

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSC.27.06.2017.B.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

ЭЛОВА НИЛУФАР АРАШОВНА

**ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЛАР ПРОДУЦЕНТЛАРИ БЎЛГАН МАҲАЛЛИЙ
ЛАКТОБАКТЕРИЯ ШТАММЛАРИНИ АЖРАТИШ ВА ТАНЛАБ ОЛИШ**

03.00.04 – Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2019

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of Doctor of philosophy (PhD)

Элова Нилуфар Арашовна

Экзополисахаридлар продуцентлари бўлган маҳаллий лактобактерия
штаммларини ажратиш ва танлаб олиш 3

Элова Нилуфар Арашовна

Выделение и отбор местных штаммов лактобактерий-продуцентов
экзополисахаридов 21

Elova Nilufar Arashovna

Isolation and selection of local strains of lactobacteria producing
exopolysaccharides..... 39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works..... 42

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSC.27.06.2017.B.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

ЭЛОВА НИЛУФАР АРАШОВНА

**ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЛАР ПРОДУЦЕНТЛАРИ БЎЛГАН МАҲАЛЛИЙ
ЛАКТОБАКТЕРИЯ ШТАММЛАРИНИ АЖРАТИШ ВА ТАНЛАБ ОЛИШ**

03.00.04 – Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2019

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2019.2.PhD/В301 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Микробиология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифасида (microbio@academy.uz) ва «Ziynet» Ахборот таълим порталида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Огай Дарья Кисеновна
Биология фанлари номзоди

Расмий оппонентлар:

Исхакова Холида Илхамовна
Тиббиёт фанлари доктори, профессор

Мирзаева Мамлакат Айнакуловна
Тиббиёт фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот:

Биоорганик кимё институти

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги DSc.27.06.2017.В.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2019 йил «___» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтохур тумани, А. Қодирий кўчаси 7б-уй, Микробиология институти мажлислар зали. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: microbio@academy.uz.

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин. (№___ рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтохур тумани, А. Қодирий кўчаси 7б-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 5-қават, кутубхона. Тел.: (+99871) 241-92-28).

Диссертация автореферати 2019 йил «___» _____ куни тарқатилди
(2019 йил «___» _____ даги №___ рақамли реестр баённомаси)

Арипов Тахир Фатихович

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси, б.ф.д., профессор, академик

Жураева Роҳила Назаровна

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

Гулямова Ташхан Гафуровна

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда полисахаридларга бўлган саноат эҳтиёжларининг ортиши муносабати билан экзополисахарид (ЭПС) ҳосил қилувчи микроорганизмларни излаш ва улардан фойдаланишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Микроорганизмлар полисахаридлари иқлимга боғлиқ эмаслиги, ишлаб чиқариш жараёнининг соддалиги ва тежамкорлиги, хусусиятларини бошқариш осонлиги туфайли етакчи ўринларни эгаллаб келмоқда. Полисахаридларнинг ишлатилиш соҳалари уларнинг функционал (сувда эрувчанлиги, юқори ковушқоқликка эга эритмалар, лиқилдоқлар, геллар ҳосил қилиш қобилияти) ва биологик хоссаларини ҳисобга олган ҳолда белгиланади. Бу борада, хорижда ксантан, геллан ва курдлан каби бактериал полисахаридларни олиш ва ишлатиш жуда ривожланган. Шу сабабли, микроорганизмлардан олинадиган экзополисахаридлар орасида сут ачитувчи бактериялардан олинадиган экзополисахаридлар муҳим аҳамиятга эга.

Жаҳонда лактобактерия экзополисахаридларини одам ва ҳайвонлар организмида борадиган физиологик жараёнларга таъсирини аниқлаш амалий жиҳатдан муҳим ҳисобланади. Жумладан, экзополисахарид синтез қилувчи лактобактерия штамmlарини ажратиш, уларнинг морфологик, физиологик-биокимёвий хусусиятларини тавсифлаш, ЭПС тирик организмларда роли ҳақида тасаввурларни шакллантириш учун турли хил турлар ва штамmlар томонидан синтезланадиган ЭПС кимёвий тузилишини ҳамда физик, биологик хусусиятларини аниқлаш, лактобактерия ЭПСларининг холестеринни камайтирувчи, иммуномодулятор, касалликларга ва мутагенларга қарши фаолликларини асослаш муҳим ҳисобланади. Полисахаридлар тузилиши, ҳужайраларда жойлашиши, физик-кимёвий ва биологик хоссаларига кўра турли-тумандир. Шунга кўра, экзополисахаридлар продуцентлари бўлган маҳаллий лактобактерия штамmlарини ажратиш ва танлаб олиш, кимёвий структураси ва биологик фаоллигини аниқлаш муҳим илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Республикамизда аҳолини зарур миқдордаги биологик жиҳатдан тўлақонли ҳисобланган озиқ-овқат маҳсулотлари билан таъминлашга алоҳида эътибор қаратилмоқда, шунингдек самарали терапевтик таъсирга эга бўлган янги биопрепаратлар ишлаб чиқиш бўйича инновацион ютуқлардан фойдаланиш борасида муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида¹ (4-йўналиш) «...фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларини арзон, сифатли дори воситалари билан таъминланишини яхшилаш» вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларини амалга оширишда, жумладан маҳаллий лактобактерия штамmlари ва улар ҳосил қилган экзополисахаридлар асосида янги зарарсиз дори воситалари олиш

¹Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси» тўғрисидаги Фармони

муҳим аҳамият касб этади. Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 23 январдаги ПҚ-3489-сон «Дори воситалари ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқариш ҳамда олиб киришни янада тартибга солиш чора тадбирлари тўғрисида» ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғи жадал ривожлантириш бўйича кўшимча чора тадбирлар тўғрисида»ги қарорида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Юқори биологик ва функционал фаолликка эга лактобактерия штамларини ажратиш ва танлаб олиш ва улардан пробиотиклар сифатида фойдаланишга оид маълумотлар дунё илмий адабиётларида жуда кенг ёритилган (Bergmaier, Champagne, Lacroix, 2003; Champagne, Gardner, Lacroix, 2007 ва бошқ.).

Кўпчилик олимлар полисахаридларнинг (пептидогликанлар) ҳужайра қобиғининг таркибий қисми сифатидаги ва бактерия ҳужайраларининг атроф-муҳитдаги юқори кислоталилик, ўт кислота тузларининг таъсири каби ноқулай шароитларга чидамлилигини оширадиган аҳамиятини алоҳида қайд этишган (de los Reyes-Gavilan et al., 2011; Chapot-Chartier et al. 2011).

Адабиётларда экзополисахарид синтез қилувчи лактобактерия штамларини ажратиш ва морфологик, физиологик-биокимёвий хусусиятлари аниқланган (Aly Savadogo et al., 2004; Yuksekdag et al., 2008; Bukola C. et al., 2008; Wang et al., 2010; Byoung-Joo Seo et al., 2015; Adesulu-Dahunsi et al., 2018); лактобактерияларнинг культурал суюқлигидан экзополисахаридларни ажратиб олиш, улардан юқори миқдорда ЭПС олиш учун озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитларини оптималлаштириш, ЭПСларнинг моносахарид таркиби ва молекуляр массасини аниқлаш (Adebayo-Tayo et al., 2008; Zajsek et al., 2011; Van Calsteren et al., 2015; Ji Wang et al., 2015); экзополисахаридлардан саноатда желеловчи агентлар, биосурфактантлар, эмульгаторлар ва биосорбентлар сифатида фойдаланиш (Poli et al., 2010; de Oliveira Martins et al., 2008); ЭПС ларнинг антиоксидант, антимиқроб, пребиотик фаоллигини баҳолаш (Yvonne Wang et al., 2010; Liu et al., 2010; Grosu-Tudor et al., 2013; Salazar et al., 2015), лактобактерия ЭПС ларининг холестеринни камайтирувчи, иммуномодулятор, ракка қарши ва мутагенларга қарши фаолликларини аниқлаш (H. Tsuda et al., 2008; Zhang et al., 2009; Surayot et al., 2014; Правдивцева М., 2012), лактобактерия ЭПС ларининг кумуш нанозарраларини биоген синтезлашини тадқиқ этиш (Adebayo-Tayo, 2017; Saravanan et al., 2017), лактобактериялар eps-

гени кластерини секвенирлашга (Siezen R.J. et al., 2008; Suzuki C. et al., 2013) оид илмий ишлар кенг ёритилган.

Республикамиз олимлари томонидан маҳаллий лактобактерия штамmlарини ажратиш ва улардан сут саноати, тиббиёт ва фармацевтикада фойдаланиш (Огай Д.К., 1978, 2002; Кутлиева Г.Дж., 2002; Миралимова Ш.М. 2009; 2017) ва диазотроф ризобактериялар экзополисахаридлари асосида кумуш нанозарралари олиш (Расулов Б.Г., 2019) бўйича чуқур илмий тадқиқотлар олиб борилган.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган олий таълим ёки илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Микробиология институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф6-Т219 «*Lactobacillus casei* groupга мансуб маҳаллий штамmlар ҳосил қилган бактериоцинга ўхшаш моддаларнинг одамда ошқозон ва 12-бармоқли ичак яраси касаллигини қўзғатувчи *Helicobacter pylori* га таъсирини ўрганиш» (2012-2016 йй.), ВА-ФА-А10-006 «Лактобактериялар асосида одам МИЙ яллиғланиш касалликларига қарши препарат ишлаб чиқиш» (2017-2018 йй.) мавзуларидаги фундаментал ва амалий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади экзополисахаридлар продуцентлари бўлган маҳаллий лактобактерия штамmlарини танлаб олиш, экзополисахаридларнинг физик-кимёвий хоссалари ва биологик фаоллигини тавсифлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

табiiй манбалардан лактобактерия штамmlарини ажратиб олиш ва уларнинг тур мансублигини аниқлаш;

янги ажратилган лактобактерия штамmlарнинг пробиотик имкониятларини баҳолаш;

маҳаллий лактобактерия штамmlари ҳосил қилган экзополисахаридларни ажратиб олиш ва қисман тозалаш;

лактобактериялардан олинган ЭПС ларнинг физик-кимёвий хоссалари ва биологик фаоллигини тадқиқ этиш;

лактобактерия штамmlари ЭПС биосинтезини ошириш учун озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитларини оптимизациялаш;

Тадқиқотнинг объекти турли табiiй манбалардан ажратилган лактобактерия штамmlари, уларнинг биосинтетик фаоллигини тадқиқ этиш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети маҳаллий лактобактерияларнинг ЭПС синтезловчи штамmlарини ажратиш, культураларнинг таксономик ўрнини аниқлаш, уларни шартли-патоген ва патоген микроорганизмларга қарши антимикроб фаоллигига кўра скрининглаш, танлаб олинган штамmlарнинг ЭПС синтези фаоллигини тадқиқ этиш, лактобациллалар ЭПС ининг физик-кимёвий ва биологик хусусиятларини тадқиқ этиш, лактобактерия штамmlари ЭПС биосинтезини ошириш учун озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитларини оптимизациялашдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Микробиологик, биокимёвий, биотехнологик, молекуляр-генетик ва статистик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

фаол экзополисахарид ҳосил қилувчи *Lactobacillus plantarum* ЭБ-2 штамми 16S рРНК генини секвенс қилиш орқали генетик идентификация қилинган;

илк бор маҳаллий лактобактерия штамmlарининг экзополисахарид синтез қилиш хусусияти аниқланган. 5 та штамм ЭПС синтезлаш фаоллигига кўра *L. plantarum* ЭБ-2, *L. casei* СО₁, К7/3, К7; *L.rhamnosus* ж.с.2 танлаб олинган:

илк бор маҳаллий лактобактерия штамmlаридан олинган ЭПС нинг физик-кимёвий ва биологик фаоллиги аниқланган;

озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитларини оптимизациялаш йўли билан лактобактерия штамmlари ЭПС биосинтези жараёни интенсификацияланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

лактобациллалардан олинган ЭПС ўзининг физик-кимёвий, биологик хусусиятлари аниқланган ва ветеринария амалиётига антимикроб ва антиоксидант хоссаларига асосланиб тавсиялар тақдим этилган;

ЭПС синтезловчи лактобацилла штамmlари антимикроб фаоллиги ва антиоксидант хоссалари туфайли сут маҳсулотлари, гўшт ва консерва саноатида ишлатилиши бўйича тавсиялар тақдим этилган;

лактобактериялардан юқори миқдорда ЭПС олиш учун озуқа муҳити таркиби ва культураларни ўстириш шароитлари танланган;

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги замонавий микробиологик ва биокимёвий усуллар қўлланилганлиги, улар асосида олинган илмий натижалар етакчи маҳаллий ва хорижий журналларда чоп этилганлиги, лактобактериялар коллекцияси бойитилганлиги, тадқиқотнинг амалий натижалари нуфузли давлат органлари тизимига жорий этилганлиги билан изоҳланади. Экспериментал маълумотлар статистик хато, ўртача, ишончлилик интерваллари, стандарт оғишларни ҳисоблаш Statistica 6.0. компьютер дастури ва стандарт методлар ёрдамида олиб борилган. Натижаларнинг статистик аҳамияти Стьюдентнинг t-критерийсини ҳисоблаб чиқиш орқали аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти лактобациллаларнинг *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* турларига мансуб маҳаллий штамmlари ажратилган, идентификация ва классификация қилинганлиги, лактобациллаларнинг ЭПС синтез қилиш қобилияти аниқланганлиги ва юқори антиоксидант ва антимикроб фаолликка эга ЭПС ажратиб олинганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти микроорганизмлар коллекцияси лактобациллаларнинг янги, пробиотик хусусиятларга эга штамmlари билан бойитилиши, ЭПС-ҳосил қилувчи лактобацилла штамmlари сут маҳсулотлари, ветеринария ва фармацевтика саноатида турли препаратлар ишлаб чиқариш учун асос бўлиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. ЭПС-синтезловчи лактобацилла штаммларидан бактериал суспензия тайёрланиб, озуқабоп экинларни силослаш ва бузоқларда диспепсия касаллигини даволаш бўйича олинган натижалар асосида:

Лактобактерия штаммлари асосида тайёрланган “Бактосил” бактериал суспензияси Сирдарё вилояти Мирзаобод туманида ва Тошкент вилояти Қибрай ҳамда Зангиота туманларининг ферма хўжаликларида донли-бошоқли экинлар сенажи ва силос тайёрлаш амалиётида жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ хўжалиги вазирлигининг 2019 йил 17 октябрдаги 02/025-3099-сон маълумотномаси). Натижада бактериал суспензия билан ишлов бериб тайёрланган сенаж ва силос *Fusarium* авлодига мансуб замбуруғларнинг хавфли токсинлари ва вируслардан холи бўлиши имконини берган;

“Бактосил” препарати Тошкент вилояти Қибрай туманининг қорамолчилик ва Сирдарё вилоятининг эчкичилик ферма хўжалигида бедадан сенаж тайёрлаш амалиётида жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ хўжалиги вазирлигининг 2019 йил 17 октябрдаги 02/025-3099-сон маълумотномаси). Натижада назорат кўрсаткичига нисбатан қорамолларнинг кунлик сут миқдори, сутнинг ёғлилик миқдорини ошириш имконини берган;

Маҳаллий лактобактерия штаммлари бузоқларнинг диспепсия касаллигини даволаш самарадорлиги Тошкент вилояти Юқори Чирчиқ тумани ҳамда Қибрай тумани фермер хўжаликларида фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси ветеринария ва чорвачиликни ривожлантириш давлат қўмитасининг 2019 йил 24 сентябрдаги 02/23-1401-сон маълумотномаси). Натижада диспепсия билан касалланган бузоқлардан диареянинг 2-суткада бартараф этилиши ва умумий ҳолатининг яхшиланиши имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 13 та, жумладан 8 та халқаро ва 5 та республика илмий-амалий анжуманларда муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 23 та илмий иш, шулардан 7 таси Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан 4 таси республика ва 3 таси хорижий илмий журналларда нашр этилган, 2 та ихтиро патенти олинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 116 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий

натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертациянинг тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Лактобактерия штамmlарининг биологик ва функционал фаоллиги ва лактобактерия штамmlаридаги ЭПС биосинтезига оид илмий манбалар шарҳи**» деб номланган биринчи бобида лактобактерия штамmlарини ажратиш ва классификациялаш, лактобактерия штамmlарининг пробиотик хоссаларини тадқиқ қилиш ва турли касалликларни даволаш ва олдини олишда ишлатилиши, лактобактерия штамmlари ЭПС биосинтези ва эополисахаридларнинг биологик фаоллигини аниқлаш бўйича илмий манбалар чуқур таҳлил қилинган.

Диссертациянинг «**Диссертация ишининг объекти ва уни амалга оширишда қўлланилган усуллар**» номли иккинчи бобида тадқиқот олиб боришда қўлланилган микробиологик, морфологик-культурал, молекуляр-генетик, биокимёвий ва статистик усуллар ҳақида батафсил маълумотлар берилган.

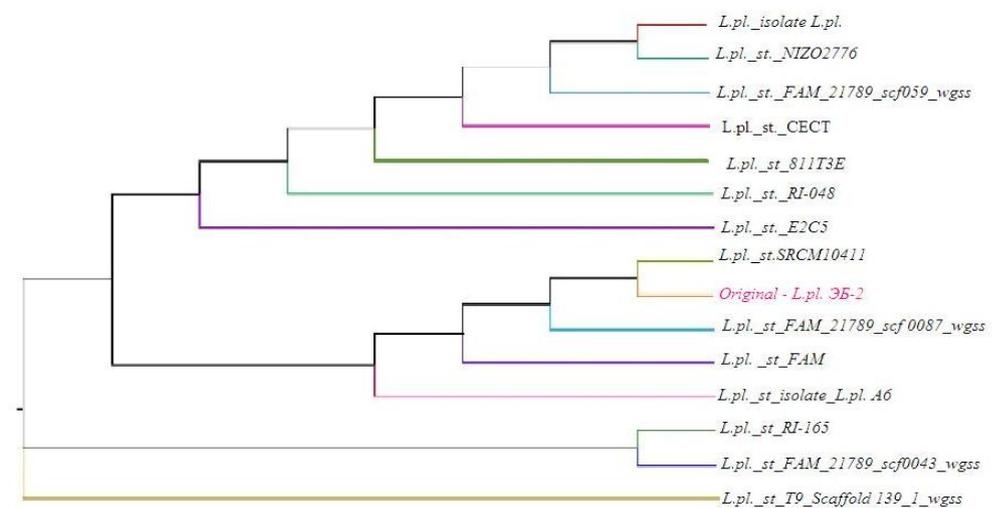
Диссертациянинг «**ЭПС-продуцентлари бўлган маҳаллий лактобактерия штамmlарини ажратиш ва уларнинг пробиотик хоссаларини ўрганиш**» номли учинчи бобида турли табиий манбалардан лактобактерия штамmlарини ажратиш ва танлаб олиш, уларнинг морфологик-культурал, физиологик ва биокимёвий хоссаларини тадқиқ этиш, ажратилган лактобактерияларнинг тур мансублигини аниқлаш, танлаб олинган лактобактерия штамmlарининг пробиотик хоссаларини баҳолашга оид тадқиқот натижалари ёритилган.

ЭПС-продуцентлари бўлган лактобактерия штамmlарини турли табиий манбалардан ажратиб олиш. Тузланган сабзаётлар (тузланган қарам, бодиринг ва помидор), турли ўсимлик органларининг эпифит микрофлораси (настарин гули, тархун барглари ва туя ва беҳи меваси), сут маҳсулотлари (қимиз, шубат, бринза ва пишлок), гўшт маҳсулотлари (бастурма) ва соғлом гўдаклар фекалийси лактобактерияларни ажратиш учун манба бўлиб хизмат қилди. Юқорида қайд этилган манбалардан 164 та намуна олинган ва улардан 119 та лактобактерия изоляти ажратиб олинган. Барча ажратилган изолятлар микроскопда кўрилганда таёқча шаклига эга, ҳужайраларнинг ўлчами ўртача 0,6-0,72 x 1,2-2,4 мкм, Граммусбат, каталаза синтезламайди, лакмусли сутни ачитди ва унинг кислоталилигини 60 - 90°Т гача оширди.

Шундай қилиб, ЭПС-ҳосил қилувчи лактобактерия штамmlарини ажратишда анъанавий манбалар: сут маҳсулотлари ва тузланган маҳсулотлар билан бир қаторда турли ўсимлик органларининг эпифит микрофлорасидан ҳам фойдаланилди. Ўтказилган морфологик-культурал, физиологик ва биокимёвий тадқиқотлар натижалари асосида тоза культуралардан 25 тасининг тур мансублиги аниқланди: *L.casei* (8 та штамм), *L.plantarum* (10 та штамм), *L.rhamnosus* (6 та штамм), *L.brevis* (1 та штамм).

ЭПС ҳосил қилувчи L.plantarum ЭБ-2 культурасини 16S рРНК генини секвенс қилиш ва филогенетик таҳлил орқали идентификациялаш. L.plantarum

ЭБ-2 культураси 16S рРНК генини секвенс қилиш ва филогенетик таҳлил орқали идентификацияланди. 16S рРНК генининг BLAST таҳлили *L.plantarum* ЭБ-2 культурасининг *L.plantarum*нинг 15 та типовой штаммига юқори (100%) ўхшашлик борлигини кўрсатди. Филогенетик таҳлил *L.plantarum* ЭБ-2 культураси 16S рРНК генининг секвенс маҳсулоти *L.plantarum* SRCM103411 олинган секвенс маҳсулотга жуда яқин туриши аниқланди (1-расм).



1-расм. *L.plantarum* ЭБ-2 культураси 16S рРНК гени секвенси асосида тузилган филогенетик шажара

Тузилган филогенетик дарахт таҳлили асосида шундай хулоса қилиш мумкинки, *L.plantarum* штамmlарини 3 та алоҳида тармоққа гуруҳлаш мумкин, улардан биттаси 2 та тармоққа ажралади. *L.plantarum* ЭБ-2 штамми ушбу тармоқдаги 2 та шохнинг 1 таси сифатида шаклланади ва 2-шоҳда *L.plantarum* SRCM103411 штамми жойлашади. *L.plantarum* ЭБ-2 штамми ушбу шохланиш ичидаги *L. plantarum* FAM 21789 FAM21789 scf0087, *Lactobacillus plantarum* isolate *L. plantarum* A6, *Lactobacillus plantarum* strain Nizo2776 NODE, *L.plantarum* SRCM103411 штамmlари билан 100% ўхшашликка эга эканлигини намоён қилди ва ушбу 5 та штамм ўзаро боғлиқ эканлигини кўрсатди. Кластердаги бошқа штамmlар билан кетма-кетликнинг ўхшашлиги 98% ни ташкил этди.

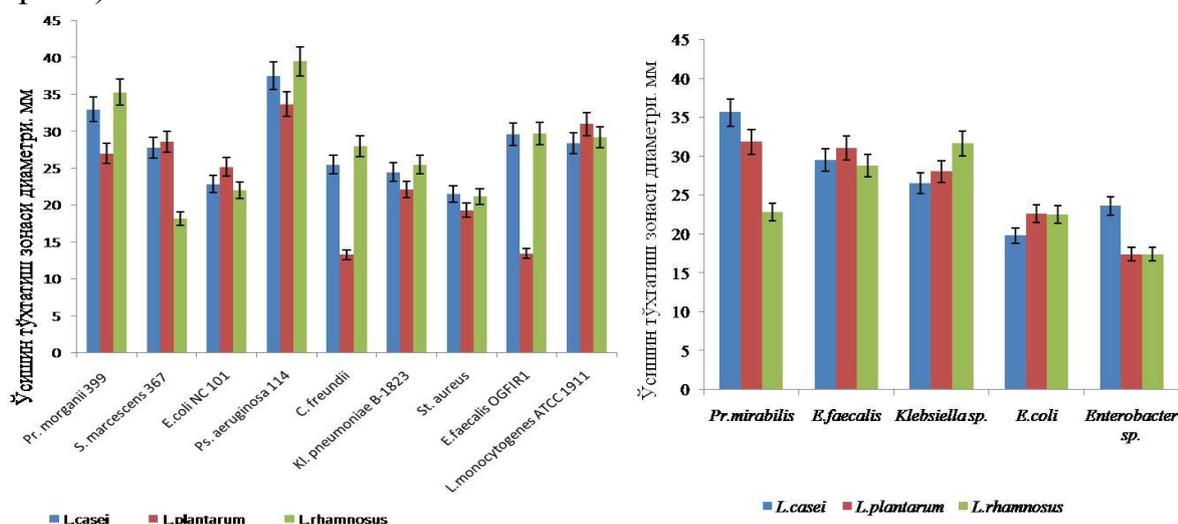
Ажратилган маҳаллий лактобацилла штамmlарининг пробиотик хоссаларини тадқиқ этиш. Тадқиқ қилинаётган лактобацилла штамmlарининг антибиотиклар таъсирига сезгирлиги. САБ ларни қўллашга тавсия қилишдан аввал уларнинг антибиотикларга сезгирлигини аниқлаш зарур. Чунки, антибиотикка чидамли штамmlар патоген бактерияларга чидамлилик генини узатиш орқали одам организмига зарар етказиши мумкин (Herreros M., 2005).

Биз тадқиқ қилган лактобацилла штамmlарининг 100% ванкомицин ва оксациллинга чидамлилик қайд қилинди. Лактобацилла штамmlарининг ванкомицин таъсирига чидамлилиги хромасомаларда жойлашган генларда кодланганлиги туфайли чидамлилик бошқа микроорганизмларга узатилмайди (Н.Л.Бруслик, 2015). Барча штамmlарда гентамицин, эритромицин, хлорамфеникол, линкомицин, цефотаксим, рифампицин, ампициллинга

сезгирлик кузатилди (культуралар ўсишни тўхтатиш зонаси диаметри 20 дан 35 мм гачани ташкил этди).

Маҳаллий лактобактерия штамmlарининг антибиотикларга сезгирлик профилини таҳлил қилиб, шундай хулоса қилиш мумкинки, янги ажратилган штамmlарнинг антибиотикларга сезгирлик профили мазкур авлоднинг типик культуралари учун хос бўлган профилдан фарқ қилмайди.

Маҳаллий лактобацилла штамmlарининг шартли патоген ва патоген микроорганизмларнинг типик штамmlарига қарши антимиқроб таъсири. Биз 17 та янги ажратилган лактобактерия штамmlарининг шартли патоген ва патоген микроорганизмларнинг 9 та типик штамmlарига қарши антимиқроб таъсирини ўргандик. Текширилган *Lactobacillus* штамmlари барча шартли патоген микроорганизмларга қарши юқори антимиқроб таъсирни намоён қилди (2-расм).



2-расм. Лактобактерия штамmlарининг шартли патоген ва патоген микроорганизмларнинг типик ва клиник штамmlарига қарши антимиқроб таъсири

Маҳаллий лактобацилла штамmlарининг шартли-патоген ва патоген микроорганизмларнинг клиник штамmlарига қарши антимиқроб таъсири. Ажратилган лактобактерия штамmlари *Proteus mirabilis* нинг 22 та клиник изолятига қарши юқори антагонистик фаоллик намоён қилди, ўсишни тўхтатиш зонаси диаметри 31,6 ммдан 38,7 ммни ташкил қилди. Шунингдек, лактобацилла штамmlарининг *Enterococcus faecalis* турига мансуб 25 та клиник изолятига қарши фаоллиги текширилди ва ўсишни тўхтатиш зонаси диаметри 27,5 ммдан 31,6 ммни ташкил қилди. Культуралар шунингдек бошқа энтеробактериялар: клебсиелла, эшерихия ва энтеробактерларга қарши ҳам юқори фаолликка эга эканлиги аниқланди.

Шундай қилиб, ажратилган лактобактерия штамmlарининг антимиқроб фаоллигини аниқлашга оид ўтказилган тадқиқотларда шу маълум бўлдики, штамmlар нафақат шартли патоген ва патоген микроорганизмларнинг типик штамmlарига қарши, балки клиник штамmlарга қарши ҳам юқори фаолликка эга.

Диссертациянинг «Маҳаллий лактобактерия штамлари экзополисахаридларини ажратиш ва уларнинг физик-кимёвий ва биологик фаоллигини ўрганиш» деб номланган тўртинчи бобида маҳаллий лактобактерия штамларининг культурал суюқлигидан ЭПС ларни ажратиш ва қисман тозалаш, олинган ЭПС ларнинг физик-кимёвий хоссалари (ИҚ-спектрлари, моносахарид таркиби ва молекуляр оғирлиги) ва биологик фаоллигини тадқиқ қилиш бўйича тадқиқот натижалари баён этилган.

Тадқиқ этилган 10 та культурадан 8 та культурада ЭПС синтезлаш қобилияти борлиги аниқланди (1-жадвал).

1-жадвал.

Лактобактерия штамларининг экзополисахарид ҳосил қилиши

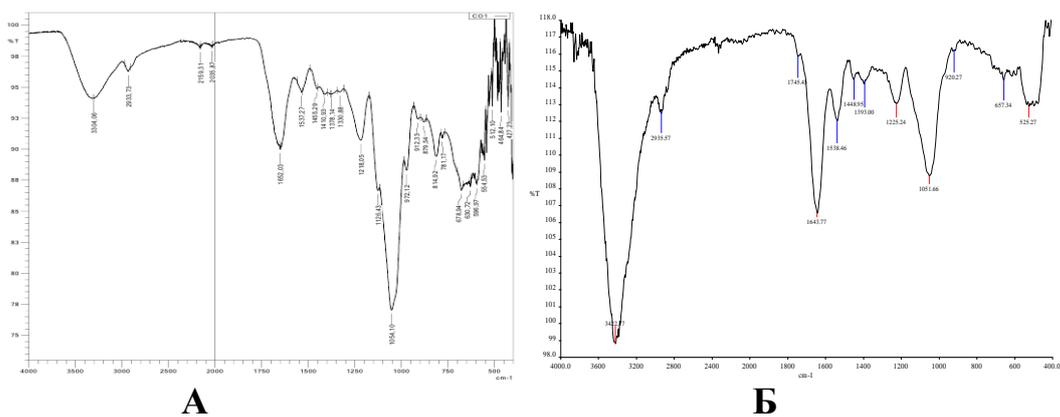
Культуралар	Экзополи-сахарид ҳосил қилиши, мг/л	Умумий полисахаридлар миқдори, %.	Оқсил миқдори, %.	Умумий азот миқдори, %.
<i>L.plantarum</i> LPN1*	170,0	64,29	3,7	маълумот йўқ
<i>L.casei</i> AL 15 **	14,1	63,85	3,4	маълумот йўқ
<i>L.casei</i> CO1	400,0	65,59±0,7	7,11	1,13
<i>L.plantarum</i> ЭБ-2	250,0	67,54±0,01	7,37	1,17
<i>L.plantarum</i> к-3	175,0	70,2±0,02	текширилмади	текширилмади
<i>L.rhamnosus</i> ж.с.2	75,0	66,25±0,01	текширилмади	текширилмади
<i>L.casei</i> К7	24,2	69,22 ±0,4	7,27	1,15
<i>L.casei</i> К7/4	18,73	текширилмади	текширилмади	текширилмади
<i>L.casei</i> К 7/3	10,0	68,03±0,3	7,11	1,22
<i>L.plantarum</i> АБ-1	16,7	текширилмади	текширилмади	текширилмади

Изоҳ: *- Bukola C. Adebayo-tayo et al. 2008; ** - Pinaria Yeanly Wuenan, et al. 2016;

Экзополисахарид ҳосил қилувчи 8 та штамдан 4 таси *L. casei* турига мансуб: CO₁, К7/3, К7, К7/4; 3 штамм *L.plantarum* га мансуб: АБ-1, ЭБ-2, к-3 ва 1та штамм *L. rhamnosus* га мансуб (ж.с.2). Юқоридаги штамларнинг культурал суюқлигидан ажратиб, диализ қилинганидан сўнг лиофил қуритилган экзополисахаридлари қаймоқ рангли аморф кукун кўринишида бўлиб, сувда яхши эрийди, бир текис толали структурага эга.

Шундай қилиб, маҳаллий лактобактерия штамларининг ЭПС ҳосил қилиш қобилиятини скрининглаш настарин гули эпифит микрофлорасидан ажратилган *L. casei* CO₁ культураси энг кўп миқдорда ЭПС синтезлаш қобилиятига эгаллигини кўрсатди. Ушбу далил эпифит микрофлора ҳам ЭПС-ҳосил қилувчи лактобактерияларни ажратиш олиш учун манба бўлиши мумкинлигини кўрсатади.

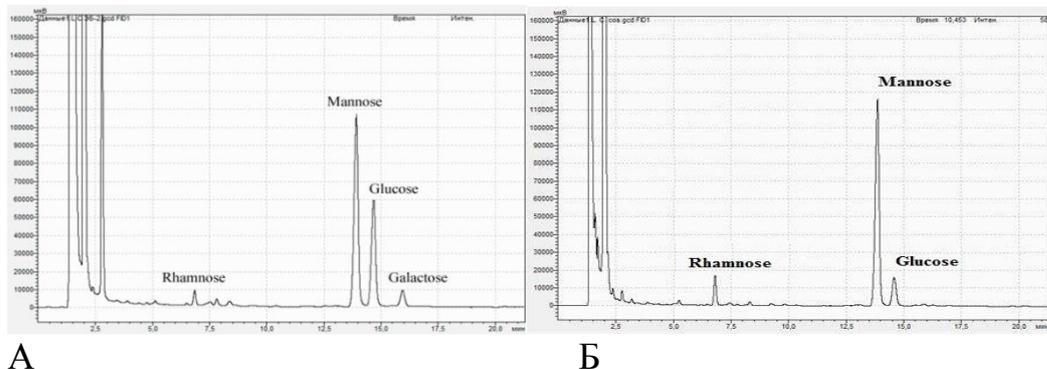
Лактобактерия штамларидан олинган экзополисахаридларнинг ИҚ-спектроскопик таҳлили. Олинган экзополисахаридларнинг инфрақизил спектроскопик таҳлили ЎзР ФА Ўсимлик моддалари кимёси институти ходимлари билан ҳамкорликда олиб борилди. Текширилган барча лактобактерия штамларининг ЭПС лари ИҚ-спектрларида углеводлар синфи учун хос бўлган интенсив ютилиш чўкқилари мавжуд (3-расм).



3-расм. Культуралар ЭПС ларининг ИҚ-спектри: А. *L.casei* CO₁, Б. *L.plantarum* ЭБ-2

ЭПС ларнинг моносахарид таркиби ва молекуляр оғирлигини аниқлаш. 4 та культурадан олинган экзополисахаридларнинг моносахарид таркиби ЎЗР ФА Ўсимлик моддалари кимёси институти ходимлари билан ҳамкорликда аниқланди. *L. casei* CO₁ культурасидан олинган ЭПС моносахарид таркибининг ГХ-таҳлили шуни кўрсатдики, ушбу ЭПС манноза, глюкоза ва рамнозадан таркиб топади. Моносахаридларнинг моляр нисбати мос равишда 11,3:1,7:1 га тенг. Молекуляр оғирлиги 71000 Da га тенг.

Шундай қилиб, *L. casei* K7/3 штаммининг ЭПС моносахарид таркиби гидролизланганда мос равишда моляр нисбатда 2,7:1,5:1 бўлган, глюкоза, манноза ва галактоза ажралиши аниқланди. Молекуляр оғирлиги 5600 Da га тенг. *L. casei* K7 ЭПС таркибида ҳам моляр нисбати 2,7:2,7:1 мос равишда бўлган, глюкоза, манноза ва галактоза аниқланди (4-расм). Молекуляр оғирлиги 5600 Da га тенг.



4-расм. *L.plantarum* ЭБ-2 (А) ва *L.casei* CO₁ (Б) ЭПС ининг моносахарид таркиби

L.plantarum ЭБ-2 ЭПС ГХ-хроматограммсида ҳам моляр нисбати 21,7:12,4:2:1 мос равишда бўлган, глюкоза, манноза, галактоза ва рамноза аниқланди. *L.plantarum* ЭБ-2 ЭПС молекуляр оғирлиги 31600 Da га тенг. *L.rhamnosus* ж.с. 2 ЭПС молекуляр оғирлиги 63000 Da га тенг. Лактобациллалар экзополисахаридларининг молекуляр оғирлиги 40 дан 6000 Da гача бўлади (Ji Wang et al, 2015).

Шундай қилиб, олинган маълумотлар кўрсатяптики, тадқиқ қилинган лактобацилла ЭПС паст молекуляр оғирликка эга ва нейтрал моносахаридлар: манноза, глюкоза, галактоза ва рамноза қолдиғидан ташкил топган.

Маҳаллий лактобацилла штаммларининг симулирланган ошқозон шираси (рН 2) ва ингичка ичак шираси (рН 8) таъсирига чидамлилиги. Биопрепаратлар таркибига киритиладиган пробиотик культуралар ОХҚЙ юқори токсикликка эга суюқликлари – ошқозон шираси, ингичка ичак шираси ва ўт суюқлигининг ингибирловчи таъсирига бардош бериш учун маҳсус ҳимоя механизmlарига эга бўлиши керак. Лактобактериялар томонидан ЭПС ҳосил қилишнинг муҳитнинг ноқулай таъсиридан ҳимоя механизми сифатидаги аҳамиятини аниқлаш учун ЭПС ҳосил қилувчи лактобацилла штаммларининг симулирланган ошқозон шираси (рН 2), ингичка ичак шираси, ўт суюқлиги ва ош тузининг юқори концентрациялари таъсиридаги яшовчанлиги аниқланди (2-жадвал).

2-жадвал

Лактобактерия штаммларининг симулирланган ошқозон шираси (рН 2) ва ингичка ичак шираси (рН 8) таъсирига чидамлилиги, lg КХҚБ/мл

Штаммлар	СОШ рН-2				СИИШ рН-8			
	0	30 дақ	60 дақ	90 дақ	1 с	2 с	3 с	4 с
<i>L.casei</i> К7/3	9,08±0,04	1,06±0,01	0	0	8,03±0,02	7,08±0,04	7,03±0,02	7,03±0,04
<i>L.casei</i> К7	9,08±0,02	2,05±0,01	0	0	8,07±0,03	7,08±0,04	7,10±0,03	7,08±0,02
<i>L.casei</i> К7/4	9,03±0,05	4,07±0,02	0	0	7,07±0,02	6,03±0,03	6,00±0,02	6,08±0,04
<i>L.casei</i> СО1	9,10±0,04	1,03±0,01	0	0	8,08±0,03	7,06±0,03	7,06±0,02	6,06±0,02
<i>L.plantarum</i> ЭБ-2	9,05±0,03	6,02±0,04	4,1±0,08	3,03±0,02	8,08±0,04	8,07±0,03	7,06±0,03	6,06±0,04
<i>L.plantarum</i> к-3	9,05±0,05	1,03±0,01	2,03±0,02	4,10±0,03	8,09±0,05	7,08±0,04	6,06±0,03	5,07±0,03
<i>L.plantarum</i> АБ-1	9,08±0,04	1,08±0,01	0	0	7,07±0,04	7,03±0,02	7,08±0,04	6,0±0,03
<i>L.rhamnosus</i> ж.с.2	9,05±0,03	0	0	0	8,03±0,02	7,08±0,04	7,03±0,02	6,03±0,02

ЭПС синтезловчи лактобактерия штаммларининг симулирланган ошқозон шираси (рН 2, 90 дақиқа) таъсиридаги яшовчанлиги ўрганишда 8 та культурадан 6 таси ошқозон ширасининг кислоталилига сезгир эканлиги аниқланди: СОШ да 30 дақиқа турганидан кейин тирик хужайралар титрининг логарифми кескин 8 бирликка пасайиши кузатилди.

Фақат 2 та культурада: *L.plantarum* к-3ва ЭБ-2 СОШ билан 90 дақиқа ишлов берилганида тирик хужайралар аниқланди ва тирик хужайралар титрининг логарифми, мос равишда 4,10±0,03 ва 3,03±0,02 lg КХҚБ/мл га тенг бўлди.

Культураларнинг ошқозон шираси таъсирига сезгирлигини муҳит рН ининг паст кўрсаткичларида ва хлорид кислота таъсирида полисахаридларнинг қисман гидролизга учраши билан изоҳлаш мумкин. Тадқиқ этилган культураларнинг барчаси ингичка ичак учун хос бўлган ишқорий муҳит (рН 8) таъсирида 4 соат давомида ишлов берилганда ҳам юқори чидамликни намоён қилди.

ЭПС ҳосил қилувчи лактобактерия штаммларининг ўт суюқлиги ва NaCl нинг турли концентрациялари таъсирига чидамлилиги. Биз ЭПС ҳосил қилувчи 8 та маҳаллий лактобактерия штаммининг ўт суюқлиги таъсирига чидамлилигини таркибида 0,2%, 0,3% ва 0,4% ўт суюқлиги тутувчи суюқ МРС озуқа муҳитида ўстириш орқали аниқладик. *L. casei* К7 культураси ўт суюқлигининг 0,4%-ли концентрациясига энг чидамли культура эканлиги аниқланди, тирик хужайралар титри логарифми 9,07±0,04 lg КХҚБ/мл ни ташкил этди. Озуқа муҳити таркибида ўт суюқлигининг концентрацияси 0,4%

бўлганда *L. casei* K7/3 культурасининг тирик ҳужайралар титри логарифми 3 бирликка, *L. casei* CO₁ ва K7/4 культуралари тирик ҳужайралари титри логарифми 4 бирликка камайганлиги қайд этилди. Қолган культураларда ҳам шу каби чидамлилиқ кузатилди (3-жадвал).

3-жадвал

Штаммларнинг ўт суюқлиги ва NaCl нинг турли концентрациялари таъсирига чидамлилиги

штаммлар	NaCl нинг турли концентрацияларида ҳужайралар сони, lg КХҚБ/мл				Ўт суюқлигининг турли концентрацияларида ҳужайралар сони, lgКХҚБ/мл		
	0%	2%	4%	6.5%	0.2%	0.3%	0.4%
<i>L.casei</i> K7/3	10,03±0,05	8,0±0,03	8,03±0,03	5,05±0,02	10,01±0,05	8,03±0,04	7,05±0,03
<i>L.casei</i> K7	9,10±0,06	9,05±0,04	9,03±0,05	8,06±0,03	9,08±0,05	9,07±0,04	9,07±0,04
<i>L.casei</i> K7/4	10,02±0,05	9,10±0,06	9,10±0,06	9,07±0,04	8,05±0,03	7,03±0,02	6,09±0,02
<i>L.casei</i> CO1	9,10±0,06	9,08±0,05	9,06±0,04	7,03±0,04	6,09±0,02	6,05±0,04	5,09±0,04
<i>L.plantarum</i> ЭБ-2	9,10±0,06	9,07±0,04	9,08±0,05	8,05±0,04	9,08±0,05	8,08±0,04	7,10±0,04
<i>L.plantarum</i> κ-3	9,10±0,06	9,09±0,06	8,09±0,04	8,05±0,04	8,09±0,04	7,03±0,04	6,03±0,02
<i>L.plantarum</i> АБ-1	10,1±0,05	8,06±0,03	8,06±0,03	6,03±0,02	8,03±0,03	7,08±0,04	6,10±0,04
<i>L. rhamnosus</i> ж.с.2	9,06±0,04	9,05±0,04	9,03±0,05	7,10±0,04	8,06±0,03	7,03±0,02	6,06±0,02

Барча ўрганилган культуралар озуқа муҳити таркибида ош тузининг 2% ва 4% концентрациясига чидамлилиги аниқланди, ҳужайралар титри логарифми бир бирликка камайди ва 8,05±0,02 lg КХҚБ/мл дан паст бўлмади. Культуралар NaCl нинг озуқа муҳитидаги 6,5%-ли концентрациясига турлича даражада чидамлилиқ намоён қилишди. *Lactobacillus casei* K7/3 культураси NaCl нинг озуқа муҳитидаги 6,5%-ли концентрацияси таъсирига энг сезгир бўлиб, ҳужайра титри логарифми 5,05±0,02 lg КХҚБ/мл гача пасайиши қайд этилди.

Лактобактерияларнинг пробиотик культуралари учун рН3 ли муҳит ва ўт суюқлигининг 0,3% концентрациясига чидамлилиқ стандарт кўрсаткич ҳисобланади [Liong M., 2005]. Лактобактериялар учун хос пробиотиклик хусусияти биргина микроорганизмлар таъсири ва ҳужайра деворининг таркибий қисмлари билан эмас, балки ЭПС ҳосил қилиш билан ҳам боғлиқ. Лактобактерия ЭПС лари ҳужайра атрофида кислотали стрессдан ҳимояловчи тўсиқ ҳосил қилиб, протонларнинг цитоплазмага диффузияланишига тўсқинлик қилади [Raineу P.V., 2004].

Шундай қилиб, тажрибалар натижалари ЭПС ҳосил қилиши туфайли лактобацилла штаммлари ОХҚЙ ва технологик жараённинг стресс омиллари таъсирига бардош беришини кўрсатмоқда. Тадқиқ этилган штаммлар ўт суюқлиги ва ҳазм ферментлари каби зарарли биологик суюқликлар таъсиридан ҳимоялаш механизмларига эга.

ЭПС ҳосил қилувчи лактобактерия штаммларининг адгезияланиш фаоллигини тадқиқ қилиш. ЭПС ларнинг асосий вазифаси лактобациллаларнинг атроф-муҳитнинг таркибий қисмлари орасидаги ўзаро таъсири ва бактерияларнинг адгезияланишини амалга оширишдан иборат. Адгезияланиш қобилятининг ЭПС ҳосил қилиш қобиляти билан боғлиқлигини аниқлаш учун Сасо-2 ҳужайра линиясидан фойдаланган ҳолда лактобацилла штаммларининг адгезив фаоллигини аниқлашга оид тажрибалар ўтказилди. Сасо-2 ҳужайра линияси – яхши ўрганилган ҳужайра линияси бўлиб одам йўғон ичагининг аденокарциномасидан олинган ва пробиотик культураларнинг

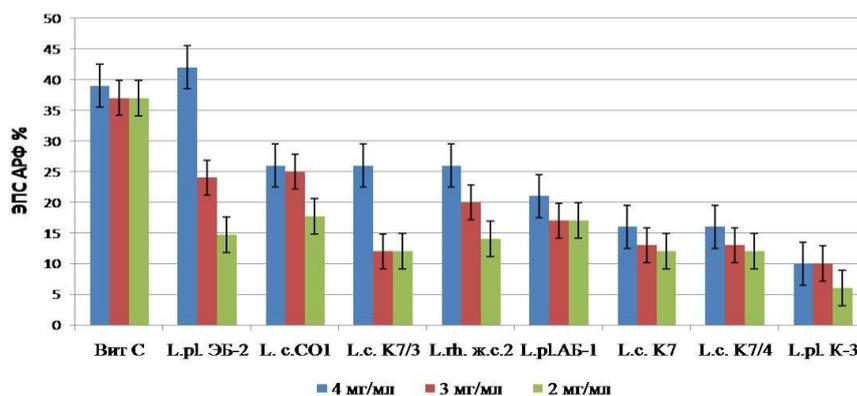
адгезияланиш қобилятини ўрганишда ичак эпителий қаватининг *in vitro* модели бўлиб хизмат қилади [Jankowska, 2008].

Тадқиқотларимизда текширилган штаммларнинг Сасо-2 хужайраларига адгезияланиши ҳар хил штаммда турлича бўлиб, штаммнинг тур мансублигига боғлиқ эмаслиги аниқланди. Пробиотик культураларнинг адгезияланиш фаоллиги текширилганда ушбу кўрсаткичнинг юқори микдорий параметрларини аниқламади. Текширилган штаммлар орасида *L. plantarum* ЭТ-2 ва *L. casei* СО₁ ва *n 6/2* культуралари нисбатан юқорироқ фаоллик намоён қилишди, қолган культуралар паст даражадаги адгезияланиш қобилятини кўрсатишди.

Шундай қилиб, энг фаол ЭПС ҳосил қилувчи штамм - *L. casei* СО₁нинг адгезияланиш фаоллиги хужайра деворига боғланган ЭПС ва қолган 2 та штаммлар - *L. plantarum* ЭТ-2 ва *L. casei n 6/2* нинг адгезияланиш қобиляти бошқа адгезияланиш воситалари билан боғлиқ.

Маҳаллий лактобактерия штаммлари ЭПС ининг биологик фаоллиги. Маҳаллий лактобактерия штаммлари ЭПС нинг антиоксидант фаоллиги спектрофотометрия усули билан дифенилпикрилгидразиннинг (ДФПГ) эркин оксид радикалларини бириктириш фаоллигига кўра тадқиқ этилди.

Лактобактерия ЭПС нинг антиоксидант фаоллигини 2, 3 ва 4 мг/мл концентрацияларида тадқиқ этилди. Назорат сифатида аскорбин кислотасидан фойдаланилди. *L. plantarum* ЭБ-2 штаммидан олинган ЭПС нисбатан юқори антиоксидант фаолликка эга эканлиги аниқланди (5-расм).



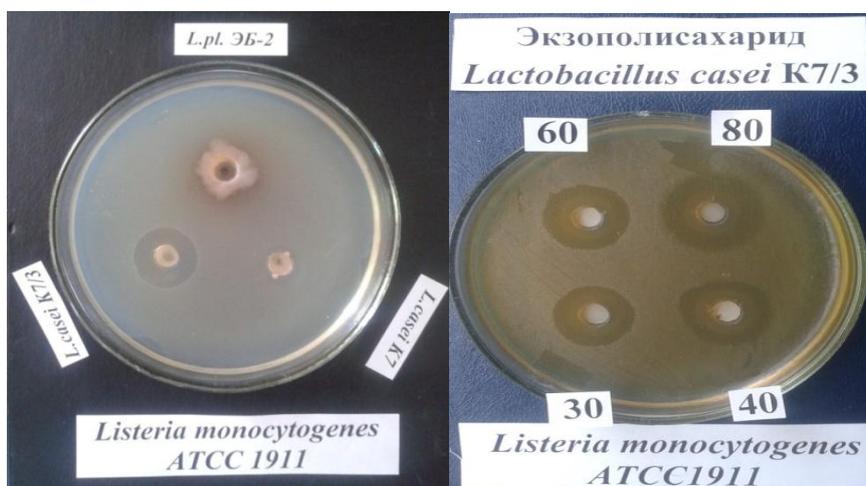
5-расм. Лактобактерия штаммлари ЭПС нинг антиоксидант фаоллиги

Натижада, текширилган лактобацилла ЭПС нинг антиоксидант фаоллигида хилма-хиллик борлиги аниқланди. Ушбу хилма-хилликни ЭПС нинг антиоксидант фаоллиги унинг моносахарид таркиби, молекуляр оғирлиги ва молекуласидаги гликозид боғлари конфигурацияси ҳамда ажратишда фойдаланилган экстракция усуллари каби турли омиллар билан узвий боғлиқлиги билан тушунтиришимиз мумкин (J. Cao, 2014).

Шундай қилиб, ЭПС физик-кимёвий хусусиятларини тадқиқ қилиш натижалари таҳлили асосида шундай хулоса қилиш мумкинки, *L. plantarum* ЭБ-2 штаммининг юқори антиоксидант фаоллиги унинг паст молекуляр оғирлиги (31 600 Da) ва таркибида глюкоза микдорининг юқорилиги билан боғлиқ.

Лактобактерия штамлари ЭПС нинг *Listeria monocytogenes* озиқа патогенига қарши антимикроб фаоллиги агарга диффузияланиш усули ёрдамида аниқланди. *L.casei* К7/3 культурасидан олинган ЭПСнинг 20 мг/мл концентрацияли сувли эритмаси *Listeria monocytogenes* АТСС 1911 га қарши антимикроб фаоллик намоён қилди, ўсишни тўхтатиш зонаси диаметри 16 мм ни ташкил қилди. *L.casei* К7 ва *L.plantarum* ЭБ-2 культураларидан ажратилган ЭПС листерияга қарши фаоллик кўрсатмади.

L.casei К7/3 культурасидан олинган ЭПС нинг антимикроб фаоллигининг концентрацияга боғлиқлиги ҳам текширилди. Бунда ЭПС нинг 30, 40, 60 ва 80 мг/мл концентрацияларида *Listeria monocytogenes* АТСС 1911 ўсишини тўхтатиш зонаси диаметри, мос равишда, 20, 22, 22 ва 25 мм ташкил қилди (6-расм).



6-расм. *L.casei* К7/3 культурасидан олинган ЭПС нинг *Listeria monocytogenes* АТСС 1911 га қарши антимикроб фаоллиги

L.casei К7/3 культурасидан олинган ЭПС нинг антимикроб фаоллигини ушбу модда олигосахарид ҳисобланиб, қуйи молекуляр оғирликка эгаллиги туфайли тест-микроорганизмнинг ҳужайра деворидаги тешиқлар орқали кириб ҳужайранинг бўлинишини издан чиқариши, ҳужайра деворининг ўзини ва цитоплазматик мембранани бузиши, ҳамда ДНК занжирини узиши билан изоҳлаш мумкин (He et al., 2010).

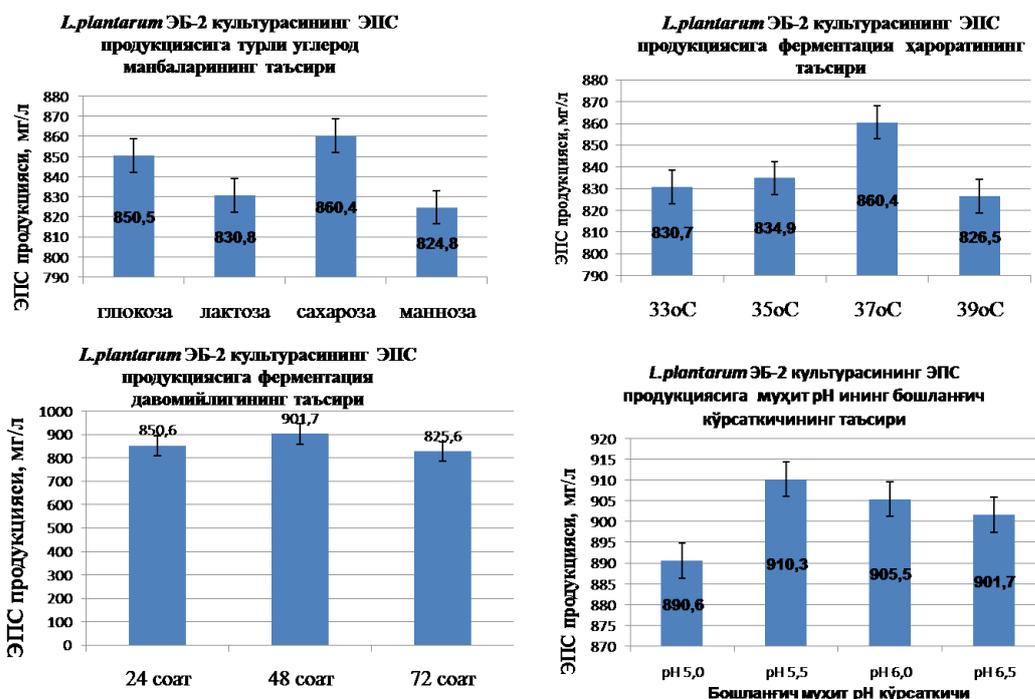
Шундай қилиб, тадқиқот натижалари шуни кўрсатадики, лактобацилла штамларидан олинган ЭПС юқори биологик фаолликка эга ва уларнинг фаоллиги физик-кимёвий хоссаларига чамбарчас боғлиқ.

Диссертациянинг «ЭПС-ҳосил қилувчи *Lactobacillus plantarum* ЭБ-2 штамми учун озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитларини оптималлаштириш» деб номланган бешинчи бобида азот манбалари (пептон ва триптон) ва углерод манбалари (глюкоза, сахароза, лактоза ва манноза) ва ўстириш шароитларининг (инкубация ҳарорати ва вақти, муҳитнинг бошланғич рН кўрсаткичи) таъсирини тадқиқ қилиш бўйича олинган натижалар баён қилинган.

Ушбу тажрибаларни амалга оширишда ферментация муҳити сифатида творог зардоби асосида тайёрланган озуқа муҳитидан фойдаланилди

(Карапетьян, 2009). Оптимал муҳит таркибини танлаб олишда пептон ва триптондан азот манбаси сифатида, глюкоза, сахароза, лактоза ва маннозадан углевод манбаси сифатида фойдаланилган. Оптимал ўстириш шароитларини аниқлашга оид тажрибалар қуйидаги кўрсаткичларда олиб борилди: ферментация ҳарорати 33°C, 35°C, 37°C ва 39°C; ферментация вақти – 24, 48 ва 72 соат; озуқа муҳити рН кўрсаткичи 5,0, 5,5, 6,0 ва 6,5.

(7-расм).



7-расм. *Lactobacillus plantarum* ЭБ-2 штамми ЭПС-ҳосил қилиши учун оптимал озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитлари

Тадқиқот натижалари шуни кўрсатдики, *L. plantarum* ЭБ-2 культурасининг ЭПС биосинтези фаоллигига сахароза ва пептон энг юқори таъсир кўрсатади. Ферментация ҳарорати 37°C, давомийлиги 48 соат, озуқа муҳити рН 5,5 бўлганда ва доимий чайқатиш шароитида ўстирганда, *L. plantarum* ЭБ-2 культурасининг ЭПС маҳсулоти бошланғич (250 мг/л) кўрсаткичидан 3,6 мартага юқори бўлди ва маҳсулоти чиқиши 910,3 мг/л ни ташкил этди

ХУЛОСАЛАР

«Экзополисахаридлар продуцентлари бўлган маҳаллий лактобактерия штамmlарини ажратиш ва танлаб олиш» мавзусидаги диссертация иши бўйича олиб борилган тадқиқотлар асосида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Илк бор мезофил лактобациллаларнинг 55 та соф культура ҳолидаги маҳаллий штамmlари ажратиб олинди. 25 та штамmlнинг *Lactobacillus* авлодидаги таксономик ўрни белгиланди: 8 та штамм *L. casei*, 10 та штамм *L. plantarum*, 6 та штамм *L. rhamnosus*, 1 та штамм *L. brevis* турига киритилди.

2. Ажратилган лактобацилла штамmlарининг пробиотик хоссалари тадқиқ этилган. Янги ажратилган культуралар ноёб пробиотик хоссаларга эга: шартли-патоген ва патоген микроорганизмларга қарши антимиқроб фаолликка эга, ОХҚЙ нинг стресс омилларига чидамли, биологик фаол моддалар синтез қилади. Қимматли пробиотик хоссаларига кўра *L. plantarum* ЭБ-2 ва к-3 ва *L.casei* К7/3 культуралари биопрепаратлар таркибида пробиотик штамм сифатида фойдаланишга тавсия этилган.
3. Илк бор маҳаллий пробиотик лактобацилла штамmlарининг экзополисахарид синтез қилиш қобилияти скрининг қилинган: ЭПС продуценти бўлган 8 та штаммдан 3 та штамм: *L.casei* СО₁ (400,0 мг/л), *L. plantarum* ЭБ-2 (250,0 мг/л) ва к-3 (175,0 мг/л) энг маҳсулдор штаммлиги кўрсатилган. Эпифит микрофлора ЭПС ҳосил қилувчи штамmlарни ажратиш учун манба бўлиб ҳисобланади.
4. Илк бор маҳаллий лактобацилла штамmlаридан олинган ЭПС ларнинг физик-кимёвий хоссалари тавсифланган. Олинган ЭПС гетерополисахарид бўлиб, таркибида қуйидаги нейтрал моносахаридлар қолдиғи аниқланди: манноза, глюкоза, галактоза ва рамноза. Маҳаллий лактобацилла штамmlаридан олинган ЭПС лар паст молекуляр оғирликка эга (5600 дан 71000 Да гача).
5. Илк бор маҳаллий лактобацилла штамmlаридан олинган ЭПС ларнинг биологик хоссалари аниқланган. Лактобактерия штамmlарининг баъзи пробиотиклик хоссалари ЭПС синтези билан боғлиқлиги аниқланган. *L. plantarum* ЭБ-2 культурасидан олинган ЭПС юқори антиоксидант фаолликка эга. Унинг фаоллиги паст молекуляр оғирлик ва моносахарид таркибида глюкоза борлиги билан боғланганлиги кўрсатилган. *L.casei* К7/3 культурасидан олинган ЭПС *Listeria monocytogenes* АТСС 1911 қарши юқори антимиқроб фаолликка эгалиги аниқланган. *L.casei* К7/3 культурасидан олинган ЭПС биоконсервант сифатида озик-овқат саноатида ишлатиш учун тавсия этилади;
6. *L. plantarum* ЭБ-2 культураси ЭПС синтезини ошириш мақсадида озуқа муҳитининг оптимал таркиби танланди: углевод манбаси (сахароза) ва азот манбаси (пептон). Шунингдек, ўстириш шароитларининг оптимал кўрсаткичлари танланган (ўстириш ҳарорати – 37°С; ўстириш давомийлиги 48 соат, муҳит рНи – 5,5). Озуқа муҳити таркиби ва ўстириш шароитларини оптималлаштириш *L. plantarum* ЭБ-2 культураси ЭПС биосинтезини 3-4 мартагача орттириш имконини беради.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSC.27.06.2017.В.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ И
НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

ЭЛОВА НИЛУФАР АРАШОВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОТБОР МЕСТНЫХ ШТАММОВ
ЛАКТОБАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ**

03.00.04 – Микробиология и вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации доктора философии (PhD)
по биологическим наукам**

Ташкент – 2019

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2019.2.PhD/B301

Диссертация выполнена в Институте микробиологии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (microbio@academy.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный руководитель:

Огай Дарья Кисеновна
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Исхакова Халида Илхамовна
доктор медицинских наук, профессор

Мирзаева Мамлакат Айнакуловна
доктор медицинских наук, профессор

Ведущая организация:

Институт Биоорганической химии

Защита диссертации состоится «___» _____ 20 года в _____ часов на заседании Научного Совета DSc.27.06.2017.B.38.01 при Институте микробиологии и Национальном университете Узбекистана (Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхантахурский район, ул. А. Кадырий 7б, конференц-зал Института микробиологии. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, 246-02-24, e-mail: nauka@nuu.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрирована под № ____). Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхантахурский район, ул. А. Кадырий 7б, Административное здание Института микробиологии, 5-й этаж, библиотека Института микробиологии. Тел.: (+99871) 241-92-28.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2019 года
(реестр протокола рассылки № ____ от «___» _____ 2019 года)

Арипов Тахир Фатихович
Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

Жураева Рахилия Назаровна
Ученый секретарь Научного совета по
присуждению ученых степеней, к.б.н.

Гулямова Ташхан Гафуровна
Председатель научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ

(аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мире, в связи с возрастающими индустриальными потребностями в полисахаридах, получили развитие исследования по поиску и использованию микроорганизмов, продуцирующих экзополисахариды (ЭПС). Полисахариды полученные из микроорганизмов, благодаря климатической независимости, простоте, экономичности производства и регулированию свойств занимают все более лидирующие позиции. Данные полисахариды многообразны по строению, физико-химическим, биологическим свойствам и локализациям в клетках. С учетом функциональных (способность растворяться в воде, создавать высоковязкие растворы, студни, гели) и биологических свойств определяется сфера применения полисахаридов. В настоящее время в мире очень развито получение и применение бактериальных полисахаридов, таких как ксантан, геллан, курдлан и др. В связи с этим, среди микробных экзополисахаридов значительное внимание уделяется экзополисахаридам молочнокислых бактерий.

В мире важное практическое значение имеют исследования, направленные на определение влияния ЭПС лактобактерий на физиологические процессы, протекающие в организме человека и животных. Особое значение имеет поиск и выделение ЭПС-синтезирующих штаммов лактобактерий, характеристика их морфологических и физиолого-биохимических свойств, накопление данных о химической структуре, физических и биологических свойствах ЭПС синтезируемых разными видами и штаммами, обоснование холестерин-снижающей, иммуномодуляторной, противоопухолевой и антимуtagenной активности ЭПС лактобактерий. В связи с этим, выделение и отбор местных штаммов лактобактерий-продуцентов экзополисахаридов, определение химической структуры и биологической активности полученных ЭПС имеют важное научное и прикладное значение.

В Республике особое внимание уделяется обеспечению населения необходимым количеством биологически полноценных пищевых продуктов и достигнуты определенные результаты по использованию инновационных достижений для разработки новых биопрепаратов, обладающих терапевтическим эффектом. В стратегии развития Республики Узбекистан (4-направление) изложены задачи по «Реализации мер по дальнейшему развитию фармацевтической промышленности, улучшению обеспечения населения и медицинских учреждений недорогими, высококачественными лекарственными средствами и медицинскими изделиями»¹. В реализации поставленных задач, важное значение имеет получение новых безвредных биопрепаратов на основе местных штаммов лактобацилл и их экзополисахаридов.

¹Указ Президента УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан»

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», в постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-3489 от 23 января 2018 года «О мерах по дальнейшему упорядочению производства и ввоза лекарственных средств и изделий медицинского назначения», в постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-3552 от 14 февраля 2018 года «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли» и в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий в республике. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий Республики: VI. «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы. В мировой научной литературе накоплены многочисленные данные по выделению и отбору штаммов лактобактерий с высокой биологической и функциональной активностью и их практическом использовании в качестве пробиотиков (Bergmaier, Champagne, Lacroix, 2003; Champagne, Gardner, Lacroix, 2007 и др.).

Многие исследователи особо отмечают роль полисахаридов в качестве составных частей клеточной оболочки (пептидогликаны) и в повышении устойчивости клеток бактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, такие как высокая кислотность и воздействие солей желчных кислот (de los Reyes-Gavilan et al., 2011; Chapot-Chartier et al., 2011).

В литературе широко освещены работы по выделению и изучению морфологических, физиолого-биохимических свойств штаммов лактобактерий, продуцирующих экзополисахариды (Aly Savadogo et al., 2004; Yuksekdog et al., 2008; Bukola C. et al., 2008; Wang et al., 2010; Byoung-Joo Seo et al., 2015; Adesulu-Dahunsi et al., 2018); выделению и очистке экзополисахаридов из культуральной жидкости, оптимизации состава сред и условий культивирования штаммов лактобактерий для максимальной продукции ЭПС, установлению моносахаридного состава и молекулярной массы полимеров (Adebayo-Tayo et al., 2008; Zajsek et al., 2011; Van Calsteren et al., 2015; Ji Wang et al., 2015); использованию экзополисахаридов в промышленности в качестве желирующих агентов, биосурфактантов, эмульгаторов и биосорбентов (Poli et al., 2010; de Oliveira Martins et al., 2008); оценке антиоксидантной, антимикробной и пребиотической активности ЭПС лактобактерий (Yvonne Wang et al., 2010; Liu et al., 2010; Grosu-Tudor et al., 2013; Salazar et al., 2015), выявлению холестерин-снижающей, иммуномодулирующей, противораковой и антимуtagenной активности ЭПС, полученных из лактобактерий (H. Tsuda et al., 2008; Zhang et al., 2009; Surayot et al., 2014; Правдивцева М., 2012), исследованию биогенного синтеза наночастиц серебра экзополисахаридами лактобактерий (Adebayo-Tayo, 2017; Saravanan et al., 2017), секвенированию кластера eps-гена лактобактерий (Siezen R.J. et al., 2008; Suzuki C. et al., 2013).

Учеными Республики проводились исследования по выделению местных штаммов лактобактерий и применению их в молочной промышленности, медицине и фармацевтике (Огай Д.К., 1978, 2002; Кутлиева Г.Дж., 2002; Миралимова Ш.М., 2009; 2017) и получению наночастиц серебра на основе экзополисахаридов diaзотрофных ризобактерий (Расулов Б.Г., 2019).

Связь диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ высшего образовательного или научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в плане научно-исследовательских работ Института микробиологии по реализации проектов ФА-Ф6-Т219 «Изучение влияния бактериоциноподобных веществ, продуцируемых местными штаммами *Lactobacillus casei* group на *Helicobacter pylori* – возбудителя язвенных заболеваний желудка и 12-перстной кишки человека» (2012-2016 гг.) и ВА-ФА-А10-006 «Разработка препарата на основе лактобактерий против возбудителей воспалительных заболеваний ЖКТ человека» (2017-2018 гг.).

Целью исследования являлся отбор местных штаммов лактобактерий-продуцентов экзополисахаридов, характеристика физико-химических свойств и биологической активности полученных ЭПС.

Задачи исследования:

выделение из природных источников штаммов лактобактерий и установление их видовой принадлежности;

оценка пробиотического потенциала выделенных штаммов лактобактерий;

выделение и частичная очистка экзополисахаридов, продуцируемых местными штаммами лактобактерий;

исследование физико-химических свойств и биологической активности ЭПС, отобранных лактобактерий;

оптимизация состава среды и условий культивирования для повышения биосинтеза ЭПС штаммами лактобактерий;

Объектом исследования являлись штаммы лактобактерий, выделенные из различных природных источников, изучение их биосинтетической активности.

Предметом исследования являлось выделение ЭПС-синтезирующих местных штаммов лактобацилл, определение таксономического положения культур, их скрининг по антимикробной активности к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам, установление активности синтеза ЭПС отобранными штаммами, определение физико-химических и биологических свойств ЭПС лактобацилл, оптимизация состава питательной среды и условий культивирования для повышения синтеза ЭПС штаммов лактобактерий.

Методы исследований. При проведении исследований применяли микробиологические, биохимические, биотехнологические, молекулярно-генетические и статистические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

проведена генетическая идентификация активного ЭПС-продуцирующего штамма *L. plantarum* ЭБ-2 на основе секвенса гена 16S рРНК;

впервые определено свойство местных штаммов лактобактерий синтезировать экзополисахариды. По активности синтеза ЭПС отобраны 5 штаммов: *L. plantarum* ЭБ-2, *L. casei* СО₁, К7/3, К7; *L. rhamnosus* ж.с.2;

впервые определены физико-химические и биологические свойства частично очищенных ЭПС местных штаммов лактобацилл;

проведена интенсификация биосинтетического процесса ЭПС путем оптимизации состава питательной среды и условий культивирования штаммов-продуцентов;

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

определены физико-химические и биологические свойства ЭПС лактобацилл и представлены рекомендации в ветеринарную практику основываясь на антимикробных и антиоксидантных свойствах ЭПС;

ЭПС-продуцирующие лактобациллы, с учетом антимикробной активности и антиоксидантных свойств, рекомендованы для применения в молочной, мясной и консервной промышленности;

подобран состав питательной среды и условия культивирования для получения высокой продукции ЭПС из лактобактерий;

Достоверность результатов исследования подтверждается использованием современных микробиологических методов, публикацией научных результатов в ведущих местных и зарубежных журналах пополнением коллекции лактобактерий, внедрением практических результатов исследований. Математическая обработка экспериментальных данных проведена с вычислением статистической средней ошибки, интервалов достоверности и стандартных отклонений с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 и общепринятых методов. Статистические значения результатов были определены вычислением t-критерия Стьюдента.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования заключается в выделении, идентификации и классификации местных штаммов лактобацилл, относящихся к видам *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, установлении ЭПС-продуцирующих свойств штаммов лактобацилл и получении ЭПС с высокой антиоксидантной и антимикробной активностью.

Практическая значимость результатов исследования состоит в пополнении коллекции новыми видами рода *Lactobacillus*, обладающими пробиотическими свойствами. ЭПС-продуцирующие штаммы лактобацилл будут служить основой для создания препаратов для молочной, ветеринарной и фармацевтической промышленности.

Внедрение результатов исследования. На основе результатов использования бактериальной суспензии, состоящей из ЭПС-синтезирующих штаммов лактобацилл при силосовании кормовых культур и лечении диспепсии телят:

Бактериальная суспензия «Бактосил», приготовленная на основе штаммов лактобактерий, внедрена в практику силосования и сенажирования злаковых культур в фермерских хозяйствах Мирзаабадского района Сырдарьинской области, Зангиатинского и Кибрайского районов Ташкентской области (Справка Министерства сельского хозяйства РУз 02/025-3099, от 17 октября 2019 года). Результаты дали возможность устранить заражение сенажа и силоса, обработанного бактериальной суспензией, опасными токсинами грибов рода *Fusarium* и вирусами;

Препарат «Бактосил» внедрен в практику сенажирования люцерны в скотоводческих фермерских хозяйствах Кибрайского района Ташкентской области и козьей ферме Сырдарьинской области (Справка Министерства сельского хозяйства РУз 02/025-3099, от 17 октября 2019 года). Результаты дали возможность увеличить суточный удой и жирность молока коров и коз;

Эффективность местных штаммов лактобактерий при лечении диспепсии телят проверена в фермерских хозяйствах Юкори Чирчикского и Кибрайского районов Ташкентской области (Справка Государственного Комитета Ветеринарии и Развития скотоводства Республики Узбекистан за 02/23-1401, от 24 сентября 2019 года). В результате применения ассоциации штаммов диарея прекратилась на 2 суток и общее состояние больных телят улучшилось.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 13, в том числе, 8 международных и 5 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 23 научные работы, из них 7 научных статей, в том числе 4 в республиканских и 3 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации, получены 2 патента на изобретение.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объём диссертации составляет 116 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Биологическая и функциональная активность штаммов лактобактерий и биосинтез ЭПС штаммами лактобактерий**» дан глубокий анализ литературных источников по выделению и классификации, оценке пробиотических свойств и применению штаммов

лактобактерий для профилактики и лечения различных заболеваний, исследованию биосинтеза экзополисахаридов штаммами лактобактерий и выявлению биологической активности экзополисахаридов.

Во второй главе диссертации **«Объект диссертационной работы и использованные методы»** приведены методы микробиологических, морфолого-культуральных, молекулярно-генетических, биохимических и статистических исследований.

Третья глава диссертации **«Выделение местных штаммов лактобактерий-продуцентов ЭПС и исследование их пробиотических свойств»** содержит описание результатов исследований по выделению и отбору штаммов лактобактерий из различных природных источников, определению морфолого-культуральных, физиологических и биохимических свойств, установлению видовой принадлежности выделенных штаммов лактобактерий, оценке пробиотического потенциала отобранных штаммов лактобактерий.

Выделение штаммов лактобактерий-продуцентов ЭПС из различных природных источников. В качестве источников выделения ЭПС-продуцирующих штаммов лактобактерий служили ферментированные овощи (квашеная капуста, соленые огурцы и помидоры), эпифитная микрофлора различных органов растений (цветы сирени, листья тархуна, плоды туи и айвы), молочные продукты (кумыс, шубат, брынза и сыры), мясные продукты (бастурма) и фекалии здоровых младенцев. Из отобранных 164 образцов выделено 119 изолятов молочнокислых бактерий. Все отобранные изоляты при микроскопировании имели палочковидную форму и размер клеток составлял в среднем 0,6-0,72 x 1,2-2,4 мкм, грамположительные, каталазоотрицательные, сквашивали и восстанавливали лакмусовое молоко с образованием общей титруемой кислотности от 60°Т до 90°Т.

В литературе в качестве источников выделения ЭПС-продуцирующих лактобактерий наиболее часто используются молоко и молочные продукты. Нами наряду с молочными и ферментированными продуктами была использована эпифитная микрофлора различных органов растений.

Таким образом, на основании проведенных морфолого-культуральных, физиологических и биохимических исследований установлено таксономическое положение 25 штаммов: *L.casei* (8 штаммов), *L.plantarum* (10 штаммов), *L.rhamnosus* (6 штаммов), *L.brevis* (1 штамм).

Идентификация ЭПС-продуцирующей культуры L.plantarum ЭБ-2 секвенированием и филогенетическим анализом гена 16S рРНК. Культура *L.plantarum* ЭБ-2 идентифицирована путем секвенирования и филогенетического анализа гена 16S рРНК совместно с сотрудниками центра Геномики и биоинформатики. BLAST анализ секвенса 16S рРНК гена показал высокую идентичность (100%) с 15 типовыми штаммами *L.plantarum*. Филогенетический анализ выявил что, секвенс-продукт из *L.plantarum* ЭБ-2 находится очень близко к секвенс продукту штамма *L.plantarum* SRCM103411 (Рис. 1).

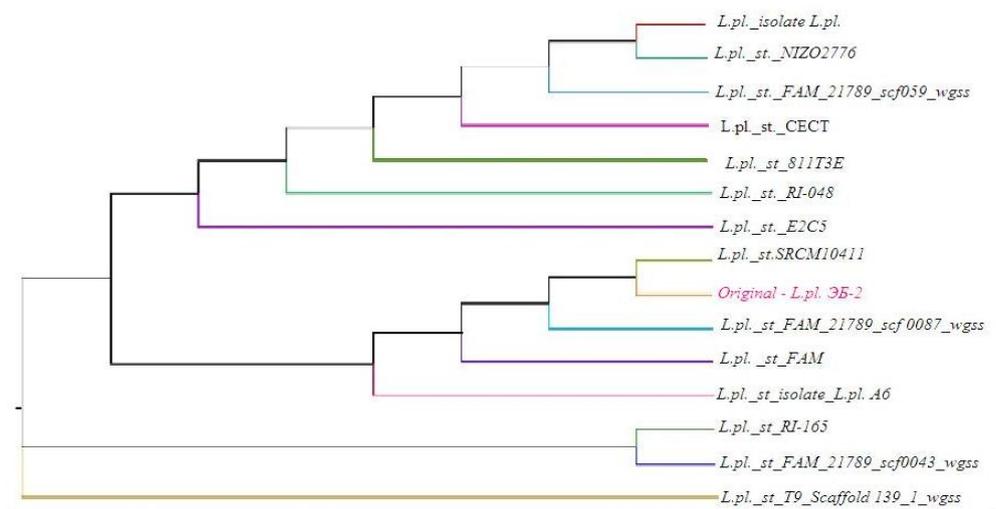


Рис. 1. Филогенетическое древо, составленное по результатам секвенса 16S рНК гена штамма *L.plantarum* ЭБ-2

Анализ полученного филогенетического древа показал, что штаммы *L.plantarum* могут быть сгруппированы в три отдельные ветви, из которых одна ветвь в свою очередь разделена на две ветви. Штамм *L.plantarum* ЭБ-2 сформирован как один из ответвлений наряду с другим ответвлением штамма *L.plantarum* SRCM103411. Внутри этого разветвления *L.plantarum* ЭБ-2 продемонстрировал 100% идентичность последовательности гена 16S рНК с *L.plantarum* FAM 21789 FAM21789 scf0087, *Lactobacillus plantarum* isolate *L.plantarum* A6, *Lactobacillus plantarum* strain Nizo2776 NODE, *L.plantarum* SRCM103411, доказывая, что эти пять штаммов тесно взаимосвязаны. Идентичность последовательности гена 16S рНК с остальными штаммами в кластере составила 98%.

Пробиотические свойства местных штаммов лактобацилл.

Чувствительность исследуемых штаммов лактобацилл к антибиотикам. Перед тем как рекомендовать штаммы МКБ к применению, необходимо определить их чувствительность к антибиотикам. Антибиотикоустойчивые штаммы могут принести вред организму человека или животных, так как они способны передавать гены устойчивости патогенным бактериям (Herrerros M., 2005).

Нами установлено, что у 100% исследованных штаммов лактобацилл обнаружена устойчивость к ванкомицину и оксациллину. Резистентность к ванкомицину кодируется хромосомными генами, она неиндуцибельна и не может передаваться [Н.Л.Бруслик, 2015]. Все изученные штаммы проявили чувствительность к гентамицину, эритромицину, хлорамфениколу, линкомицину, цефотаксиму, рифампицину, ампициллину (диаметр зоны подавления роста составлял от 20 до 35 мм).

Таким образом, полученные нами данные по антибиотикочувствительности показали, что профиль антибиотикорезистентности выделенных местных штаммов не отличается от профиля типовых культур данного рода лактобактерий.

Антимикробная активность штаммов лактобацилл против типовых штаммов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Нами была исследована антагонистическая активность 17 местных штаммов лактобактерий против 9 типовых культур патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Все исследованные нами культуры *Lactobacillus* проявили высокую антагонистическую активность против всех исследованных штаммов условно-патогенных микроорганизмов (рис. 2).

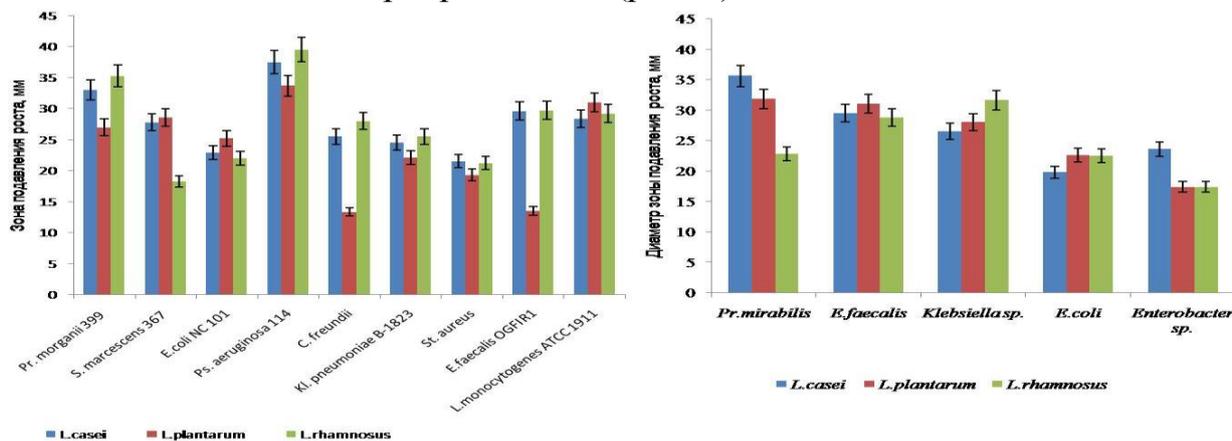


Рис. 2. Антимикробная активность штаммов лактобактерий против типовых и клинических штаммов условно-патогенных микроорганизмов

Антимикробная активность штаммов лактобактерий против клинических изолятов условно-патогенных микроорганизмов. Все исследованные 17 местных штаммов лактобактерий проявили высокую антагонистическую активность против 22 клинических изолятов *Proteus mirabilis*, диаметр зоны подавления роста составил от 31,6 до 38,7 мм. Также исследована активность штаммов против 25 клинических изолятов *Enterococcus faecalis* (диаметр зоны подавления роста от 27,5 до 31,6 мм).

Культуры также были активны против энтеробактерий, как клебсиеллы, эшерихии и энтеробактерии.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований по определению антимикробной активности местных штаммов лактобактерий показали, что штаммы обладают высокой антимикробной активностью не только к типовым штаммам, но и к клиническим изолятам условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Выявлена штаммоспецифичность антимикробного действия исследованных лактобактерий.

В четвёртой главе диссертации «**Выделение экзополисахаридов штаммов лактобактерий и исследование их физико-химических свойств и биологической активности**» изложены результаты исследований по выделению и частичной очистке ЭПС из культуральной жидкости местных штаммов лактобактерий, определению физико-химических свойств (ИК-спектры, моносахаридный состав и молекулярная масса), защитной функции ЭПС от действия токсичных биологических жидкостей и биологической активности ЭПС лактобактерий.

Из 10 исследуемых культур 8 культур проявили способность синтезировать экзополисахариды (Таблица 1).

Таблица 1

Образование экзополисахаридов штаммами лактобактерий

Культуры	Продукция экзополисахарида, мг/л	Содержание общих полисахаридов, %.	Содержание белков, %.	Содержание общего азота, %.
<i>L.plantarum</i> LPN1*	170,0	64,29	3,7	Н.д
<i>L.casei</i> AL 15 **	14,1	63,85	3,4	Н.д.
<i>L.casei</i> CO1	400,0	65,59± 0,7	7,11	1,13
<i>L.plantarum</i> ЭБ-2	250,0	67,54±0,01	7,37	1,17
<i>L.plantarum</i> к-3	175,0	70,2±0,02	Н.о.	Н.о.
<i>L.rhamnosus</i> ж.с.2	75,0	66,25±0,01	Н.о.	Н.о.
<i>L.casei</i> К7	24,2	69,22 ±0,4	7,27	1,15
<i>L.casei</i> К7/4	18,73	Н.о.	Н.о.	Н.о.
<i>L.casei</i> К 7/3	10,0	68,03±0,3	7,11	1,22
<i>L.plantarum</i> АБ-1	16,7	Н.о.	Н.о.	Н.о.

Примечание: *- Bukola C. Adebayo-tayo et al., 2008; ** - Pinaría Yeanly Wuená, et al., 2016;

Из 8 продуцентов экзополисахаридов 4 штамма относятся к *L. casei*: CO₁, К7/3, К7, К7/4; 3 штамма к *L.plantarum*: АБ-1, ЭБ-2, к-3, 1 штамм к *L. rhamnosus* ж.с.2. Лиофильно-высушенные экзополисахариды, выделенные из культуральной жидкости указанных штаммов представляют собой аморфный порошок кремового цвета, хорошо растворяющийся в воде, с гомогенной волокнистой структурой.

Таким образом, в результате скрининга ЭПС-продуцирующей способности местных штаммов лактобактерий выявлено, что культура *L. casei* CO₁, выделенная из эпифитной микрофлоры цветов сирени, обладает наиболее высокой продукцией ЭПС. Этот факт позволяет предполагать, что эпифитная микрофлора также может служить источником выделения ЭПС-продуцирующих лактобактерий.

ИК-спектроскопический анализ экзополисахаридов, полученных из штаммов лактобактерий. Инфракрасно-спектроскопический анализ ЭПС проведен совместно с сотрудниками Института химии растительных веществ АН РУз.

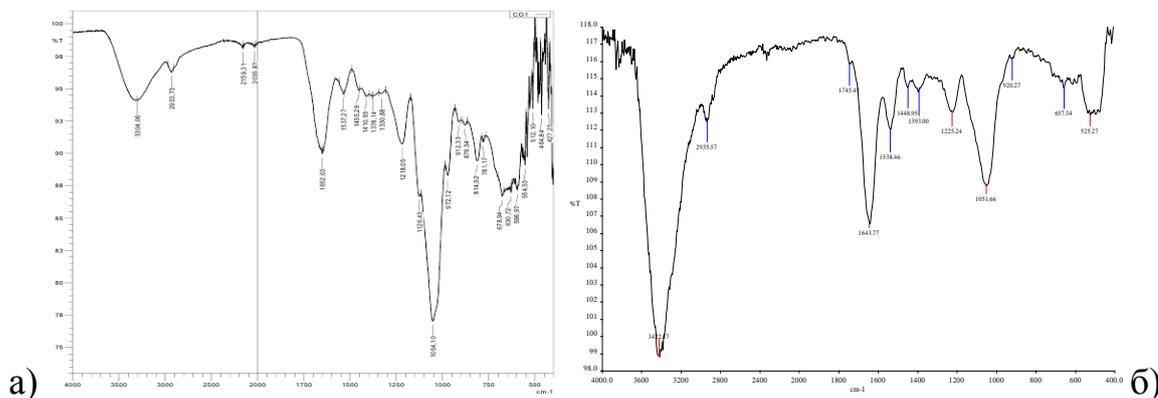


Рис 3. ИК-спектры ЭПС культур: а) *L.casei* CO₁ б) *L.plantarum* ЭБ-2

В ИК-спектрах исследованных ЭПС всех штаммов лактобактерий обнаружены интенсивные полосы поглощения, в целом характерные для класса углеводов (рис.3).

Установление моносахаридного состава и молекулярной массы ЭПС. ГХ-анализ моносахаридного состава ЭПС проведен совместно с сотрудниками Института химии растительных веществ АН РУз. ГХ-анализ моносахаридного состава ЭПС *L. casei* CO₁ показал, что данный ЭПС состоит из маннозы, глюкозы и рамнозы в молярном соотношении 11,3:1,7:1, соответственно. Молекулярная масса ЭПС равна 71000 Da. Таким же образом установлен моносахаридный состав ЭПС штамма *L. casei* K7/3, при гидролизе которого выделены глюкоза, манноза и галактоза в молярном соотношении 2,7:1,5:1, соответственно. Молекулярная масса равна 5600 Da. В составе ЭПС *L. casei* K7 обнаружены также манноза, глюкоза и галактоза, в молярном соотношении 2,7:2,7:1, соответственно. Молекулярная масса равна 5600 Da. В ГХ-хроматограмме ЭПС *L.plantarum* ЭБ-2 также обнаружены манноза, глюкоза, галактоза и рамноза, в молярном соотношении 21,7:12,4:2:1, соответственно (рис. 4).

Молекулярная масса ЭПС *L.plantarum* ЭБ-2 равна 31600 Da. Молекулярная масса ЭПС *L.rhamnosus* ж.с. 2 равна 63000 Da.

Таким образом, полученные данные показывают, что исследованные ЭПС лактобацилл имеют низкую молекулярную массу и состоят из остатков нейтральных моносахаридов: маннозы, глюкозы, галактозы и рамнозы.

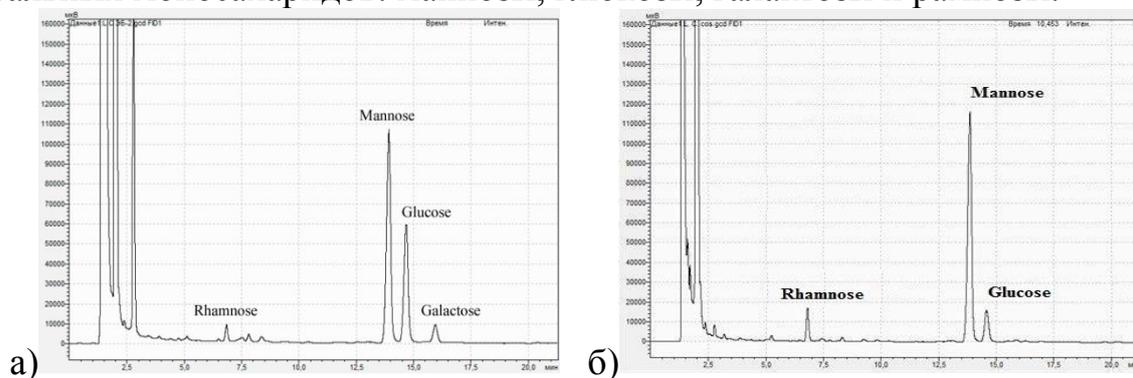


Рис. 4. Моносахаридный состав ЭПС: а) *L.plantarum* ЭБ-2 б) *L.casei* CO₁

Определение устойчивости ЭПС-продуцирующих штаммов лактобактерий к симулированному желудочному соку (pH 2) и соку тонкого кишечника (pH 8). Пробиотические культуры, входящие в состав биопрепаратов должны иметь специфический механизм защиты для противостояния ингибирующему воздействию высокотоксичных жидкостей ЖКТ, таких как желудочный сок, сок тонкого кишечника и желчь. Для выяснения значения продукции ЭПС лактобактериями в качестве механизма защиты от воздействия неблагоприятных факторов мы провели опыты по определению выживаемости ЭПС-продуцирующих штаммов лактобактерий под действием симулированного желудочного сока (pH 2), сока тонкого кишечника (pH 8), желчи и высоких концентраций хлорида натрия (Табл.2).

Таблица 2

Устойчивость штаммов к действию симулированного желудочного сока (рН-2,0) и сока тонкого кишечника (рН-8,0), lg КОЕ/мл

Культуры	СЖС рН-2				СТК рН-8			
	0	30 мин	60 мин	90 мин	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч
<i>L.casei</i> К7/3	9,08±0,04	1,06±0,01	0	0	8,03±0,02	7,08±0,04	7,03±0,02	7,03±0,04
<i>L.casei</i> К7	9,08±0,02	2,05±0,01	0	0	8,07±0,03	7,08±0,04	7,10±0,03	7,08±0,02
<i>L.casei</i> К7/4	9,03±0,05	4,07±0,02	0	0	7,07±0,02	6,03±0,03	6,00±0,02	6,08±0,04
<i>L.casei</i> СО1	9,10±0,04	1,03±0,01	0	0	8,08±0,03	7,06±0,03	7,06±0,02	6,06±0,02
<i>L.plantarum</i> ЭБ-2	9,05±0,03	6,02±0,04	4,1±0,08	3,03±0,02	8,08±0,04	8,07±0,03	7,06±0,03	6,06±0,04
<i>L.plantarum</i> κ-3	9,05±0,05	1,03±0,01	2,03±0,02	4,10±0,03	8,09±0,05	7,08±0,04	6,06±0,03	5,07±0,03
<i>L.plantarum</i> АБ-1	9,08±0,04	1,08±0,01	0	0	7,07±0,04	7,03±0,02	7,08±0,04	6,0±0,03
<i>L.rhamnosus</i> ж.с.2	9,05±0,03	0	0	0	8,03±0,02	7,08±0,04	7,03±0,02	6,03±0,02

Исследование выживаемости лактобактерий под действием симулированного желудочного сока (рН 2) в течение 90 минут показало, что среди изученных 8 культур 6 культур являются чувствительными к действию кислой среды желудочного сока: после 30 минут обработки наблюдалось резкое снижение титра живых клеток до 1,06±0,01 lg КОЕ/мл. Всего у 2-х ЭПС-продуцирующих культур: *L.plantarum* ЭБ-2 и κ-3 через 90 минут обработки титр живых клеток составлял 4,10±0,03 и 3,03±0,02 lg КОЕ/мл, соответственно.

Выявленную чувствительность штаммов к действию желудочного сока можно объяснить тем, что при низких значениях рН, под действием соляной кислоты происходит частичный гидролиз полисахаридов.

При исследовании выживаемости исследуемых штаммов под действием щелочного значения рН, характерного для тонкого кишечника, у штаммов наблюдалась высокая устойчивость.

Устойчивость ЭПС-продуцирующих штаммов лактобактерий к различным концентрациям желчи и NaCl.

Нами исследована выживаемость местных штаммов лактобактерий при наличии бычьей желчи в жидкой среде МРС в концентрациях 0,2%, 0,3% и 0,4%. Культура *L. casei* К7 оказалась самой устойчивой к содержанию 0,4% желчи в среде, логарифм титра живых клеток составлял 9,07±0,04 lg КОЕ/мл. У других культур были получены аналогичные данные.

Все исследованные культуры проявили устойчивость к наличию в среде 2% и 4% NaCl, логарифм титра клеток составил не ниже 8,05±0,02 lg КОЕ/мл. Исследованные культуры обладали разной устойчивостью к наличию 6,5% NaCl в среде (Табл. 3).

Таблица 3

Количество живых клеток лактобацилл в МРС бульоне при различных концентрациях NaCl и желчи

Культуры	Количество клеток при концентрация соли в среде МРС (lg КОЕ/мл)				Количество клеток при наличии в среде желчи (lgКОЕ/мл)		
	0%	2%	4%	6.5%	0.2%	0.3%	0.4%
<i>L.casei</i> К7/3	10,03±0,05	8,0±0,03	8,03±0,03	5,05±0,02	10,01±0,05	8,03±0,04	7,05±0,03
<i>L.casei</i> К7	9,10±0,06	9,05±0,04	9,03±0,05	8,06±0,03	9,08±0,05	9,07±0,04	9,07±0,04
<i>L.casei</i> К7/4	10,02±0,05	9,10±0,06	9,10±0,06	9,07±0,04	8,05±0,03	7,03±0,02	6,09±0,02
<i>L.casei</i> СО1	9,10±0,06	9,08±0,05	9,06±0,04	7,03±0,04	6,09±0,02	6,05±0,04	5,09±0,04
<i>L.plantarum</i> ЭБ-2	9,10±0,06	9,07±0,04	9,08±0,05	8,05±0,04	9,08±0,05	8,08±0,04	7,10±0,04
<i>L.plantarum</i> κ-3	9,10±0,06	9,09±0,06	8,09±0,04	8,05±0,04	8,09±0,04	7,03±0,04	6,03±0,02
<i>L.plantarum</i> АБ-1	10,1±0,05	8,06±0,03	8,06±0,03	6,03±0,02	8,03±0,03	7,08±0,04	6,10±0,04
<i>L.rhamnosus</i> ж.с.2	9,06±0,04	9,05±0,04	9,03±0,05	7,10±0,04	8,06±0,03	7,03±0,02	6,06±0,02

Из исследованных культур *Lactobacillus casei* культура К7/3 оказалась самой чувствительной, при содержании в среде 6,5% соли её титр снизился до $5,05 \pm 0,02$ lg КОЕ/мл.

Резистентность к рН 3,0 и рост в среде, содержащей 0,3% желчи считается стандартным требованием к пробиотическим культурам лактобактерий [Liong M., 2005]. Пробиотический эффект, приписываемый лактобациллам, обусловлен не только действием целых микроорганизмов и компонентов клеточной стенки, но и продукцией ЭПС. ЭПС лактобактерий образует защитный барьер от кислотного стресса, который препятствует диффузии протонов в цитоплазму клеток [Raineу P.V., 2004].

Таким образом, результаты опытов свидетельствуют о том, что благодаря продукции ЭПС штаммы лактобацилл выживают под действием стрессовых факторов ЖКТ и технологического процесса.

Адгезивная активность ЭПС-продуцирующих пробиотических культур. Основная роль ЭПС заключается в том, что они опосредуют взаимодействие лактобацилл с компонентами окружающей среды и способствуют бактериальной адгезии. Для выяснения опосредованности адгезивной способности с продукцией ЭПС, штаммами лактобактерий проведены опыты по определению адгезивной активности с использованием клеточной линии Сасо-2. Исследования по определению адгезивных свойств ЭПС-продуцирующих штаммов лактобацилл проведены совместно с сотрудниками Института биоорганической химии АН РУз.

В нашем исследовании показано, что адгезия к Сасо-2 клеткам варьирует в зависимости от штамма и не зависит от видовой принадлежности культуры. Исследование адгезивной активности пробиотических культур не выявило высоких количественных параметров данного показателя. В наших опытах наиболее адгезивными культурами оказались один ЭПС-продуцирующий штамм - *L.casei* СО₁ и 2 ЭПС не продуцирующие штаммы *L. plantarum* ЭТ-2 и *L.casei* n 6/2. Остальные 7 культур обладали низкой степенью адгезивности.

Таким образом, выявлено, что адгезивность штамма *L.casei* СО₁, который является самым активным ЭПС-продуцирующим штаммом, опосредована экзополисахаридами, связанными с клеточной стенкой, а у двух остальных штаммов - *L. plantarum* ЭТ-2 и *L.casei* n 6/2 другими средствами адгезии.

Биологическая активность ЭПС местных штаммов лактобацилл. Антиоксидантную активность ЭПС местных штаммов лактобактерий определяли спектрофотометрическим методом по активности связывания ЭПС свободных оксидных радикалов дифенилпикрилгидразина (ДФПГ). Антиоксидантная активность ЭПС лактобактерий определена при концентрациях 2, 3 и 4 мг/мл, аскорбиновая кислота служила в качестве положительного контроля. Среди изученных ЭПС лактобактерий ЭПС штамма *L.plantarum* ЭБ-2 проявил сравнительно высокую антиоксидантную активность (рис.5).

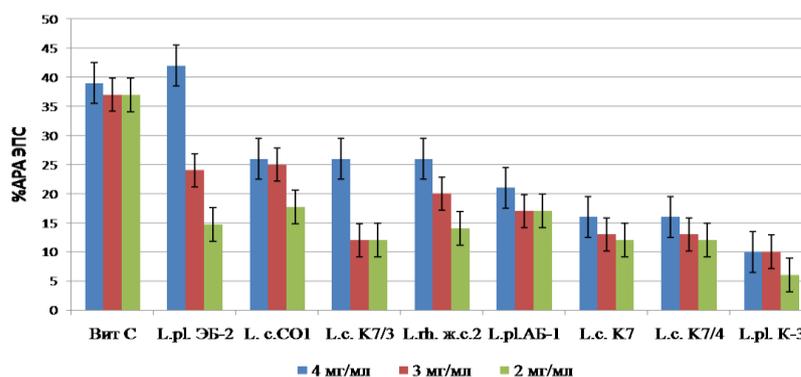


Рис. 5. Антиоксидантная активность ЭПС штаммов лактобактерий

В результате выявлено, что между ЭПС исследуемых культур существует разнообразие в антиоксидантной активности. Это разнообразие можно объяснить тем, что антиоксидантная активность ЭПС обуславливается различными факторами, такими как, моносахаридный состав, молекулярная масса и конфигурация гликозидных связей в молекуле полисахарида, а также использованными методами экстракции и выделения (J. Cao, 2014).

Таким образом, на основе анализа результатов исследований по определению физико-химических свойств ЭПС можно сделать вывод о том, что антиоксидантная активность ЭПС, выделенного из *L.plantarum* ЭБ-2, обусловлена его низкой молекулярной массой (31 600 Da) и высоким содержанием глюкозы в моносахаридном составе.

Антимикробная активность водных растворов ЭПС штаммов лактобактерий против пищевого патогена *Listeria monocytogenes* выявлена методом диффузии в агар при концентрации 20 мг/мл (Рис.6).

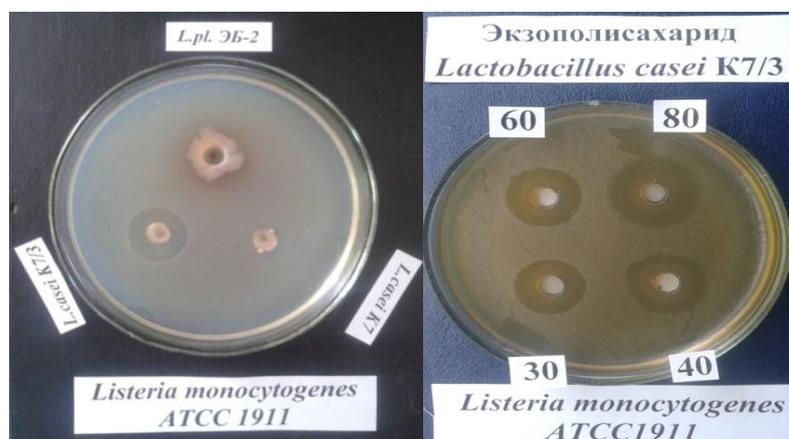


Рисунок 6. Антимикробная активность ЭПС культуры *L.casei* K7/3 против *Listeria monocytogenes* ATCC 1911

Антимикробную активность против *Listeria monocytogenes* ATCC 1911 проявил ЭПС *L.casei* K7/3, диаметр зоны подавления роста составил 16 мм. ЭПС, выделенные из культур *L.casei* K7 и *L.plantarum* ЭБ-2 не проявили активность против листерии. Также, изучена дозовая зависимость антимикробной активности ЭПС *L.casei* K7/3 против *Listeria monocytogenes* ATCC 1911. При концентрациях 30, 40, 60 и 80 мг/мл диаметр зоны подавления

роста *Listeria monocytogenes* ATCC 1911 составил 20, 22, 22 и 25 мм, соответственно.

Антимикробную активность ЭПС *L.casei* К7/3 можно связать с тем, что данное вещество является олигосахаридом и благодаря низкой молекулярной массе он может проникать через поры на клеточной стенке тест-микроорганизмов и нарушать процесс деления клеток, разрушать саму клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану, а также разрывать цепи ДНК (He F., 2010).

Таким образом, проведенные исследования показали, что ЭПС, полученные из штаммов лактобацилл обладают высокой биологической активностью и их активность обуславливается их физико-химическими свойствами.

В пятой главе диссертации «**Оптимизация состава питательной среды и условий культивирования для увеличения продукции ЭПС, образуемого штаммом *Lactobacillus plantarum* ЭБ-2**» изложены результаты исследований по установлению влияния источников азота (пептон и триптон) и источников углерода (глюкоза, сахароза, лактоза и манноза) и условий культивирования (время инкубации, температура инкубации и начальное значение рН среды) на повышение продукции ЭПС культурой *L.plantarum* ЭБ-2.

При проведении опытов в качестве среды для ферментации использована среда на основе творожной сыворотки (Карапетьян К.Д., 2009). При подборе оптимального состава среды пептон и триптон использованы в качестве источников азота, глюкоза, сахароза, лактоза и манноза испытаны в качестве источников углерода. Использованы следующие температуры ферментации: 33°C, 35°C, 37°C и 39°C; время ферментации – 24, 48,72 часа; значения рН среды 5,0, 5,5, 6,0 и 6,5 (рис. 7).

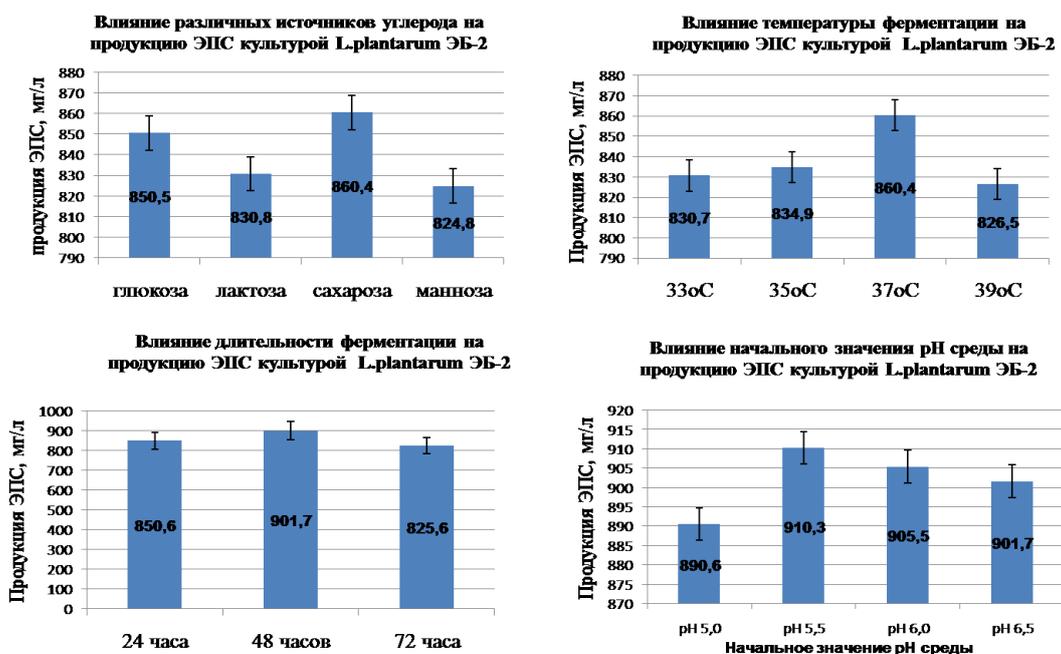


Рис.7. Оптимальные условия для продукции ЭПС *L.plantarum* ЭБ-2

В результате исследований выявлено, что на биосинтетическую активность *L.plantarum* ЭБ-2 наибольшее стимулирующее действие оказывает сочетание сахарозы и пептона. При выращивании культуры в условиях шейкер-инкубатора, при рН 5,5, при температуре 37°C и времени ферментации 48 часов выход продукта составил 910,3 мг/л, что в 3,6 раза больше по сравнению с начальной продукцией (250 мг/л) ЭПС культуры *L.plantarum* ЭБ-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных исследований на тему «Выделение и отбор местных штаммов лактобактерий-продуцентов экзополисахаридов» представлены следующие выводы:

1. Впервые выделены местные штаммы мезофильных лактобацилл. Отобраны 55 штаммов чистых культур лактобацилл. Установлена видовая принадлежность 25 культур: к *L. casei* отнесены 8 штаммов, к *L.plantarum* 10 штаммов, к *L.rhamnosus* 6 штаммов, к *L.brevis* 1 штамм.
2. Исследованы пробиотические свойства выделенных штаммов лактобацилл. Культуры обладают уникальными пробиотическими свойствами: активны против условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, устойчивы к действию стрессовых факторов ЖКТ, синтезируют биологически активные вещества. Культуры *L. plantarum* ЭБ-2 и *L.plantarum* к-3 и *L.casei* К7/3 рекомендуются для использования в качестве пробиотических штаммов в составе биопрепаратов.
3. Впервые проведен скрининг местных пробиотических штаммов лактобацилл на образование экзополисахаридов: из 8 штаммов наиболее активными продуцентами являются 3 штамма: *L.casei* СО₁ (400,0 мг/л), *L. plantarum* ЭБ-2 (250,0 мг/л) и *L. plantarum* к-3 (175,0 мг/л). Установлено, что эпифитная микрофлора является источником выделения ЭПС-продуцирующих штаммов лактобактерий.
4. Впервые проведена физико-химическая характеристика ЭПС местных штаммов лактобактерий. Полученные ЭПС являются гетерополисахаридами: в моносахаридном составе выявлены остатки маннозы, глюкозы, галактозы и рамнозы. ЭПС местных штаммов лактобацилл имеют низкую молекулярную массу (от 5600 до 71000 Da).
5. Впервые определены биологические свойства ЭПС местных штаммов лактобактерий. Установлена опосредованность некоторых пробиотических свойств штаммов лактобактерий продукцией ЭПС. Высокая антиоксидантная активность ЭПС культуры *L. plantarum* ЭБ-2 обуславливается его низкой молекулярной массой и содержанием глюкозы в моносахаридном составе. Установлена высокая антимикробная активность ЭПС, синтезируемого культурой *L.casei* К7/3 против *Listeria monocytogenes* ATCC 1911. ЭПС культуры *L.casei* К7/3 рекомендуется в качестве биоконсерванта для использования в пищевой промышленности.

6. С целью повышения синтеза ЭПС культурой *L. plantarum* ЭБ-2 подобран оптимальный состав питательной среды. Наибольшее стимулирующее действие на биосинтез ЭПС оказало сочетание сахарозы в качестве источника углерода и пептона в качестве источника азота. Подобраны оптимальные параметры условий выращивания (рН – 5,5; температура выращивания – 37°C; время ферментации 48 часов). Оптимизация состава среды и условий выращивания позволила увеличить биосинтез ЭПС культуры *L. plantarum* ЭБ-2 в 3-4 раза.

**SCIENTIFIC COUNCIL № DSc.27.06.2017.B.38.01 ON AWARD OF
SCIENTIFIC DEGREES AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND
NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

ELOVA NILUFAR ARASHOVNA

**ISOLATION AND SELECTION OF LOCAL STRAINS OF
LACTOBACTERIA PRODUCING EXOPOLYSACCHARIDES**

03.00.04 – Microbiology and virology

**DISSERTATION ABSTRACT
FOR THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PHD) ON BIOLOGICAL
SCIENCES**

Tashkent – 2019

The theme of the dissertation for degree of doctor of philosophy (PhD) has been registered under the number B2019.2.PhD/B301 at the Supreme Attestation Commission under the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan

The doctoral dissertation has been conducted at the Institute of Microbiology.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (microbio@academy.uz) and on the website of «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific consultant:

Ogay Darya Kisenovna
Philosophy Doctor in biology

Official opponents:

Iskhakova Khalida Ilhamovna
Doctor of sciences in medicine, professor

Mirzayeva Mamlakat Aynakulovna
Doctor of sciences in medicine, professor

Leading organization:

Institute of Bioorganic Chemistry

The defense of the dissertation will take place on «__» _____ 2019 at ____ the meeting of the Scientific Council DSc.27.06.2017.B.38.01 at the Institute of Microbiology and National University of Uzbekistan at the following address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology under №__ (Address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: info@microbio.uz).

The abstract of the dissertation is distributed on «__» _____ 2019 year
(protocol at the register No _____ dated by «__» _____ 2019 year)

Aripov Takhir Fatikhovich
Chairman of the Scientific Council for awarding the scientific degrees, Dr.S.B., academician

Juraeva Rokhila Nazarovna
Scientific Secretary of the Scientific Council
for awarding the scientific degrees, PhD, senior researcher

Gulyamova Tashkhan Gafurovna
Chairman of the Scientific Seminar under the
scientific council awarding scientific degrees,
Dr. Sc.B., professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the research work has been selection of local strains of lactobacteria-producing of exopolysaccharides, characterization of the physico-chemical properties and biological activity of EPS.

The object of the research work served as were strains of lactobacilli isolated from various natural sources, the study of their biosynthetic activity. Scientific novelty of the research work:

It was carried out the genetic identification, based on the 16S rRNA gene sequence, of the active EPS producing strain - *L. plantarum* EB-2;

For the first time it was researched the ability of local strains of lactobacteria to produce exopolysaccharides (EPS); and was selected five strains of lactobacilli actively produced EPS: *L. plantarum* EB-2, *L. casei* CO₁, K7/3, K7; *L.rhamnosus* j.s.2;

It was researched physico-chemical and biological properties of partial purified EPS of lactobacilli;

For the first time it was carried out intensification of the biosynthetic process by optimizing the composition of the nutrient medium and the cultivation conditions of producer strains;

Implementation of the research results: Based on the results of using a bacterial suspension consisting of EPS-synthesizing strains of lactobacilli in silage of feed crops and the treatment of calf dyspepsia:

The bacterial suspension "Bactosil", prepared on the basis of strains of lactobacilli, has been introduced into the practice of silage and haying of cereals in farms in Mirzaabad district of Sirdarya region, Zangiata and Kibray districts of Tashkent region (reference 02/025-3099 of the Ministry of agriculture of the Republic of Uzbekistan, October 17, 2019). The results made it possible to eliminate the infection of haulage and silage treated with a bacterial suspension, dangerous toxins of fungi of the genus *Fusarium* and viruses.

The bacterial suspension "Bactosil" is introduced into the practice of planting of alfalfa in cattle-breeding farms in Kibray district of Tashkent region and in goat farm in Sirdarya region (reference 02/025-3099 of the Ministry of agriculture of the Republic of Uzbekistan, October 17, 2019). The results made it possible to increase the daily yield and fat content of milk in cows and goats;

The effectiveness of local strains of lactobacilli in the treatment of calf dyspepsia has been tested on farms in the Yukori Chirchiq and Kibray districts of Tashkent region (reference 02 / 23-1401 of the State Committee for Veterinary and Cattle Breeding Development of the Republic of Uzbekistan, September 24, 2019). As a result, the cessation of diarrhea on second day and an improvement in their general state of sick calves were achieved.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of introduction, five chapters, conclusions, list of references, and appendixes. The volume of the dissertation is 116 pages

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Элова Н.А., Д.К. Огай, А.А. Ибрагимова, Г.А. Хашимова. Изучение устойчивости местных штаммов молочнокислых бактерий к вторичным желчным кислотам // Узбекский биологический журнал, 2012, №3, С.14-17 (03.00.00; № 5).
2. Элова Н.А. Спектр антимикробной активности и бактериоциногенных свойств местных штаммов *Lactobacillus casei* group. Узбекский биологический журнал. 2012 спецвыпуск. С. 72-75 (03.00.00; № 5).
3. Огай Д.К. Элова Н.А. Антибиотикочувствительность лактобацилл и бифидобактерий // «Инфекция, иммунитет и фармакология», Ташкент 2013, №5-6, С. 115-118 (14.00.00 № 15).
4. Kutliyeva G.D., Miralimova Sh.M., Ogay D.K., Elova N.A., Sahibnazarova X. The spectrum of antimicrobial action of strains of lactobacilli to enterococci *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*. Gulustan Black Sea Scientific Journal of Academic Research. October 2017 Volume 37 Issue 05, p.p. 65-67 (Global Impact Factor – 0.812).
5. Элова Н.А. Пробиотические свойства новых местных штаммов рода *Lactobacillus* // Фармацевтический журнал, 2019, №1, С. 109-114. (15.00.00 №2).
6. Elova N. A., Kutlieva G. J., Siddikova A. A., Charyshnikova O.S., Kamolova H. Fozil kizi, Rakhmonberdyeva R. K. Characteristics of exopolysaccharide *Lactobacillus casei* CO₁ and its antioxidant activity // Gulustan Black Sea Scientific Journal of Academic research, 2019, Volume 49, Issue 06. P.51-56 (Global Impact Factor – 0.912).
7. Elova N.A., Kutliyeva G. Dj., Siddikova A., Akhmedov O. R. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* EB-2 strain // International Scientific Journal Theoretical & Applied Science, 2019, Issue: 08, Volume: 76, P. 80-89 (Global Impact Factor – 0.564).

II бўлим (II часть; II part)

8. Ахмедова Х., Исламова Ж., Саидходжаева Д.М., Маликова М.Х., Огай Д.К., Элова Н.А., Рахманбердыева Р.К., Сыров В.Н. Способ получения арабиногалактана, обладающего пребиотической активностью. Патент IAP 05620.
9. Огай Д.К., Миралимова Ш.М., Кутлиева Г.Дж., Элова Н.А. Биологически активная добавка (БАД) для профилактики и терапии язвенных болезней желудочно-кишечного тракта. Патент IAP 05716.

10. Элова Н.А. Пробиотический потенциал местных штаммов *Lactobacillus* «группы casei» перспективных для использования в медицине и молочной промышленности // Сборник статей Международной научно-практической конференции Radostim -2012. Микробные биотехнологии: актуальность и будущее. 19-22 ноября 2012 г. Киев, Украина. С. 368 – 369.
11. Элова Н.А., Г.Дж. Кутлиева, Д.К.Сайлиев, Д.К. Нурмухамедова. Антагонистическая активность штаммов лактобацилл против клинических изолятов *Proteus mirabilis* // Сборник материалов IV Международной научно-практической конференции "Исследования и разработки в перспективных научных областях", 2018, С. 26-30. (г. Новосибирск. 27 марта 2018 года).
12. Элова Н.А., Кутлиева Г.Д. Сохибназарова Х.А. Широкий спектр антимикробного действия местных штаммов лактобацилл для конструирования на их основе биопрепаратов с профилактическими и лечебными свойствами // Международные Фарабиевские чтения «Актуальные проблемы биотехнологии, экологии и физико-химической биологии», 2017, С. 104 (4-21 апреля 2017 г., Алматы, Казахстан).
13. Элова Н.А., Сохибназарова Х.А. Миралимова Ш.М. Кутлиева Г.Д. Поиск антагонистически активных штаммов рода *Lactobacillus* против пищевого патогена *L.monocytogenes* // “Innovation problems of biology” for young Scientists and researchers devoted to 94th anniversary of the great son and National leader of Azerbaijani people Heydar Aliyev, 2017, С. 144-145. (27-28 апрель 2017 Баку).
14. Элова Н.А., Миралимова Ш.М., Кутлиева Г.Д., Сахибназарова Х.А. Антимикробное действие местных штаммов лактобацилл против пищевого патогена *L.monocytogenes*. Материалы XIX Международного конгресса по антимикробной терапии и клинической микробиологии. Москва. 17-19-мая 2017 г. С.40.
15. Elova N.A., Kutliyeva G.D., Miralimova Sh.M., Nurmukhamedova D.K., Kamolova Kh.F., Makhkamov K.K. Screening of the antimicrobial activity of probiotic strains of the genus *Lactobacillus* against the clinical isolates of *Proteus mirabilis*. XLVI International Correspondence Scientific and Practical Conference “International Scientific Review of the Problems and Prospects of Modern Science and Education”. Boston. USA. June 24-25, 2018. Pp. 93-95.
16. Nurmukhamedova D.K., Makhkamov K.K., Elova N.A., Kutliyeva G.D., Sayliev D.K. The possibility of using *Lactobacilli* for the Prevention and treatment of opportunistic enterococcal and prosthetic infections. XLVI International Correspondence Scientific and Practical Conference “International Scientific Review of the Problems and Prospects of Modern Science and Education”. Boston. USA. June 24-25, 2018. Pp. 88-90.
17. Элова Н.А., Кутлиева Г.Дж., Миралимова Ш.М., Нурмухамедова Д.К., Камолова Х.Ф. Скрининг антимикробной активности пробиотических штаммов рода *Lactobacillus* против клинических изолятов *Proteus mirabilis* // VII Международная научно-практическая конференция «Проблемы

- рационального использования и охрана природных ресурсов Южного Приаралья», 2018, С. 189-191. (Нукус, 17-18 июля 2018 г.).
18. Элова Н.А., Кутлиева Г.Дж., Камолова Х.Ф., Матчанов А.Д. Синтез короткоцепочечных жирных кислот местными штаммами лактобактерий // Международная конференция «Лекарственные препараты на основе природных соединений», 2019, С. 116-117. (Институт Биоорганической химии им. Садыкова. Ташкент. 18-19 сентября 2018 года)
 19. Элова Н.А., Кутлиева Г.Дж., Ахмедов О.Р., Сиддикова А.А. Физико-химические свойства сырого экзополисахарида, полученного из местного штамма *Lactobacillus casei* CO₁. Сборник тезисов научно-практической конференции «Актуальные проблемы химии природных соединений», С. 95; 18-19 марта 2019 года, Ташкент.
 20. Элова Н.А., Кутлиева Г.Дж., Нурмухамедова Д.К., Юнусходжаева Х.Г. Поиск штаммов лактобактерий, активно синтезирующих короткоцепочечные жирные кислоты // Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии», 2019, С. 373. (Ташкент, 16 мая 2019 г.).
 21. Элова Н.А., Кутлиева Г.Дж., Камолова Х.Ф., Матчанов А.Д. Метаболическая активность местных пробиотических культур лактобактерий // короткое сообщение в журнале «Инфекция, иммунитет и фармакология», Ташкент 2019 г. №2, С. 362-363.
 22. Элова Н.А., Кутлиева Г.Дж., Ахмедов О.Р., Сиддикова А.А. Экзополисахариды местных пробиотических штаммов *Lactobacillus* // короткое сообщение в журнале «Инфекция, иммунитет и фармакология», Ташкент 2019 г. №2, С. 364-365.
 23. Элмурадов Б.А. Наврузов Н., Кутлиева Г. Дж., Элова Н.А., Камолова Х.Ф. Эффективность и перспективы применения местных штаммов лактобацилл при лечении телят, больных диспепсией // Сборник тезисов III Международной научно-практической конференции «Наука и образование в современном мире: вызовы XXI века», 2019, С.150-160 (Нур-султан, Казахстан, 10-12 июля 2019 г.).

Автореферат «Ўзбекистон биология журналы» таҳририяида таҳрирдан
ўтказилди.

Босишга рухсат этилди: 5.12.2019 йил
Бичими 60x84 ¹/₁₆. «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулда чоп этилди.
Шартли босма табағи 3,0. Адади 75. Буюртма № 10-12

“IMPRESS MEDIA” MChJ босмаҳонасида чоп этилди.
Тошкент шаҳри, Қушбеги кўчаси, 6-уй.