ЖКТ, при пониженной кислотности. Результаты фиксируются подсчетом количества выживших клеток. Аналогично проверяется устойчивость к условиям пищеварительного тракта и ферментам проверяют *in vitro*, добавляя в среду с МКБ желчные соли, панкреатин и ферменты — пепсин, трипсин, устойчивость к антибиотикам. Антагонистическое действие пробиотических микроорганизмов измеряется методом лунок. О способности МКБ задерживать и останавливать рост патогенных индикаторных штаммов судят по расстоянию зоны ингибирования [14]. Для оценки адгезивности МКБ *in vitro* используют эукариотические клетки или пластины из нержавеющей стали. Метод заключа-

Таблица 1. Видовой состав микрофлоры верблюжьего молока

Географическая местность	Видовой состав микрофлоры и его процентное содержание	Источник
Кувейт (2019 г.)	<i>Enterococcus spp.</i> (24.2%), <i>Lactococcus spp.</i> (22.4%), <i>Pediococcus spp.</i> (20.7%), <i>Weissella spp.</i> (10.3%)	R. Rahmeh и др. [11].
Китай (провинция Сиань, 2009 г.)	<i>Lactobacillus spp.</i> (44%), <i>Enterococcus spp.</i> (19%), <i>Leuconostoc spp.</i> (10%), <i>Weissella spp.</i> (3%)	N. Rahman и др. [12].
Египет (2013 г.)	<i>Enterococcus spp.</i> (81.6%), <i>Lactococcus spp.</i> (9%), <i>Lactobacillus spp.</i> (9%), <i>Aerococcus viridans spp.</i> (9%)	E. Hamed, A. Elattar [7].
Казахстан (2015 г.)	<i>Enterococcus spp.</i> (51.3%), <i>Lactococcus spp.</i> (10.9%), <i>Lactobacillus spp.</i> (29.8%), <i>Leuconostoc spp.</i> (8%)	Akhmetsadykova et al. [1].

Таблица 2. Тест-штаммы возбудителей заболеваний

Патогенный тест-штамм	Классификационный номер	Заболевание
Salmonella enterica	ATCC13076	Сальмонеллез
Escherichia coli	ATCC25922	кишечные расстройства
Staphylococcus aureus	ATCC25923	инфекции кожных покровов, эндокардит
Staphylococcus epidermidis	ATCC12228	возбудитель сепсиса, эндокардита, конъюнктивита, гнойной инфекции ран
Listeria monocytogenes	ATCC7644	возбудитель листериоза
Shigella flexneri	ATCC12022	расстройства ЖКТ, шигеллез
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853	возбудитель нозокомиальных инфекций

ется в следующем, после посева и выдержки в течение суток МКБ на пластине или клеточном слое, его промывают несколько раз, в последующем оценивают процент адгезированных клеток [8–9,14].

Результаты исследований микрофлоры и ее пробиотических свойств

По данным обзора результатов исследований, наиболее распространенные штаммы МКБ, обладающие пробиотическими свойствами представлены родом *Lactobacillus spp.*, включая следующие виды — *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri*, and *Lb. reuteri.*, а так же *Lactococcus spp.*, например, *Lactococcus lactis* [3].

В приведенных исследованиях микрофлоры верблюжьего молока и молочных продуктов (табл. № 1), прослеживается содержание наиболее часто встречаемых групп микроорганизмов, таких как: *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* — которые наблюдаются и в параллельных исследованиях. Выделение и изучение основных видов состава микрофлоры

МКБ в различных географических местностях представлены в следующей таблице:

При оценке пробиотических свойств данных микроорганизмов, по данным [12], общее среднее количество МКБ в шубате колеблется в диапазоне 6,8–7,6 КОЕ/ мл, при этом рН равен 3,7–4,1. В опытах [2] указано что наилучшей устойчивостью к пониженной кислотности обладают *E. durans*, *L. casei*, *E. lactis*, *P. pentosaceus*, *W. cibaria*, к желчным солям максимально устойчивы *E. durans*, *E. faecium*, *L. casei*, *P. pentosaceus*, чуть менее устойчивым штаммом оказался *E. lactis*, выживаемость которого составила более 50% после шестичасового выдерживания в 0,4% растворе желчных солей [2].

Как уже упоминалось, немаловажную роль в оценке пробиотического потенциала играет способность МКБ оказывать угнетающее действие на особо распространенные штаммы бактерий, вызывающих нарушение естественной микрофлоры организма, а так же являющихся болезнетворными.

Среди представленных в таблице № 2 штаммов — возбудителей, стоит выделить наиболее распространен-

Таблица 3. Сравнительные данные величин зоны ингибирования МКБ и бифидобактерий выделенных из верблюжьего молока

Штамм	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S.typhimurium</i>	Источник
1. <i>Pediococcus acidilactici</i>	35.0 ± 2.0	34.3 ± 2.0	34.0 ± 0.0	Нет данных	R. Rahmeh, 2009 г.
2. <i>Lactobacillus reuteri</i>	30.0 ± 0.0	46.0 ± 0.0	33.0 ± 1.0	Нет данных	
3. <i>Enterococcus durans</i>	29.0 ± 2.0	27.0 ± 2.0	35.0 ± 1.0	Нет данных	
4. <i>Lactococcus lactis</i>	Нет данных	30.0 ± 1.0	Нет данных	33.0 ± 1.0	H.Eman, A. Elattar, 2013 г.
5. <i>Enterococcus faecium</i>	Нет данных	33.0 ± 1.0	Нет данных	38.0 ± 1.0	
6. <i>Lactobacillus plantarum</i>	17.3 ± 0.5	17.00 ± 1.0	19.00 ± 1.0	18.6 ± 0.5	G. Mulaw et.al, 2019 г.
7. <i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>	20.6 ± 0.5	20.3 ± 1.1	19.6 ± 0.5	19.6 ± 0.5	
8. <i>Lactobacillus paracasei</i>	20.0 ± 1.0	20.3 ± 0.5	19.6 ± 0.5	18.3 ± 0.5	
9. <i>Bf. longum subsp. longum</i> B-11	14 ± 0.1 мм	11 ± 0.3 мм	Нет данных	12 ± 0.1 мм	I. Yasmin et.al, 2020 г.

ные — *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* [1,7,9]. Так, по данным E. Etadati (2019), наиболее высокую антагонистическую активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Echerichia coli*, среди выделенных из МКБ верблюжьего молока, демонстрируют *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* [11]. В аналогичном исследовании, антагонистическая активность МКБ исследовалась в отношении *Salmonella typhimurium*, *E. coli* и *Vibrio fluvialis*. Полученные результаты, указывают на то, что наиболее высокая антагонистическая активность выражена у: *Enterococcus faecium* зона ингибирования выражена в миллиметрах, соответственно [10]. Другие штаммы МКБ, так же показывают хорошую антагонистическую активность: *Lactococcus lactis subsp. cremoris* и *Lactobacillus plantarum*. Составлена сравнительная таблица ценных пробиотических штаммов, выделенных из верблюжьего молока, различными учеными группами, отражает зону ингибирования в миллиметрах.

По данным таблицы № 3, *Pediococcus acidilactici*, оказывает максимальное антибактериальное воздействие на рост кишечной палочки, *Lactobacillus reuteri* ингибирует рост золотистого стафилококка, бактерии рода *Enterococcus* (в частности *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*) хорошо подавляют и препятствуют развитию патогенов *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*. Помимо основных представителей МКБ, верблюжье молоко богато и бифидобактериями, так же обладающих пробиотическим потенциалом. Среди представителей рода *Bifidobacteria* встречаются — *Bf. bifidum*, *Bf. animalis subsp. lactis*, *Bf. longum subsp. Longum* и *Bf. longum subsp. infantis* [15].

По результатам I. Yasmin [15] с соавторами, *Bf. longum subsp. longum* B-11, демонстрирует наилучшие функциональные пробиотические свойства, к примеру: выживаемость в условиях pH= 2 составляет около 85%; высокий процент гидрофобности клеточной поверхности к ксилену, около 78%, что имеет значение в процессе агрегации; отсутствие гемолитической активности; способность к росту при различных температурных режимах (от 10–45 °C) и другие. Таким образом, *Bf. longum subsp. longum* B-11 выделенный из верблюжьего молока, так же способен оказывать большее ингибирующее действие на рост и развитие бактериальных патогенов.

Заключение и выводы

Перспективы подробного изучения микрофлоры верблюжьего молока и продуктов на его основе имеют основания считаться актуальными. В мировом пространстве было проведено мало полноценных исследований функциональных пробиотических свойств МКБ верблюжьего молока, однако полученные данные подтверждают, что его микрофлора является уникальным источником пробиотических штаммов например, таких как: *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Bf. longum subsp. longum* и другие.

Таким образом, прослеживается и практическая значимость исследования в виде возможности разработок пробиотического препарата для животноводства на основе МКБ выделенных из верблюжьего молока и его продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akhmetsadykova S., Baubekova A., Konuspayeva G., Akhmetsadykov N., Faye B. Loiseau G. Lactic acid bacteria biodiversity in raw and fermented camel milk / S. Akhmetsadykova, A. Baubekova, G. Konuspayeva, N. Akhmetsadykov, B. Faye, G. Loiseau // African Journal of Food Science and Technology-2015.-Vol. 6 — P. 84–88
2. Davati N. Study of Lactic Acid Bacteria Community From Raw Milk of Iranian One Humped Camel and Evaluation of Their Probiotic Properties/ N. Davati, F. Tabatabaee Yazdi, S. Zibaee, F. Shahidi, MR. Edalati // Jundishapur J Microbiol. — 2015; Vol. 2015, No. 8. — 14 pages. DOI:10.5812/jjm.8(5)2015.16750
3. Chelliaha R In vitro and in vivo defensive effect of probiotic LAB against Pseudomonas aeruginosa using Caenorhabditis elegans model/ R. Chelliaha, J. Choia, S. Hwanga, B. Parka, E. Daliria, S. Kima, S. Weib, R. Ramakrishnanc, D. Oha // Virulence — 2018. — Vol. 9, No. 1. — P. 1489–1507. DOI: 10.1080/21505594.2018.1518088
4. Chuvakova Z. Chemical composition, microbial control and antiviral properties of freshly made and conserved Shubat “Bota” Z. Chuvakova, R. Beisembayeva, O. Puzyrevskaya, M. Saubenouva, M. Shamenova, T. Glebova, E. Popova, M. Baizhomartova, E. Baimenov // In: Park YW (ed) Bioactive components in milk and dairy products. Wiley, Hoboken- 2009.-Vol. 266, P. 171–172
5. Edalati E. Isolation of probiotic bacteria from raw camel’s milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning / E. Edalati, B. Saneei, M. Alizadeh, S. Hosseini, A. Zahedi Bialvaei, and K. Taheri
6. Farah Z, Streiff T., Bachmann M. R. 1989. Manufacture and characterization of camel milk butter. Milchwissenschaft 44:412–414
7. Hamed E. and Elattar A. Identification and Some Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Egyptian Camels Milk/ E. Hamed, A. Elattar.// Life Science Journal- 2013. — Vol. 10, No. 1. P. 1953–1966.
8. Monteiro C. In Vitro Antimicrobial Activity and Probiotic Potential of Bifidobacterium and Lactobacillus against Species of Clostridium/ C. Monteiro, S. Monique, O. Bruna, S. Matheus, C. Santos, S. Maria Rosa Q. Bomfim, E. Fernandes and V. Monteiro-Neto // Nutrients — 2019. Vol. 448. No. 11. —16 pages. DOI:10.3390/nu11020448
9. Mulaw G. In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products / G. Mulaw, T. S. Tessema, D. Muleta and A. Tesfaye // Hindawi International Journal of Microbiology-2019.-Vol. 2019–8 pages. DOI: 10.1155/2019/7179514
10. Ouwehand A. Probiotics: an overview of beneficial effects/ A. C. Ouwehand, S. Salminen, E. Isolauri // Antonie Van Leeuwenhoek- 2002. — Vol. 82, No. 1–4, P. 279–289.
11. Quigley E. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health / Quigley E. // Clin. Gastroenterol. Hepatol — 2019. Vol. 362, No. 2. — P. 333–344. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.09.028.
12. Rahman N. Characterization of the dominant microflora in naturally fermented camel milk shubat/ N. Rahman, V. Xiaohong, F. Meiqin, D. Mingsheng // World J Microbiol Biotechnol –2009. — Vol.25 No. 17. — P. 1941–1946. DOI: 10.1007/s11274–009–0092–5
13. Rahmeh R. Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk/ R. Rahmeh, A. Akbar, M. Kishk, T. Al-Onaizi, A. Al-Azmi, A. Al-Shatti, A. Shajan, S. Al-Mutairi and B. Akbar New Microbes and New Infections — 2019. — Vol. 30, No. 1. — 8 pages. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100560.
14. Ren D. Antimicrobial Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade Fermented Foods/ D. Ren, J. Zhu, S. Gong, H. Liu, H. Yu// Hindawi BioMed Research International –2018. — Vol. 2018, No.4. — 9 pages. DOI: 10.1155/2018/5416725
15. Yasmin I. In vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of Bifidobacterium Strains Isolated from Raw Camel Milk / I. Yasmin, M. Saeed, W. Ali Khan, A. Khaliq, M. Chughtai, R. qbal, S. Tehseen, S. Naz, A. Liaqat, T. Mehmood, S. Ahsan and S. Tanweer // Microorganisms 2020. Vol. 354, No. 8. 21 pages. DOI:10.3390/microorganisms8030354.