

გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის  
ინსტიტუტი

იანა მალხაზოვა

მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი ენდემური რძემჟავა ბაქტერიების გენოტიპური და  
ფენოტიპური დახასიათება

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის  
სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

03.00.03 - მოლეკულური ბიოლოგია

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:  
ნ. ალექსიძე  
ბიოლ. მეცნ. დოქტორი, პროფესორი

ნ. ჭანიშვილი  
ბიოლ. მეცნ. კანდიდატი

თბილისი

2006

## ს ა რ ო ე ვ ი

შესავალი.

ნაწილი I ლიტერატურის მიმოხილვა.

თავი 1. მაწონი და მაწვნის მსგავსი რძემჟავა პროდუქტების დახასიათება.

თავი 2. რძემჟავა ბაქტერიების ზოგადი დახასიათება.

თავი 3. რძემჟავა ბაქტერიების ფენოტიპური ნიშან-თვისებების როლი საკვები პროდუქტების ფერმენტაციულ წარმოებაში.

3.1. აციდოფიკაციური აქტივობა, როგორც საწარმო მიკროორგანიზმების ძირითადი თვისება.

3.2. მიკროორგანიზმების ურეაზული აქტივობა.

3.3. რძემჟავა ბაქტერიების პროტეოლიზური, პეპტიდაზური და აუტოლიზური აქტივობა, როგორც სასელექციო კრიტერიუმი.

3.4. ეგზოპოლისაქარიდების მნიშვნელობა ფერმენტირებული პროდუქტების ტექსტურის ფორმირებაში.

3.5. რძემჟავა ბაქტერიების ანტაგონისტური თვისებების მნიშვნელობა პრობიოტიკული ფუნქციის ფორმირებაში.

თავი 4. მიკროორგანიზმების მოლეკულური ტიპირება და მისი მნიშვნელობა.

ნაწილი II მასალა და მეთოდები.

თავი 5. მასალები.

თავი 6. მეთოდები.

ნაწილი III საკუთარი გამოკვლევები.

თავი 7. საქართველოს სხვადასხვა კუთხეში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამების იდენტიფიკაცია.

თავი 8. *S. thermophilus*-ის შტამების ფენოტიპური თვისებების შესწავლა.

თავი 9. *S. thermophilus*-ის შტამების გენოტიპური დახასიათება.

თავი 10. *E. durans*-ის შტამების ტიპირება.

თავი 11. *E. durans*-ის შტამების ფენოტიპური თვისებების შესწავლა.

თავი 12. რძემჟავა კოკების ანტაგონისტური აქტივობის შესწავლა.

თავი 13. ლიზოგენური შტამების გამოვლენა ფისკას მეთოდით.

კვლევის შედეგების განხილვა.

დასკვნები.

პრაქტიკული რეკომენდაციები.

ციტირებული ლიტერატურა.

## შესავალი

**ნაშრომის აქტუალობა.** ევროპის განვითარებულ ქვეყნებში რძემჟავა პროდუქტების მრეწველობა დამყარებულია სტანდარტიზირებულ ტექნოლოგიურ პროცესებზე, რაც უზრუნველყოფს მაღალი ხარისხის პროდუქტების მიღებას, ამ დარგის განვითარებას და ეკონომიკურ წარმატებას. საერთაშორისო სტანდარტების თანახმად რაციონალური ტექნოლოგიური პროცესის შემუშავებისთვის პირველ რიგში აუცილებელია სტაბილური სტარტერის (ე.წ. დედოს) შექმნა [91].

სტაბილური სტარტერული დედოს შექმნისთვის უპირველეს ყოვლისა საჭიროა მიკროორგანიზმთა იდენტიფიკაციის სწრაფი და ზუსტი მეთოდების შემუშავება. მიკრობიოლოგიისა და მოლეკულური ბიოლოგიის კლასიკური მეთოდები ხშირად საკმარისი არ არის ერთიდაიგივე ეკოლოგიურ ნიშაში არსებული და მსგავსი ფუნქციური მნიშვნელობის მქონე სახეობათა იდენტიფიკაციისა და დახასიათებისათვის. შტამების დონეზე მიკროორგანიზმთა დიფერენცირების (გენოტიპირების) აუცილებლობას განაპირობებს აგრეთვე რძემჟავა პროდუქტების მრეწველობაში კომერციული სტარტერული კულტურების რიცხვის ინტენსიური ზრდა. ბაქტერიათა ტიპირების გზით შესაძლებელია მნიშვნელოვანი ბიოტექნოლოგიური თვისებების მქონე შტამების მარკირება ანუ ე.წ. წარმოშობის დაცული ნიშნის - P.D.O (Protected Designation of Origin) მინიჭება, რაც მიზანშეწონილია ენდემური რძემჟავა ბაქტერიების სტარტერული კულტურების დაპატენტებასა და მომდევნო კომერციალიზაციისათვის [47].

საკვები პროდუქტების მაქსიმალური სტანდარტიზაცია დასავლური პარამეტრების გათვალისწინებით გულისხმობს წარმოებაში ჩართული რძემჟავა ბაქტერიების მთელი რიგი ფენოტიპური თვისებების მიხედვით დახასიათებას. კერძოდ, სტარტერულ კულტურებს, მათ მიმართ წამოყენებული მოთხოვნების თანახმად უნდა გააჩნდეს ისეთი სასარგებლო თვისებები, რომელიც განაპირობებს

პროდუქტის ხარისხის და კვებითი ღირებულების გაუმჯობესებას და დადებით გავლენას მოახდენს ადამიანის ორგანიზმზე [117].

საქართველოში გავრცელებული ეთნიკური რძემჟავა პროდუქტები მათი კვებითი ღირებულების და სამკურნალო-დიეტური თვისებების გამო დიდი პოპულარობით სარგებლობს. სამწუხაროდ, საქართველოში წარმოებული საკვები პროდუქტების უმრავლესობა ჯერ კიდევ არ შეესაბამება საერთაშორისო სტანდარტებს. ამავე დროს ზოგიერთი მათგანი, მაგალითად მაწონი, ნადული და ა.შ., ამჟამად განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს ისეთ ქვეყნებში, როგორცაა იაპონია, კორეა და სხვა.

დღესდღეობით დაპატენტებულია მხოლოდ ე.წ. “მაწვნისმაგვარი რძემჟავა პროდუქტები”. მათი მიღების ხერხები, ძირითადად, ეყრდნობა ხალხური გამოცდილების შედეგად მიღებულ მონაცემებს. განვითარების გზაზე მდგომი ქართული მაწვნის თანამედროვე წარმოებაში სტანდარტული სტარტერის არარსებობის გამო კვლავაც შინაურული წესით დამზადებულ დედოებს იყენებენ, რის გამოც საბოლოო პროდუქტის ხარისხი და ტექნოლოგიური მაჩვენებლები (კოლტის სტრუქტურა, გემო, მჟავიანობა და სხვა) არასტაბილურია. პრაქტიკულად, ყოველდღიურად ვიღებთ განსხვავებულ ტიპის მაწვნის პროდუქტებს, რომელთა გავლენა ადამიანის ჯანმრთელობაზე ხშირად უცნობია.

აღსანიშნავია, რომ კონკრეტული სტარტერული კომბინაციის და არა გლეხური მეურნეობიდან ან/და წინა დღის მაწვნიდან აღებული დედოს გამოყენებით, თავიდან ავიცილებთ პროდუქტში სპონტანური კონტამინანტური ფლორის განვითარებას და შესაბამისად მათ მიერ გამოწვეულ მრავალ არასასურველ რეაქციას: ტოქსიკოინფექციებს, ალერგიულ რეაქციებს და ა.შ. პრობიოტიკური თვისებების მქონე სტარტერული შტამების შერჩევით შესაძლებელი ხდება არა მარტო მაღალი კვებითი ღირებულების, არამედ სამკურნალო-პროფილაქტიკური დიეტური პროდუქტის მიღება.

მაწვნის ხარისხის სტაბილურობის მისაღწევად აუცილებელია შესატანი დედოს ზუსტი მიკრობიოლოგიური სტრუქტურის ცოდნა, რაც გულისხმობს როგორც ბაქტერიული კომპონენტების იდენტიფიცირებას და მათი შეფარდების დადგენას, ასევე ფერმენტაციის პროცესში და საბოლოო პროდუქტის თვისებების ჩამოყალიბებაში

თითოეული მათგანის ფუნქციის გარკვევას. სტარტერული კულტურების ბიოტექნოლოგიური ღირებულების დასადგენად აუცილებელია მათი გენეტიკისა და ბიოქიმიური თვისებების დაწვრილებითი შესწავლა.

მეცნიერულ გამოკვლევების საფუძველზე შემუშავებული დედო და მაწვნის მიღების დახვეწილი ტექნოლოგიური პროცესი უზრუნველყოფს ამ პროდუქტის ხარისხის საერთაშორისო დონეზე აყვანას. ენდემური რძემჟავა ბაქტერიების ფენოტიპური ნიშან-თვისებების დეტალური შესწავლა საშუალებას მოგვცემს დასავლეთში მიღებული სტანდარტების მიხედვით შევარჩიოთ მაღალი ბიოტექნოლოგიური ღირებულების მქონე შტამები. გენოტიპირების საშუალებით შესაძლებელი იქნება მათი მარკირება, რაც დაპატენტებისათვის აუცილებელი პირობაა.

მეოცე საუკუნის 70-იან წლებში მაწონი ბულგარულ იოგირტთან იყო გაიგივებული. მომდევნო წლებში კვლევის მეთოდების დახვეწასთან ერთად ეს მოსაზრებაც თანდათანობით იცვლება. მაწვნისა და იოგურტის შემადგენელი კომპონენტების ნათესაური კავშირი ჯერ დაუდგენელია, ის არც დადასტურებულია და არც ბოლომდე უარყოფილი. ამდენად, მაწვნის ბაქტერიული კომპონენტების გენოტიპირების საფუძველზე შესაძლებელი იქნება თეორიული ცოდნის გაღრმავება და ზოგიერთი ევოლუციური საკითხის უფრო მკაფიოდ შემუშავება. ყოველივე ეს მაწვნის გავრცელებას უფრო პერსპექტიულს გახდის როგორც ადგილობრივ, ასევე საერთაშორისო ბაზარზე, რაც, საბოლოოდ დადებითად აისახება ქვეყნის ეკონომიკურ განვითარებაზე.

წინამდებარე ნაშრომი წარმოადგენს მცდელობას გაამდიდროს ენდემური რძემჟავა ბაქტერიების შესახებ არსებული ცოდნა და წვლილი შეიტანოს საქართველოში მაწვნის საწარმოო პროცესის სტანდარტიზაციასა და რაციონალიზაციაში.

**კვლევის მიზანი.** ბუნებრივი კავკასიური პროდუქტის - მაწვნის სპონტანური მიკროფლორის შემადგენელი ბაქტერიული კომპონენტების დადგენა, ცალკეული სახეობების გენოტიპური და ფენოტიპური მრავალფეროვნების შესწავლა. ნატურალური პროდუქტიდან გამოყოფილი ენდემური შტამების საერთაშორისო სტანდარტებით მიღებული კრიტერიუმებით (აციდოფიკაციური, პროტეოლიზური, აუტოლიზური აქტივობა, ეგზოპოლისაქარიდების, ბაქტერიოცინებისა და ბიოგენური

ამინების სინთეზის უნარი და სხვ.) დახასიათების საფუძველზე ბიოტექნოლოგიური ღირებულების მქონე შტამების შერჩევა სტანდარტიზირებული მაწვნის დედოს შესაქმნელად.

### **კვლევის ამოცანები:**

- 1) საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი კოკოვანი ფორმების იდენტიფიკაცია;
- 2) მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამების ბიოტექნოლოგიურად მნიშვნელოვანი ფენოტიპური თვისებების (აციდოფიკაციური, ურეაზული, პროტეოლიზური, პეპტიდაზური და აუტოლიზური აქტივობის, ეგზოპოლისაქარიდების და ბიოგენური ამინების წარმოქმნის უნარი) შესწავლა;
- 3) მაწვნის დედოების ტიპური კომპონენტის – *S. thermophilus*-ის შტამების გენოტიპური მრავალფეროვნების გამოვლენა;
- 4) გენოტიპურ მრავალფეროვნებასა და ფენოტიპურ პოლიმორფიზმს შორის კორელაციის დადგენა;
- 5) მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამების ანტაგონისტური თვისებების შესწავლა;
- 6) ლიზოგენური შტამების გამოვლენა;
- 7) სტანდარტული დედოების შესაქმნელად შესაფერისი თვისებების მქონე ბაქტერიული შტამების შერჩევა.

**კვლევის მეცნიერული სიახლე.** მაწვნის მიკრობული სტრუქტურის დადგენის მიზნით კვლევის პროცესში გამოყენებული იყო მოლეკულური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდები, რის შედეგადაც ზუსტად დადგინდა ქართული მაწვნის შემადგენელი ტიპური კოკოვანი ფორმების სახეობები (*S. thermophilus* და *E. durans*).

ენდემური რძემჟავა ბაქტერიების კვლევის ისტორიის მანძილზე მათი გენოტიპირებისათვის პირველად იქნა გამოყენებული ისეთი უახლესი მეთოდი, როგორც არის F-Rep-PCR. მოცემული მეთოდი ეფექტური აღმოჩნდა *S. thermophilus*-ის შიდასახეობრივი გენოტიპური პოლიმორფიზმის გამოსავლენად. გარდა ამისა, ამ მეთოდის საშუალებით შესაძლებელი გახდა კონკრეტული გენოტიპების მქონე

შტამებსა და მათი “გეოგრაფიულ წარმოშობას“ (მაწვნის დედოს მოპოვების რეგიონებს) შორის გარკვეული კავშირების დადგენა. აგრეთვე აღსანიშნავია, რომ F-Rep-PCR მეთოდის საშუალებით საკვებისეული რძემჟავა ბაქტერიების მოლეკულური ტიპირების პრეცედენტი დღემდე არ ყოფილა.

ასევე პირველად განხორციელდა მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამების დახასიათება იმ ფენოტიპური ნიშან-თვისებების მიხედვით, რომლებიც საერთაშორისო ბიოტექნოლოგიურ კრიტერიუმებს შეესაბამება.

**ნაშრომის პრაქტიკული დირებულება.** მიღებული შედეგები მნიშვნელოვანია რძის მრეწველობაში ბიოტექნოლოგიური პროცესების რაციონალური წარმართვისათვის. წინამდებარე ნაშრომის შედეგად შედგენილი იქნა საკვებისეული წარმოშობის შტამების კოლექცია, რომელიც 70-მდე ზუსტად იდენტიფიცირებულ, ფენოტიპურად დახასიათებულ ენდემურ შტამს ითვლის. კონკრეტული თვისებების მიხედვით თითოეული შტამი შეიძლება რეკომენდირებული იყოს სხვადასხვა ფერმენტირებული პროდუქტების პირველად და მეორად სტარტერად.

ჩვენს მიერ დადგინდა, რომ F-Rep-PCR მეთოდი მიზანშეწონილია საკვებისეული *S. thermophilus*-ის შტამების გენოტიპირებისათვის. ამ მეთოდის უფრო მაშტაბური გამოყენების შედეგად შესაძლებელია ენდემური შტამების სპეციფიკური გენოტიპების გამოვლენა, რაც არსებითია ამ შტამების მარკირების, დაპატენტებისა და მომდევნო კომერციალიზაციისათვის.

**ნაშრომის აპრობაცია.** დისერტაციის ძირითადი დებულებები მოხსენებულია გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტის სამეცნიერო საბჭოს სხდომაზე 2006 წლის 29 მაისს. დისერტაცია რეკომენდირებულია საჯარო დაცვისათვის.

**დისერტაციის ძირითადი დებულებები მოხსენიებულია:**

- ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის სტუდენტთა 58, 59 და 60-ე სამეცნიერო კონფერენციებზე (თბილისი, საქართველო 1998, 1999, 2000);

- სტუდენტთა და ასპირანტთა სოროსის კონფერენციაზე (თბილისი, საქართველო 2000, 2001, 2003);
- მე-19 საერთაშორისო ICFMH (International Symposium, Food Micro) სიმპოზიუმზე (პორტორიზი, სლოვენია 2004).
- მე-10 საერთაშორისო ICCC (International Congress for Culture Collections) კონგრესზე (ცუკუბა, იაპონია 2004),
- აკადემიკოს თ. ჭანიშვილის 80 წლის იუბილესადმი მიძღვნილ ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენციაზე (თბილისი, საქართველო 2004)

**პუბლიკაციები:** დისერტაციის მასალებზე გამოქვეყნებულია 7 სამეცნიერო ნაშრომი.

**დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა.** დისერტაცია წარმოდგენილია ნაბეჭდი ტექსტის 127 გვერდზე. მოიცავს შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, მასალასა და მეთოდების აღწერას, საკუთარ გამოკვლევებს და შედეგების განხილვას, დასკვნებს და გამოყენებული ლიტერატურის სიას. დისერტაცია ილუსტრირებულია 7 ცხრილით, 3 გრაფიკით, 11 დიაგრამით, 17 სურათით. ლიტერატურის სია მოიცავს 195 ნაშრომს.

## ნაწილი I ლიტერატურის მიმოხილვა

### თავი I. მაწონი და მაწვნის მსგავსი რძემჟავა პროდუქტების დახასიათება

ფერმენტირებული რძის პროდუქტების მოხმარება უძველესი დროიდან არის ცნობილი და დამახასიათებელია მსოფლიოს ყველა ცივილიზაციისთვის.

მსოფლიო მაშტაბით დღესდღეობით 2000 მეტი განსხვავებული ტიპის რძემჟავა პროდუქტი არსებობს. მათი უმრავლესობა ეთნიკურია და მცირე რაოდენობით იწარმოება კონკრეტული რეგიონის მოსახლეების მიერ. ზოგიერთი მათგანი იწარმოება კომერციულადაც, შედარებით მცირე ინდუსტრიული მაშტაბებით. დადგენილია, რომ ევროპელთა დიეტის 25% და ბევრი განვითარებადი ქვეყნის მოსახლეობის დიეტის 60% სწორედ ფერმენტირებული პროდუქტებისაგან შედგება [150].

რძემჟავა პროდუქტები იყოფა 2 ძირითად ჯგუფად: ფერმენტირებული რძის პროდუქტები და ყველის ნაირსახეობები. ფერმენტირებული რძის პროდუქტებს



შენარჩენებული აქვთ რძის ყველა კომპონენტი, ყველში კი შემადგენელი კომპონენტების ნაწილი რჩება შრატში.

ლაქტოზის ფერმენტაციის ტიპის მიხედვით რძემჟავა პროდუქტები ასევე ორ ჯგუფად იყოფა. პირველ ჯგუფში გაერთიანებული პროდუქტების (იოგურტი, პროსტოკვაშა, ხაჭო, არაჟანი და ა.შ.) მიღებას საფუძვლად უდევს რძემჟავური დუღილი. მეორე ჯგუფში (კეფირი, კუმისი, აციდოფილური რძე) შედის ე.წ. შერეული ტიპის ფერმენტაციის პროდუქტები, რომელთა წარმოების პროცესში შეუღლებულია რძემჟავა და სპირტული დუღილის რეაქციები [10].

განსხვავებული გეოგრაფიული და ისტორიული პირობების გამო სხვადასხვა ქვეყანაში ჩამოყალიბდა რძემჟავა პროდუქტების მიღების საკუთარი სპეციფიკური მეთოდები, რამაც ხელი შეუწყო ამ პროდუქტების ასორტიმენტის გაფართოებას. ქვევით მოგვყავს ზოგიერთი ქვეყნის ტრადიციული მაწვნის მსგავსი რძემჟავა პროდუქტის მოკლე დახასიათება:

**პროსტოკვაშა** – სტერილიზებულ ანადუღარ რძეს აცივებენ 40-45°C-მდე, დედო შეაქვთ 1-5% რაოდენობით. რძემჟავა ბაქტერიების კულტურების დამზადების წესის სპეციფიკის მიხედვით არჩევენ ჩვეულებრივ, მეჩნიკოვის, უკრაინულ, აციდოფილურ პროსტოკვაშას და ვარენცს. მაგ., “მეჩნიკოვის” პროსტოკვაშას წარმოებაში იყენებენ სიმბიოზურ დედოს, რომელიც შედგება *S. thermophilus*-ისა და *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*-გან თანაფარდობით 4:1 ან 5:1. შედეგების პროცესი გრძელდება 3-5 საათი, რის შემდეგაც პროდუქტს სწრაფად აცივებენ და ინახავენ.

**უკრაინული პროსტოკვაშა ანუ რიაჟენკა** – რძისა და ნაღების ნარევისაგან კეთდება, რომელსაც წინასწარ 2-3სთ-ის განმავლობაში ადუღებენ. ასეთი ხანგრძლივი დუღილის გამო რძე მუქ შეფერილობას და მჟრალი რძის გემოს იღებს. შემდეგ რძეს 40-45°C-მდე აცივებენ და თერმოფილური სტრეპტოკოკების მეშვეობით ადედებენ. ზოგჯერ ბულგარულ ჩხირს და სტრეპტოკოკს ამატებენ თანაფარდობით: 1:4\_1:5. შედეგების პროცესი 3-6 საათი გრძელდება, რის შემდეგაც მზა პროდუქტს აცივებენ და 4-8°C-ზე ინახავენ [5].

**ლებენი** – ეგვიპტეში გავრცელებული იოგურტის მსგავსი რძემჟავა პროდუქტია. იოგურტისაგან განსხვავებით ის მცირე რაოდენობით ალკოჰოლს შეიცავს, რაც საფუძვრების ფერმენტაციის შედეგია.

**დაჰი** – ინდოეთის ნახევარკუნძულზე გავრცელებული ტრადიციული რძემჟავა პროდუქტია. მისი წარმოების მეთოდი შემდეგნაირია: რძეს ადუღებენ, აცივებენ 37°C-მდე და თიხის ჭურჭელში ასხამენ, რომელსაც სითბოს შენარჩუნებისათვის თივაში ინახავენ. დედოდ წინა დღეების დაჰის ხმარობენ, თანაც მცირე რაოდენობით, რადგანაც ჭურჭლის ფორებში დარჩენილი მიკროორგანიზმებიც საკმარისია იმისათვის, რომ ფერმენტაციის საკმაოდ ძლიერი პროცესი დაიწყოს. კამეჩის რძის დაჰი გამოიყენება ერბოს წარმოებისთვის.

**იოგურტი** - აღმოსავლეთ ევროპას, თურქეთსა და კავკასიაში ფერმენტირებული რძის ტრადიციულ ფორმას წარმოადგენს. მათი დამზადებისათვის ამ ქვეყნებში, როგორც წესი, იყენებენ ძროხის, თხის, ცხვრის ან კამეჩის ცხიმმოუხდელ რძეს, რომელსაც დიდი ხნის განმავლობაში ადუღებენ, ისე რომ მოცულობაში შემცირდეს და შემდეგ 45°C-მდე აცივებენ (ლებენის შემთხვევაში 52°C-მდე), დედოს სახით წინა დღის პროდუქტს უმატებენ და თბილ ადგილას ინახავენ, სანამ არ შედედდება.

დასავლეთ ევროპასა და ჩრდილოეთ ამერიკის ქვეყნებში, სადაც რძის მრეწველობა კარგად არის განვითარებული, იოგურტს დიდი მასშტაბებით აწარმოებენ. დედოს სახით კი იყენებენ *S. thermophilus*-ის და *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*-ის სუფთა კულტურებს თანაფარდობით 1:1. ფერმენტაცია 6 საათი გრძელდება. ეს ორი სახეობა რძეში სიმბიოზურად იზრდება. თავდაპირველად სტრეპტოკოკი იწყებს სწრაფ გამრავლებას გახსნილი ჟანგბადის ხარჯზე და ჭიანჭველმჟავას და CO<sub>2</sub> წარმოქმნის, რომლებიც ანაერობულ პირობებთან ერთად უკვე ჩხირების გამრავლებას უწყობს ხელს. ლაქტობაცილების ძლიერი პროტეინაზული და პეპტიდაზური აქტივობის გამო რძეში ამინომჟავები და პეპტიდები გროვდება, რომლებიც აუცილებელია კოკების ინტენსიური გამრავლებისთვის. როცა pH 5.5-მდე ქვეითდება სტრეპტოკოკი წყვეტს გამრავლებას, ხოლო ლაქტობაცილები აგრძელებენ ზრდას და ეს პროცესი მხოლოდ მაშინ წყდება, როცა პროდუქტს +4°C-მდე აცივებენ და ამ დროს საბოლოო pH 4.3-ია.

საბოლოო პროდუქტში *S. thermophilus*-ის და *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*-ის თანაფარდობა 3:2 არ უნდა აღემატებოდეს [150].

სამხრეთული ტიპის, იოგურტის მსგავსი რძემჟავა პროდუქტების ნაირსახეობებს წარმოადგენს მაწონი, რომელიც სომხეთში ცნობილია მაწუნის, ხოლო თათარსტანში კიოდა კატიკის სახელით. მაწონი წარმოდგენილი ნაშრომის განსაკუთრებული ინტერესის საგანს წარმოადგენს, ამიტომ ამ პროდუქტის მიკრობულ შემადგენლობასა და მის თვისებებზე უფრო ვრცლად შევჩერდებით.

**მაწონი** - კავკასიური რძემჟავა პროდუქტია, რომელიც თავისი ორგანოლეპტიკური თვისებებით, ქიმიური შემადგენლობით და მიკროფლორით სამხრეთული ტიპის შერეული დუღილის რძემჟავა პროდუქტებს მიეკუთვნება. საუკუნეების განმავლობაში მაწვნის მეტნაკლებად მდგრადი სპონტანური მიკროფლორა ჩამოყალიბდა.

მაწონს როგორც ძროხის, ცხვრის, თხის და კამეჩის რძისაგან, ასევე ყველა ზემოთ ჩამოთვლილი ცხოველების რძის ნარევისაგან ამზადებენ. მისი ქიმიური შემადგენლობა, ძირითადად, დამოკიდებულია იმ რძის ქიმიურ შემცველობაზე, რომლისაგანაც ის არის დამზადებული. კამეჩის რძისაგან დამზადებული მაწონი უფრო ბლანტი კონსისტენციისაა, ვიდრე ძროხის და ცხვრის რძისაგან. კოლტის სიმკვრივე რძეში მშრალი ნივთიერებების შემცველობაზეა დამოკიდებული. კამეჩის მაწონიდან შრატი ბევრად უფრო ნაკლები რაოდენობით გამოიყოფა, ვიდრე ძროხის რძიდან დამზადებული ანალოგიური პროდუქტიდან.

მაწვნის დამზადების შინაურული წესი ასეთია: რძეს ადუღებენ, აცივებენ 44 -45 °C-მდე და დედოდ მასში წინა დღის მაწონი შეაქვთ, დაახლოებით 1%-ის რაოდენობით. ჭურჭელს ნაჭერში (საბანში) ახვევენ და კოლტის წარმოქმნამდე (დაახლოებით 3-5 საათი) თბილ ადგილას ათავსებენ, რის შემდეგაც ცივ ადგილას გადააქვთ გასაცივებლად და კოლტის გასამაგრებლად [3].

მკვლევართა აზრი მაწვნის მიკრობიოლოგიური შემადგენლობის შესახებ დროთა განმავლობაში ევოლუციას განიცდიდა. ამ პროდუქტის ბიოქიმიისა და მიკროფლორის კვლევის ისტორია ერთ საუკუნეს ითვლის. პირველად 1897 წელს ბერლინის სოფლის მეურნეობის აკადემიის ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიაში ა. კალანტარმა სომხური

“მაწუნის” მიკროფლორის გამოკვლევა ჩაატარა, რომლის შედეგადაც დაადგინა, რომ ის სხვადასხვა სოკოების, ბაქტერიებისა და 4 სახის საფუვრებისაგან შედგებოდა. კალანტარის აღწერით “მაწუნის” ბაცილას ტეხილი ფორმა ჰქონდა, წარმოქმნიდა რძემჟავას და სპორებს. “მაწუნის” პირველი მკვლევარი მთავარ როლს ამ პროდუქტის გემოს ფორმირებაში \_ საფუვრებს ანიჭებდა [14].

ამიერკავკასიაში მაწუნის მიკროფლორის შესახებ პირველი გამოკვლევები მ. დემურიშვილს ეკუთვნის (1930). მისი აზრით მაწუნის ძირითად კომპონენტებს რძემჟავა ბაქტერიების კოკოვანი და ჩხირისებური ფორმები და საფუვრები წარმოადგენენ [11]. უკვე 1935 წელს თ. ჯანდიერი და მ. სხირტლაძე თავის ნაშრომში “მაწონის მიკროფლორა და მიკროორგანიზმთა ურთიერთქმედება” აღნიშნავენ, რომ საფუვრების განვითარება მაწონში სპირტ-ეთერული არომატის წარმოქმნას იწვევს, რაც მაწუნის ტიპურ ორგანოლეპტურ თვისებას არ შეესაბამება, ხოლო რძემჟავური დუდილის წამყვანი მიკროორგანიზმებია: *Thermobacterium bulgaricum* (ანუ *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*) და *S. thermophilus*, შეფარდებით 1:2 [12].

მსგავსი შედეგები ლ. ერზინკიანმაც მიიღო. მისი გამოკვლევების თანახმად მაღალი ხარისხის “მაწუნის” მიკროფლორა თერმოფილური რძემჟავა ჩხირებისა და კოკებისაგან (შეფარდებით 1:2 ან 1:3) შედგება. კოკების წარმომადგენელია *S. thermophilus*, ხოლო ჩხირების *L. mazuni*, რომელიც ამ მკვლევარის აზრით *L. bulgaricus*-ის კავკასიურ ქვესახეობას მიეკუთვნება. ლ. ერზინკიანი აღნიშნავს, რომ “მაწუნის” ხშირად გამოიყოფა აგრეთვე *L. acidophilus*. რაც შეეხება საფუვრებს, ისინი “მაწუნის” სპონტანურ მიკროფლორას წარმოადგენენ და მათი განვითარება, როგორც წესი, აუარესებს ამ პროდუქტის ორგანოლეპტურ თვისებებს [13].

უფრო გვიანდელი გამოკვლევებით მაწუნის მიკროფლორის სტრუქტურა დადგენილი იქნა, როგორც: *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* და *S. thermophilus*, შეფარდებით 1:2 [8,16].

უკანასკნელი გამოკვლევები მაწონზე ჩატარებული იყო 1996 წელს ნ. ჭანიშვილისა და სხვათა მიერ ფინელ კოლეგებთან ერთად. შესწავლილ იქნა სხვადასხვა სიმაღლეზე მდებარე სოფლებში (380მ-დან 1700მ-მდე) მოპოვებული ოჯახებში წარმოებული 20 მაწუნის დედოს ბაქტერიული შემადგენლობა და ნაჩვენები იყო

მნიშვნელოვანი ნაირგვარობა მაწვნის ნიმუშების სახეობრივი შემადგენლობისა და კომპონენტების რიცხვის მიხედვით. დედობის უმრავლესობა 5-7 კომპონენტს შეიცავდა, ზოგჯერ კი ეს რიცხვი 9-ს აღწევდა. იდენტიფიცირებული იქნა შემდეგი ბაქტერიული სახეობები და საფუვრები: *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus cremoris*, *L. lactis*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lucitaniae*. დადგინდა, რომ სახეობების ზემოთაღნიშნული ნაირფეროვნების მიუხედავად მაწვნის კოლტისა და გემოვნებითი თვისებების ჩამოყალიბებაზე *L. delbrueckii ssp. lactis* და *S. thermophilus* (შეფარდებით 1:3) აგებენ პასუხს. როგორც ზემოთ თქმულიდან ჩანს, აღნიშნული მონაცემები მაწვნის მიკროფლორის შემადგენლობას სრულიად ახლებურად აშუქებს. საყურადღებო იყო ის ფაქტი რომ, საქართველოს სხვადასხვა კუთხის მაწვნის დედოს “ზმირ” კომპონენტებს ენტეროკოკული შტამები წარმოადგენს, მაგრამ მათი როლი გარკვეული არ იყო. გამოთქმული იყო მოსაზრება, რომ ენტეროკოკები დადებითად მოქმედებს მაწვნის ორგანოლეპტიკური და პრობიოტიკური თვისებების განვითარებაზე ან პირიქით, არასასურველი რეაქციების მიზეზს წარმოადგენს [36,38].

*S. thermophilus* და *L. delbrueckii ssp. lactis*-ის შტამებით წარმოდგენილი მაწვნის სტარტერული ასოციაცია ატარებს ე.წ. პროტოკოლოპერაციის სახეს. ასეთი პოზიტიური ურთიერთქმედება ეფექტურად მოქმედებს ორივე სახეობის ზრდაზე, მჟავების წარმოქმნის პროცესსა და, შესაბამისად, პროდუქტის ორგანოლეპტურ თვისებებზე. ფერმენტაციის დასაწყისში, როდესაც pH-ის ცვლილება უმნიშვნელოა (<0.5), ხოლო ტერმპერატურული მაჩვენებელი თერმოფილური ბაქტერიებისათვის ოპტიმალურია (42°C), ექსპონენციალურ ზრდას იწყებს *S. thermophilus*-ის შტამები, რომელთა კვებითი მოთხოვნილებები, ლაქტობაქტერიებთან შედარებით უფრო მარტივია.

*S. thermophilus*-ის შტამების უმეტესობა ზრდა-განვითარების სტიმულირებისათვის საჭიროებს 2-5 ამინომჟავას, მაშინ როდესაც ლაქტობაქტერიებისათვის აუცილებელია ამინომჟავების უფრო მრავალფეროვანი კომპლექსი (3 - 14 მდე) [48]. *S. thermophilus*-ის შტამებს ახასიათებს ექსპონენციალური ზრდის 2 ფაზა, რომლებიც რამდენიმე საათიანი ლატენტური პერიოდით არის გამოყოფილი. პირველი ფაზა: მიკროორგანიზმები იყენებენ რძეში არსებულ თავისუფალ ამინომჟავებს და პეპტიდებს. როდესაც მათი

კონცენტრაცია შემცირდება ზრდის შემზღუდავ მაჩვენებლამდე, იწყება მოკლე ლატენტიური ფაზა, რომელიც საჭიროა უჯრედული კედლის პროტეინაზების სინთეზისათვის. ამ ფერმენტების აქტივობის (რძის კაზეინის დაშლის) შემდეგ იწყება ზრდის მეორე ფაზა და შესაბამისად გრძელდება რძემჟავური დუდილის პროცესი. *S. thermophilus*-ის უჯრედული კედლის პროტეინაზების მნიშვნელობა გამოიხატება მათ უნარში კაზეინის ჰიდროლიზის გზით უზრუნველყონ უჯრედებისთვის საჭირო აზოტოვანი ნაერთების მარაგი. აზოტოვანი ნაერთებით შედარებით გამდიდრებულ რძეში გამრავლებას იწყებს *L. delbrueckii*, რომლის ზრდის სტიმულირებას აგრეთვე ახდენს სტრეპტოკოკების მიერ წარმოქმნილი პირუვატი, ჭიანჭველმჟავა და CO<sub>2</sub>. *L. delbrueckii* ხასიათდება უფრო აქტიური უჯრედული კედლის პროტეინაზებით და თავის მხრივ უზრუნველყოფს *S. thermophilus*-ის შემდგომი ზრდა-განვითარებისათვის საჭირო პეპტიდების და ამინომჟავების საჭირო რაოდენობას [113].

უძველესი დროიდან ცნობილია მაწვნის სამკურნალო ეფექტი. ამიერკავკასიაში მას ხმარობენ კუჭ-ნაწლავის დაავადებების, მოწამვლის, მზის დარტყმის, დამწვრობების, გველის და მორიელის ნაკბენის, წყლულების შემთხვევებში. სახალხო კოსმეტიკაში მაწონს წარმატებით იყენებენ კანისა და თმის ხარისხის (დარბილება, ძირების გამაგრება) გასაუმჯობესებლად. უმაცვირობის პირობებში მაწონი სწრაფად-ფუჭებადი პროდუქტების შესანახადაც შეიძლება იქნას გამოყენებული. ყოველივე ზემოთ თქმული მაწვნის შემადგენელი ბაქტერიული კომპონენტების პათოგენური და ლპობის გამომწვევი საპროფიტების მიმართ მაღალ ანტაგონისტურ უნარზე მეტყველებს. უნდა აღინიშნოს, რომ მაწვნის სამკურნალო და ანტიბაქტერიული თვისებების განმაპირობებელი კომპონენტების ქიმიური ბუნება და მოქმედების მექანიზმი შედარებით ნაკლებად არის შესწავლილი. საქართველოში არსებობს მხოლოდ მცირეოდენი მეცნიერული ნაშრომი, რომელშიც ყურადღება გამახვილებულია სწორედ მაწვნის სამკურნალო-პროფილაქტიკური თვისებებზე [37].

ტაბლიაშვილის (1989) მიერ შეფასებული იყო მაწვნით კვების დადებითი ზეგავლენა ჩვილი ბავშვების ნივთიერებათა ცვლაზე. აღნიშნული იყო, რომ მაწვნის მიღება მიზანშეწონილია, როგორც ჯანმრთელი, ასევე ესკუდატური დიათეზის მქონე ბავშვებისათვის [20]. მაზმანიშვილის (1988) მიერ C ვიტამინით გამდიდრებული

ფერმენტირებილი რბემჟავა პროდუქტის – მაწვნის ჩვილ ბავშვთა კვებაში კლინიკური შეფასების შედეგად, დადგენილი იყო, რომ ეს პროდუქტი დადებითად მოქმედებს ჩვილი ბავშვების იმუნორეაქტიულ მდგომარეობაზე, საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის ადგილობრივ დაცვით რეაქციებზე და უზრუნველყოფს ბავშვის ნორმალურ ფიზიოლოგიურ განვითარებას. ორივე მკვლევარის ნაშრომში აღნიშნულია მაწვნის გამოყენების განსაკუთრებული მნიშვნელობა ცხელი კლიმატის რეგიონებში მცხოვრები ბავშვების კვებით რაციონში [17].

ნ. ჭანიშვილი და სხვ. მიერ შესწავლილი იყო მაწვნის ძირითადი მიკრობული კომპონენტების პრობიოტიკური – სამკურნალო თვისებები, კერძოდ, კი მათი ანტაგონისტური ზემოქმედება სხვადასხვა პათოგენურ მიკროორგანიზმებზე (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*). ამგვარად, ქართულ სამედიცინო და ყოფით კულტურაში ცნობილი მაწვნის ძლიერად გამოხატული პრობიოტიკური თვისებები დაკავშირებული იქნა კონკრეტულ ბაქტერიულ კომპონენტებთან და/ან კონსორციუმებთან. *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* ანტაგონისტური მოქმედების ფართო სპექტრით და ეფექტურობით შედარებულ იქნა ცნობილ პრობიოტიკულ შტამთან *Bifidobacterium bifidum* - თან, რომელიც სამედიცინო პრაქტიკაში გავრცელებული ბიოფარმაცევტული პრეპარატის ბიფიდობაქტერინის საბაზო შტამს წარმოადგენს [37, 148].

*L. delbrueckii ssp. lactis* ელექტრონული მიკროსკოპით შესწავლისას მის სტრუქტურაში აღმოჩენილ იქნა შოლტები, ცნობილია, რომ შოლტები ამ ტიპის ბაქტერიების ადამიანის კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის ეპითელიუმზე მიმაგრებას და აქტიურ კოლონიზაციას უწყობს ხელს. ამის შედეგად ეს ლაქტობაქტერიები ადამიანის ნორმალური მიკროფლორასთან ერთად მონაწილეობს ლორწოვანი გარსების ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში, პირობითად-პათოგენური მიკროორგანიზმების დათრგუნვაში, იმუნური სისტემის სტიმულაციაში, სხვადასხვა მეტაბოლურ ( $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K$ ,  $D$  და  $B$  ჯგუფის ვიტამინების სინთეზი) და საჭმლის მომნელების პროცესებშიც [37,38].

მაწვნის მიკრობული სტრუქტურის მრავალფეროვნება მიგვანიშნებს, რომ აღნიშნული პროდუქტის გემოვნებითი, სამკურნალო და სხვა თვისებები დიდად არის დამოკიდებული მისი შემადგენელი მიკროორგანიზმების გენოტიპურ და ფენოტიპურ თვისებებზე. უნდა აღინიშნოს, რომ მაწვნის მიკროფლორის შემადგენელი მიკროორგანიზმების ჩაღრმავებული კვლევა, რომელიც თანამედროვე მოლეკულური ბიოლოგიის მეთოდების გამოყენებაზე იქნებოდა დამყარებული დღემდე არ შესრულებულა. წინამდებარე ნაშრომი დეტალური გენეტიკური, ბიოქიმიური და მოლეკულური კვლევის ანალიზის პირველ მცდელობას წარმოადგენს.

## თავი 2. რძემჟავა ბაქტერიების ზოგადი დახასიათება

რძემჟავა ბაქტერიების რიცხვს ეკუთვნის გრამ-დადებითი, ანაერობული ან მიკროაეროფილური, მჟავატოლერანტული მიკროორგანიზმები, რომელთაც ნახშირწყლების ფერმენტაციის შედეგად რძემჟავის წარმოქმნის უნარი შესწევთ.

რძემჟავა ბაქტერიები ევოლუციურად 1.5-2 მილიარდი წლის წინათ ჩამოყალიბდნენ. ეს ის პერიოდია, როცა დედამიწის ანაერობული ატმოსფერო და გარემო აერობულით შეიცვალა [166].

ლაქტობაქტერიების ჯგუფში შედის, როგორც ჩხირისებრი, ასევე კოკოვანი ფორმები [18]. ზოგიერთი მკვლევარის აზრით კოკოვანი ფორმები ჩხირისებრი ფორმების მორფოლოგიური დეგენერაციის შედეგად განვითარდნენ, სხვა მოსაზრების თანახმად ლაქტობაცილები და ლაქტოკოკები ფილოგენეზურად დაკავშირებული არიან, თუმცა, სხვადასხვა წინაპარი გააჩნიათ [26]. რძემჟავა ბაქტერიების უმეტესობას არ გააჩნია მოძრაობის და სპორების წარმოქმნის უნარი. მათთვის დამახასიათებელია კატალაზა-ნეგატიური და ოქსიდაზა-ნეგატიური რეაქცია, მაგრამ უკანასკნელ წლებში აღწერილ იქნა ამ თვისებების მიხედვით ზოგიერთი ატიპური შტამი [15]. B

ლაქტობაქტერიებს სახეობა-სპეციფიკური კომპლექსური კვებითი მოთხოვნილებები გააჩნია. მათი უმრავლესობა, განსაკუთრებით კი ლაქტობაცილები, თავიანთი განვითარებისათვის ვიტამინებს საჭიროებს. ლაქტობაქტერიების ზრდაზე დადებითად მოქმედებს ციტრატი და ძმარმჟავა, ხოლო არაორგანული ზრდის



ფაქტორებიდან აღსანიშნავია სპილენძის, რკინის, ნატრიუმის, ფოსფორის, იოდის, გოგირდის და, განსაკუთრებით, მანგანუმის ნაერთები. საკვებისადმი მაღალი მოთხოვნილებების მიუხედავად ამ ჯგუფის წარმომადგენლები ბუნებაში ფართოდ არის გავრცელებული.

ბაქტერიების ამ ჯგუფისათვის აგრეთვე დამახასიათებელია მაღალი რეზისტენტულობა ერთატომიანი სპირტების მიმართ, რაც იმით აიხსნება, რომ ხანგრძლივი ევოლუციის პროცესში ლაქტობაქტერიებს, საფუვრებთან ერთად ერთიდაიგივე ბუნებრივ და საწარმოო სუბსტრატებში ზრდა-განვითარება უხდებოდა [15].

რძემჟავა ბაქტერიების ჯგუფის მაღალი ჰეტეროგენურობის გამო მათი კლასიფიკაცია დღემდე ინტენსიური შესწავლის ობიექტს წარმოადგენს. უკანასკნელი მონაცემების მიხედვით ამ ჯგუფში გაერთიანებულია 10 გვარი: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*. ათივე გვარი ბერჯის სისტემატიკის სახელმძღვანელოს თანახმად ბაქტერიების II კატეგორიას ანუ უჯრედული კედლის მქონე გრამ-დადებით ეუბაქტერიებს მიეკუთვნება [18]. G კვების პროდუქტების მრეწველობისათვის მნიშვნელოვანი ლაქტობაქტერიები კარგად შესწავლილ და დახიათებულ ჯგუფს წარმოადგენს. რძემჟავა ბაქტერიების ის სახეობები, რომლებიც საზოგადოდ აღიარებულია, როგორც უსაფრთხო (GRAS - Generally Recognized As Safe), ფართოდ გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის პროდუქტების წარმოებაში: ფერმენტირებული რძის, ხორცისა და თევზის მრეწველობა, ბოსტნეულის და ხილის ბიოლოგიური კონსერვაცია, ღვინის წარმოება, პურის ცხობა. აგრეთვე პერსპექტიული აღმოჩნდა ლაქტობაქტერიებისა და მათ მიერ სინთეზირებული ბაქტერიოცინების საწარმო გამოყენება ბიოპრეზერვატორების (ბიოკონსერვანტების) სახით [150, 167].

ქვემოთ მოყვანილია რძემჟავა პროდუქტების, მათ შორის მაწვნის წარმოებისთვის მნიშვნელოვანი ბაქტერიული გვარების მოკლე დახასიათება.

### გვარი *Lactobacillus*

გვარში გაერთიანებულია 1,0-10/0,5-1,2მკმ ზომის ჩხირისებრი ბაქტერიები, რომელთა ფორმა იცვლება ძეწკვების წარმომქმნელ ჩხირებიდან კოკობაცილებამდე. მათი უმეტესობა უძრავია. ძველი კულტურები მაღალი pH-ის პირობებში იღებება გრამ-უარყოფითად. ლაქტობაცილები ჩვეულებრივ ფაკულტატიური ანაერობებია (გვხდება მიკროაეროფილური და მკაცრი ანაერობებიც); აერობულ პირობებში უკეთ იზრდება ნიადაგში თიოგლიკოლატის და ცისტეინის დამატებისას. კვების ტიპის მიხედვით ისინი ქემორგანოტროფებია (დუდილის მეტაბოლიზმით). ნიტრატებს არ აღადგენს, კაზეინს არ შლის, არ წარმოქმნის ინდოლს და H<sub>2</sub>S, ძალიან იშვიათად გამოყოფს პიგმენტს (კრემისფერიდან-აგურისფერ-წითლამდე). ისინი კატალაზა- და ციტოქრომოქსიდაზა- უარყოფითები არის. ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმი 30-40°K, pH-ის ოპტიმუმი კი - 5,5-5,8. გლუკოზის ფერმენტაციისას აირის წარმოქმნის უნარის მიხედვით ლაქტობაცილებს ყოფენ აირარწარმომქმნელ (14 სახეობა) და აირწარმომქმნელ (11 სახეობა) ჯგუფებად [19].

გვარი *Lactobacillus* მოიცავს 70-მდე სახეობას. თანამედროვე დაყოფა ქვეჯგუფებად ფერმენტაციის ტიპზეა დამყარებული [18, 150]:

**I ჯგუფი: ობლიგატური ჰომოფერმენტატიული ლაქტობაცილები** – ჰექსოზების ფერმენტაციის შედეგად ძირითადად რძემჟავას (85%) წარმოქმნის და რძეს 3% კულტურის შეტანისას 3-5 საათში ადედებს. სახეობათა უმეტესობა თერმოფილურია (ზრდის ოპტიმუმი 40-45°C). ორლა-იანსენის (1919) კლასიფიკაციით (მორფოლოგიის და ტემპერატურისადმი დამოკიდებულების მიხედვით) მათ აგრეთვე თერმოლაქტობაცილებს უწოდებენ [18,150].

ტიპური წარმომადგენლებია: *L. delbrueckii ssp. delbrueckii*, *L. delbrueckii ssp. lactis*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (ცნობილია, როგორც ბულგარული ჩხირი). სამივე ქვესახეობა ლაქტოზის ფერმენტაციის შედეგად D(-) რძემჟავას წარმოქმნის და დნმ-ის >80% ჰომოლოგიას ამჟღავნებს, მაგრამ ერთმანეთისაგან კარბოჰიდრატული პროფილით და ეკოლოგიური ნიშით გამოირჩევა [158,189]. G+C შემცველობა დნმ-ში 49-51%-ია [90]. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* გენომის ზომა 2.3MMbp წარმოადგენს [112]. ბულგარული ჩხირის ზოგიერთი შტამი აცეტალდეჰიდს წარმოქმნის, რომელიც პროდუქტებს

სპეციფიკურ გემოს და არომატს ანიჭებს. სამივე ქვესახეობა სხვადასხვა რძემჟავა პროდუქტების სტარტერების (დედობის) შემადგენლობაში შედის [91].

ამ ჯგუფში აგრეთვე გაერთიანებულია შემდეგი სახეობები: *L. acidophilus*, *L. helveticus*.

*L. acidophilus*-ის ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა 37-38°C; ამ სახეობის შტამები რძეს 3-5 საათში ადედებს; ლაქტოზის ფერმენტაციისას DL რძემჟავას წარმოქმნის; გამძლეა ტუტე რეაქციის (pH 3,8), ფენოლის, ნაღველის (20%) და NaCl-ის (2%) მიმართ.

რძის მრეწველობაში *L. acidophilus*-ს აციდოფილური რძემჟავა პროდუქტების და კუმისის წარმოებაში იყენებენ.

თერმოლაქტობაცილების ზოგიერთი სახეობა ფართოდ გამოიყენება კვების მრეწველობაში, კერძოდ რძის პროდუქტების, პურის ცხობის, ალკოჰოლური სასმელების წარმოებაში [150].

**II ჯგუფი: ფაკულტატური ჰომოფერმენტული ლაქტობაცილები** - ძირითადად ახდენს პენტოზების ფერმენტაციას, რის შედეგად წარმოქმნის რძემჟავას, ძმარმჟავას, ჭიანჭველმჟავას, ეთანოლს და CO<sub>2</sub>-ს. ფაკულტატური ჰომოფერმენტული ლაქტობაცილები ჰექსოზების ფერმენტაციის შედეგად რძემჟავას შედარებით მცირე რაოდენობით (50%) წარმოქმნის. ამ ჯგუფში გაერთიანებულია მეზოფილური რძემჟავა ბაქტერიები (ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა – 30°C). ამ სახეობის შტამების უმეტესობა რძეს 48-72 საათში ადედებს, აქვთ ჩხირისებრი უჯრედები, რომლებიც მოკლე ძეწკვებს წარმოქმნის (სტრეპტოლაქტობაცილები) [15].

ქვეჯგუფში გაერთიანებულია შემდეგი სახეობები: *L. casei ssp. casei*, *L. casei ssp. rhamnosus*, *L. casei ssp. pseudoplatarum*, *L. paracasei*, *L. sake*, *L. curvatus*. ტიპური წარმომადგენელია *L. plantarum* [18].

*L. plantarum* რძის მრეწველობაში ყველის მომწიფების პროცესსა და კეფირის წარმოებაში გამოიყენება. აღნიშნული სახეობა ფერმენტირებული ბოსტნეულის პროდუქტების წარმოების ერთ-ერთი წამყვანი კომპონენტია [150].

ჯგუფის მეორე ტიპური წარმომადგენელია *L. casei*. *L. casei*-ის შტამები მაღალი პროტეაზური აქტივობის გამო ფართოდ გამოიყენება ყველის წარმოების პროცესში [91].

*L. plantarum*-ისა და *L. casei*-ის თავისებურებად ითვლება მათი მაღალი გამძლეობა ნაღველისა (40%) და NaCl-ის (6%) მიმართ [19].

*L. sake* და *L. curvatus*-თვის დამახასიათებელია ზრდა დაბალი ტემპერატურის (2-4°C) პირობებში, რაც განაპირობებს მათ ფართო გამოყენებას ფერმენტირებული ხორცის და ბოსტნეულის წარმოებაში. *L. sake* გამოიყენება იაპონური საკვს მიღების პროცესში [150].

**III ჯგუფი: ობლიგატური ჰეტეროფერმენტატული ანუ ბეტალაქტობაცილების ჯგუფს** მხოლოდ პენტოზების ფერმენტაციის უნარი შესწევს. ობლიგატური ჰეტეროფერმენტული ლაქტობაცილების რიცხვს ეკუთვნის შემდეგი სახეობები: *L. fermentum*, *L. divergens*, *L. kefir*, *L. confusus*, *L. reuteri*, *L. fructosus*. ყველა ჩამოთვლილი სახეობა DL ლაქტატს აწარმოებს. გამონაკლისია *L. fructosus*, რომელიც D(-) ლაქტატს გამოყოფს. ეს ჯგუფი მეტად ვარიაბელურია, როგორც კარბოჰიდრატული, ისე გენეტიკური თვალსაზრისითაც.

ქვეჯგუფის სახეობები რძის მრეწველობაში, პურის ცხობაში, ფერმენტირებული ბოსტნეულის წარმოებაში გამოიყენება. ისინი სუსტი მჟავა-წარმომქმნელები არის, რძეს ვერ ადუღებენ. ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა 30°K. ბეტალაქტობაცილები თავისი თვისებებით არომატწარმომქმნელ ლაქტოკოკებს გავს, სხვა ლაქტობაცილებისაგან განსხვავებით არგინინიდან ამიაკს წარმოქმნის და დაბალი თერმორეზისტენტულობა გააჩნია [15, 150].

### **გვარი *Streptococcus***

სტრეპტოკოკები 0,5-2,0 მკმ-ის სფერული ან ოვალური ფორმის, წყვილებად ან მოკლე ძეწკვებად განლაგებულ უჯრედებს წარმოქმნის. სხვადასხვა ფაქტორების ზემოქმედებით მათ შეუძლიათ წაგრძელებული ფორმა მიიღონ და კოკობაცილებს დაემსგავსონ. სტრეპტოკოკები უძრავია, სპორებს არ წარმოქმნის, ზოგიერთ სახეობას აქვს კაპსულა. კვების ტიპის მიხედვით ქემოორგანოტროფებია; კატალაზა-ნეგატიურები და ფაკულტატური ანაერობები (უპირატესობა ენიჭება 5% CO<sub>2</sub> შემცველობას), ზოგიერთი მიკროაეროფილია; იზრდება 25°-45°K-ის ინტერვალში,

ტემპერატურული ოპტიმუმი 37°C. სახეობათა უმეტესობას გააჩნია ჰემოლიზური აქტივობა [18].

ფილოგენეზურად ეს სახეობა *L. lactis*-თან ახლოს დგას. ზოგიერთი მკვლევარი მას გამოყოფს როგორც *S. salivarius* ქვესახეობას *S. salivarius ssp. thermophilus* [158].

*S. thermophilus*-ის ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა 40<sup>0</sup>-45<sup>0</sup>°K-ია. თერმოფილური სტრუქტოკოკების უმეტესობა ჰომოფერმენტული დუდილის შედეგად pH-ს ამცირებს 4.0-მდე. მინიმალური რაოდენობით რძეში შეტანისას აქტიური შტამები რძეს 12-14 საათში ადედებს. მრავალი შტამისათვის დამახასათებელია ურეაზას წარმოქმნა. *S. thermophilus* მარილების დაბალი კონცენტრაციების მიმართ იჩენს მგრძობელობას [18].

*S. thermophilus*-ის გენომი, რომელიც ქრომოსომასა და პლაზმიდებისაგან შედგება რძემჟავა ბაქტერიებს შორის ყველაზე მცირეა (1.8Mbp). პლაზმიდა PA33 (6.9.kbp) მასპინძლის უჯრედის მორფოლოგიას, რძის შედედების სისწრაფეს და ანტიბიოტიკო-და ფაგო-რეზისტენტულობის პროფილს განსაზღვრავს. თერმოფილური სტრუქტოკოკების შტამებში ლიზოგენია საკმაოდ იშვიათ მოვლენას წარმოადგენს [125].

ამჟამად არჩევენ სტრუქტოკოკების 20-ზე მეტ სახეობას, მაგრამ სტარტერულ კულტურად გამოიყენება მხოლოდ ერთი - *Streptococcus thermophilus*, რომლის ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური თვისებები განაპირობებს მის კომერციულ მნიშვნელობას. ის ფართოდ გამოიყენება იოგურტის, მაწვნის, იტალიური ტიპის (მაგ., მოცარელა) და ზოგიერთი შვეიცარული ტიპის მაგარი ყველის წარმოებაში [4, 81, 150].

თერმოფილური სტრუქტოკოკის პრობიოტიკური ღირებულება ლაქტოზის დეგრადაციის უნარით გამოიხატება. ამ სახეობის შემცველი რძემჟავა პროდუქტების მიღება რეკომენდირებულია ლაქტაზის A უკმარისობის დროს [156].

### **გვარი *Enterococcus***

ენტეროკოკები - 0,6-2,0/0,6-2,5 მკმ ზომის, ოვალური ფორმის უჯრედების მქონე ბაქტერიებია, რომლებიც წყვილებად ან მოკლე ძეწკვებადაა განლაგებული. ენტეროკოკები სპორებს არ წარმოქმნიან, კაპსულა არ გააჩნია. ზოგიერთი სახეობა ხასიათდება მოკლე წამწამების არსებობით. გვარის წარმომადგენლები კატალაზა-

ნეგატიური ფაკულტატური ანაერობები და ქემოორგანოტროფებია, იშვიათ შემთხვევებში აღადგენს ნიტრატებს. ენტეროკოკების ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმი 37<sup>0</sup>ჩ, მათთვის დამახასიათებელია განსაკუთრებული თერმოგამძლეობა – უმეტესობა კარგად იზრდება 45<sup>0</sup>ჩ-ზე, უძლებს 60<sup>0</sup>ჩ-მდე გაცხელებას 30 წუთის განმავლობაში. სტრუქტოკოკებისგან განსხვავებით ენტეროკოკები იზრდება 6,5% NaCl-ის შემცველ ნიადაგზე და pH 9,6-ზე, ცვლის მეთილენის ლილიანი რძის შეფერვას 4-6 საათის განმავლობაში 37<sup>0</sup>-ზე ინკუბირებისას. ტიპიურ სახეობას *E. faecalis* წარმოადგენს [18, 26, 19].

ენტეროკოკების განსაკუთრებული რეზისტენტულობა გარემოს არახელსაყრელი პირობების მიმართ მათ ბუნებაში ფართო გავრცელებას განაპირობებს. ეს უბიქვოტური რძემჟავა ბაქტერიები დიდი რაოდენობით გვხვდება ნიადაგში, წყალში, ეპიფიტურ მიკროფლორაში, მრავალ ფერმენტირებულ პროდუქტში, აუდუდარ, ასევე პასტერიზებულ რძეში. ეს მიკროორგანიზმები აგრეთვე ადამიანისა და სხვადასხვა ხერხემლიანების საჭმლის მომწოდებელი ტრაქტის მიკროფლორის ნაწილს წარმოადგენს [150].

გვ. *Enterococcus* ზოგიერთი სახეობა პირობით-პათოგენურია. ბოლო დროს განსაკუთრებულ ყურადღებას იქცევს ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული, კერძოდ, ვანკომიცინ-რეზისტენტული ენტეროკოკები (VRE). ეს მუტანტური შტამები ანტიბიოტიკების უსისტემო და უკონტროლო ხმარების შედეგია. სამწუხაროდ, ნაწლავური ენტეროკოკები, რომლებიც თავდაპირველად საკმაოდ უწყინარ პირობით-პათოგენურ ბაქტერიებს წარმოადგენდნენ ამ მუტანტური ცვლილების შედეგად აგრესიულ ნაწლავურ გამომწვევებად გადაიქცნენ, რომლებიც განსაკუთრებით საშიშ შედეგს სწორედ ანტიბიოტიკებით ან სხვა ქიმიური პრეპარატებით ნამკურნალებ დასუსტებულ ორგანიზმებში იწვევენ. ენტეროკოკების ეს ჯგუფი არ უნდა ავურიოთ ამავ გვარის არაპათოგენურ წარმომადგენლებში [133].

არაპათოგენური ენტეროკოკების უმრავლესობა ბიოგენური ამინებს წარმოქმნის და ალიმენტარულ ინტოქსიკაციების მიზეზს წარმოადგენს. ენტეროკოკების თანაობა რძემჟავა პროდუქტებში ხანგრძლივი დროის განმავლობაში როგორც არასასურველი სანიტარული პირობების მაჩვენებელი განიხილებოდა. მაგრამ უკანასკნელი წლების

გამოკვლევებით ნაჩვენებია იქნა მათი დადებითი როლი ზოგიერთი პროდუქტის (ევროპული ტიპის ყველი, ფერმენტირებული ძეხვეული) წარმოების პროცესში [32,33,46]. *E. faecium* K 77D შტამი კი ACNFP (UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes 1996) მიერ რეკომენდირებული იყო როგორც სტარტერული კულტურა [21]. სტარტერული ენტეროკოკების ბიოქიმიურ თვისებებს შორის აღსანიშნავია მაღალი ლიპაზური აქტივობა, ციტრატის უტილიზაციის და არომატული კომპონენტების სინთეზის უნარი [82,83].

ზოგიერთი ავტორი ყურადღებას ამახვილებს ენტეროკოკების უნარზე მოახდინონ კაზეინის აქტიური დაშლა და მათ სტარტერულ კულტურებად გამოყენებას მიზანშეწონილად მიიჩნევენ [43]. მთუმცა, ლიტერატურაში ფართოდ მოიპოვება მონაცემები ენტეროკოკების სუსტი პროტეოლიზური აქტივობის შესახებ, გვ. *Enterococcus* სახეობებს შორის ყველაზე მაღალი აქტივობა აღნიშნულია *E. faecalis* შემთხვევაში, Eეს უკანასკნელი კი კვებითი ენტეროკოკული ინტოქსიკაციების 80-90% მიზეზს წარმოადგენს [32, 61].

### თავი 3. რძემჟავა ბაქტერიების ფენოტიპური ნიშან-თვისებების როლი საკვები პროდუქტების ფერმენტაციულ წარმოებაში

რძემჟავა პროდუქტების ხარისხი და კვებითი ღირებულება ძირითადად დამოკიდებულია მათი წარმოებისათვის გამოყენებულ მიკროორგანიზმებზე. რძემჟავა პროდუქტების დამზადების პროცესში შესრულებული როლის მიხედვით არჩევენ ე.წ. “სასარგებლო” და “მავნე” მიკროორგანიზმებს:

“სასარგებლო” მიკროორგანიზმები დადებითად მოქმედებს ამა თუ იმ პროდუქტისათვის დამახასიათებელი თვისებების ჩამოყალიბებაზე და წარმოადგენს პირველად (*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) ან/და მეორად (*Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium* *Enterococcus*, საფუარი და ობის სოკოები) სტარტერულ მიკროფლორას.

“მავნე” ანუ არასტარტერული მიკროორგანიზმები (NSLAB -Non starter lactic acid bacteria) (პათოგენური და ლაზობის ბაქტერიები) იწვევს პროდუქტების ხარისხისა და გემოვნების დეფექტებს [91].

რძემჟავა პროდუქტის ორგანოლეპტიკური (სენსორული), რეოლოგიური (სტრუქტურულ-მექანიკური და სინერეტიული) და პრობიოტიკური თვისებები განპირობებულია იმ ბიოქიმიური რეაქციებით, რომლებშიც სტარტერული მიკროორგანიზმები უშუალო მონაწილეობას ღებულობს. მეორადი სტარტერული კულტურები, როგორც წესი, პასუხს არ აგებს რძემჟავა ფერმენტაციაზე, მაგრამ გააჩნია სხვა ფუნქციური დატვირთვა, მაგალითად, პროპიონის მჟავას წარმოქმნის უნარი, პროტეოლიზი და ა.შ [9].

სტარტერული კულტურები იყოფა 2 ძირითად ჯგუფად:

ბუნებრივი “შინაური” ანუ “კუსტარული” კულტურები, რომლებსაც ე.წ. რეინოკულაციის (გადათესვის) პრინციპით მზა პროდუქტიდან – “დედოდან” ღებულობენ. ასეთი კულტურები არასტაბილურია, მათი სახეობრივი შემადგენლობა ცვალებადობს და ხშირად კონტამინანტურ მიკროფლორას შეიცავს.

შერჩეული (სელექციური) სტარტერები - წარმოდგენილია კონკრეტული სახეობების კომბინაციით, შტამები შერჩეულია საწარმო მოთხოვნების მიხედვით.

შერჩეული სტარტერული კულტურები 3 ჯგუფად იყოფა: თერმოფილურ, მეზოფილურ და პრობიოტიკულ ბაქტერიებად.

სტარტერული კულტურების შერჩევისას შემდეგ ფენოტიპურ კრიტერიუმებს ითვალისწინებენ:

- აციდოფიკაციის უნარს;
- პროტეოლიზური და პეპტიდაზურ აქტივობას;
- აუტოლიზურ აქტივობას;
- ეგზოპოლისაქარიდების პროდუქციის უნარს;
- ბაქტერიოცინების სინთეზის უნარს;
- რეზისტენტობას ბაქტერიოფაგების მიმართ;
- რეზისტენტობას ლიზოციმის მიმართ (ამ ფერმენტს ხშირად უმატებენ რძეს პათოგენური და ლაზობის ბაქტერიებისგან დაცვის მიზნით);



- არომატული კომპონენტების წარმოქმნას (ამ კრიტერიუმის მიხედვით უპირატესობა ენიჭება ჰეტეროფერმენტულ მიკროორგანიზმებს);

- ბიოგენური ამინების სინთეზს, რაც უარყოფით თვისებად მიიჩნევა და ამიტომ სტარტერული კულტურების შერჩევა მიმდინარეობს ბიოგენური ამინების პროდუცენტი შტამების გამორიცხვით.

სტარტერული კულტურების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა საშუალებას გვაძლევს ოპტიმალურად გამოვიყენოთ ეს მიკროორგანიზმები არა მარტო პროდუქტების კონსისტენციის, გემოს და არომატის ფორმირების პროცესში, არამედ ტექნოლოგიური პროცესის ინტენსიფიცირებისა და რძის პროდუქტების ბიოლოგიური ღირებულების და ხარისხის ასამაღლებლად. გარდა ამისა, ნედლეულში და საბოლოო პროდუქტში ტექნოლოგიურად უვარგისი და პათოგენური მიკროფლორის განვითარების შედეგად მიმდინარე ქიმიური ცვლილებების ცოდნა საშუალებას იძლევა თავიდან ავიცილოთ პროდუქტის წუნი და კვებითი ინტოქსიკაციები [117].

განვიხილოთ სტარტერული კულტურების ტექნოლოგიური თვალსაზრისით განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი ფენოტიპური ნიშან-თვისებები.

### 3.1 აციდოფიკაციური აქტივობა, როგორც საწარმო მიკროორგანიზმების ძირითადი თვისება

რძემჟავა პროდუქტების ტექნოლოგიაში დიდი ყურადღება ექცევა სტარტერული მიკროორგანიზმების აციდოფიკაციურ აქტივობას ანუ უნარს ლაქტოზის მეტაბოლიზმის შედეგად წარმოქმნან რძემჟავა, რომელიც რძის pH-ის დაწვეის და შედეგების ძირითად მიზეზს წარმოადგენს.

აციდოფიკაციური აქტივობის მიხედვით რძემჟავა ბაქტერიების შტამები იყოფა ორ ჯგუფად: მაღალი აქტივობის (რძეს ადედებენ 10-16 საათის განმავლობაში) და დაბალი აქტივობის (რძეს ადედებენ 17-24 საათის განმავლობაში) აციდოფიკატორები (მჟავაწარმომქმნელები) [4].

აციდოფიკაციური აქტივობას არსებითი როლი გააჩნია რძემჟავა პროდუქტების რეოლოგიური თვისებების (სტრუქტურისა და კონსისტენციის) ფორმირებაში. წარმოქმნილი რძემჟავა განაპირობებს კაზეინის მჟავურ კოაგულაციას და გელის

წარმოქმნის პროცესს ანუ რძის კოლოიდური სისტემის გადასვლას თავისუფალი დისპერსიული მდგომარეობიდან (ზოლიდან) ბმულ დისპერსიულში (გელში).

მჟავური კოაგულაციის არსი მდგომარეობს შემდეგში: დაგროვილი რძემჟავა ამცირებს კაზეინის მიცელების უარყოფით მუხტს რადგან  $H^+$ -იონები თრგუნავს კაზეინის კარბოქსილური და ფოსფორმჟავას ჰიდროქსილური ჯგუფების დისოციაციას. როდესაც რძის pH 4,6-4,9-ს მიაღწევს (კაზეინის იზოელექტრული წერტილი) ადგილი აქვს დადებითი და უარყოფითი მუხტების გათანაბრებას. კოლოიდურ მდგომარეობაში მყოფი კაზეინური მიცელები კარგავს სტაბილურობას, ვერ ანეიტრალებს მუხტებს და იწყებს კოაგულაციას, რის შედეგადაც რძე დედდება, გამოიყოფა შრატი.

კაზეინის უარყოფითი მუხტის შემცირების გარდა, მჟავური კოაგულაციის დროს ირღვევა კაზეინატ-კალციუმ-ფოსფატური კომპლექსის სტრუქტურა (მოსცილდება კალციუმის ფოსფატი და სტრუქტურის წარმოქმნელი კალციუმი). სტრუქტურაწარმოქმნელი კალციუმი და კალციუმის ფოსფატი წარმოადგენს ამ კომპლექსის მნიშვნელოვან სტრუქტურულ ელემენტს, მათი გადასვლა ხსნარში აგრეთვე აძლიერებს კაზეინის მიცელების დესტაბილიზაციას.

რძის შედედების პროცესზე შემდეგი ფაქტორები მოქმედებს: 1) ტემპერატურა – სხვადასხვა ტემპერატურაზე კაზეინის იზოელექტრული წერტილი შეიძლება შეიცვალოს: pH4,6-დან ( $20^{\circ}C$ -ზე) pH 5,6-მდე ( $40^{\circ}C$ -ზე) და 2) აციდოფიკაციის სიჩქარე, რომელიც ტექნოლოგიური, სანიტარული და ეკონომიკური თვალსაზრისით მეტად მნიშვნელოვან პარამეტრს წარმოადგენს. მისი რეგულირებით შესაძლებელი ხდება ამა თუ იმ პროდუქტის დამზადების პროცესის მართვა და სასურველი თვისებების მქონე პროდუქტების მიღება. თავის მხრივ ის პროცესები, რომლებიც ზემოქმედებს აციდოფიკაციის სიჩქარეზე დაკავშირებულია ლაქტოზის მეტაბოლიზმთან, ურეაზულ აქტივობასა და პროტეოლიზურ სისტემასთან [9, 10].

ლაქტოზის მეტაბოლიზმი. რძის ნახშირწყლებს შორის ძირითად კომპონენტს რძის შაქარი ანუ ლაქტოზა წარმოადგენს. მისი შემცველობა ძროხის რძეში საშუალოდ 4,6% (4,4-4,9%) შეადგენს. მიკროორგანიზმების მიერ წარმართული ლაქტოზის დუღილი კი რძემჟავა პროდუქტების მიღებისას წამყვან ბიოქიმიურ პროცესად გვევლინება. ამ

პროცესის სიჩქარე და მიმართულება განაპირობებს საბოლოო პროდუქტის კონსისტენციის, გემოს და არომატის ჩამოყალიბებას.

ლაქტოზის ფერმენტაციის შედეგად რძემჟავა ბაქტერიებმა შეიძლება წარმოქმნან რძემჟავის ორი ოპტიკური იზომერი: მარცხნივმბრუნავი D(-) და მარჯვნივმბრუნავი L(+), რაც განისაზღვრება მიკრობული ლაქტატდეჰიდროგენაზის ტიპით [10].

თერმოფილური სტრეპტოკოკების, ლაქტოკოკების, ბიფიდობაქტერიების უმეტესობა წარმოქმნის L(+) ლაქტატს; *L. bulgaricus* და ლეუკონოსტოკები ძირითადად D(-) ლაქტატს; *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* ორივე იზომერს (DL რაცემატს) წარმოქმნიან თანაბარი რაოდენობით [15].

L(+) ლაქტატი ადამიანის ნივთიერებათა ცვლის შუალედურ პროდუქტს წარმოადგენს, ამიტომ ადვილად გარდაიქმნება პიროყურძნის მჟავად, რომელიც იჟანგება CO<sub>2</sub> და H<sub>2</sub>O-მდე ან გამოიყენება გლიკოგენის სინთეზისათვის. D(-) ლაქტატი ზრდასრულ ორგანიზმში ძალიან ნელა იშლება, ხოლო ახალშობილებში მისი უტილიზაცია საერთოდ არ ხდება. ამიტომ რძემჟავა პროდუქტების (განსაკუთრებით ბავშვთა კვების პროდუქტების) წარმოებაში მიზანშეწონილია ისეთი შტამების შერჩევა, რომლებიც რძემჟავის L(+) ან DL(-) ფორმას წარმოქმნიან [10].

ფერმენტაციის საწყის ეტაპზე ლაქტოზა ფერმენტ β-გალაქტოზიდაზას (ლაქტაზას) ზემოქმედებით იშლება გლუკოზად და გალაქტოზად. დუღილის შემდგომი ეტაპები ძირითადად მიმდინარეობს გლუკოზის გლიკოლიზის ხარჯზე, რადგან გალაქტოზის ფერმენტაციის პროცესი, როგორც წესი, შეზღუდულია [10].

გლუკოზის ფერმენტაციის ტიპის მიხედვით ლაქტობაქტერიები იყოფა სამ ძირითად ჯგუფად:

1) ობლიგატური ჰომოფერმენტატორები (*Lactobacillus*-ის I ჯგუფი, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*) – გააჩნიათ ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატის დამშლელი ფერმენტი – ფრუქტოზო დიფოსფატ (FDP) ალდოლაზა, გლუკოზის დაშლის (ემბდენ-მეიერჰოფის გლიკოლიზური გზით) შედეგად, ძირითადად, წარმოქმნიან რძემჟავას. არ შეუძლიათ გლუკონის მჟავისა და პენტოზების ფერმენტაცია.

ჰომოფერმენტული დუღილის შედეგად მცირე რაოდენობით (10%) წარმოქმნება სხვა საბოლოო პროდუქტები, როგორცაა აქროლადი და არააქროლადი ორგანული

მჟავები, გლიცერინი, აცეტალდეჰიდი, სპირტები, აცეტონი, დიაცეტილი, CO<sub>2</sub>). ეს ნაერთები განაპირობებს პროდუქტისთვის დამახასიათებელი არომატის, გემოსა და კონსისტენციის ჩამოყალიბებას. დუღილის რეაქციის მიმართულება დამოკიდებულია კონკრეტულ პირობებზე (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>-ის თანაობა, pH, ტემპერატურა და ა.შ.).

2) ფაკულტატური ჰომოფერმენტატორები (*Lactobacillus*-ის II ჯგუფი) – გააჩნიათ C<sub>6</sub>-დეჰიდროგენაზები, შესაბამისად შესწევთ ნახშირწყლების ჰეტეროფერმენტატული გარდაქმნის უნარი, მაგრამ დუღილს ძირითადად ახორციელებენ ემბდენ-მეიერჰოფის გზით.

3) ობლიგატური ჰეტეროფერმენტატორები (*Lactobacillus*-ის III ჯგუფი *Leuconostoc*) – არ გააჩნიათ ალდოლაზა, მაგრამ გააჩნიათ გლუკოზა-6-ფოსფატის და 6-ფოსფოგლუკონის მჟავას დეჰიდროგენაზები; ჰექსოზების ფერმენტაცია ხდება ჰექსოზომონოფოსფატური შუნტის გზით, რის შედეგად წარმოქმნება რძემჟავა, CO<sub>2</sub>, აცეტატი ან ეთანოლი (შეფარდებით 1:1:1); პენტოზებს შლიან პენტოზო-ფოსფატური გზით, რძემჟავას, აცეტატის ან ეთანოლის (შეფარდებით 1:1) წარმოქმნით [15, 150].

გალაქტოზის ფერმენტაცია შეიძლება განხორციელდეს ლეილორის (*Leior*) გზით. ამ გზის პირველ საფეხურს წარმოადგენს ფოსფორილირების რეაქცია, რომელშიც ჩართულია სპეციფიკური გალაქტოკინაზები. კერძოდ, კი ფერმენტურიდინდიფოსფატგლუკოზას აქტივობა განაპირობებს გალაქტოზის გარდაქმნას გლუკოზო-1-ფოსფატად. უკანასკნელი განიცდის იზომერიზაციას, წარმოქმნება გლუკოზა-6-ფოსფატი, რომელიც ირთვება გლუკოზის გარდაქმნის ციკლში. გლუკოზა-6-ფოსფატის გარდაქმნა პიროყურძნის მჟავად მიმდინარეობს ემბდენ-მეიერჰოფ-პარნასის გზით. პიროყურძნის მჟავას შემდგომი გარდაქმნის რეაქციების მიმართულება განისაზღვრება სტარტერული მიკროორგანიზმების სპეციფიკით და გარემო პირობებით [9,86,150].

სტარტერული რძემჟავა ბაქტერიების უმეტესობას შესწევს ლაქტოზის დაშლის შედეგად წარმოქმნილი გალაქტოზის გარდაქმნის უნარი. აღსანიშნავია, რომ კვების მრეწველობაში ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი სახეობის *S. thermophilus*-ის შტამების უმეტესობას ეს უნარი არ გააჩნია [125]. როგორც წესი, *S. thermophilus*-ის შტამები ვერ ახდენს არა მარტო ლაქტოზის ჰიდროლიზის შედეგად გამოთავისუფლებული, არამედ

უჯრედში ტრანსპორტირებული თავისუფალი გალაქტოზის დეგრადაციას. მიუხედავად ამისა, ამ სახეობაში აღწერილი იყო ლეილორის გზის ფერმენტების გალაქტოკინაზას (*galK*), გალაქტოზ-1-ფოსფატურიდილტრანსფერაზას (*galT*), UDP-გლუკოზო-4-ეპიმერაზას (*galE*) გენები. ეს ქრომოსომული გენები გაერთიანებულია gal ოპერონის სახით, რომელიც განლაგებულია გალაქტოზ-მურატაზას (*galM*) გენის და lac ოპერონის წინ [183].

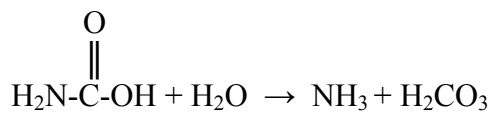
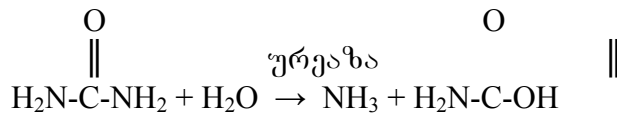
ლიტერატურული მონაცემების თანახმად Gal<sup>-</sup> ფენოტიპის არსებობა დაკავშირებულია *galK* გენის ინდექციის მექანიზმების დეფექტურობასთან. ვარაუდობენ, რომ გალაქტოკინაზა წარმოადგენს ლეილორის გზის მალიმიტირებელ ფერმენტს [58] (de Vos 1996). მოგვიანებით გამოთქმული იყო მოსაზრება, რომ გალაქტოზის გარდამქმნელი შტამების გამოყოფა შესაძლებელია შესაბამის სელექციურ პირობებში კულტივირებისას [93, 115, 172]. ვაილანკორტის მონაცემებით Gal<sup>-</sup> ნეგატიურ ფენოტიპი დაკავშირებულია გალაქტოზის ფოსფორილირების პროცესისთვის აუცილებელი ფერმენტის გალაქტოკინაზას გენის (*galK*) ექსპრესიის (და/ან ტრანსლაციის) შესუსტებასთან [175]. როგორც აღმოჩნდა, ექსპრესიის დაბალი დონე შეიძლება გამოწვეული იქნას *galK* პრომოტორული უბნის წერტილოვანი მუტაციით. ყველა ეს მოსაზრება საჭიროებს შემდგომ გამოკვლევას, რადგან გალაქტოზა-ნეგატიური ფენოტიპების განმაპირობებელი ფაქტორებისა და მექანიზმების დადგენით შესაძლებელი ხდება გალაქტოზის გარდამქმნელი სტაბილური შტამების მიღების ახალი სტრატეგიების შემუშავება. Gal<sup>+</sup> შტამების გამოყენებით შესაძლებელი ხდება აციდოფიკაციის პროცესის სიჩქარის გაზრდა, ამიტომ ასეთი შტამების გამოყენება რეკომენდირებულია სხვადასხვა რძემჟავა პროდუქტის (იოგურტი და მისი მსგავსი პროდუქტების) სტარტერების შესაქმნელად [183].

### 3.2 მიკროორგანიზმების ურეაზული აქტივობა

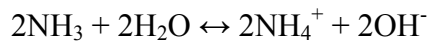
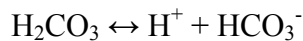
აციდოფიკაციურ აქტივობაზე უარყოფითად მოქმედ ფაქტორს სტარტერული კულტურების ურეაზული აქტივობა წარმოადგენს [121].

ურეაზული აქტივობა და მისი განმაპირობებელი გენეტიკური დეტერმინანტები კარგად არის შესწავლილი სამედიცინო თვალსაზრისით მნიშვნელოვან მიკრობულ სახეობებში, მაგრამ თითქმის შეუსწავლელია აგროალიმენტარულ სახეობებში.

ბაქტერიული ურეაზები (ურეა-ამიდოჰიდროლაზები E.C. 3.5.1.5). ეკუთვნის იზოფერმენტების ოჯახს, რომელიც ახდენს შარდოვანას ჰიდროლიზის რეაქციის კატალიზირებას:



წარმოქმნილი ნახშირმჟავასა და ამიაკის მოლეკულები ხსნარში გაწონასწორებულია დეპროტონირებულ და პროტონირებულ ფორმებთან. შარდოვანას ჰიდროლიზის ჯამურ შედეგს წარმოადგენს არის pH-ის ზრდა.



გამოკვლევების შედეგად დადგენილი იყო ურეაზას სტრუქტურა და შესწავლილი იყო ამ ფერმენტის კატალიზური საიტი. გაირკვა, რომ ბაქტერიული ურეაზები 200000-250000 Da მოლეკულური მასის მქონე ჰეტეროპოლიმერებია. მათი უმეტესობა წარმოადგენს ტრიმერს (αβγ)<sub>3</sub>. ურეაზული სახეობების უმეტესობაში ურეაზას თითოეული მონომერის აქტიური ცენტრი დაკავშირებულია ორ Ni<sup>2+</sup> იონთან. დაკავშირებული Ni<sup>2+</sup> იონების რაოდენობის მიხედვით, ბაქტერიული ურეაზები შეიძლება პირობითად 2 ჯგუფად დაიყოს. პირველი ჯგუფის (მაგ., *Klebsiella aerogenes*) ფერმენტების აქტიური ცენტრი შეიცავს Ni<sup>2+</sup> ორ იონს, მეორე ჯგუფის წარმომადგენლების (მაგ., *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus xylosus* და სხვ.) კი მხოლოდ ერთს.

ბაქტერიული ურეაზები უჯრედშიდა ფერმენტებია. უმეტესობა განიცდის ინაქტივაციას pH<5-ზე, pH-ის ოპტიმალური მაჩვენებელი უახლოვდება ნეიტრალურს. ურეაზების ფერმენტული კატალიზის კინეტიკა ეყრდნობა მიხაელის-მენტენის განტოლების პრინციპს.

ბაქტერიული ურეაზები ძირითადად დეტერმინირებულია ქრომოსომაში განლაგებული გენებით. პლაზმიდური ლოკალიზაციის ურეაზული გენების მქონე სახეობებში აღსანიშნავია *E. coli* და *E. faecium*.

იდენტიფიცირებული იყო ერთიანი გენეტიკური ლოკუსი, რომელიც შეიცავს არა მარტო აპოენზიმის (Apo-Ure)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  სუბერთეულების სინთეზზე პასუხისმგებელ სტრუქტურულ გენებს (*ureC*, *ureB*, *ureA*), არამედ აპოენზიმის აქტივაციის პროცესებისათვის საჭირო ცილების დამხმარე გენებს (*ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH*, *ureD*).

დადგენილი იყო, რომ *in vivo* ურეაზას აქტიური ფორმის მისაღებად საჭიროა  $\text{Ni}^{2+}$  ექვსი იონის,  $\text{CO}_2$  და დამხმარე (UreD, UreF, UreG, UreE, UreH) ცილების არსებობა. UreD მოქმედებს როგორც ურეაზა-სპეციფიკური “chaperon” პროტეინი, უკავშირდება Apo-URE და ქმნის Apo-URE-D კომპლექსს. უკანასკნელი ურთიერთქმედებს UreF და UreG-სთან. ვარაუდობენ, რომ ეს დამხმარე ცილები უზრუნველყოფს  $\text{CO}_2$ -ის მოლეკულების დაკავშირებას, რის შედეგად აპოენზიმის აქტიურ საიტი  $\text{Ni}^{2+}$  დაკავშირებისათვის კომპეტენტური ხდება.

UreE ცილა ჩართულია ნიკელის იონების ციტოპლაზმაში ტრანსპორტირების პროცესში. ის ასრულებს ნიკელის დონორის ფუნქციას, უკავშირდება Apo-URE-D-F-G აგრეგატს და განაპირობებს  $\text{Ni}^{2+}$  იონების დაკავშირებას აპოენზიმის აქტიურ ცენტრთან. ციტოპლაზმური მემბრანის გავლით უჯრედში ნიკელის შეღწევას სავარაუდოდ ხელს უწყობს დამხმარე UreH ცილა. Apo-URE გააქტიურების შემდეგ დამხმარე ცილები მოწყდება ფერმენტის მოლეკულას და ურთიერთქმედებს აპოენზიმის ახალ მოლეკულასთან [127].

ურეაზების გენების ექსპრესია რეგულირდება სხვადასხვა მექანიზმებით. ზოგიერთ სახეობაში (მაგ., *Bacillus pasteurii*, *Mirganella morgani*) გვხვდება კონსტიტუციური ფერმენტები. ბაქტერიული ურეაზების უმეტესობა ინდუცირებადია. *Klebsiella sp.* და *Pseudomonas aeruginosa*-თვის დამახასიათებელია ტრანსკრიპციის ნეგატიური კონტროლი. ურეაზების ბიოსინთეზი ითრგუნება გარემოში ასიმილაციისათვის ადვილად გამოსაყენებადი აზოტის წყაროს (მაგ. ამიაკის) თანაობისას [45,72,97].

პოზიტიური კონტროლი ძირითადად დამახასიათებელია პლაზმიდებზე განთავსებული ურეაზული გენების მქონე მიკროორგანიზმებისათვის. ასეთ შემთხვევაში გენთა ექსპრესიის ინდუცირების მიზნებს შარდოვანა წარმოადგენს.

*S. salivarius*-ის მაგალითზე აღწერილი იყო ურეაზების ექსპრესიის კონტროლის მესამე ტიპი, რომელიც დამოკიდებულია არეს pH-ზე, კერძოდ, ამ სახეობის ბუნებრივი ეკოსისტემის (პირის ღრუ) მჟავიანობის დონეზე [39].

ურეაზული აქტივობა ძირითადად დამახასიათებელია პათოგენური მიკროორგანიზმებისათვის (მაგ., *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Streptococcus salivarius*, გვ. *Bacillus* ზოგიერთი სახეობა) და წარმოადგენს პათოგენურობის ერთ-ერთ ფაქტორს [127].

არაპათოგენური ბაქტერიებისთვის ურეაზების მნიშვნელობა გამოიხატება იმაში, რომ შარდოვანას ჰიდროლიზის შედეგად გამოთავისუფლებული  $\text{NH}_3$  ასიმილაციისთვის საჭირო აზოტის წყაროს წარმოადგენს [63].

სტარტერულ ლაქტობაქტერიებს შორის ურეაზული აქტივობა დამახასიათებელია მხოლოდ *S. thermophilus*-სთვის. აღსანიშნავია, რომ ურეაზული აქტივობა დამახასიათებელია *S. thermophilus*-ის შტამების უმეტესობისათვის [173]. ნაჩვენები იყო, რომ *S. thermophilus*-ის ურეაზული გენების კლასტერი *S. salivarius*-ის კლასტერის ჰომოლოგიურია. იოგურტის სტარტერული კულტურების მაგალითზე დამტკიცებული იყო, რომ აციდოფიკაციის დონე უფრო მაღალია იმ შემთხვევაში, როდესაც *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*-თან ერთად კო-სტარტერულ კულტურის სახით გამოყენებული იყო *S. thermophilus*-ის არა ველური ტიპის  $\text{Ure}^+$ , არამედ  $\text{Ure}^-$  მუტანტური შტამები [131].

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად ურეაზა-ნეგატიური ფენოტიპის მქონე შტამების არსებობა დაკავშირებულია  $\alpha$  სუბერთეულის სინთეზის პასუხისმგებელი *ureC* გენის სტრუქტურულ ცვლილებებთან. მონეს (2004) მიერ ნაჩვენები იყო, რომ ურეაზა-უარყოფითი შტამების მიღება ადვილად შესაძლებელია N-მეთილ-N'-ნიტრო-N-ნიტროზოგუანინდინით გამოწვეული სპონტანური მუტაციით. საკვებისეული წარმოშობის *D. S. thermophilus* DDSM 20617<sup>T</sup> შტამის  $\text{Ure}^-$  ფენოტიპი განპირობებულია *ureC* გენის 693 bp მონაკვეთის დელეციით [129, 131].



შარდოვანას კონცენტრაცია ძროხის რძეში მერყეობს 0,2-0,4 გ/ლ ფარგლებში, რაც დამოკიდებულია ჯიშზე, ლაქტაციის სტადიასა და კვების რაციონზე. რძის შედედებისას *S. thermophilus* ურეალიზური შტამების გამოყენება იწვევს შარდოვანას ჰიდროლიზს, რაც თავის მხრივ განაპირობებს რძის pH-ის გაზრდას და აციდოფიკაციის პროცესის შენელებას. აციდოფიკაციის შენელების დონე დამოკიდებულია რძეში შარდოვანას კონცენტრაციაზე, შტამსა და კულტურის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე.

ურეაზული აქტივობის უარყოფითი ზეგავლენა რძის პროდუქტების დამზადების პროცესზე არაერთხელ იყო ნაჩვენები იოგურტისა და სხვადასხვა ტიპის ყველის მაგალითზე. გაირკვა, რომ შენელებული აციდოფიკაცია იწვევს ფერმენტაციისათვის საჭირო დროის გაზრდას და რძემჟავა პროდუქტების ტექნოლოგიური პროცესების დაყოვნებას, რაც თავისთავად მოქმედებს საბოლოო პროდუქტის ხარისხზე და ქმნის გარკვეულ ეკონომიკურ სირთულეებს. გარდა ამისა, ურეაზული აქტივობა დამოკიდებულია რძეში შარდოვანას პროცენტულ შემცველობაზე, რაც განაპირობებს ფერმენტაციის პროცესების სტანდარტიზაციასთან დაკავშირებულ პრობლემებს. ყველა ამ ფაქტის გათვალისწინებით რძემჟავა პროდუქტების სტარტერების შესაქმნელად უპირატესობა ეძლევა ურეაზა-ნეგატიურ ან სუსტი აქტივობის მქონე შტამებს [121, 161, 195].

### 3.3 რძემჟავა ბაქტერიების პროტეოლიზური, პეპტიდაზური და აუტოლიზური აქტივობა როგორც სასელექციო კრიტერიუმი

სტარტერული კულტურების მეორე მნიშვნელოვან ფენოტიპურ თვისებას პროტეოლიზური აქტივობა წარმოადგენს. მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის შტამებს სპეციალურად არჩევენ მთელი რიგი რძემჟავა პროდუქტების დედობის შესაქმნელად (ყველი, კულტივირებული კარაქი). ამ აქტივობას განსაკუთრებით დიდი ყურადღება ყველის “მომწიფების” პროცესში ენიჭება [124].

პროტეოლიზი – ცილების დაშლის რთული პროცესია, რომელიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს სხვადასხვა რძემჟავა პროდუქტების გემოს, არომატისა და

სტრუქტურის ფორმირების პროცესში. ცილების დაშლის პროდუქტები – სხვადასხვა მოლეკულური მასის მქონე პეპტიდები და ამინომჟავები - გროვდება რძემჟავა პროდუქტებში და განიცდის შემდგომ გარდაქმნას ორგანულ მჟავებად, ალდეჰიდებად, ამინებად ან სხვა ნაერთებად, რომლებიც ხასიათდება მკაფიოდ გამოხატული გემოვნებითი თვისებებით. ცილების და ამინომჟავების დაშლას რძემჟავა ბაქტერიების ფერმენტების ზემოქმედებით, დადებითი მნიშვნელობა გააჩნია, რადგან პროდუქტი მდიდრდება წყალში ხსნადი აზოტოვანი და არააზოტოვანი ნაერთებით. მზა პროდუქტი იძენს საჭირო კონსისტენციას, დამახასიათებელ გემოსა და არომატს და ადამიანის კუჭ-ნაწლავის ტრაქტისათვის ადვილად მონელებადი ხდება. არასასურველი არასტარტერული მიკროფლორით გამოწვეული რძის ცილების ღრმა დაშლისაგან განსხვავებით რძემჟავა ბაქტერიებს ახასიათებს უფრო სპეციფიკური ნაზი პროტეოლიზი, რომლის შედეგად იზრდება რძის პროდუქტის ბიოლოგიური ღირებულება და გემოვნებითი თვისებები.

რძეში არსებული ცილების 80% მოდის კაზეინზე, რომელიც წარმოდგენილია სპეციფიკური ნაწილაკების - მიცელების სახით. მიცელები წარმოადგენს კაზეინის ფრაქციების რთულ კომპლექსებს კალციუმის კოლოიდურ ფოსფატთან. აარჩევენ კაზეინის 4 განსხვავებული ფრაქციას:  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - და  $\kappa$ -კაზეინი. რძემჟავა ჩხირების და სტრუქტოკოკების შემცველი კომბინირებული დედოს გამოყენების დროს კაზეინის ჰიდროლიზი შეინიშნება კულტივირების პირველივე საათებში [9,10].

რძემჟავა ბაქტერიები აუქსოტროფული ორგანიზმებია, რომელიც ზრდა-განვითარებისთვის საჭიროებს ამინომჟავების გარკვეულ ნაკრებს (8-16 ამინომჟავა). ამიტომ, რძემჟავა ბაქტერიების რძეში აქტიური გამრავლების უნარი დაკავშირებულია მათი პროტეოლიზური სისტემის ეფექტურობასთან. დადგენილი იყო, რომ ლაბორატორიულ პირობებში რძეში კულტივირებისას მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის მქონე შტამები ხანგრძლივი დროის განმავლობაში ინარჩუნებენ სიცოცხლისუნარიანობას [4].

ლაქტობაქტერიები ძირითადად ცილოვანი ფრაგმენტების ჰიდროლიზს ახდენს, მაგრამ აგრეთვე შერჩევითად მოქმედებს ნატიური კაზეინის ფრაქციებზეც. სახეობათა უმრავლესობაში პროტეინაზები უფრო ადვილად შლის  $\alpha$ -კაზეინს, ზოგიერთი

ძირითადად ახდენს  $\beta$ -კაზეინის ჰიდროლიზს, სხვა კი ერთნაირი სიჩქარით მოქმედებს როგორც  $\alpha$  ასევე  $\beta$  კაზეინზე [9].

პროტეოლიზი იწყება და აქტიურად მიმდინარეობს კულტურების ექსპონენციალური ზრდის ფაზაში, როდესაც უჯრედების რაოდენობა არეში მაქსიმალურია. ეს იმაზე მეტყველებს, რომ ცილის ჰიდროლიზს ძირითადად ახდენს ცოცხალი უჯრედების მიერ გამოყოფილი ფერმენტები [4].

განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს რძემჟავა ბაქტერიების კაზეინოლიზური აქტივობის შესწავლა. კაზეინის დაშლის საბოლოო პროდუქტების მიხედვით ახდენენ რძემჟავა ბაქტერიების დიფერენცირებას. სტრეპტოკოკები ცილებს შლის პეპტიდებამდე, ჩხირები ათავისუფლებს ამინომჟავების დიდ რაოდენობას [5].

პროტეოლიზური აქტივობა წარმოადგენს სახეობა-სპეციფიურს და ასევე შტამ-სპეციფიურ ნიშან-თვისებას. სტრეპტოკოკებთან შედარებით, რძემჟავა ჩხირებს ახასიათებს კაზეინის ჰიდროლიზის უფრო მაღალი დონე (ლაქტობაცილებს ხსნად ფორმაში გადაყავს კაზეინის 25-30%, კოკებს – 15-17%). ლაქტობაცილებს შორის მაღალი პროტეოლიზური აქტივობით ხასიათდება *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilum*, *L. helveticum*; კოკებში კი – *L. lactis*, *L. cremoris*.

აღსანიშნავია, რომ რძის პროდუქტების დამზადებისას, როგორც წესი, იყენებენ სხვადასხვა სახეობის და შტამის კომბინაციას. კულტურათა კომბინაციის ჯამურ პროტეოლიზურ აქტივობას განსაზღვრავს ამ კულტურებს შორის არსებული ურთიერთქმედების ხასიათი. მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის მქონე კულტურებით დაბალი აქტივობის კულტურების სტიმულირებას ახდენენ, რის შედეგად ჰიდროლიზის საერთო დონე იზრდება. ამასთანავე, ერთდროული გამრავლების დასაწყისში თავისუფალი ამინომჟავების რაოდენობა ხშირად არ იცვლება, რადგან ერთ-ერთი კულტურა იწყებს მათ აქტიურ მონელებას.

მიკროორგანიზმთა სიმბიოზური ურთიერთქმედება დაფუძნებულია მათ უნარზე უზრუნველყონ ერთმანეთის ზრდა-განვითარებისათვის საჭირო ნაერთების (ზოგიერთი ამინომჟავა, ვიტამინები) წარმოქმნა, მაგალითად, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* წარმოქმნის ამინომჟავა ვალინს, გლიცინს, ჰისტიდინს, რომელიც *S. thermophilus*-ის ზრდის სტიმულირებას ახდენს.

პროტეოლიზური აქტივობის შესწავლას დიდი პრაქტიკული მნიშვნელობა გააჩნია. პირველ რიგში იმიტომ, რომ მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის მქონე შტამებისგან შემდგარი სტარტერების გამოყენება ხელს უწყობს რძემჟავა პროდუქტების მიღების დაჩქარებას; მეორე მხრივ, პროტეოლიზის შედეგად გამოთავისუფლებული პეპტიდები და ამინომჟავები მნიშვნელოვნად ზემოქმედებს პროდუქტის ორგანოლეპტურ თვისებებზე.

პროტეოლიზის შედეგად რძემჟავა ბაქტერიების უმეტესობა იწვევს რძეში გლუტამინის მჟავას და პროლინის დაგროვებას. ამ დომინანტური ამინომჟავების გარდა, ზოგიერთი სახეობა და შტამი განაპირობებს ასპარაგინის მჟავას, ალანინის, ლეიცინის, ლიზინის და სხვათა დაგროვებას. ზოგიერთ მათგანს აქვს მკაფიოდ გამოხატული გემო, მაგ., გლიცინი, პროლინი, ალანინი, სერინი საბოლოო პროდუქტს ანიჭებს მოტკბო გემოს; არგინინი, ჰისტიდინი, ტრიპტოფანი და ლეიცინი – მწარეს; ვალინი, თრეონინი, ფენილალანინი - მოტკბო-მომწაროს; გლუტამინის და ასპარაგინის მჟავა – მჟავეს; ცისტინი და მეთიონინი - ლაყე კვერცხის გემოს. გარდა ამისა, რძემჟავა პროდუქტების ორგანოლეპტიკურ თვისებებზე ძლიერ ზეგავლენას ახდენს, თავისუფალი ამინომჟავების შემდგომი გარდაქმნის (დეზამინირების, გადაამინირების, დეკარბოქსილირების), პროდუქტები – ორგანული მჟავები, ალდეჰიდები, ამინები და სხვ.

პროტეოლიზური აქტივობის ხარისხი განისაზღვრება არეში დაგროვილი კაზეინის ჰიდროლიზის შედეგად გამოთავისუფლებული საერთო ხსნადი, ცილოვანი და არაცილოვანი აზოტის და თავისუფალი ამინომჟავების მიხედვით.

პროტეოლიზური აქტივობა დამოკიდებულია არის ქიმიურ შემადგენლობაზე, pH-ზე, კულტივირების ტემპერატურასა და სხვა ფაქტორებზე.

რძემჟავა სტრეპტოკოკების პროტეინაზების მოქმედების ოპტიმუმს წარმოადგენს pH 6-7.5, ჩხირების პროტეინაზების - pH-5,7-6. pH 5-ზე პროტეოლიზის ინტენსივობა მცირდება 50 %-მდე. შესაბამისად, რძემჟავა პროდუქტების მომწიფების პროცესში იქმნება პროტეოლიზური ფერმენტების მოქმედებისათვის (განსაკუთრებით რძემჟავა სტრეპტოკოკების პროტეინაზებისათვის) არახელსაყრელი პირობები [9,10].

რძემჟავა ბაქტერიების პროტეოლიზური სისტემის კომპონენტები ფუნქციის მიხედვით 4 ჯგუფად იყოფა:

- ზედაპირული, უჯრედული კედლის პროტეინაზები - CEP (cell envelope protease);
- ციტოპლაზმური მემბრანის პეპტიდაზები;
- შიდაუჯრედული ანუ ციტოპლაზმური პეპტიდაზები;
- პეპტიდების და ამინომჟავების სატრანსპორტო სისტემა.

უჯრედული კედლის პროტეინაზების მოქმედების შედეგად წარმოქმნილი პეპტიდები მემბრანის გავლით გადადის უჯრედში. იმ შემთხვევაში, თუ ეს პეპტიდები საკმარისად მოკლეა, მათი გადატანა უჯრედის შიგნით ციტოპლაზმური მემბრანის ოლიგოპეპტიდების სატრანსპორტო სისტემის კომპონენტების მეშვეობით ხდება. წინააღმდეგ შემთხვევაში მემბრანული პეპტიდაზები ახდენს მათ ჰიდროლიზს, წარმოიქმნება ძალიან მოკლე პეპტიდები და თავისუფალი ამინომჟავები, რომლებიც აგრეთვე ტრანსპორტირდება უჯრედში. უჯრედის შიგნით პეპტიდების დაშლის პროცესს აგრძელებენ ენდო-, ამინო- და კარბოქსი-პეპტიდაზები. ამ ფერმენტებს განსაკუთრებით დიდი ყურადღება ენიჭება ყველის დამზადების პროცესში, რადგან უჯრედის სიკვდილის (აუტოლიზის) შედეგად ეს პეპტიდაზები გადადის არეში და დომინანტურ როლს ასრულებს საბოლოო პროდუქტის მომწიფების პროცესში [106].

რძემჟავა პროდუქტების წარმოების პროცესში განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია CEP-ბი, რადგან მხოლოდ ამ პროტეინაზებს შესწევს კაზეინის საწყისი დეგრადაციის უნარი.

რძემჟავა ბაქტერიების CEP წარმოადგენს სერინპროტეინაზებს, რომელიც ეკუთვნის სუბტილიზინის მსგავს სერინპროტეინაზების - სუბტილაზების ოჯახს. ეს არის მაღალკონსერვატული კატალიზური საიტის მქონე, მულტიდომენური პროტეინები. მათი აქტივობის ოპტიმუმი ვლინდება 30-37°C pH 7-7,5-ზე, მაგრამ აქტივობას ინარჩუნებენ უფრო დაბალ ტემპერატურასა და pH 5-5.5 –ზე [66].

ყველაზე კარგად შესწავლილია *L. lactis ssp. cremoris* CEP-ბი. მათ მიერ წარმოქმნილი პროტეინაზები წარმოადგენს 180-190 kDa მოლეკულური მასის მქონე მონომერულ ფერმენტებს. CEP-ს გააჩნია კატალიზური დომენის შემცველი N-

ტერმინალური უბანი და გრძელი C-ტერმინალური უბანი, რომლითაც ეს პროტეინაზები უკავშირდება უჯრედულ კედელს. C-ტერმინალურ უბანში განლაგებულია B დომენი, რომელიც შეიცავს  $Ca^{2+}$  იონების დამაკავშირებელ და აუტოპროტეოლიზურ საიტებს.

*L. lactis ssp. cremoris* მაგალითზე ნაჩვენებია იყო, რომ კატალიზურად აქტიური CEP პროდუცირება დამოკიდებულია არეში  $Ca^{2+}$  იონების არსებობაზე. ეს შეიძლება აიხსნას იმით, რომ  $Ca^{2+}$ -ის თანაობისას უჯრედული კედლის პროტეინაზები იძენს აქტიურ კონფორმაციას და ინარჩუნებს თერმოსტაბილურობას [64].

$Ca^{2+}$ -ის იონები CEP-ს იცავს უჯრედთან არსებული კავშირის დაკარგვისაგან.  $Ca^{2+}$ -ის ნაკლებობის დროს პროტეინაზები კარგავს კალციუმს, განიცდის კონფორმაციულ ცვლილებას, ხდება მგრძობიარე აუტოპროტეოლიზის მიმართ და მოწყდება უჯრედს. კონფორმაციული ცვლილება აგრეთვე განაპირობებს თერმული მდგრადობის დაქვეითებას (მაგ., 25°C-ზე, pH 6.5-ზე CEP მთლიანად კარგავს აქტიურობას) [64,77].

“სამიზნე” კაზეინის ტიპის მიხედვით არჩევენ ლაქტოკოკების პროტეინაზების 2 კლასს: PI და PIII. PI პროტეინაზა გამოყოფილი იყო *L. lactis ssp. cremoris* Wg2, HP, H2 შტამებიდან. PI ტიპის პროტეინაზების პირველად სუბსტრატს წარმოადგენს β-კაზეინი, მეორადს κ-კაზეინი. PIII დამახასიათებელია *L. lactis ssp. cremoris* SK11, AM1, AC1 და NCD0763 შტამებისათვის. PIII ძირითადად α<sub>s1</sub>-კაზეინს, მცირე რაოდენობით კი β- და κ-კაზეინს შლის. L ლაქტოკოკების პროტეინაზების განმსაზღვრელი გენები განლაგებულია ლაქტოზის უტილიზაციისათვის საჭირო გენების მატარებელ პლაზმიდებზე [66,105].

რძემჟავა ჩხირების პროტეინაზები შესწავლილი იყო *L. casei ssp. casei* HN1, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* CNRZ397 და *L. helveticus* CP790 შტამების მაგალითზე. *L. casei* შტამებიდან გამოყოფილ PrtP პროტეინაზებს აქვს ლაქტოკოკების PI პროტეინაზას მოქმედების ტიპი – შლის მხოლოდ β-კაზეინს. PrtP-ს მოლეკულური მასა უდრის 180 kDa, ოპტიმალურ pH-ს წარმოადგენს 6.5. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*-ის PrtB პროტეინაზები (170 kDa) ახდენს α<sub>s1</sub> – და β-კაზეინის ჰიდროლიზს, ოპტიმალური pH 5.5 უდრის. *L. helveticus* CP790-ში იდენტიფიცირებული იყო 45 kDa, ხოლო L89 შტამში 180 kDa მასის მქონე PrtH პროტეინაზები (ოპტიმალური

pH 6,5 და 7,0 შესაბამისად). ორივე ტიპის პროტეინაზები ახდენს  $\alpha_1$  – და  $\beta$ -კაზეინის დეგრადაციას [109, 193].

*L. helveticus* ანტიჰიპერთენზიური პეპტიდის მაგალითზე ნაჩვენებია იყო, რომ CEP შეიძლება იყოს ჩართული ბიოაქტიური პეპტიდების ფორმირების პროცესში რაც მიუთითებს იმაზე, რომ უჯრედული კედლის პროტეინაზების პროდუცენტი ლაქტობაქტერიების შტამები შეიძლება გამოყენებულ იქნას ჯანმრთელობისთვის სასარგებლო თვისებების მქონე პროდუქტების დასამზადებლად [66, 119].

მიუხედავად იმისა, რომ *S. thermophilus*-ის შტამები ფართოდ გამოიყენება რძემჟავა პროდუქტების წარმოებაში, მათ CEP შესახებ მცირე ინფორმაცია არსებობს. ამ სახეობის შტამების უმეტესობას CEP-ის სინთეზის უნარი არ შესწევს ან CEP-ის პროდუქციის დაბალი დონე ახასიათებს [129].

ბოლო წლებში იდენტიფიცირებული იყო *S. thermophilus*-ის უჯრედულ კედელთან ასოცირებული PrtS პროტეინაზა. აღმოჩნდა, რომ PrtS პროტეინაზა ავლენს მაქსიმალურ აქტივობას 37°C და pH 5,5-5,8-ზე. მისი მოლეკულური მასა უდრის 153 kDa. სხვა რძემჟავა ბაქტერიებისაგან განსხვავებით ეს პროტეინაზა უჯრედულ კედელთან კოვალენტურად არის დაკავშირებული. *S. thermophilus*-ის PrtS პროტეინაზა ახდენს როგორც [<sup>14</sup>C] კაზეინის, ასევე  $\beta$ - და  $\alpha_1$ -კაზეინის დეგრადაციას. ამინომჟავური შემადგენლობის შესწავლის შედეგად გამოვლენილი იყო, რომ სხვა რძემჟავა ბაქტერიების CEP-ისგან განსხვავებით PrtS არ გააჩნია B დომენი. მიუხედავად ამისა, PrtS აქტივობა მკვეთრად იზრდება CaCl<sub>2</sub>-ის დამატებით. როგორც დადგინდა თერმოფილური სტრეპტოკოკების PrtS-ის სტაბილური აქტივობისათვის ხელშემწყობ ფაქტორს Ca<sup>2+</sup> იონები და NaCl-ის მაღალი (7%) კონცენტრაცია წარმოადგენს, რაც *S. thermophilus*-ის რძემჟავა პროდუქტებში არსებულ პირობებთან ადაპტაციასთან არის დაკავშირებული.

სხვა სუბტილაზების მსგავსად, სტრეპტოკოკების PrtS სინთეზის საწყის პროდუქტს წარმოადგენს პრეპროენზიმი, რომლის მომწიფებისთვის საჭიროა ლიპოპროტეინის (PrtM) არსებობა. ლაქტოკოკებში და ლაქტობაცილებში ამ ცილის განმსაზღვრელი გენი განლაგებულია *prtP*-ის გენის მარცხნივ. *S. thermophilus*-ის შტამებში PrtM ცილის მაკოდირებელი გენი აღმოჩენილი არ იყო [66].

**რძემჟავა ბაქტერიების პეპტიდაზები.** როგორც უკვე აღვნიშნეთ, კაზეინის ჰიდროლიზის შედეგად წარმოქმნილი პეპტიდები განიცდის შემდგომ გარდაქმნას. ამ გარდაქმნაში ჩართულია სხვადასხვა ტიპის უჯრედშიდა პეპტიდაზებით წარმოდგენილი რთული პეპტიდაზური სისტემა.

დღესდღეობით ბიოქიმიურად და გენეტიკურად დახასიათებულია რძემჟავა ბაქტერიების სხვადასხვა სახეობის 20-მდე პეპტიდაზა. ბაქტერიული პეპტიდაზების კლასში გაერთიანებულია ცისტეინ-, მეტალო- და სერინ-პეპტიდაზები. პეპტიდაზების კლასიფიკაციას ახდენენ “სამიზნე” სინთეზური პეპტიდური სუბსტრატების მიხედვით [43].

#### **ზოგადი ამინოპეპტიდაზები - PepN და PepC.**

PepN გამოყოფილი იყო *L. lactis ssp. cremoris*, *L. casei ssp. casei*, *L. delbrueckii ssp. lactis* და *ssp. bulgaricus*, *L. helveticus* შტამებიდან. ეს უჯრედშიდა ამინოპეპტიდაზა წარმოდგენილია მონომერული მოლეკულით. PepN აქტივობა მაქსიმუმს აღწევს ნეიტრალურ ან ნეიტრალურთან ახლო pH-ზე, მოლეკულური მასა ~ 95kDa-ია. პეპტიდების ჰიდროლიზის შედეგად PepN ამინოპეპტიდაზა ათავისუფლებს ჰიდროფობულ ამინომჟავებს Leu, Ala, Phe, ფუძე ამინომჟავებს Lys, Arg. განსაკუთრებულ აქტივობას ავლენს Met- და Phe-pNA მიმართ, მაშინ როდესაც აქტიური არ არის Asp-,Glu-,Gly-pNA მიმართ [84].

PepC გამოყოფილი იყო *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *S. thermophilus* შტამებიდან. ეს ჰექსომერული ენდოგენური ფერმენტი (300 kDa) აქტიურად შლის ფუძე (Arg, His, Lys) და მჟავე (Glu, Asp) ამინომჟავების შემცველ პეპტიდებს, ოპტიმალური pH არის 7. PepC თავისთავად და აგრეთვე PepN ერთად მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ე.წ. ”მწარე” პეპტიდების დაშლაში, მაგრამ არცერთი მათგანი ვერ ახდენს პროლინის შემცველი სუბსტრატების ჰიდროლიზს [65].

#### **სპეციფიკური აქტივობის ამინოპეპტიდაზები.**



PepA (გლუტამილამინოპეპტიდაზა), რომელიც გამოყოფილი იყო *S. thermophilus* და *L. lactis* შტამებიდან, წარმოდგენილია ტრიმერის ან ჰექსომერის სახით. მას გააჩნია აქტივობის ვიწრო სპექტრი, რომელიც შემოიფარგლება N-ტერმინალური Glu და Asp შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზით. PepA აგრეთვე დი- და დეკა-პეპტიდების ჰიდროლიზის უნარი შესწევს [107].

კაზეინში შემავალ ამინომჟავებს შორის ყველაზე ხშირ კომპონენტს პროლინს წარმოადგენს. ზოგადი ამინოპეპტიდაზები ამ ამინომჟავას შემცველი სუბსტრატების მიმართ დაბალ ჰიდროლიზურ აქტივობას ავლენს. პროლინის შემცველი პეპტიდების დაშლას ახდენს სპეციფიკური PepX და PepI პეპტიდაზები.

PepX (პროლილდიპეპტიდილამინოპეპტიდაზა) გამოყოფილი იყო *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. lactis* და *S. thermophilus* შტამებიდან. PepX ათავისუფლებს N-ტერმინალურ ბოლოში მყოფ Xaa-Pro ტიპის დიპეპტიდებს. გამოთავისუფლებული დიპეპტიდები, როგორც წესი, შეიცავს ფუძე Arg-, His-, Lis- ან/და არომატულ Phe-, Tyr- ამინომჟავებს. PepX აგრეთვე Pro-Pro-(Xaa)<sub>n</sub> ტიპის სუბსტრატების ჰიდროლიზის უნარი შესწევს, მაგრამ ეს ფერმენტი არ არის აქტიური Xaa-Pro სუბსტრატების მიმართ (გარდა იმ შემთხვევისა როცა Xaa-პროლინია).

*L. delbrueckii*, *L. helveticus* შტამებიდან გამოყოფილია პროლინამინოპეპტიდაზა PepI, რომელიც ჰიდროლიზურ აქტივობას ავლენს Pro-Xaa სუბსტრატების მიმართ, იმ შემთხვევაში, თუ C-ტერმინალურ ბოლოში გვხვდება ჰიდროფობული -Ala, -Gly, -Ile, -Leu, -Val, მჟავე -Glu და არომატული -Phe, -Tyr ამინომჟავები. გარდა ამისა ეს ფერმენტი ტრიპეპტიდებიდან ათავისუფლებს N-ტერმინალურ პროლინს, მაგრამ ვერ შლის ტეტრა და პენტაპეპტიდებს [43].

დიპეპტიდაზებს შორის შესწავლილი იყო PepD და მისი მსგავსი PepV პეპტიდაზა. PepD, რომელიც დამახასიათებელია *L. helveticus*-ის შტამებისთვის, Val-Xaa, Ile-Xaa გარდა ყველა ტიპის დიპეპტიდების ჰიდროლიზს ახდენს. PepV დამახასიათებელია *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. sake*, *L. lactis* და *L. helveticus*-თვის. ეს დიპეპტიდაზა ახდენს N-ტერმინალურ -Gly შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზს [190].

რემჟავა ბაქტერიების ამინოპეპტიდაზებს შორის აგრეთვე უნდა აღინიშნოს ტრიპეპტიდაზები (PepT) და ენდოპეპტიდაზები (PepE, PepF, PepG, PepO) [107].

რძემჟავა ბაქტერიების აუტოლიზური აქტივობა. აუტოლიზი ბაქტერიული უჯრედის სპონტანურ დეზინტეგრაციას წარმოადგენს. დეზინტეგრაციის პროცესში მონაწილეობს რძემჟავა ბაქტერიების რთული აუტოლიზური სისტემა, რომელიც წარმოდგენილია ე.წ. აუტოლიზინების - პეპტიდოგლიკანჰიდროლაზების ჯგუფის ფერმენტებით: N-აცეტილმურამიდაზებით (ლიზოციმები), N-აცეტილგლუკოზამინიდაზებით, N-აცეტილმურამილ-L-ალანინამიდაზებით, ენდოპეპტიდაზებით და ტრანსგლიკოზიდაზებით [176].

პეპტიდოგლიკანჰიდროლაზები მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ როლს ასრულებს ბაქტერიული კულტურის განვითარების სხვადასხვა ფაზაში. ისინი არეგულირებს უჯრედული კედლის სინთეზს, უჯრედების დაყოფას, შოლტების წარმოქმნას და ზოგიერთი ანტიბიოტიკის ლიზისს [30]. ამ ფერმენტების არაკონტროლირებადი მოქმედება, რომელიც სხვადასხვა ფაქტორებით (კულტურის ფიზიოლოგიური მდგომარეობით, ტემპერატურით, pH-ით, NaCl-ის კონცენტრაციით) შეიძლება იყოს განპირობებული, იწვევს უჯრედების სპონტანურ ლიზისს. ზოგიერთ შემთხვევაში აუტოლიზის ფენომენის მიზეზს ბაქტერიოფაგების ფერმენტი - ენდოლოზინი წარმოადგენს [102].

ზრდა-განვითარების ნორმალურ პირობებში რძემჟავა ბაქტერიების უმეტესობა ამინომჟავებს უმნიშვნელოდ შლის. უჯრედული კედლის ჰიდროლიზის შედეგად არეში გადადის ყველა უჯრედშიდა კომპონენტი: ენდოფერმენტები, ქრომოსომები, პლაზმიდები, დაბალი მოლეკულური მასის მქონე სხვადასხვა ნივთიერება, მაგ., მინერალური მარილები, ამინომჟავები, ვიტამინები. ამ კომპონენტების უმეტესობა გამოყოფილ არეში ამჟღავნებს მაღალ ბიოლოგიურ აქტივობას. აუტოლიზის შედეგად ბაქტერიული უჯრედებიდან გამოთავისუფლებული ენდოფერმენტები ამინომჟავების ინტენსიურ გარდაქმნას უწყობს ხელს. ცნობილია, რომ ზოგიერთი ლაქტობაქტერიის აუტოლიზის შედეგად გამოყოფილი კომპონენტები ახდენს საფუარი სოკოების ზრდა-განვითარების ინჰიბირებას.

აუტოლიზური აქტივობა წარმოადგენს სტარტერული კულტურების მნიშვნელოვან ტექნოლოგიურ მახასიათებელს. აუტოლიზის პროცესი განსაკუთრებულ

როლს თამაშობს იტალიური და შვეიცარული ყველის მიღების პროცესში, რადგან აუტოლიზის შედეგად არეში გამოყოფილი ენდოფერმენტები აქტიურად ერთვება კაზეინის დაშლის პროცესში, ხელს უწყობს სპეციფიკური გემოს განმაპირობებელი კომპონენტების წარმოქმნას და უზრუნველყოფს პროდუქტის ორგანოლექტიკური თვისებების ჩამოყალიბებას.

აუტოლიზის ფენომენი კარგად არის შესწავლილი შემდეგ სახეობებში: *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. reuteri*, *S. thermophilus*, *Pediococcus pentasaceus* და *Leuconostoc spp.* დადგენილია, რომ აუტოლიზური აქტივობის მნიშვნელოვანი პარამეტრები (სიჩქარე და ხარისხი) შტამ-სპეციფიკური მახასიათებლებს წარმოადგენს [194].

არსებობს მონაცემები ყველის სტარტერული სახეობისთვის დამახასიათებელი აუტოლიზინების შესახებ: მაგ., *L. lactis* MG 1363-ის AcmA და AcmB, *S. thermophilus*-ის Mur-I, *E. hirae* Mur-II, *E. faecalis* აუტოლიზინები და სხვა [30].

აღსანიშნავია, რომ *S. thermophilus*-ის შტამებში აუტოლიზის მოვლენა როგორც წესი დაკავშირებულია მათ ლიზოგენურობასთან [92].

### 3.4 ეგზოპოლისაქარიდების მნიშვნელობა ფერმენტირებული პროდუქტების ტექსტურის ფორმირებაში

კვებითი პროდუქტების წარმოებაში ეგზოპოლისაქარიდები (eps) გამოიყენება როგორც სტაბილიზატორები, ემულსიფიკატორები, სიბლანტის განმაპირობებელი და წყლის შემაკავებელი აგენტები [179]. დღესდღეობით გამოყენებადი პოლისაქარიდები ძირითადად მცენარეული (სახამებელი, პექტინი, ალგინატი) ან ცხოველური (ჟელატინი) წარმოშობისაა. რეოლოგიური თვისებების გაუმჯობესების მიზნით მათი უმეტესობა ქიმიურად მოდიფიცირებულია, ეს კი იწვევს მათი გამოყენების მკაცრ შეზღუდვას [153]. მიკრობული წარმოშობის eps-ის უპირატესობა გამოიხატება მათ თიქსოტროპულ ბუნებაში და აგრეთვე მათ უნარში დაბალი კონცენტრაციით დაგროვებისას წარმოქმნან ბლანტი ხსნარები ანუ გაზარდონ ხსნარის სიბლანტე. დღესდღეობით არსებული კომერციული მიკრობული პოლისაქარიდები საკმაოდ

მცირერიცხოვანია. მათი გამოყენების შემზღუდავ ფაქტორს eps-ის წარმოების მცირე მოცულობა და მასთან დაკავშირებული დიდი დანახარჯები წარმოადგენს. ამ პრობლემის მოხსნა დაკავშირებულია eps-ის პროდუქციის ბიოსინთეზის და შესაბამისი ბიოპროცესების ტექნოლოგიის უფრო დეტალურ შესწავლასთან [25].

მიკრობული eps წარმოადგენს ექსტრაუჯრედულ პოლისაქარიდებს, რომელიც შედის უჯრედის ზედაპირთან ასოცირებული კაპსულის ან სეკრეტირებული ლორწოს შემადგენლობაში [170].

პროდუცენტი უჯრედებისათვის eps-ს პროტექტორული მნიშვნელობა გააჩნია. eps იცავს მიკრობულ უჯრედს გამოშრობისაგან, ოსმოსურ სტრესისაგან, ფაგოციტოზისაგან, ფაგების, ანტიბიოტიკების ან ტოქსიკური კომპონენტების ზემოქმედებისაგან. ვარაუდობენ, რომ eps აგრეთვე წარმოადგენს სამარაგო პოლიმერებს, თუმცა ლორწოწარმომქმნელი ბაქტერიების უმეტესობას არ შესწევს საკუთარი eps კატაბოლიზმის უნარი [60].

კვებითი მნიშვნელობის მიკროორგანიზმებს შორის Eeps პროდუცირება დამახასიათებელია რძემჟავა-, პროპიონო- და ბიფიდობაქტერიებისათვის. რძემჟავა ბაქტერიების eps განიხილება როგორც პროდუქტების რეოლოგიური თვისებების გაუმჯობესებისა და კონსისტენციის გასქელებისთვის საჭირო აგენტების ახალი თაობა [152].

რძემჟავა ბაქტერიების ეგზოპოლისაქარიდებს შორის ყველაზე კარგად არის შესწავლილ გვ. *Lactobacillus*, *Lactococcus* და *Streptococcus* ჰეტეროპოლისაქარიდები.

ბერგის მიერ რძემჟავა ბაქტერიების 660 შტამზე ჩატერებული სკრინინგის შედეგად გამოვლენილი იყო eps-პროდუცენტი 30 შტამი, რომელიც ავტორების მიერ რეკომენდირებულია სხვადასხვა პროდუქტების ტექნოლოგიურ პროცესებში გამოსაყენებლად [178].

რძემჟავა ბაქტერიების ეგზოპოლისაქარიდები იყოფა ორ ძირითად ჯგუფად: ჰომო- და ჰეტეროპოლისაქარიდებად. მათი შემადგენელი მონომერების რიცხვი მერყეობს 2-6 მდე.

ჰომოპოლისაქარიდები ერთი ტიპის მონოსაქარიდებისგან შემდგარი პოლისაქარიდების ჯგუფია. ჰომოპოლისაქარიდები იყოფა 4 ქვეჯგუფად:  $\alpha$ -D-

გლუკანები – გვ. *Leiconostoc mesenteroides ssp*, *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*;  $\beta$ -D-გლუკანები, დამახასიათებელი გვ *Pediococcus ssp*, *Streptococcus ssp.*; ფრუქტანები (*Streptococcus ssp.*) და პოლიგალაქტანის ტიპის პოლისაქარიდები.

ჰომოპოლისაქარიდების ძირითადი ნაწილი (დექსტრანები, მუტანები, ლევანები, ალტერნანები) სინთეზირდება ექსტრაუჯრედულად, ბიოსინთეზის პროცესი საჭიროებს სპეციფიურ სუბსტრატს – საქაროზას და პოლიმერიზაციის რეაქციისთვის აუცილებელ ფერმენტ გლიკოზილტრანსფერაზას [35].

ჰეტეროპოლისაქარიდებს ეკუთვნის სხვადასხვა ტიპის მონოსაქარიდებისაგან წარმოქმნილი პოლისაქარიდები. ჰეტეროპოლისაქარიდების სტრუქტურა პირველად აღწერილი იყო 1968 კოიმანის მიერ კეფირის “მარცვლებიდან” გამოყოფილი *L. brevis* ჰეტეროსაქარიდის მაგალითზე [162].

მათი სინთეზი დამახასიათებელია მეზოფილური (*L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, *L. casei*, *L. sake*, *L. rhamnosus* და ა.შ.), და თერმოფილური (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. helveticus* და *S. thermophilus*) რბემჟავა ბაქტერიებისათვის [35].

ჰეტეროპოლისაქარიდების მონომერები ძირითადად წარმოდგენილია გალაქტოზით, გლუკოზით, უფრო იშვიათად რამნოზით, ფრუქტოზით, მანოზით და გალაქტოზამინით [179].

ჰომოპოლისაქარიდებისგან განსხვავებით, ჰეტეროსაქარიდების პროდუქცია უფრო დაბალია (60-400 მგ/ლ) [168]. ჰეტეროპოლისაქარიდების წინამორბედი მოლეკულების სინთეზი მიმდინარებს ციტოპლაზმაში, საბოლოო ფორმირება კი ციტოპლაზმურ მემბრანაზე. ჰეტეროპოლისაქარიდების ბიოსინთეზში არსებით როლს ასრულებს საქარიდ-1-ფოსფატებისგან წარმოებული საქარიდ- ნუკლეოტიდები. საქარიდ-ნუკლეოტიდების არსებობაზე დამოკიდებულია როგორც მონოსაქარიდების პოლიმერიზაციის, ასევე შაქრების გარდაქმნის (ეპიმერიზაციის, დეკარბოქსილირება, დეჰიდროგენიზაცია) პროცესები. ბიოსინთეზში ჩართულია მრავალი ფერმენტი: ფოსფო- $\beta$ -გალაქტოზიდაზა,  $\beta$ -გალაქტოზიდაზა, გლუკოკინაზა, ფოსფოგლუკომუტაზა, ურიდინდიფოსფო-გალაქტოზ-4-ეპიმერაზა, დეჰიდრატაზა, ეპიმერაზ-რედუქტაზა და სხვ.). წარმოქმნილი eps მემბრანის გავლით გადაიტანება უჯრედის ზედაპირზე და

სეკრეტირდება გარემოში ლორწოს სახით ან რჩება ზედაპირთან ასოცირებული კაპსულარული eps სახით. ამის მიხედვით არჩევენ კაპსულარულ და ლორწოვან eps.

eps-ის ბიონინთეზის პროცესი საჭიროებს ენერჯის დიდ რაოდენობას. ეს არ წარმოადგენს პრობლემას აერობული ბაქტერიებისათვის, მაგრამ გვევლინება შემზღვევად ფაქტორად ისეთი ანაერობული მიკროორგანიზმებისათვის, როგორცაა ლაქტობაქტერიები. ამ ჯგუფში eps-ის პროდუქტიულობა მერყეობს 50-350 მგ/ლ და იშვიათად აღწევს 800 მგ/ლ (მაგ., *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* შემთხვევაში), მაშინ როდესაც აერობული ბაქტერიების (მაგ., *Xantomonas campestris*) მიერ წარმოქმნილი eps-ის რაოდენობა უდრის 30-50 გ/ლ [60].

რძემჟავა ბაქტერიების eps-ის ფუნქციური თვისებების ერთ-ერთ განმსაზღვრელ ფაქტორს წარმოადგენს მოლეკულური მასა, რომელიც 10kDa დან 200kDa > 1000kDa ფარგლებში მერყეობს [35, 179]. ფიზიკურ და რეოლოგიურ თვისებებს აგრეთვე განსაზღვრავს eps-ის მოლეკულების სივრცითი კონფორმაცია. პოლისაქარიდების მეორეული და მესამეული სტრუქტურა მკაცრად დამოკიდებულია პირველად სტრუქტურაზე. პირველადი სტრუქტურის მცირე ცვლილებაც კი იწვევს პოლისაქარიდების ფუნქციურ ცვლილებებს [170].

თერმოფილური რძემჟავა ბაქტერიების eps-ის სინთეზზე და გამოყოფაზე პასუხისმგებელი გენები ძირითადად ქრომოსომებშია ლოკალიზებული. კლასტერად ორგანიზებული გენები ქმნის 4 ფუნქციურ უბანს: ცენტრალური უბანი – აერთიანებს eps-ის განმეორებადი ერთეულების ბიოსინთეზისათვის საჭირო გლიკოზილტრანსფერაზების გენებს, ორი უბანი, რომელიც შეიცავს პოლიმერიზაციის და ექსპორტის პროცესში ჩართული ფერმენტების გენებს და რეგულატორული უბანი [60]. ვან Kკრანენბურგის მიერ აღწერილი იყო *L. lactis cremoris NIZOB40* ეგზოპოლისაქარიდების სინთეზზე პასუხისმგებელი 40 kb პლაზმიდაზე ლოკალიზებული გენთა კლასტერი (12kb) [182].

ლაქტობაქტერიების Eeps-ის რაოდენობა და ტიპი დამოკიდებულია კულტივირების პირობებზე: არის შემადგენლობაზე (ნახშირწყლების, მინერალური მარილების, ამინომჟავების, ნუკლეინის მჟავების, ვიტამინების, შემცველობაზე), ფიზიკურ და ქიმიურ ფაქტორებზე (pH, ტემპერატურა, ჟანგბადის კონცენტრაცია,

ინკუბაციის დრო). კულტივირების ოპტიმალურ პირობებში სინთეზირებული eps-ის რაოდენობა მერყეობს 0,15-0,6 გ/ლ ფარგლებში, მაშინ როდესაც არახელსაყრელ პირობებში ის 0,045-0,35 გ/ლ-მდე მცირდება. აღსანიშნავია, რომ eps-პროდუცენტი *S. thermophilus*-ის არაპროდუცენტი *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* – თან კომბინირებული კულტივირების შემთხვევაში სტრუქტოკოკების პროდუქტიულობა იზრდება 0.8 გ/ლ-მდე [34,35].

eps-სინთეზის ხელშემწყობ ფაქტორს კულტივირების არეში საფუვრების მიერ პროდუცირებული ვიტამინები წარმოადგენს. ჯინკას მიერ ნაჩვენები იყო, რომ რძემჟავა ბაქტერიების და საფუვრების ერთდროული კულტივირება *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* HPI-ის ეგზოპოლისაქარიდულ პროდუქტიულობაზე დადებით ეფექტს ახდენს [80].

სხვადასხვა მკვლევარის მიერ ნაჩვენები იყო, რომ თერმოფილურ რძემჟავა ბაქტერიებში eps-ის წარმოქმნის ეფექტურობა იზრდება მაღალი (ანუ ზრდისთვის ოპტიმალური) ტემპერატურის პირობებში კულტივირებისას [60]. თუმცა, აღწერილია მეზოფილური შტამები (მაგ., *L. sake 0-1*, *L. casei 0-1*), რომლებსაც eps-ის სინთეზის მაღალი დონე დაბალ ტემპერატურაზეც ახასიათებს. eps-ის სინთეზის მასტიმულირებელ ფაქტორს აგრეთვე 6.0-თან მიახლოებული pH წარმოადგენს [134].

აღსანიშნავია, რომ გახანგრძლივებული ინკუბაციის დროს ადგილი აქვს eps-ის დეგრადაციას, რაც დაკავშირებულია გლიკოჰიდროლაზების აქტივობასთან და გარემო პირობებზეა (pH, ტემპერატურა) დამოკიდებული [75, 76].

კარგად არის შესწავლილი იოგურტის სტარტერული *Streptococcus thermophilus* კულტურების ჰეტეროპოლისაქარიდები. მოლეკულურ მასის მიხედვით eps-პროდუცენტი *S. thermophilus*-ის შტამები დაიყო 3 ჯგუფად: I ჯგუფი – მაღალი მოლეკულური მასის (>1000kDa) eps-ის პროდუცენტი შტამები; II ჯგუფი – დაბალი მოლეკულური მასის (<1000kDa) eps-ის პროდუცენტები; III ჯგუფი - ორივე ტიპის eps-ის სინთეზის უნარის მქონე შტამები.

მონომერების ანალიზის საფუძველზე *S. thermophilus*-ის შტამები დაიყო 6 ჯგუფად: I, III, IV, V ჯგუფის eps შეიცავს რძემჟავა ბაქტერიების კლასიკურ მონოსაქარიდებს: გალაქტოზას, გლუკოზას, რამნოზას და/ან N-აცეტილ-

გალაქტოზამინს, სხვადასხვა შეფარდებით; II ჯგუფის eps შეიცავს მხოლოდ გალაქტოზას და რამნოზას; VI ჯგუფის eps - N-აცეტილ-გლუკოზამინს [181].

თერმოფილურ სტრეპტოკოკებში eps-ის წარმოქმნის უნარი – არასტაბილური თვისებაა. არასტაბილურობა შეიძლება იყოს გამოწვეული როგორც გენოტიპის (მუტაციის ან მობილური გენეტიკური ელემენტების არსებობით) ასევე ფენოტიპის დონეზე. აღწერილი იყო *S. thermophilus*-ის ლორწოწარმოქმნელი შტამები, რომლებიც კარგავდა ლორწოს წარმოქმნის უნარს მაღალი ტემპერატურის პირობებში კულტივირებისას. რძეში მრავალჯერადი პასაჟების შედეგად ასეთი შტამების უმეტესობა აღადგენდა eps სინთეზის უნარს, რაც ეწინააღმდეგება მოსაზრებას, რომლის მიხედვითაც ეს ფენომენი eps გენების მატარებელი პლაზმიდების დაკარგვით არის გამოწვეული [34,75].

eps-წარმოქმნელი რძემჟავა ბაქტერიები მრავალი ფერმენტირებული რძის პროდუქტის მისაღებად გამოიყენება, მაგ., სხვადასხვა ტიპის იოგურტი, კეფირი, პროსტოკვაშა, აციდოფილინი, არაჟანი, ფინური “ვიილი”, სკანდინავიური “ლანგვილი” და სხვა. რძემჟავა ბაქტერიების ეგზოპოლისაქარიდებს დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ამ პროდუქტების ტექსტურის ჩამოყალიბებაში. განსაკუთრებული მნიშვნელობა eps-ის პროდუცენტ შტამებს აქვს დიეტური (ცხიმის დაბალი შემცველობის) იოგურტის წარმოებაში [59, 162].

არსებობს მოსაზრება იმის შესახებ, რომ სტარტერული კულტურების მიერ გამოყოფილი eps უკავშირდება რძის ცილებს, ქმნის მაღალი ჰიდროფილობის კომპლექსებს, რომელიც დადებითად მოქმედებს პროდუქტების კონსისტენციაზე [9]

აღსანიშნავია, რომ ლაქტობაქტერიების ზოგიერთი eps აღიარებულია როგორც პრებიოტიკი. არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ eps-პროდუცენტი *L. lactis ssp. cremoris SBT0495* შტამის შემცველი ფერმენტირებული რძე ეფექტურია ქოლესტერინის დონის დასაწევად, თუმცა, ამ აქტივობის მექანიზმი უცნობია [136]. *L. helveticus ssp. jugurti*-ის eps სიმსივნის საწინააღმდეგო აქტივობას ავლენს [139]. შესწავლილია eps ან eps-პროდუცენტი უჯრედების მასტიმულირებელი ზეგავლენა იმუნურ სისტემაზე [69, 103].



ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე eps-ის ბიოსინთეზის, გენეტიკური, მოლეკულური ორგანიზაციის და ფიზიოლოგიური ასპექტების დაწვრილებითი შესწავლა საშუალებას მოგვცემს შევიმუშაოთ მათი პროდუცენტი შტამების კულტივირებისა და ეფექტური გამოყენების მეთოდები, რომელიც ხელს შეუწყობს ტექნოლოგიური პროცესების სტანდარტიზაციას და სასურველი ორგანოლეპტიკური და რეოლოგიური თვისებების მქონე პროდუქტების მიღებას.

### 3.5 რძემჟავა ბაქტერიების ანტაგონისტური თვისებების მნიშვნელობა პრობიოტიკური ფუნქციის ფორმირებაში

რძემჟავა ბაქტერიების გამოყენებით დამზადებული საკვები პროდუქტების სამკურნალო ეფექტი უძველესი დროიდან არის ცნობილი.

დადებითი ეფექტი, რომელსაც ლაქტობაქტერიები ახდენენ ორგანიზმზე გამოიხატება მათ უნარში:

- დათრგუნონ პათოგენური ნაწლავური მიკროორგანიზმები და, შესაბამისად, ხელი შეუწყონ ორგანიზმის ნორმალური მიკროფლორის შენარჩუნებას;
- მოახდინონ ნაწლავებში არსებული საკვების ტოქსიგენური კომპონენტების და მათი მეტაბოლიტების ნეიტრალიზაცია;
- გამოყონ ფერმენტები, რომელიც ხელს უწყობს ზოგიერთი პროდუქტის მონელებას;
- დადებითად იმოქმედონ ნაწლავების პერისტალტიკაზე;
- მოახდინონ იმუნური სისტემის სტიმულირება;
- ლაქტობაქტერიების შტამების უმეტესობა მონაწილეობს ვიტამინების (მაგ., ბიოტინი, რიბოფლავინი, B<sub>6</sub> B<sub>12</sub>, K, ფოლის მჟავა) სინთეზში, წარმოქმნის მოკლე ჯაჭვიან ცხიმოვან მჟავებს (პროპიონატი, ბუტირატი), რომლებიც მსხვილი ნაწლავის ეპითელიური უჯრედებისათვის ენერჯის წყაროს წარმოადგენს;
- ცდებით ნაჩვენები იყო, რომ რძემჟავა ბაქტერიების შემცველი პროდუქტების მიღება ხელს უწყობს უროგენეტალური ინფექციების, მსხვილი ნაწლავის წყლულის მკურნალობას, ეფექტურია სისხლში ქოლესტერინის კონცენტრაციის შესამცირებლად და მეტეორიზმის დროს [78, 143, 154,169].

- არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ზოგიერთ რძემჟავა ბაქტერიას გააჩნია გარკვეული ანტიკანცეროგენური, ანტიმუტაგენური აქტივობა [171].

ყოველივე ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, რძემჟავა ბაქტერიების უმეტესობა შეიძლება აღიარებულ იქნას როგორც პრობიოტიკური მიკროორგანიზმი.

პრობიოტიკებად აღიარებულია ცოცხალი მიკროორგანიზმები ან დიეტური კვებითი დანამატები, რომლებიც კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის მიკროფლორის შემადგენლობასა და მეტაბოლურ აქტივობაზე ზემოქმედების გზით დადებით ეფექტს ახდენს მასპინძლის ორგანიზმზე [74].

პრობიოტიკების კონცეფცია პირველად შემუშავებულ იქნა მექნიკოვის მიერ (1908). მან ბალკანელი გლეხების სიცოცხლის ხანგრძლივობა *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*-ის და *S. thermophilus*-ის შემცველი რძემჟავა პროდუქტებით კვებას დაუკავშირა. მან ივარაუდა, რომ ლაქტობაქტერიები ნაწლავებში არსებულ ლპობის გამომწვევ მიკროორგანიზმებსა და მათ ტოქსინებზე დამთრგუნველად მოქმედებენ და, შესაბამისად, დადებით ეფექტს ახდენენ ორგანიზმზე [126].

პრობიოტიკური შტამების სელექცია მიმდინარეობს შემდეგი კრიტერიუმების გათვალისწინებით:

1. **წარმოშობა:** შტამი ადამიანის გასტროინტესტინალური წარმოშობის ე.ი. ადამიანის ნორმალური მიკროფლორის წარმომადგენელი უნდა იყოს;
2. **რეზისტენტულობა:** შტამი კუჭის დაბალი pH-ის (<1,5), თორმეტგოჯა ნაწლავის ნაღვლის მარილების და პროტეინაზების მიმართ გამძლე უნდა იყოს. პირველი ორი კრიტერიუმის შესაბამისად უნდა გააჩნდეს ნაწლავების ეპითელიუმზე ადგეზიის, კოლონიზაციის და სტაბილური პოპულაციის წარმოქმნის უნარი.
3. **უსაფრთხოება საკვებსა და კლინიკურ თერაპიაში:** შტამი უნდა იყოს არაპათოგენური და არარეზისტენტული სამედიცინო პრაქტიკაში მიღებული ანტიბიოტიკების მიმართ
4. **ფუნქციური თვისებები:** შტამს უნდა გააჩნდეს კლინიკურად დადასტურებული პრობიოტიკური თვისებები, კერძოდ, ანტაგონიზმი პათოგენური და კარიოგენური ბაქტერიების მიმართ; ანტიმიკრობული ნივთიერებების (რძე-მჟავა, წყალბადის პეროქსიდი, ბაქტერიოცინები) სინთეზის უნარი;

5.კომერციული ღირებულება: შტამი უნდა იყოს ადვილად კულტივირებადი კომერციულ პირობებში და უნდა ინარჩუნებდეს სიცოცხლისუნარიანობას მისთვის ჩვეულ პირობებში შენახვის დროს [<http://www.dairyscience.info>].

როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული, პრობიოტიკური კულტურების ძირითად თვისებას ანტაგონისტური უნარი წარმოადგენს. მიკრობული ანტაგონიზმის მოვლენა პირველად პასტერის და ჟუბერის მიერ იყო აღმოჩენილი (1877). მიკრობიოლოგიის განვითარების დასაწყისში მეცნიერებმა აღწერეს ციმბირის წყლულის გამომწვევი ჩხირების სწრაფი სიკვდილი, ლპობის გამომწვევ ბაქტერიების კულტურასთან შერევის შედეგად [7].

ანტაგონიზმის პრაქტიკული გამოყენების იდეა პირველად შემოთავაზებული იყო ი.ი. მეჩნიკოვის მიერ XX საუკუნის დასაწყისში. მან პირველმა მიაქცია ყურადღება იმ ფაქტს, რომ სწორედ რძემჟავა ბაქტერიების ანტაგონისტური თვისებები განაპირობებს მათ წარმატებულ კონკურენციას ადამიანის საჭმლის-მომწვლელ ტრაქტში არსებულ ლპობის გამომწვევ მიკროორგანიზმებთან [126]. 80-იანი წლებში ამ მოსაზრებამ განსაკუთრებული აღიარება ჰპოვა აღმოსავლეთ ევროპასა და იაპონიაში. ექსპერიმენტულად დამტკიცდა, რომ ბაქტერიების უმრავლესობა ანტაგონიზმს უმეტესად *in vitro* პირობებში ამჟღავნებს, მაგრამ ზოგიერთი მათგანს ასეთი აქტივობა *in vivo* პირობებშიც უნარჩუნდება [31].

რძემჟავა ბაქტერიების სპეციფიკური ბაქტერიოციდული და ბაქტერიოსტატიკური მოქმედება განიხილება, როგორც აქტიურ ანტაგონიზმი და განპირობებულია მათ მიერ ორგანული მჟავების, წყალბადის პეროქსიდის, ნახშირორჟანგის, დიაცეტილის, ფართო სპექტრის ანტიბიოტიკების (მაგ. რეუტერინი) და ბაქტერიოცინების სინთეზის უნარით [31,78,150].

ორგანული მჟავების წარმოქმნა. ლაქტობაქტერიების მიერ წარმოებული რძე-, ძმარ, პროპიონ- და ჭიანჭველ-მჟავა, ბაქტერიების ციტოპლაზმურ მემბრანაზე ახდენს ზემოქმედებას, იწვევს მისი ფუნქციების მოშლას და თრგუნავს აქტიურ ტრანსპორტს. გარდა ამის, ორგანული მჟავები გარემოს pH-ის მაჩვენებელს ადაბლებს, რითაც აიხსნება მათი ზემოქმედება მჟავის მიმართ მგრძობიარეE მიკროორგანიზმებზე.

ანტაგონისტური მოქმედების ეფექტურობა დამოკიდებულია მჟავის მოლარულ კონცენტრაციაზე, დისოციაციის კონსტანტასა (pK) და გარემოს pH-ზე [150].

წყალბადის პეროქსიდის წარმოქმნა. ლაქტობაქტერიებს ფერმენტი კატალაზა, ფსევდოკატალაზა და პეროქსიდაზა არ გააჩნიათ, ამიტომ ისინი ჟანგბადის თანაობისას წყალბადის პეროქსიდს წარმოქმნიან, რომელიც დაგროვების შემთხვევაში ზოგიერთ მიკროორგანიზმზე დამთრგუნველად მოქმედებს. ზრდა-განვითარების ინჰიბირება მემბრანულ ლიპიდებსა და უჯრედულ ცილებზე ძლიერი დამჟანგველი ეფექტითაა განპირობებული. შესაბამის პირობებში ზოგიერთი შტამის მიერ გამოყოფილი H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ის კონცენტრაცია 6-8 მკგ/მლ არ აღემატება და განაპირობებს ბაქტერიოსტატიკურ ეფექტს, უფრო იშვიათად ის 30-40მკგ/მლ აღწევს, რაც ბაქტერიოციდული მოქმედებას იწვევს [150, 191].

ნახშირორჟანგის წარმოქმნა. ჰეტეროლაქტური ფერმენტაციის შედეგად გამოყოფილი CO<sub>2</sub> ანაერობული გარემოს ქმნის, რაც ზოგიერთი აერობული მიკროორგანიზმის განვითარებაზე ტოქსიკურ ზემოქმედებას ახდენს. CO<sub>2</sub>-ის მოლეკულები უჯრედის მემბრანის ფუნქციებს ცვლის და უჯრედის გარე და შიდა pH-ს ამცირებს [150].

დიაცეტილის წარმოქმნა. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* და *Pediococcus*-ის მრავალი შტამი ციტრატის მეტაბოლიზმის შედეგად დიაცეტილს გამოყოფს. გრამ-უარყოფითი ბაქტერიები, საფუარი და ობის სოკოები მის მიმართ უფრო მგრძობიარენი არიან, ვიდრე გრამ-დადებითი ბაქტერიები [99]. ინჰიბიტორული ეფექტი ვლინდება არეში დიაცეტილის 0.1-0.25% კონცენტრაციისას და განსაკუთრებულად იზრდება pH≤5ზე. მაღალი ტემპერატურის პირობებში დიაცეტილის მოქმედება ბაქტერიოციდულ ხასიათს ატარებს [31]. დიაცეტილი მნიშვნელოვანი ფერმენტების ინაქტივაციას ახდენს: მისი დიკარბონილის ჯგუფი (-CO-CO-) ურთიერთქმედებს არგინინთან და იწვევს ფერმენტების კატალიზური უბნების მოდიფიკაციას [150].

ანტიბიოტიკების სინთეზი. ადამიანის, ღორის, შინაური ფრინველების და სხვა ცხოველების საჭმლის-მომწელებელი ტრაქტიდან გამოყოფილი იყო ანტიბიოტიკი რეუტერინის პროდუცენტი *L. reuteri* შტამები.

რეუტერინი ( $\beta$ -ჰიდროქსიპროპიონალდეჰიდი  $\text{CHO-CH}_2\text{-CH}_2\text{O}$ ) – დაბალი მოლეკულური მასის მქონე, წყალში ხსნადი ნივთიერებაა. მისი ანტიბაქტერიული ეფექტი ზოგიერთი მნიშვნელოვანი ფერმენტის (მაგ., რიბონუკლეოტიდრედუქტაზას) ინაქტივაციასთან არის დაკავშირებული [44].

ბაქტერიოცინების სინთეზი. თანამედროვე მონაცემებით ბაქტერიოცინები – მოკლე, თერმოსტაბილური, ჰიდროფობული პოლიპეპტიდებია (შეიცავენ 60-მდე ამინომჟავურ ნაშთს). მათთვის დამახასიათებელია მდგრადობა სხვადასხვა ფაქტორების მიმართ (დაბალი pH, გაყინვა, ორგანული გამხსნელებისა და ფერმენტების ზემოქმედება). ამავე დროს მათი ბიოაქტივობა ირღვევა პროტეოლიზური ფერმენტის ზემოქმედებით. ბაქტერიოცინების უმრავლესობა დაბალ pH-ზე აქტიურდება, მაგრამ pH-9.0-ზე ბიოლოგიურ აქტიურობას კარგავს [150].

ბაქტერიოცინების სინთეზი ლაქტობაქტერიების როგორც კოკოვანი, ასევე ჩხირისებური ფორმებისათვისაა დამახასიათებელი. ისინი ერთმანეთისაგან თავისი ფიზიკურ-ქიმიური მაჩვენებლებით და მოქმედების სპექტრით ძლიერ განსხვავდება.

ბაქტერიოცინების მაკოდირებელი გენები ძირითადად სხვადასხვა ზომის პლაზმიდებზე არის განლაგებული (მაგ., პედიოცინ AcH ან PA-1 - 8,9kb პლაზმიდაშია, ლაქტოკოცინ A - 60kb პლაზმიდაში), ზოგიერთი ქრომოსომული ლოკალიზაციისა (მაგ., პლანტარაცინ A და საქაცინ-674), ზოგი კი (მაგ., ნიზინი) ტრანსპოზონებთან არის დაკავშირებული [104].

ბაქტერიოცინებს გააჩნიათ ბაქტერიოციდული აქტივობის შედარებით ვიწრო სპექტრი. ჩვეულებრივ მათი მოქმედება ბაქტერიოცინის პროდუცენტი ბაქტერიის სახეობის და მონათესავე სხვა სახეობების რამდენიმე შტამის ინჰიბირებით შემოიფარგლება. საკუთარი ბაქტერიოცინების მიმართ პროდუცენტ უჯრედებს სპეციფიკური იმუნიტეტის ცილებით უზრუნველყოფილი რეზისტენტულობა გააჩნია.

ბაქტერიოცინების ბაქტერიოციდული მოქმედება ციტოპლაზმური მემბრანის ფუნქციების (შერჩევითი განვლადობა და ენერჯის გენერაციის პროცესები) დარღვევას ემყარება. გრამ-უარყოფით ბაქტერიებში ლიპოპოლისაქარიდული შრე ბაქტერიოცინების ზემოქმედებისგან დამცავი ბარიერის სახით გვევლინება, ამიტომ, ბაქტერიოცინები ძირითადად მხოლოდ გრამ-დადებითი ბაქტერიებზე მოქმედებს.

ლაბორატორიულ ცხოველებსა და უჯრედულ კულტურებზე ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად დადასტურებული იყო ბაქტერიოცინების არატოქსიურობა. კლასიკურ ანტიბიოტიკებთან შედარებით ბაქტერიოცინების უპირატესობა იმაში გამოიხატება, რომ საჭმლის-მომწელებელ ფერმენტებს მათი დაშლა შეუძლია. ამიტომ ბაქტერიოცინების პროდუცენტი შტამები შეიძლება დამატებითად შეყვანილ იქნას ფერმენტირებულ საკვებში, ამ უკანასკნელის ხარისხისა და უსაფრთხოების გასაუმჯობესებლად [150].

რემეჩავა ბაქტერიების ბაქტერიოცინები ოთხ კლასად იყოფა:

კლასი I: ლანთიბიოტიკები, რომლებიც პოსტ-ტრანსლაციურად მოდიფიცირებულ ამონომეჩავებს: დიდეჰიდროალანინს ან თიოეთერულ დიანთიონინს შეიცავენ.;

კლასი II: მცირე ზომის თერმორეზისტენტული არა-ლანთიბიოტიკები;

კლასი III: დიდი ზომის (>30kDa) თერმოლაბილური ბაქტერიოცინები;

კლასი IV: კომპლექსური ბაქტერიოცინები, რომლებიც გლიკო- და ლიპიდური ნაშთებისაგან შედგება. ინაქტივირება ხდება პროტეინაზული, გლიკოლიზური და ლიპოლიზური ფერმენტებით [104, 137].

ბაქტერიოცინების პროდუცენტ შტამებს შორის პირველ რიგში აღსანიშნავია გვ. *Lactobacillus*-ის წარმომადგენლები.

*L. acidophilus*-ის მრავალი შტამი ლაქტობაქტერიების სხვა ჩხირისებრ ფორმებს შორის გამორჩეულია, როგორც ყველაზე ძლიერი ანტაგონისტური სახეობა და რიგი თვისებების საფუძველზე (ბაქტერიოცინების სინთეზი, მეჩავა- და ნაღველ-რეზისტენტულობა, კოლონიზაციის უნარი და სხვ.) პრობიოტიკადაა აღიარებული [24,104,192].

შტამი *L. acidophilus* 11088 ბაქტერიოცინს “ლაქტაციინი F“-ს აწარმოებს. ეს ბაქტერიოცინი თრგუნავს *L. bulgaricus*, *L. leichmannii*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. fermenti* და *Enterococcus faecalis* ზრდას, მგრძობიარეა ფიცინის, პროტეინაზა K, ტრიპსინისა და სუბტილიზინის მიმართ, ამავე დროს თერმოსტაბილურობით ხასიათდება და 121 °C-ზე 15 წთ-ით გაცხელების შემდეგაც კი ინარჩუნებს აქტივობას. *L. acidophilus* 11088 (Laf+Lafr) შტამს 4 MDa და 27 MDa მოლეკულური მასის მქონე პლაზმიდები გააჩნია.

*L. acidophilus* N2-ის მიერ სინთეზირებული ბაქტერიოცინი “ლაქტაცინი B” 6000-6500 Da მოლეკულური მასის მქონე ცილაა, რომელიც პროტეინაზა K-თი ინაქტივირდება, მაგრამ აქტივობას 8M შარდოვანასა და 0.1% SDS-ით დამუშავებისასაც ინარჩუნებს. ლაქტაცინი B-ს დეტერმინანტი გენი ქრომოსომაშია მოთავსებული [24].

ლიტერატურაში ცნობილია აგრეთვე შტამი-ანტაგონისტი *L. acidophilus* M46, რომელიც აციდოცინ B-ს ასინთეზირებს. აციდოცინი B ჰიდროფობული ბუნებისა, pH-დამოუკიდებელი და შედარებით თერმორეზისტენტული ბაქტერიოცინია. ეს ბაქტერიოცინი ბაქტერიების ინჰიბირების ვიწრო სპექტრის მიუხედავად *Clostridium sporogenes*-ს ზრდას თრგუნავს [192].

*L. plantarum*-ის ანტაგონისტური თვისებები პირველად აღწერილი იყო 1952 წელს კოდამას მიერ. თანამედროვე ლიტერატურული მონაცემების თანახმად ცნობილია რამდენიმე ბაქტერიოცინი, რომლებსაც *L. plantarum*-ის სხვადასხვა შტამები წარმოქმნის, ესენია: პლანტარიცინი A (*L. plantarum* C11), პლანტარიცინი B (*L. plantarum* NCDO1193), პლანტარიცინი S (*L. plantarum* LPCO-10), პლანტარიცინი BN (*L. plantarum* BN), პლანტარიცინი C19 (*L. plantarum* C19) [23,49, 98, 104, 138].

1990 წელს რამელსბერგის ჯგუფმა *L. casei*-ს შტამიდან გამოყო კაზეიცინი 80 (მოლეკულური მასა 42 KDa-ია). მისი სინთეზი ქრომოსომული გენებით არის განპირობებული [151].

ცნობილია აგრეთვე კაზეიცინი GG, რომლის სინთეზზეც *L. casei* GG არის პასუხისმგებელი. ეს ბაქტერიოცინი ინჰიბიტორულ მოქმედებას ამჟღავნებს *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*-ის, მაგრამ არა *Lactobacillus*-ის სახეობების მიმართ [95].

აღსანიშნავია, რომ *L. sake* LB706-ი ასინთეზირებს 43 ამინომჟავისაგან შემდგარ საკაცი A -ს [150].

ცნობილია *L. brevis*-ის მიერ სინთეზირებული ბაქტერიოცინები: ბრევიცინი 27 და ბრევიცინი 37. ბრევიცინი 27 პროდუცენტი *L. brevis* SB27 თრგუნავს ჰეტეროფერმენტული ლაქტობაცილების (კერძოდ *L. brevis* და *L. buchneri*-ის) და გვარი *Pediococcus* და *Bacillus* ზოგიერთი შტამის ზრდას. ეს ბაქტერიები წარმოადგენს

ფერმენტირებული ალკოჰოლური სასმელების (ლუდის, ღვინის) კონტამინანტურ მიკროფლორას [27].

მონაცემები *S. thermophilus*-ის მიერ სინთეზირებული ბაქტერიოცინების შესახებ საკმაოდ მცირეა. მეტნაკლებად კარგადაა შესწავლილია 6 სტრუქტოკოკული ბაქტერიოცინი: თერმოფილინ 347, თერმოფილინი A, თერმოფილინი T, ანტილისტერიული თერმოფილინ 13, *Clostridium tyrobutyricum*-ის მიმართ აქტიური თერმოფილინ 580 და იოგურტიდან გამოყოფილია *S. thermophilus* 81-შტამის ბაქტერიოცინები. დადგენილი იყო, რომ მცირე მოლეკულური მასის მქონე თერმოფილინ 81 ინჰიბიტორულ აქტივობას ამჟღავნებს *E. coli*, *Listeria innocua*, *Bacillus subtilis* და *S. thermophilus*-ის ზოგიერთი შტამის მიმართ [22,96,120,122,186,188].

საყურადღებოა ის ფაქტიც, რომ ენტეროკოკების ზოგიერთი შტამი აღიარებულია როგორც პრობიოტიკი. ენტეროკოკების (*E. faecium* BFE900, LMG2749, DPC1146 და H98) მიერ სინთეზირებული ბაქტერიოცინები (ენტეროცინები) ისეთი პათოგენური ბაქტერიების, როგორცაა *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium ssp.* და *Bacillus ssp* ზრდა-განვითარებას თრგუნავს [83, 71, 141].

ამრიგად, ზემოთ მოყვანილი მონაცემები და ლიტერატურაში მრავლად არსებული სხვა მასალა ნათლად მეტყველებს ლაქტობაქტერიების უნარზე დაასინთეზირონ მრავალფეროვანი სახის ბაქტერიოცინები. სწორედ ეს თვისება, უპირველეს ყოვლისა, განაპირობებს მათი, როგორც ბიოკონსერვატორების გამოყენების ფართო პერსპექტივას კვების მრეწველობასა და სახალხო მეურნეობის სხვა დარგებში.

#### თავი 4. მიკროორგანიზმების მოლეკულური ტიპირება და მისი მნიშვნელობა

მსოფლიო მასშტაბით რძემჟავა პროდუქტების სტანდარტიზირებულ მრეწველობაში შერჩეული სტარტერული კულტურების გამოყენება მნიშვნელოვნად ამცირებს ნატურალური მიკროფლორის მრავალფეროვნებას. სხვადასხვა ქვეყნის ეთნიკური რძემჟავა პროდუქტების მისაღებად დღემდე იყენებენ არაპასტერიზებულ, სპონტანური მიკროფლორის შემცველ რძეს და ბუნებრივ ბაქტერიულ კულტურებს. ამიტომ, ასეთი ტიპის პროდუქტები, მათ შორის მაწონიც, წარმოადგენს ახალი,



ბიოტექნოლოგიური თვალსაზრისით საინტერესო თვისებების მქონე შტამების მდიდარ წყაროს. რა თქმა უნდა, საწარმო პროცესში ეთნიკური პროდუქტებიდან გამოყოფილი ბაქტერიული შტამების ჩართვას წინ უნდა უსწრებდეს მათი ზუსტი იდენტიფიკაცია და ტიპირება [132].

მიკროორგანიზმთა იდენტიფიკაციის საყოველთაოდ აღიარებული კლასიკური მეთოდები, როგორც წესი, საშუალებას გვაძლევს მოვახდინოთ მათი გარჩევა ოჯახის, გვარისა და სახეობის დონეზე, მაგრამ იშვიათად არის სრულყოფილი რათა მოხდეს ქვესახეობების და შტამების დონეზე იდენტიფიკაცია და დახასიათება [160]. მიკროორგანიზმთა მოლეკულური ტიპირების მეთოდები საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ შიდასახეობრივი მრავალფეროვნება, განვსაზღვროთ სახეობის გარემოში გლობალური გავრცელების ხარისხი, დავადგინოთ კორელაცია სპეციფიურ გენოტიპებსა და კონკრეტულ გარემო პირობებს შორის და განვსაზღვროთ მოცემული მიკრობული ტიპის ენდემურობა. პათოგენური მიკროორგანიზმების შემთხვევაში ტიპირების მეთოდები გამოიყენება ინფექციის გამომწვევის გავრცელების ისტორიის შესასწავლად, ზოგიერთი პათოგენური სახეობა კი შეიძლება იყოს დიფერენცირებული მასპინძელი-ორგანიზმების სპეციფიკის მიხედვით. აღსანიშნავია, რომ თანამედროვე მეთოდების საშუალებით შესაძლებელია არაკულტივირებადი მიკროორგანიზმების იდენტიფიკაციაც [28,62,140].

რძემჟავა ბაქტერიების ტიპირების სწრაფი მეთოდების შემუშავება მნიშვნელოვანია სხვადასხვა რძემჟავა პროდუქტების (განსაკუთრებით კი, შერეული კულტურების გამოყენებით მიღებული პროდუქტების) წარმოების ხარისხიანი კონტროლისათვის, პრობიოტიკური შტამების და/ან სახეობების *in vivo* იდენტიფიკაციისათვის და ფერმენტაციის პროცესის მონიტორინგისათვის (მაგ., კონტამინაციის სკრინინგი დუდილის პროცესში) [47].

მოლეკულური ტიპირების მეთოდებს შორის არჩევენ ფენოტიპური და გენოტიპური ტიპირების მეთოდებს [180].

ფენოტიპური ტიპირების მეთოდებს შორის აღსანიშნავია ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელში უჯრედული ცილების

ელექტროფორეზის მეთოდი (SDS-PAGE of WCP - SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Whole Cell Proteins).

ნებისმიერი მიკრობული უჯრედი წარმოქმნის 2000-ზე მეტ განსხვავებულ ცილას, რომელიც წარმოადგენს მიკროორგანიზმების იდენტიფიკაციის, კლასიფიკაციისა და დახასიათებისთვის საჭირო ინფორმაციის მდიდარ წყაროს. ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელში ელექტროფორეზის შედეგად უჯრედული ცილები ქმნის რთულ, მხოლოდ ამ სახეობისთვის/შტამისათვის დამახასიათებელ პროფილებს ე.წ. ცილების “თითების ანაბეჭდებს”. ამ ცილოვანი პროფილების ვიზუალური შეფასებით ან კომპიუტერული ინტერპრეტაციის გზით ახდენენ მიკროორგანიზმების ფენოტიპურ ტიპირებას [149].

გენოტიპური ტიპირებისას სამიზნე დნმ-ის მიხედვით არჩევენ ქრომოსომული დნმ-ის, პლაზმიდური დნმ-ის და ცალკეული გენის (ფრაგმენტის) “თითების ანაბეჭდების” მეთოდებს. პოლიმორფიზმის დადგენა ხდება სამი ხერხით: პირდაპირი ელექტოფორეზის, რესტრიქციული ანალიზისა და ამპლიფიკაციის მეთოდით [180].

ცალკეული გენის (დნმ-ის უბნის) “თითის ანაბეჭდების” მეთოდი საშუალებას გვაძლევს გამოვავლინოთ დნმ-ის გარკვეული ფრაგმენტისთვის დამახასიათებელი პოლიმორფიზმი. ამ მეთოდის ერთ-ერთ მაგალითს წარმოადგენს 16S-23S რიბოსომული გენების ITS (intergenic transcribed spacer) სპეისერული უბნის ანალიზის მეთოდი - RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). 16S და 23S რ-რნმ გენებთან შედარებით, ITS უბანი მაღალი ვარიაბილურობით ხასიათდება. მისი ამპლიფიცილებისათვის იყენებენ უნივერსალურ პრაიმერებს, რომლებიც უკავშირდება 16S 3' და 23S 5' კონსერვატულ ბოლოებს. ზოგიერთი სახეობისთვის დამახასიათებელია განსხვავებული თანმიმდევრობის მქონე რამდენიმე რ-რნმ-ოპერონის არსებობა (მაგ., *L. lactis* გენომი შეიცავს რ-რნმ-ის 6 ოპერონს, *S. thermophilus* 5 ან 6, *L. acidophilus* მინიმუმ 4, *E. faecalis* – 3. ITS უბანში შეიძლება იყოს ჩართული კონსერვატული თანმიმდევრობები. მაგ., *L. lactis*, *S. thermophilus* სპეისერული თანმიმდევრობა შეიცავს ალანინის ტ-რნმ-ის გენს [41].

ზოგიერთი მკვლევარის აზრით ITS უბნის სიგრძე სახეობა-სპეციფიკური სიდედაა, ამიტომ მისი ამპლიფიკაციის შედეგად შესაძლებელია მხოლოდ სახეობა-სპეციფიკური “თითების ანაბეჭდებს” მიღება. სხვა მკვლევართა მიერ არაერთხელ ნაჩვენები იყო ამ მეთოდის ეფექტურობა ერთი სახეობის (მაგ., *Clostridium difficile*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus cereus* და ა.შ) შტამების დიფერენცირებისათვის [51,52,89].

მმოლეკულური ტიპირებისათვის უფრო ხშირად იყენებენ ისეთ გენებს, რომელთათვის არის დამახასიათებელი მაღალი შიდასახეობრივი ვარიაბელურობა (მაგ., ეგზოპოლისაქარიდების *epsD* გენი და ა.შ). პოლიმორფიზმის გამოსავლენად ამ გენის ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებულ პროდუქტებს სხვადასხვა რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით ამუშავებენ ( RFLS - restriction fragment length polymorphism) [130,180].

ქრომოსომული დნმ-ის “თითის ანაბეჭდების” ანალიზისათვის ორი ტიპის მეთოდს იყენებენ. პირველ შემთხვევაში ქრომოსომულ დნმ-ს ამუშავებენ ზოგადი ან სპეციფიკური რესტრიქტაზებით, რის შემდეგ ახდენენ მიღებული ფრაგმენტების ელექტროფორეზს (PFGE-pulse field gel electrophoresis). მმეორე შემთხვევაში, მეთოდს საფუძვლად უდევს მთელ გენომში გაბნეული ხშირად განმეორებადი თანმიმდევრობების PCR-ამპლიფიკაცია და ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ელექტოფორეზი (RAPD - random amplified polymorphic DNA, rep-PCR - repetitive extragenic palindromic-PCR და სხვ.) [180].

Rep-PCR (ანუ BOX-PCR) მეთოდის უპირატესობა ზემოთ აღნიშნულ მეთოდებთან შედარებით გამოიხატება მაღალ რეპროდუციბელურობაში (RAPD და RISA-თან შედარებით), შესრულების სისწრაფესა და სიმარტივეში (RFLS –თან შედარებით). Rep-PCR ამპლიფიკაციის შედეგები არ არის დამოკიდებული ანალიზირებადი კულტურის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე. ყველა ამ მიზეზის გამო Rep-PCR წარმოადგენს ბიოგეოგრაფიული და ეპიდემიოლოგიური გამოკვლევების ერთ-ერთ ყველაზე ფართოდ გავრცელებულ მეთოდს [28,29,40,174].

ამ მეთოდს საფუძველად უდევს გენომში გაბნეული ხშირად განმეორებადი ნუკლეოტიდური ე.წ BOX თანმიმდევრობების ამპლიფიკაცია. შესაბამისად, ამ მეთოდით შესაძლებელი ხდება მთლიანი გენომის ანალიზი. BOX უბნები პირველად

აღმოჩენილი იყო *Streptococcus pneumoniae* შტამებში [177]. შემდგომში ეს თანმიმდევრობები იდენტიფიცირებული იყო მრავალი სხვა გრამ-დადებითი და გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების გენომში. არჩევენ სხვადასხვა ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მქონე სამი ტიპის BOX ელემენტებს: BoxA (57 bp), BoxB (43 bp) და BoxC (50 bp). BoxA თანმიმდევრობა აღმოჩენილი იყო მიკროორგანიზმების უმატესობაში, მათ შორის ისეთ გრამ-უარყოფით სახეობაში, როგორცაა *E. coli* [184,185].

Rep-PCR გამოყენებული იყო ისეთ ბაქტერიული პოპულაციების მრავალფეროვნების გამოსაკვლევად როგორცაა *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteridis*, *Geodermatophilaceae*, *Frankia* და სხვა [40,42,62,79,87,110,164,174].

ვერსალოვიჩის მიერ შემუშავებული იყო Frep-PCR მოდიფიცირებული მეთოდი F-rep-PCR, რომელიც ითვალისწინებს ფლუოროცენტული საღებავით (FAM, JOE, ROX) მონიშნული პრაიმერის გამოყენებას. ამ მეთოდის ეფექტურობა ნაჩვენებია იყო პენიცილინ-რეზისტენტული *Streptococcus pneumoniae* და *Micobacterium avium* შტამების მაგალითზე [184,185]. მიუხედავად ამისა, ამ საინტერესო მიდგომამ აღიარება ვერ ჰპოვა და იშვიათად გამოიყენება ბაქტერიული პოპულაციების ანალიზისათვის.

აღსანიშნავია, რომ rep-PCR მეთოდის საშუალებით საკვებისეული წარმოშობის სტრუქტოკოკების მოლეკულური ტიპირების პრეცედენტი დღემდე არ ყოფილა. წინამდებარე ნაშრომი მაწვიდან გამოყოფილი თერმოფილური სტრუქტოკოკების გენოტიპირების პირველ მცდელობას წარმოადგენს.

## ნაწილი II მასალა და მეთოდები

### თავი 5. მასალა

#### 1. სამუშაოში გამოყენებული იყო შემდეგი ბაქტერიული შტამები:

1.1. მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი *Streptococcus thermophilus* 49 შტამი და *Enterococcus durans* 18 შტამი (ცხრილი 1).

1.2. იტალიის, ქ. პოტენცას ბაზილიკატას უნივერსიტეტის ბიოლოგიის, სოფლის მეურნეობის და მეტყევეობის ბიოტექნოლოგიის ლაბორატორიის კოლექციის (DBDAF - Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agrarie e Forestali, University of Basilicata, Potenza, Italy) სხვადასხვა რძემჟავა პროდუქტებიდან გამოყოფილი ენტეროკოკები: *E. durans* 98, PENE 16,17; *E. faecalis* 19, 84, 85, 97, 160, 166, 192, 233, 234, 1E10, 1F2, 1F7, 4A8, PENA 14, 15, 16, 17, 19; *E. faecium* 96, 191, 221, 22, 2C6, 2G2, PEND2; *E. gallinarum* 263, *E. casseiflavus* 264, *E. hiraie* 266.

1.3. სტანდარტული შტამები:

ა) გერმანიის მიკროორგანიზმების და უჯრედულ კულტურათა კოლექციის (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) შტამები: *S. thermophilus* DSM 20617<sup>T</sup>; *Lactobacillus plantarum* DSM20174; *Micrococcus luteus* DSM1790;

ბ) ამერიკის ტიპური კულტურათა კოლექციის (ATCC - the American Type Culture Collection) შტამები: *Lactococcus lactis* ATCC11454; *Proteus vulgaris* ATCC 29905; *Enterococcus faecalis* ATCC14433, *E. faecium* ATCC14434;

გ) ნიდერლანდების საკვებისა და პროდუქტების კვლევითი ინსტიტუტის კოლექციის TNO (Nutrition and Food Research Institute, The Netherlands) შტამები: *Listeria innocua* BL86/26, *L. plantarum* ISLCPT57.

დ) გენტის უნივერსიტეტის მიკრობიოლოგიის ლაბორატორიის კოლექციის (Universiteit Gant, Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium) შტამი: *E. durans* LMG 10746.

1.4 გ. ეელიავას სახ. ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის, მიკრობთა და ბაქტერიოფაგების გენეტიკის ლაბორატორიის კულტურათა კოლექციის შტამები: *Staphylococcus aureus* MRSA-17, 80, 21; *Pseudomonas aeruginosa* 573, 6768, 7018, M28, M-14; *Esherichia coli* SEL 17, 21, 28, 43; *Shigella flexneri* 1188

**ცხრილი 1.** საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამების სია

ნომერი	წარმოშობა		შტამი
	ადგილი	<sup>1</sup> რუქაზე (სურ. 1)	
1	წყავზოკა	18	<i>S. thermophilus</i> 3203; <i>E. durans</i> 2

6	ქუთაისი	3	<i>S. thermophilus</i> 3206, 3207; <i>E. durans</i> 3
7	გორი	4	<i>S. thermophilus</i> 3210; <i>E. durans</i> 4
8	სურამი	11	<i>S. thermophilus</i> 3211, 3212;
9	ქუთაისი	3	<i>S. thermophilus</i> 3213;
10	კვიტირი	15	<i>S. thermophilus</i> 3217, 3219; <i>E. durans</i> 5
11	გოდოგანი	14	<i>S. thermophilus</i> 3221, 3222;
12	ოფურჩხეთი	16	<i>S. thermophilus</i> 3225; <i>E. durans</i> 6
13	ოფურჩხეთი	16	<i>S. thermophilus</i> 3229;
14	ქობულეთი	19	<i>S. thermophilus</i> 3232, 3233;
15	სენაკი	5	<i>S. thermophilus</i> 3235, 3236;
16	სენაკი	5	<i>S. thermophilus</i> 3202; <i>E. durans</i> 1
17	განთიადი	17	<i>S. thermophilus</i> 3238, 3239; <i>E. durans</i> 7
18	განთიადი	17	<i>S. thermophilus</i> 3240, 3242;
19	ორთაბათუმი	23	<i>S. thermophilus</i> 3245; <i>E. durans</i> 8
20	პერველი მაისი	25	<i>S. thermophilus</i> 3248; <i>E. durans</i> 9
21	ბათუმი	6	<i>S. thermophilus</i> 3252; <i>E. durans</i> 10
25	წყნეთი	8	<i>S. thermophilus</i> 3261; <i>E. durans</i> 20
26	ტაბახმელა	13	<i>S. thermophilus</i> 3263;
27	ტაბახმელა	13	<i>S. thermophilus</i> 3265, 3266;
28	შინდისი	24	<i>S. thermophilus</i> 3270, 3271;
29	თელეთი	9	<i>S. thermophilus</i> 3273; <i>E. durans</i> 12
30	თელეთი	9	<i>S. thermophilus</i> 3275, 3276;
31	თელეთი	9	<i>S. thermophilus</i> 3278;
32	თელეთი	9	<i>S. thermophilus</i> 3279;
33	ხაშური	20	<i>S. thermophilus</i> 1B, 1D; <i>E. durans</i> 13
34	წყნეთი	8	<i>S. thermophilus</i> 3B;
35	ბაკურიანი	21	<i>S. thermophilus</i> 4A, 4B;
36	ცხვარიჭამია	10	<i>S. thermophilus</i> 5B;
37	გომბორი	22	<i>S. thermophilus</i> 6A;
38	მეტეხი	12	<i>S. thermophilus</i> 10B, 10C; <i>E. durans</i> 15
39	ზესტაფონი	7	<i>S. thermophilus</i> 11A; <i>E. durans</i> 16
40	ზესტაფონი	7	<i>S. thermophilus</i> 12A; <i>E. durans</i> 17
41	თბილისი	1	<i>S. thermophilus</i> 13B; <i>E. durans</i> 18
45	მცხეთა	2	<i>S. thermophilus</i> 1720; <i>E. durans</i> 23



სურ. 1. მაწვნის დელოების მოპოვების ადგილები. (აღნიშვნები იხ. ცხრილი 1)

## 2. საკვები არეები

### 2.1. M17 (DIFCO)

გამოყენებული იყო როგორც ბულიონი, ასევე 0.7% და 2% აგარი. სამივე შემთხვევაში M17–ს ემატებოდა ლაქტოზას სტერილური წყალხსნარი საბოლოო კონცენტრაციით 2% წონა/მოცულობაზე. საკვები არის ქიმიური შემადგენლობა დეტალურად არის მოცემული ლიტერატურულ წყაროებში [55].

### 2.2. MRS (deMan, Rogosa, Sharpe) არე (DIFCO)

გამოყენებული იყო როგორც ბულიონი, ასევე 0.7% და 2% აგარი. საკვები არის ქიმიური შემადგენლობა დეტალურად არის მოცემული ლიტერატურულ წყაროებში [55].

### 2.3. ტრიპსინის სოიოს ბულიონი TSB (DIFCO)

გამოყენებული იყო 1,2% აგარი. საკვები არის ქიმიური შემადგენლობა დეტალურად არის მოცემული ლიტერატურულ წყაროებში [55].

### 2.4. ტრიპსინული სოიოს ბულიონი 0,6% საფუვრის ექსტრაქტით

#### TSBYE (Trypticase soy broth with 0.6% yeast extract) (DIFCO)

გამოყენებული იყო როგორც ბულიონი, ასევე 0,7% აგარი. საკვები არის ქიმიური შემადგენლობა დეტალურად არის მოცემული ლიტერატურულ წყაროებში [55].

### 2.5. ცხიმოხდილი რძე (DIFCO)

### 2.6 გულ-ტვინის გამონაწვლელი

#### Brain Heart Infusion (DIFCO)



გამოყენებული იყო როგორც ბულიონი, ასევე 0.7% და 2% აგარი. საკვები არის ქიმიური შემადგენლობა დეტალურად არის მოცემული ლიტერატურულ წყაროებში [55].

## 2.7. შაქრის ბულიონის არე [54]

### BSM (broth-sugar-medium)

საფუვრის ექსტრაქტი	6,0გ
პეპტონი	15,0გ
ტვინ 80	1,0მლ
ქლორფენოლის წითელი	0,04გ
აგარი	1,0გ
დისტილირებული H <sub>2</sub> O	1000მლ
pH 6,4 ავტოკლავირება 100°C 30 წუთ.	

ავტოკლავირებულ BSM არეს ემატება ფილტრაციით სტერილიზებული გალაქტოზის წყალხსნარი, საბოლოო კონცენტრაციით 0,2% წონა/მოცულობაზე.

## 2.8. მოდიფიცირებული MRS არე [145]

MRS –ის ბულიონს ემატება:

ნატრიუმის ციტრატი	2.0გ
გლუკოზას მონოჰიდრატი	22.0გ
ტრიპტონი	15.0გ
დეიონიზირებული H <sub>2</sub> O (Milly Q)	100.0მლ
pH 6,8.; ავტოკლავირება 121°C 15 წთ.	

## 2.9. RRM (ruthenium skim milk) არე [168]

საფუვრის ექსტრაქტი	5გ
ცხიმოხდილი რძე	100გ
საქაროზა	10გ
აგარი	15გ
დისტილირებული H <sub>2</sub> O	1000მლ

რძეს ასტერილებენ ცალკე, ავტოკლავირებულ არეს ემატება სტერილურ წყალში გახსნილი რუთენიუმის წითელი 0,08გ/ლ.

## 2.10. საქაროზის (5%) შემცველი MRS აგარი [145]

MRS –ის ბულიონს ემატება:

ბაქტერიოლოგიური პეპტონი ..... 10.0გ  
 ლაბ-ლემკოს ფხვნილი ..... 8.0გ  
 ნატრიუმის ციტრატი ..... 2.0გ  
 საქაროზა ..... 50.0გ  
 აგარი ..... 12.0გ  
 დისტილირებული H<sub>2</sub>O ..... 100.0მლ

pH 6,8, ავტოკლავირება 121°C 15 წთ.

## 3. სამუშაოში გამოყენებული იყო შემდეგი რეაქტივები

### 3.1. ტრის-EDTA (ერთ-ჯერადი)

ტრის -HCl 10 მმოლ; EDTA 1 მმოლ; pH8

### 3.2. პოლიმერული ჯაჭვური რეაქციის (PCR-ის) სარეაქციო ბუფერი (ერთ-ჯერადი):

10 მმოლ ტრის -HCl, pH 8.8/ 50 მმოლ KCl//0, 1% ტრიპტონი (Pharmacia)

### 3.3. TBE (ტრის-ბორატის/EDTA) ელექტროფორეზის ბუფერი (0,5-ჯერადი):

ტრის-ფუძე - 54გ; ბორის მჟავა - 27,5 გ; 0,5მოლ EDTA (pH8.0) (Sigma)

### 3.4. გელის დასატვირთი ხსნარი (Gel Loading Solution):

საქაროზა 40% წონა/მოცულობაზე, ბრომფენოლის ლურჯი 0,05%  
 წონა/მოცულობაზე, ნატრიუმის დოდეცილ სულფატი (SDS) 0,5%  
 წონა/მოცულობაზე, EDTA 0,1 მმოლ, pH 8.0.

### 3.5. NAD<sup>+</sup>-L-ლაქტატდეჰიდროგენაზას ხსნარი:

გლიცინის ბუფერი (0,5მოლ, pH9,0) - 2,5 მლ; NAD<sup>+</sup>-ის ხსნარს (17,9მგ NAD<sup>+</sup>/1მლ წყალში) - 0,25 მლ; L-ლაქტატდეჰიდროგენაზა – 0,02 მლ (Boehringer-Mannheim).

### 3.6. NAD<sup>+</sup>-D- ლაქტატდეჰიდროგენაზას ხსნარი:

გლიცინის ბუფერი (0,5მოლ, pH9,0) - 2,5 მლ; NAD<sup>+</sup>-ის ხსნარს (17,9მგ NAD<sup>+</sup>/1მლ წყალში) - 0,25 მლ; D-ლაქტატდეჰიდროგენაზა – 0,04მლ (Boehringer-Mannheim)

### 3.7. კოლორიმეტრიული რეაქტივი:

რეაქტივის მოსამზადებლად 6 მლ წყალში ხსნიან p-  
 იოდონიტროტეტრაზოლიუმის ლურჯის (Sigma) 10 მგ და  
 ფენაზინომეტასულფატის (Sigma) 6 მგ, რის შემდეგ საერთო მოცულობა აყავთ 10  
 მლ-მდე.

### 3.8. ხსნარები ურეაზული აქტივობის დასადგენად:

A ხნარი: შარდოვანა - 2გ/ლ (გახსნილი 95% ეთანოლში),სტერილური წყალი – 4მლ.  
 B ხსნარი: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1გ/ლ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1გ/ლ; NaCl – 5გ/ლ; ფენოლის წითელი –  
 20მგ/მლ

### 3.9. ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელ-ელექტროფორეზისთვის (SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrilammide gel electrophoresis) საჭირო რეაქტივები:

#### 3.9.1. სინჯის ბუფერი (Sample buffer) (ერთ-ჯერადი):

62,5 მმოლ/ლ ტრის-HCl pH 6,8; 25% გლიცეროლი; 2% ნატრიუმ დოდეცილ  
 სულფატი, 5% β-მერკაპტოეთანოლი; 0,5% (წონა/მოცულობაზე) ბრომფენოლის  
 ლურჯი; დეიონიზირებული H<sub>2</sub>O (Milly Q).

#### 3.9.2. საწყისი ბუფერი (Running (electrode) buffer) (ერთ-ჯერადი):

25 მმოლ/ლ ტრის, 192 მმოლ გლიცინი; 0,1% ნატრიუმ დოდეცილსულფატი; pH 8,3.

#### 3.9.3. ბისაკრილამიდი (30%):

29,2გ აკრილამიდი, 0.8გ N'N'-Bis-მეთილენ აკრილამიდი, 100მლ  
 დეიონიზირებული H<sub>2</sub>O (Milly Q)

#### 3.9.4 შემკრები გელი (Stacking Gel) - 4% (0,125 მოლ/ლ ტრის, pH 6.8) – 10 მლ /

ორი გელისთვის:

ბისაკრილამიდი (30%) .....	1.3Mმლ
ზედა გელის ხსნარი (0.5 მოლ ტრის-HCl/ pH 6,8).....	2.5 მლ
H <sub>2</sub> O MillyQ .....	6.1 მლ
10% ნატრიუმდოდეცილსულფატი .....	100 მკლ
Temed (N,N,N',N'-ტეტრა-მეთილენ დიამინი).....	10 მკლ
ამონიუმის პერსულფატი 10% .....	100 მკლ

**3.9.5. გამყოფი გელი (Separating Gel) – 12% (0,375 მოლ/ლ ტრის, pH 8.8) – 10 მლ / ორი**

**გელისთვის:**

ბისაკრილამიდი (30%) .....	4.0Mმლ
ქვედა გელის ხსნარი (1.5 მოლ ტრის -HCl/ pH 8,8).....	2.5 მლ
H <sub>2</sub> O MillyQ .....	3.3 მლ
10% ნატრიუმდოდეცილსულფატი .....	100 მკლ
Temed .....	7 მკლ
ამონიუმის პერსულფატი 10% .....	100 მკლ

**3.9.6. საღებავი ხსნარი:**

მეთანოლი/ დეიონიზირებული H<sub>2</sub>O (Milly Q)/ძმარმჟავა (შეფარდებით 5:5:2); 0.1% კუმასის ლურჯი R-250 (Sigma).

**3.9.7. გამაუფერებელი ხსნარი:**

30% მეთანოლი, 10% ძმარმჟავა, 60% დეიონიზირებული H<sub>2</sub>O (Milly Q)..

**3.10. Cd-ნინჰიდრინის რეაქტივი:**

ნინჰიდრინი 0,8გ, ეთანოლი 80 მლ; ძმარმჟავა 10მლ, მიღებულ ხსნარს ემატება 1მლ წყალში გახსნილი CdCl<sub>2</sub> (1გ).

**3.11. გრამის საღებავები (Merck)**

გრამის წესით შეღებვისათვის გამოყენებული იყო გრამის საღებავები, რომელთა შემადგენლობა მოყვანილი ლიტერატურულ წყაროებში [55].

**4. დნმ-ის მასის განმსაზღვრელი მარკერები:**

- 1) მასის განმსაზღვრელი დნმ-ის კიბე, მაღალი რანგის მარკერი Mass Ruler DNA Ladder, High Range marker (MBI Fermentas);
- 2) გენის განმსაზღვრელი დნმ-ის კიბე, შერეული რანგის მარკერი

Gene Ruler DNA Ladder, Mix range (bp) 100-1000 (MBI Fermentas);

3) მასის განმსაზღვრელი დნმ-ის კიბე, დაბალი რანგის მარკერი

Mass Ruler DNA Ladder, Low Range marker (MBI Fermentas);

4) დნმ-ის 50 ფუძეთა წყვილის მარკერული კიბე

50bp DNA Ladder marker (Pharmacia).

## თავი 6. მეთოდები

### 1. საკვები პროდუქტებიდან რძემჟავა კოკების გამოყოფის მეთოდი [4]

მაწვნის საკვლევი ნიმუშებს გამოკვლევის წინ ანჯღრევენ, უმატებენ 9 მლ სტერილურ 0,85% NaCl-ის ხსნარს. მიღებული სინჯის  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  განზავების 1 მლ-ს შპატელის მეშვეობით თანაბრად ანაწილებენ M17 2% აგარის შემცველ პეტრის ფინჯნის ზედაპირზე. ფინჯნების ინკუბაცია მიმდინარეობს აერობულ პირობებში  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე 24-48 საათის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ მიღებულ კოლონიებს გრამის მეთოდით ღებავენ და ახდენენ გრამ-დადებითი კოკების გადარჩევას. მის შემდეგ ცალკეული კოლონიები გადაქვთ M17 ბულიონში. გამოყოფილ შტამებს ინახავენ 80%-ან გლიცეროლის ხსნარში  $-80^{\circ}\text{C}$ -ზე.

### 2. ბაქტერიების სახეობათა ფენოტიპური იდენტიფიკაციის API (Assay of Phenotypic Identification) \_ბიოქიმიური მეთოდი

ამ მეთოდით ხდება ბაქტერიების კარბოჰიდრატული პროფილების დადგენა. გამოყენებული იყო AAPI-20 Strep (Bio-Merieux) ტესტები გამომშვების შესაბამისი ინსტრუქციის მიხედვით.

### 3. ქრომოსომული დნმ-ის გამოყოფა ფენოლ-ქლოროფორმის მეთოდით [85]

24 საათიანი ბაქტერიული კულტურის 500 მკლ-ის ცენტრიფუგირებით (15000 ბრ/წთ; 5წთ.) მიღებულ ნალექს უმატებენ 400 მკლ ტრის-EDTA (1ჯერადი) და 15 მკლ ლიზოციმის ხსნარს (20 მგ/მლ).

$37^{\circ}\text{C}$ -ზე 60 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ მიღებულ სუსპენზიას უმატებენ 15მკლ ნატრიუმდოდეცილსულფატის წყალხსნარს (20% წონა/მოცულობაზე) და 15მკლ პროტეინაზა K-ს ხსნარს (18 მგ/მლ). სინჯს საინკუბაციოდ 15 წუთით ათავსებენ  $55^{\circ}\text{C}$ -

ზე, შემდეგ აცენტრიფუგირებენ (15000 ბრ/წთ, 15წთ) და შეაქვთ ტრის-HCl-ით გაჯერებული ფენოლის 250 მკლ. ფენოლის მოშორების შემდეგ, სუპერნატანტს უმატებენ 400 მკლ ქლოროფორმს. სინჯს ანჯღრევენ და კვლავ აცენტრიფუგირებენ (15000 ბრ/წთ; 5 წთ). მიღებული სუპერნატანტი გადაქვთ სტერილურ ეპენდორფის სინჯარაში, სადაც შეაქვთ 40 მკლ ნატრიუმის აცეტატის ხსნარი (3 მოლ; pH 5.2) და 800 მკლ ეთანოლი (99% მოცულობა/მოცულობაზე). მომდევნო ცენტრიფუგირების (15000 ბრ/წთ; 30წთ; - 4°C) და სუპერნატანტის მოშორების შემდეგ დალექილ დნმ-ს რეცხავენ 300 მკლ ეთანოლში (70%).

საბოლოო ცენტრიფუგირების (15000 ბრ/წთ; 5წთ) და ეთანოლის მოშორების შემდეგ, დალექილ დნმ-ს აშრობენ ვაკუუმის ცენტრიფუგაში 30°C-ზე 5-10 წუთის განმავლობაში. დნმ-ს ხსნიან 40 მკლ სტერილურ დისტილირებულ წყალში და ინახავენ -20°C-ზე.

დნმ-ის რაოდენობას საზღვრავენ სპექტროფოტომეტრულად 260 ნმ-ის სიგრძის ტალღაზე. დნმ-ის განსაზღვრულ რაოდენობას იყენებენ სხვადასხვა PCR-სთვის.

## 5. PCR (Polymerase Chain Reaction) – პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდი [155]

PCR-ისთვის ამზადებენ სარეაქციო ნარევს (30 მკლ), რომელიც შეიცავს: ერთ-ჯერადი PCR ბუფერს, 2 მმოლ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 მმოლ თითოეული dNTP, 0,3 მკმოლ F პრაიმერს, 0,3 მკმოლ R პრაიმერს, 5% DMSO-დიმეთილსულფოქსიდს (Sigma), 1,3U TaqDNA პოლიმერაზას (Pharmacia) და 15 ნგ ბაქტერიულ დნმ-ს.

დნმ-ის კონკრეტული ფრაგმენტის (გენის) ამპლიფიკაციისათვის იყენებენ განსაზღვრული თანმიმდევრობის მქონე პრაიმერებს. PCR-ს ატარებენ პროგრამირებად თერმოციკლერში (Termosycker BioRad). ტემპერატურული რეჟიმები დამოკიდებულია გამოყენებული პრაიმერების და დნმ-ის სამიზნე უბნის სპეციფიკაზე. ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული პროდუქტების ვიზუალიზაციას ახდენენ აგაროზის გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით.

### 5.1 16S-23S სპეისერული უბნის დადგენა PCR-ის მეთოდით [100]

ა) სტრუქტოკოკების იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული შემდეგი პრაიმერები:

ITS F 5'-GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA-3'

ITS R 5'-CCA GGC ATC CAC CGT-3'

ბ) ენტეროკოკების იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იყო შემდეგი პრაიმერები:

G1 5' GAA GTC GTAACAAGG 3'

L1 5' CAAGGCATCCACCGT 3'

PCR-ის წარმართვისათვის გამოყენებული იყო შემდეგი ტემპერატურული რეჟიმები: საწყისი დენატურაცია - 92°C-2წთ; ამპლიფიკაციის (94°C-45წმ / 55°C-1წთ/ 72°C-2წთ) 5 ციკლი და (92°C-45წმ / 60°C-45წმ / 72°C-2წთ) 35 ციკლი; საბოლოო რენატურაცია - 72°C-7წთ.

### 5.2 *lacZ* გენის დადგენა PCR-ის მეთოდით [116]

*lacZ* გენის ამპლიფიკაციისთვის გამოყენებული იყო შემდეგი პრაიმერები:

*lacZ* F: 5' CAC TAT GCT CAG AAT ACA 3'

(შეესაბამება *lacZ* გენის 166-184 ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას)

*lacZ* R: 5' CGA ACA GCA TTG ATG TTA 3'

(შეესაბამება *lacZ* გენის 1133-1115 ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას)

PCR-ის წარმართვისათვის გამოყენებული იყო შემდეგი ტემპერატურული რეჟიმები: საწყისი დენატურაცია 94°C-2წთ; ამპლიფიკაციის 30 ციკლი (90°C-30წმ / 54°C-1'10წმ / 72°C-30წმ); საბოლოო რენატურაცია 72°C-10წთ.

### 5.3. *ureC* გენის დადგენა PCR-ის მეთოდით [131]

*ureC* გენის ამპლიფიკაციისთვის გამოყენებული იყო შემდეგი პრაიმერები:

*ure* CDO F 5'- CTG TTC ATG ATC CTA TTC AG-3'

(შეესაბამება *ureC* გენის 1719-1739 ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას)

*ure* CDO R 5'- CAA CAC CAA TAG CTA GGA CA-3'

(შეესაბამება *ureD* გენის 860-840 ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას)

PCR-ის წარმართვისათვის გამოყენებული იყო შემდეგი ტემპერატურული რეჟიმები: საწყისი დენატურაცია 95°C-2წთ; ამპლიფიკაციის 40 ციკლი (94°C-45წმ / 58°C-35წმ / 72°C-2წთ); საბოლოო რენატურაცია 72°C-7წთ.

***prtS* გენის დადგენა PCR-ის მეთოდით [165]**

*prtS* გენის ამპლიფიკაციისთვის გამოყენებული იყო შემდეგი პრაიმერები:

*prtS* F 5' - TGT TCC TGA CGC AAT CGT CA-3'  
*prtS* R 5'- CGT GCA TAC CGT GTG AAC GT-3'

PCR-ის წარმართვისათვის გამოყენებული იყო შემდეგი ტემპერატურული რეჟიმები: საწყისი დენატურაცია 94°C-2წთ; ამპლიფიკაციის 40 ციკლი (94°C-45წმ / 56°C-35წმ / 72°C-50წმ); საბოლოო რენატურაცია 72°C-7წთ.

**6. აგაროზის გელ-ელექტროფორეზის მეთოდი [155]**

ელექტროფორეზისთვის იყენებენ 1,5% აგაროზის გელს. გელის დასამზადებლად და ელექტროფორეზისთვის იყენებენ TBE ბუფერს. თითოეულ ფოსოზე დატანილი სინჯი შეიცავს 2 მკლ გელის დასატვირთ ხსნარს და PCR-ის პროდუქტის 3 მკლ. ელექტროფორეზს ატარებენ ჰორიზონტალურ აპარატში (100-150V). გელს დებავენ ეთიდიუმ ბრომიდის 5 მმოლ ხსნარში (Sigma) 20 წუთის განმავლობაში, შემდეგ რეცხავენ დისტილირებული წყლით. შედეგების ანალიზს ახდენენ ულტრაიისფერი UV-ტრანსილუმინაციის მეშვეობით. სურათის დოკუმენტირებისათვის იყენებენ Gel-Doc2000 (BIO-RAD) სისტემის ფოტოკამერას და Diversity Database 2.1.1 (BIO-RAD) კომპიუტერულ პროგრამას.

**7. განმეორებადი ექსტრაგენული პალინდრომული უბნების პოლიმერაზული**

**ჯაჭვური რეაქციის მეთოდი [184, 185]**

**(Rep-PCR -Repetitive Extragenic Palindromic-PCR)**

ბაქტერიული დნმ-ის გამოსაყოფად იყენებენ სტანდარტულ ფენოლ-ქლოროფორმის მეთოდს (იხ. მეთოდები 3)

Rep-PCR-სთვის იყენებენ ჩვეულებრივი ან 6-FAM (6-კარბოქსიფლუორესცინი) ფლუოროცენტული საღებავით მონიშნული BOXA1R პრაიმერს: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG-3'.



გენომური დნმ-ის რაოდენობას საზღვრავენ აგაროზის გელში  $\lambda$ -დნმ მარკერის გამოყენებით (Sigma) და სპექტროფოტომეტრულად 260 ნმ-ზე (SmartSpec 3000 spectrophotometer, Biorad, Milan, Italy).

Rep-PCR-სთვის გამოყენებული სარეაქციო ნარევი (30მკლ) შეიცავს 1 ჯერად PCR-ის ბუფერს (Pharmacia, Italy), 2 მმოლ  $MgCl_2$ , 0.10 მმოლ dNTP, 0,8 მკმოლ პრაიმერ BOXA1R (ან BOX6FAM), 5 % DMSO- დიმეთილსულფოქსიდი (Sigma), 1,3U TaqDNA პოლიმერაზას (Pharmacia), 15ნგ ბაქტერიულ დნმ-ს.

ამპლიფიკაციას ატარებენ შემდეგი ტემპერატურული რეჟიმების დაცვით: საწყისი დენატურაცია  $94^{\circ}C$ -5წთ, ამპლიფიკაციის 35 ციკლი ( $94^{\circ}C$ -1წთ;  $45^{\circ}C$ -1წთ;  $72^{\circ}C$ -2წთ), საბოლოო რენატურაცია  $72^{\circ}C$ -2წთ.

ამპლიფიცირებული პროდუქტების ვიზუალიზაციას ახდენენ 1.5% აგაროზის გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით.

F-Rep-PCR-ის შემთხვევაში ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ანალიზს ატარებენ ლაზერულ სკანერთან და CCD კამერასთან დაკავშირებული კაპილარული ელექტროფორეზის სისტემის ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) გამოყენებით (სინჯების გარბენის დრო 60 წთ, თითოეული სინჯის აღრიცხვის დრო 5 წმ ( $15kV$ -ზე), POP-4 პოლიმერი და  $47\mu m \times 50 \mu m$  კაპილარი). PCR პროდუქტების 3 მკლ ემატებოდა 6-კარბოქსი-X-როდამინი (0,8 მკლ) (Genescan-2500 ROX internal lane standart, Applied Biosystems, Monza, Italy) და დეიონიზირებული ფორმამიდი 15 მკლ.  $95^{\circ}C$  10 წუთიანი დენატურაციის შემდეგ, სინჯები გადააქვთ ყინულზე (5 წთ).

ანალიზის შედეგად მიღებული ელექტროფეროგრამების თითოეული პიკი შეესაბამება დნმ-ის გარკვეული სიდიდის ფრაგმენტს. თითოეული შტამი კი ხასიათდება განსაზღვრული მოლეკულური მასის მქონე ფრაგმენტებისაგან შემდგარი კონკრეტული პროფილით ე.წ. “თითის ანაბეჭდებით”. მიღებული მონაცემების ანალიზისთვის იყენებენ Genescan 3.1.2 კომპიუტერული პროგრამას (Local Southern Method) (Applied Biosystems).

სტატისტიკური ანალიზისათვის ადგენენ ფრაგმენტების (პიკების) საშუალო რაოდენობას და სტანდარტული გადახრას. დნმ-ის ფრაგმენტების (პიკების) არსებობა-არარსებობის აღრიცხვის საფუძველზე იქმნება 0/1 ბინარული მატრიცა.

მსგავსება პროფილებს (შტამებს) შორის ისაზღვრება NTSYSpc 2.01 კომპიუტერული პროგრამის SimQual ფუნქციის მეშვეობით (Applied Biostatistics Inc., UUS), ჟაკარდის კოეფიციენტის გამოთვლის გზით:

$$r_j = A/A+B$$

სადაც, AA – იმ ფრაგმენტების რიცხვი, რომელიც გვხდება ორივე პროფილში  
B – იმ ფრაგმენტების რიცხვი, რომლითაც განსხვავდება ორი პროფილი

ჟაკარდის კოეფიციენტის გამოყენებით ადგენენ მსგავსების მატრიცას. კლასტერული ანალიზის UPGMA მეთოდის (unweighted pair group method with arithmetic average) საშუალებით იქმნება დენდროგრამა, რომელიც გამოხატავს გენეტიკური მსგავსების ხარისხს სხვადასხვა შტამის F-Rep-PCR პროფილებს შორის [163].

#### 8. ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელში უჯრედული ცილის ელექტროფორეზის მეთოდი [149] (WCP-ის SDS-PAGE - SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Whole Cell Proteins)

**უჯრედული ცილების გამოყოფა:** 16 საათიანი კულტურის (1.5 მლ) ცენტრიფუგირებით (10000 ბრ/წთ, 2 წთ) მიღებული ბიომასა 3-ჯერ ირეცხება ტრის-HCl-ის ბუფერში (50 მმოლ, pH 7.0). თითოეულ სინჯს ემატება ლიზოციმის ხსნარის 150 მკლ (2 მგ/მლ, ტრის ბუფერი 50 მმოლ/ლ, pH 8.0) და ე.წ. “შუმის მძივებს” (SIGMA, დიამეტრი 0,150-0,212მმ) რის შემდეგ სინჯს ანჯღრევენ ვორტექსის სანჯღრეველას გამოყენებით (მაქსიმალურ სიჩქარე, 6 წთ). სინჯს ათავსებენ წყლის აბაზანაზე (37°C) და ამუშავებენ ულტრაბგერებით (Sonorex Super 10P, Bandelin) (60 წთ, 3 ციკლი: 10წთ ულტრაბგერებით, 10წთ ულტრაბგერების გარეშე). სინჯს ხელმეორედ ანჯღრევენ ვორტექსის სანჯღრეველას გამოყენებით (მაქსიმალურ სიჩქარე, 6 წთ). ცენტრიფუგირების (12000 ბრ/წ, 5 წთ) შედეგად მიღებული სუპერნატანტი გადააქვთ სტერილური ეპენდორფის სინჯარაში. ექსტრაგირებული ცილების კონცენტრაციას ბრედფორდის მეთოდით საზღვრავენ (იხ. მეთოდები 10).

ელექტროფორეზისთვის ამზადებენ სინჯს, რომელიც შეიცავს სინჯის ბუფერის 15 მკლ და განზავებული სუპერნატანტის 50 მკლ-ს. სუპერნატანტის განზავებისათვის იყენებენ შემდეგ ფორმულას:

$50\text{მკლ} = A\text{მკლ} + B\text{მკლ}$ , სადაც A (სუპერნატანტის რაოდენობა) =  $50 \cdot 0,5/X$  მგ/მლ; X – ექსტრაგირებული ცილების კონცენტრაცია, განსაზღვრული ბრედფორდის მეთოდით; B\_სტერილური წყლის რაოდენობა.

მიღებულ სინჯს აცხელებენ  $95^{\circ}\text{C}$ -ზე 10 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგ სინჯის 15 მკლ შეაქვთ ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელის (იხ. მეთოდი 9) შესაბამის ფოსოში. გელის პირველ და ბოლო ფოსოში შეაქვთ მოლეკულური მასის განმსაზღვრელი მარკერის 5 მკლ (6,500 - 205,000 Dalton, Sigma Marker Wide Range).

მიღებული ცილოვანი პროფილების (“თითის ანაბეჭდების”) ანალიზს და სტატისტიკურ დამუშავებას ახდენენ Diversity Database™ (Bio-Rad) კომპიუტერული პროგრამის მეშვეობით. პირსონის კორელაციის კოეფიციენტის (Pearson product moment correlation coefficient) საფუძველზე იქმნება მსგავსების მატრიცა. პირსონის კორელაციის კოეფიციენტის გამოსათვლელად იყენებენ შემდეგ ფორმულას:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})}{(n-1)s_x s_y}$$

სადაც,  $x_i$  და  $y_i$  – ორი ცვლადის მნიშვნელობები,  $\bar{x}$  და  $\bar{y}$  – ცვლადების საშუალო მნიშვნელობები,  $s_x$  და  $s_y$  – ცვლადების სტანდარტული გადახრა,  $n$  – ნიმუშ-თვისებათა წყვილების რიცხვი.

კლასტერული ანალიზისთვის იყენებენ UPGMA მეთოდს და Systat 10 კომპიუტერული პროგრამას (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 9. ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელ-ელექტროფორეზი (SDS-PAGE) [108]

პოლიაკრილამიდის გელს ამზადებენ ლაემლის მიერ აღწერილი მეთოდის თანახმად (იხ. მასალები 3.9.4 და 3.9.5.). ელექტროფორეზისთვის იყენებენ 5-ჯერად ელექტროდის ბუფერს.

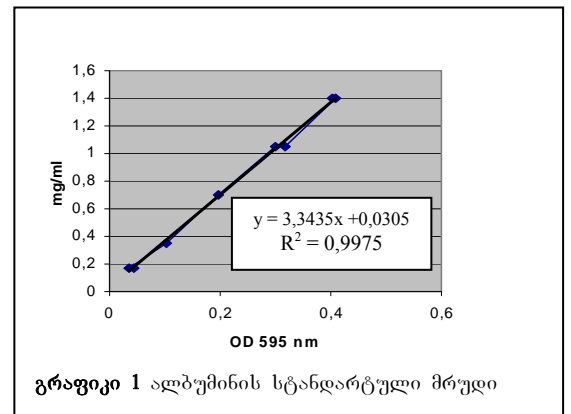
ელექტროფორეზს ატარებენ Mini Protean II ან III (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) სისტემის გამოყენებით, შემდეგი პარამეტრების დაცვით: ვოლტაჟი 200V, ამპერაჟი 37mA, სიმძლავრე 40W, დრო 60-90 წთ, ტემპერატურა 4°C.

შესაღებად გელს 2 საათით ათავსებენ საღებავ ხსნარში, შემდეგ გამაუფერელებელ ხსნარში 30წთ-ით (იხ. მასალები 3.9.6 და 3.9.7). სკანერის (Scanjett 3400C, Hewlett Packard) მეშვეობით იღებენ გელის სურათს.

## 10. ცილების კონცენტრაციის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით [155]

სუპერნატანტის 10 მკლ ემატება 990 მკლ წყალი და 1000 მკლ ბრედფორდის რეაქტივი B (Sigma). სინჯს კარგად ანჯღრევენ და გადააქვთ სემიმკრულ კიუვეტაში. 5 წუთის შემდეგ 595 ნმ სიგრძის ტალღაზე საზღვრავენ სინჯის ოპტიკურ სიმკვრივეს. კონტროლად გამოყენებული ნარევი სუპერნატანტის ნაცვლად შეიცავს 10 მკლ წყალს.

ცილების კონცენტრაციას (მგ/მლ) საზღვრავენ ალბუმინის (Bovine Serum Albumin, fraction V, Sigma) წყალხსნარების (1,4 მგ/მლ; 0,74 მგ/მლ; 0,354 მგ/მლ; 0,144 მგ/მლ; 0,074 მგ/მლ) გამოყენებით აგებული სტანდარტული მრუდის მიხედვით (გრაფიკი 1).



## 11. ბიოქიმიური თვისებების შესწავლის მეთოდები

### 11.1. აციდოფიკაციური აქტივობის შეფასების მეთოდი [145]

ცხიმოხდილი რძის 5 მლ-ში შეაქვთ M17 ბულიონში გაზრდილი 16 საათიანი კულტურა. ინოკულუმის სტანდარტიზაციისთვის იყენებენ შემდეგ ფორმულას:

0,1\*1/OD650nm\*fd, სადაც OD650nm - მბულიონში გაზრდილი 16-საათიანი კულტურის ოპტიკური სიმკვრივეა, 650 ნმ სიგრძის ტალღაზე გაზომილი (ეს მაჩვენებელი არ უნდა აღემატებოდეს 1, საწინააღმდეგო შემთხვევაში კულტურა უნდა განზავდეს); fd - განზავების ფაქტორია.

ინოკულირებული რძის 1 მლ დაუყონებლივ გადააქვთ ყინულში მოთავსებულ სტერილურ ეპენდორფის სინჯარაში. pH იზომება ინკუბაციამდე და 37°C (42°C) 6/24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ.

### 11.2. გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარის შესწავლა [54]

16-საათიანი კულტურის ცენტრიფუგირების შემდეგ (8000 ბრ/წთ, 8 წთ) მიღებული ბიომასა ირეცხება (2-ჯერ) და რესუსპენდირდება 0.85% NaCl ხსნარში. მიღებული სუსპენზია (1% ინოკულუმი) შეაქვთ 5 მლ “BSM + გალაქტოზა” არეში (იხ. მასალა 2.7).

შედეგების შეფასება ხდება 37°C-ზე ინკუბაციის შემდეგ 12, 24 და 36 საათის განმავლობაში. გალაქტოზის უტილიზაციის უნარის მქონე შტამების შემთხვევაში მუქი იისფერი BSM არე იღებს ყვითელ შეფერილობას. (სუსტი აქტივობის შტამების შემთხვევაში არე იღებს ღია ნარინჯისფერ შეფერილობას)

### 11.3. რბემჟავას ოპტიკური იზომერების წარმოქმნა [187]

მოდიფიცირებულ MRS-ში გაზრდილ 48-საათიანი კულტურის 1.5 მლ აცხელებენ 100°C-ზე 2-3 წუთის განმავლობაში.

მიკროტიტრული ფინჯნის ღრმულების პირველ რიგში ათავსებენ ნარევს, რომელიც შეიცავს: 100 მკლ NAD<sup>+</sup>-L-ლაქტატდეჰიდროგენაზას ხსნარს, 5 მკლ ბაქტერიულ კულტურას და 5 მკლ კოლორიმეტრიულ რეაქტივს.

ღრმულების მეორე რიგში ათავსებენ ნარევს, რომელიც შეიცავს: 100 მკლ NAD<sup>+</sup>-D-ლაქტატდეჰიდროგენაზას ხსნარს, 5 მკლ ბაქტერიულ კულტურას და 5 მკლ კოლორიმეტრიულ რეაქტივს (იხ. მასალები 3.5; 3.6; 3.7).

ორივე შემთხვევაში მზადდება საკონტროლო ნარევი, რომელიც ბაქტერიული კულტურის ნაცვლად სტერილურ MRS არეს შეიცავს. დადებით კონტროლად იყენებენ

ნარეგებს, რომელიც შეიცავს იდენტიფიცირებულ სახეობების კულტურას. ფინჯნების ინკუბაციას ატარებენ 37°C-ზე, სიბნელეში, 30 წუთის განმავლობაში.

შედგების განხილვა: თუ შტამი წარმოქმნის რძემჟავას L(+) იზომერს L-ლაქტატდეჰიდროგენაზის შემცველი ღრმული შეიფერება ყოლოსფრად, თუ შტამი წარმოქმნის D(-) იზომერს D-ლაქტატდეჰიდროგენაზის შემცველი ღრმული შეიფერება ყოლოსფრად. DL რძემჟავას წარმოქმნის შემთხვევაში ნარევი ორივე ღრმულში ყოლოსფრად იფერება.

#### 11.4. ურეაზული აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი [111]

16-საათიანი კულტურის ცენტრიფუგირებით (8000 ბრ/წთ 8 წუთ) მიღებულ ბიომასას ემატება A და B ხსნარი (იხ. მასალები 3.8.) შეფარდებით 1:19.

შედგების აღრიცხვა ხდება 37°C 1-12სთ ინკუბაციის შემდეგ: ურეაზა-დადებითი რეაქციის შემთხვევაში სუსპენზია ღებულობს მუქ ვარდისფერ ან იისფერ შეფერილობას. დადებითი კონტროლისათვის იყენებენ *Proteus vulgaris*, უარყოფითი კონტროლისთვის კი *E.coli* შტამებს.

#### 11.5. კაზეინის დაშლის უნარის შესწავლის მეთოდი [165]

16-საათიანი კულტურის 10 მლ-ის ცენტრიფუგირებით (6000 ბრ/წთ 5 წთ.) მიღებულ ბიომასას ემატება 3 მლ 0.1 მოლ ტრის-HCl, pH 8.0. მომდევნო ცენტრიფუგირების შემდეგ, ბიომასა რესუსპენდირდება 500 მკლ 0.1 მოლ ტრის-HCl, pH 8.0. მიღებული სუსპენზია გადაქვთ 3 სტერილურ ეპენდორფის სინჯარაში. ცენტრიფუგირების შემდეგ ერთ სინჯს უმატებენ 500 მკლ - 2 მმოლ CaCl<sub>2</sub>, მეორეს კი 500 მკლ - 10 მმოლ CaCl<sub>2</sub>. სამივე სინჯს ემატება 5 მკლ კაზეინის ხსნარი (10 მგ/მლ). საკონტროლო სინჯი შეიცავს მხოლოდ კაზეინის და 10 მმოლ CaCl<sub>2</sub> ხსნარს.

ინკუბაციისათვის სინჯებს 4 საათით ათავსებენ 37°C-ზე. ინკუბაციის შემდეგ სუსპენზიის ცენტრიფუგირებით მიღებული სუპერნატანტის 50 მკლ გადააქვთ სტერილურ ეპენდორფის სინჯარაში.

შედგების ვიზუალიზაციას ახდენენ ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელში (იხ. მეთოდები 9). ელექტროფორეზისთვის მზადდება

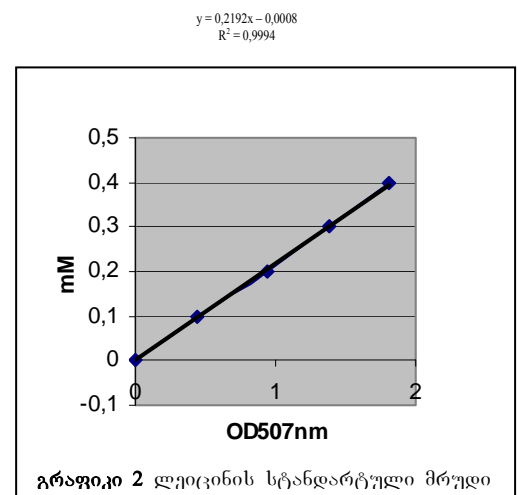
სინჯი, რომელიც შეიცავს გამოსაკვლევი სუსპენზიის 50 მკლ და სინჯის ბუფერს 50 მკლ. მიღებულ სინჯს აცხელებენ 95°C 10 წუთის განმავლობაში, რის შემდეგ სინჯის 15 მკლ შეაქვთ პოლიაკრილამიდის გელის შესაბამის ფოსოში.

### 11.7. პროტეოლიზური აქტივობის შესწავლის მეთოდი [145]

ცხიმოხდილი რძის 5 მლ-ში შეაქვთ გამოსაკვლევი შტამის 50 მკლ. 37°C 24 საათიანი და 7 დღიანი ინკუბაციის შემდეგ, გაზრდილი კულტურის 1,5 მლ გადააქვთ სტერილურ ეპენდორფის სინჯარაში. ცენტრიფუგირების (14000 ბრ/წთ 15 წთ) შემდეგ მიღებულ სუპერნატანტში თავისუფალი ამინომჟავების კონცენტრაციას Cd-ნინჰიდრინის მეთოდით საზღვრავენ [68].

Cd-ნინჰიდრინის მეთოდი: სუპერნატანტის 100 მკლ უმატებენ 400 მკლ დისტილირებულ წყალს და 1 მლ-ი Cd-ნინჰიდრინის რეაქტივს. მიღებულ სინჯს აცხელებენ 84°C 5 წუთის განმავლობაში და ყინულზე გაცივების შემდეგ 507 ნმ სიგრძის ტალღაზე დაუყონებლივ საზღვრავენ ოპტიკური სიმკვრივეს. საკონტროლო სინჯი სუპერნატანტის ნაცვლად შეიცავს 100 მკლ დისტილირებულ წყალს. ნინჰიდრინი ურთიერთქმედებს ამინომჟავებთან, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ქრომოფორი, რომლის სპექტროფოტომეტრული შეფასება წარმოადგენს ამ მეთოდის საფუძველს.

თავისუფალი ამინომჟავების მოლური კონცენტრაცია ისაზღვრება სინჯის ოპტიკური სიმკვრივის მიხედვით, ლეიცილის სტანდარტული მრუდის გამოყენებით. სტანდარტული მრუდის ასაგებად იყენებენ ლეიცილის 0,4 მმოლ, 0,3 მმოლ, 0,2 მმოლ, და 0,1 მმოლ წყალხსნარებს (გრაფიკი 2).



შედგები (თავისუფალი ამინომჟავების კონცენტრაცია -  $C_{\text{ამინ}}$  მგ/ლ) მოცემულია ლეიცილის ექვივალენტური რაოდენობით, რომელიც გამოთვლილია შემდეგი ფორმულის მიხედვით:  $C_{\text{ამინ}} = Y \cdot 131.2$ , სადა  $Y$ - ამინომჟავების მოლური კონცენტრაციაა.

### 11.8. პეპტიდაზური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი [145]

M17 ბულიონში (36 მლ) შეაქვთ 16-საათიანი კულტურის 4 მლ.  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე 16 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ 650 ნმ სიგრძის ტალღაზე იზომება ოპტიკური სიმკვრივე (საჭიროებისამებრ, ანუ თუ ოპტიკური სიმკვრივის მაჩვენებელი  $OD > 0,7$  უჯრედულ სუსპენზიას ანზავებენ სტერილური 0,85% NaCl-ით), რის შემდეგ კულტურას აცენტრიფუგებენ 10000 ბრ/წთ 5 წუთის განმავლობაში. მიღებულ ბიომასა ირეცება (2-ჯერ) 0,85% NaCl-ით და იხსნება 35 მლ ტრის-HCl-ში (50 მმოლ/ლ, pH 8.0). U

ბაქტერიული უჯრედების ლიზისს ახდენენ 5 წთ განმავლობაში ულტრაბგერების ზემოქმედებით (Bandelin Sonoplus HD200; ციკლი 50%, სიმძლავრე MS 73/D), ამის შემდეგ სინჯის (ლიზატის) 1 მლ აცენტრიფუგირებენ 12000 ბრ/წთ 15წთ, მიღებულ სუპერნატანტში ცილების კონცენტრაციას საზღვრავენ ბრედფორდის მეთოდით (იხ მეთოდები 10).

პეპტიდაზური აქტივობის შესაფასებლად მზადდება სინჯი რომელიც შეიცავს: სუპერნატანტის 75 მკლ; კალიუმის ფოსფატის ბუფერის (50 მმოლ/ლ pH 7.0) 195 მკლ; ნატრიუმის აზიდის წყალხსნარის (0,05%) 90 მკლ; aa-pNA (p-ნიტროანილიდი) –ის (20 მმოლ/ლ ხსნარი მეთანოლში) 30 მკლ, aa-pNA წარმოდგენილია შემდეგი პეპტიდებით:

L-lys-pNA (Sigma) – ზოგადი PepN და PepC ამინოპეპტიდაზებისათვის;

L-glu-pNA (Sigma) – გლუტამილამინოპეპტიდაზისათვის (PepA);

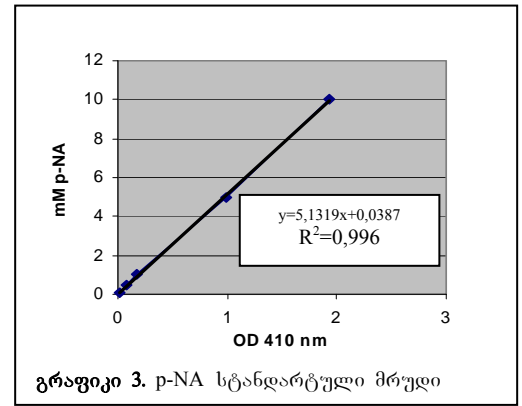
L-pro-pNA (Sigma) – პროლინიმინოპეპტიდაზებისათვის (PepI);

Arg-pro-pNA(Sigma) – პროლილდიპეპტიდილამინოპეპტიდაზებისათვის (PepX)

წყლის აბაზანაზე  $37^{\circ}\text{C}$  4 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ რეაქციის შესაჩერებლად სინჯს ემატება ძმარმჟავას (10%) 0,9მლ და 410 ნმ-ზე იზომება ოპტიკური სიმკვრივე. საკონტროლო სინჯი სუპერნატანტის ნაცვლად შეიცავს 75 მკლ ტრის-HCl ბუფერს.

თავისუფალი p-NA კონცენტრაციას საზღვრავენ სტანდარტული მრუდის მიხედვით. სტანდარტულ მრუდს აგებენ p-ნიტროანილიდის (20





თითოეული პეპტიდაზას ხვედრითი კატალიზურ აქტივობას საზღვრავენ 4 საათიანი (14400 წმ) ინკუბაციის შემდეგი ფორმულის მიხედვით:

XX პეპტიდაზას ხვედრითი კატალიზური აქტივობა (მიკროკატალი/მგ) =  $1000000 \cdot ((A/1000)/B)/14400$ , სადაც A - XX პეპტიდაზას აქტივობის შედეგად გამოთავისუფლებული pNA-ის მოლური კონცენტრაციაა (მმოლ), B - ცილების კონცენტრაციაა (მგ/მლ). 1 კატალი არის ფერმენტის ის რაოდენობა რომელიც ახდენს pNA 1 მოლის გამოთავისუფლებას 1 წამში.

### 11.9. ბაქტერიული უჯრედების აუტოლიზური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი [145]

იღებენ ოპტიმალურ ტემპერატურაზე გაზრდილ 16-საათიან კულტურას და 650 ნმ სიგრძის ტალღაზე საზღვრავენ მის ოპტიკურ სიმკვრივეს. საჭიროებისამებრ, ანუ თუ ოპტიკური სიმკვრივის მაჩვენებელი  $OD > 0,7$ , უჯრედულ სუსპენზიას ანზავებენ სტერილური 0,85% NaCl-ით.

კულტურის 1,5 მლ გადააქვთ სტერილურ ეპენდორფის სინჯარაში (თითო შტამისთვის 3 სინჯი), აცენტრიფუგირებენ 10000 ბრ/წთ 5 წუთის განმავლობაში, ამორებენ სუპერნატანტს და ბიომასას 2-ჯერ რეცხავენ სტერილური 0,85% NaCl. გარეცხილ ბიომასას ხსნიან 1 მლ სხვადასხვა pH-ის მქონე ბუფერში: 1) კალიუმის ფოსფატი 50 მმოლ/ლ pH 7; 2) ნატრიუმის ლაქტატის (10გ/ლ) და ნატრიუმის ქლორიდის (40გ/ლ) წყალხსნარი pH 5,1; 3) NaCl 11,7გ/ლ (0,2M) pH 5,5.

შესაბამის ბუფერში მიღებული უჯრედული სუსპენზიის OD ზომავენ 650 ნმ-ზე ინკუბაციამდე ( $OD_0$ ), 40°C-ზე 30 წთ ( $OD_{30}$ ) და 180 წთ ( $OD_{180}$ ) ინკუბაციის შემდეგ.

საკონტროლო სინჯი შეიცავს შესაბამის ბუფერს და სტერილურ 0,85% NaCl-ს. (N.B. ყველა პროცედურა უნდა განხორციელდეს ძალიან სწრაფად, ყინულში მოთავსებული ეპენდორფის სინჯარაში ან კიუვეტაში).

აუტოლიზურ აქტივობას აფასებენ ორი პარამეტრის მიხედვით:

აუტოლიზის სიჩქარე: RA (Rate of Autolysis) =  $(OD_0 - OD_{30}) / OD_{30}$

აუტოლიზის ხარისხი: EA (Extent of autolysis) =  $(OD_0 - OD_{180}) / OD_0$

### 11.10. პოლისაქარიდების წარმოქმნის უნარის შესწავლა

ა) M17 ბულიონში გაზრდილ 16-საათიან კულტურას თესვენ RRM აგარზე. ეგზოპოლისაქარიდების პროდუცენტი შტამები RRM აგარზე წარმოქმნის თეთრ ან ვარდისფერ კოლონიებს. შტამები, რომლებსაც არ შესწევს ეგზოპოლისაქარიდების სინთეზის უნარი წარმოქმნის მუქ-ვარდისფერ ან წითელ კოლონიებს [168].

ბ) MRS +საქაროზა არეს შემცველი ფინჯნების ზედაპირზე აწვეთებენ საცდელი კულტურის 5 მკლ (თითო ფინჯანზე 6 შტამი). ინკუბირებას ახდენენ ფინჯნების გადატრიალების გარეშე 48 საათის განმავლობაში. პოლისაქარიდების (დექსტრანის) წარმოქმნელი შტამები ქმნის საკმაოდ მსხვილ კოლონიებს, რომლის საზღვრებზე აღინიშნება სხივისებური გამონაზარდები [145].

### 11.11. ბიოგენური ამინების წარმოქმნის უნარის შესწავლა [101]

ტიროზინიდან ტირამინის წარმოქმნის უნარის შესაფასებლად L-ტიროზინის შემცველი TSB 1,2% აგარიანი (100 მლ TSB 1,2% აგარი + 10 მლ დისტილირებულ წყალში გახსნილი ტიროზინი 0,5 გ) ფინჯნის ზედაპირზე აწვეთებენ საცდელი შტამის 5 მკლ. შედეგი დადებითად ითვლება იმ შემთხვევაში თუ საცდელი შტამის გარშემო წარმოიქმნება გამჭვირვალე ზონა.

### 12. ანტაგონისტური აქტივობის შესწავლა [146]

MRS აგარის შემცველი ფინჯნის ზედაპირზე აწვეთებენ ტესტ-შტამის 16-საათიანი კულტურის 5 მკლ (ერთ ფინჯანზე 6 სხვადასხვა ტესტ-შტამი). ოპტიმალურ პირობებში 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ტესტ-შტამების შემცველი ფინჯნებს ამუშავებენ

ქლოროფორმით (30 წთ). MRS, TSBYE ან BH ბულიონში გაზრდილი ინდიკატორული შტამის O100 მკლ შეაქვთ MRS+0,7% აგარში (*L. lactis*, *L. plantarum* შემთხვევაში), TSBYE+0,7% აგარში (*L. innocua*, *M. luteus* შემთხვევაში) ან BH+07% აგარში (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* და *Shigella flexneri*-ს შემთხვევაში) და თანაბრად ანაწილებენ ტესტ-შტამების შემცველი ფინჯნის ზედაპირზე.

37°C-ზე (*M. luteus* შემთხვევაში 30°C-ზე) 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ინჰიბიტორული აგენტის წარმოქმნილი შტამის კოლონიების გარშემო უნდა წარმოიშვას ნათელი, გამჭვირვალე ზონა.

ფართო ინჰიბიტორული ზონა (>0,3სმ), როგორც წესი, მეტყველებს ინჰიბიტორული აგენტის ბაქტერიოცინურ ბუნებაზე, ასეთ შემთხვევაში ტესტს იმეორებენ: ინდიკატორული შტამის შემცველი აგარის ფინჯნებზე მოთავსებას წინ უსწრებს ტესტ-შტამების დამუშავება ფერმენტებით. ამ პროცედურისთვის მზადდება ტრიპსინის, ქიმოტრიპსინის და პრონაზას ხსნარები (2 მგ/მლ) ტრის ბუფერში (0,05 მოლ pH 7.5 + 0,005 მოლ CaCl<sub>2</sub>). თითოეული ფერმენტს 5 მკლ რაოდენობით აწვეთებენ ტესტ-შტამის კოლონიის გვერდით. თუ ამ შტამის მიერ პროდუცირებული ინჰიბიტორული აგენტი მგრძობიარეა რომელიმე ფერმენტის მიმართ, დაწვეთების ადგილას ინჰიბიტორული ზონა არ წარმოიქმნება და პირიქით.

### 13. ლიზოგენური შტამების გამოვლენა ფისკას მეთოდით [67]

24-საათიანი ბაქტერიული კულტურის 0,1-0,2 მლ უმატებენ 0.7%-იანი აგარის 3 მლ. ამ ნარევს თანაბრად ანაწილებენ პეტრის 2%-იანი აგარის შემცველი ფინჯნების ზედაპირზე. მეორე 24-საათიან ბაქტერიულ კულტურას უმატებენ 0,2-0,5 მლ ქლოროფორმს, აყოვნებენ მაცივარში 1 სთ განმავლობაში და შემდეგ მიღებულ ლიზატებს აწვეთებენ შესაბამისი შტამის გაზონზე. დადებითად ითვლება ის შედეგი, როდესაც დაწვეთებული ლიზატის გარშემო წარმოიქმნება ნათელი ზონა.

### ნაწილი III საკუთარი გამოკვლევები

თავი 7. საქართველოს სხვადასხვა კუთხეში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამების იდენტიფიკაცია

2001-2004 წლებში ჩატარებული ორი ექსპედიციის შედეგად საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში მოგროვებული იყო 40 შინაური მაწვნის დედო (ცხრილი 1, სურათი 1). სამუშაოდ შერჩეული დედოების მიკრობიოლოგიური კვლევისას ყურადღება გამახვილებული იქნა კოკოვანი ფორმის შტამებზე.

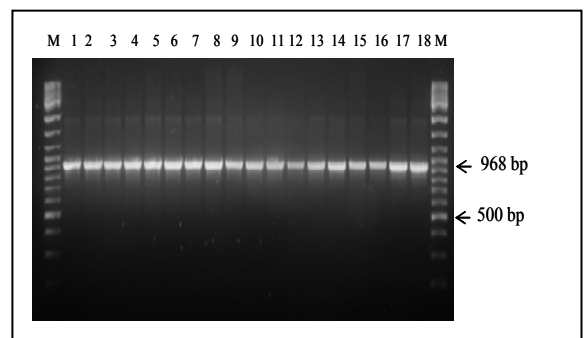
მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან შტამების გამოყოფა განხორციელდა რძემჟავა კოკებისათვის სელექციურ MM17 არეზე. გამოყოფილი იქნა 67 შტამი. მორფოლოგიის და ტინქტორიალური თვისებების შესწავლის შემდეგ დადგინდა, რომ ყველა გამოყოფილი შტამი მორფოლოგიურად წარმოადგენს წყვილებად ან ჯაჭვებად განლაგებულ გრამ-დადებით კოკებს.

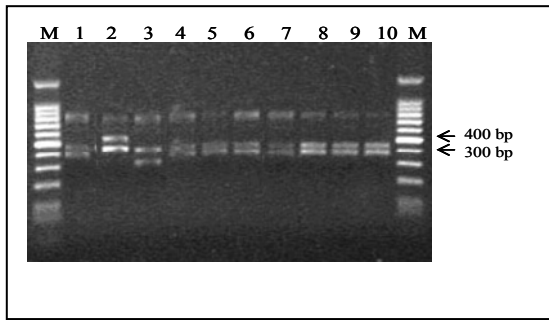
შტამების საწყისი იდენტიფიკაცია განხორციელდა მათი კარბოჰიდრატული პროფილების მიხედვით (API-20 Strep ტესტებით). ამ ეტაპზე გამოყოფილი რძემჟავა კოკები დაიყო 2 ძირითად ჯგუფად: გვ. *Streptococcus* და გვ. *Enterococcus* შტამები.

მომდევნო ეტაპზე, სახეობების იდენტიფიკაცია განხორციელდა 16S-23S გენთაშორისი ტრანსკრიბირებადი სპეისერული უბნის (ITS) ამპლიფიკაციის მეთოდით. 20 შტამის შემთხვევაში მიღებული იყო *E. durans*-ისთვის დამახასიათებელი 300, 400 bp ზომის ფრაგმენტები (სურათი 2).

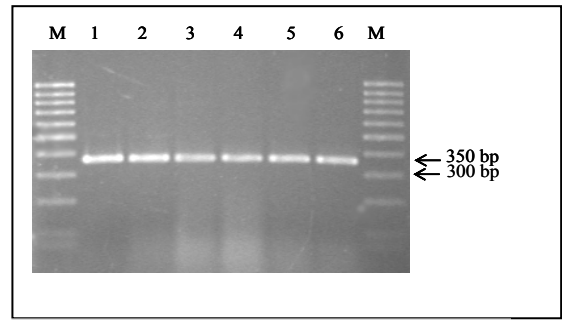
49 შტამის შემთხვევაში დაფიქსირებული იყო მხოლოდ ერთი 350 bp ფრაგმენტი (სურათი 3). ანალოგიური ზომის ფრაგმენტი დამახასიათებელია როგორც *S. thermophilus*, ასევე *S. salivarius*-ის შტამებისათვის, ამიტომ *S. thermophilus*-ის იდენტიფიკაციისათვის ეს მეთოდი საკმარისი არ აღმოჩნდა.

*S. thermophilus*-ის იდენტიფიკაციის დასადასტურებლად გამოყენებული იყო *lacZ* გენის PCR-ის მეთოდი, რომელიც წარმოადგენს ამ სახეობისთვის სპეციფიკურ, ზუსტ მეთოდს. *LacZ* გენის ამპლიფიკაციის შედეგად 49 შტამის შემთხვევაში აღრიცხული იყო 968 bp ზომის პროდუქტი, რომელიც დამახასიათებელია მხოლოდ *S. thermophilus*-ისთვის (სურათი 4).





**სურ. 2** 16S-23S ITS უბნის PCR-ის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ელექტროფორეგრამა *E. faecium* 1 ფრაგმენტების ელექტროფორეგრამა  
**სურ. 3** 16S-23S ITS უბნის PCR-ის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ელექტროფორეგრამა  
 1 - *S. thermophilus* DSM 20617<sup>T</sup> ATCC 49619  
 2-6 - მაწვნიდან გამოყოფილი შტამები  
 M - დნმ-ის მასის მარკერი (Gene Ruler DNA Ladder Mix, range 100-1000 bp)



**სურ. 3** 16S-23S ITS უბნის PCR-ის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ელექტროფორეგრამა  
 1 - *S. thermophilus* DSM 20617<sup>T</sup>  
 2-6 - მაწვნიდან გამოყოფილი შტამები  
 M - დნმ-ის მასის მარკერი (Gene Ruler DNA Ladder Mix, range 100-1000 bp)

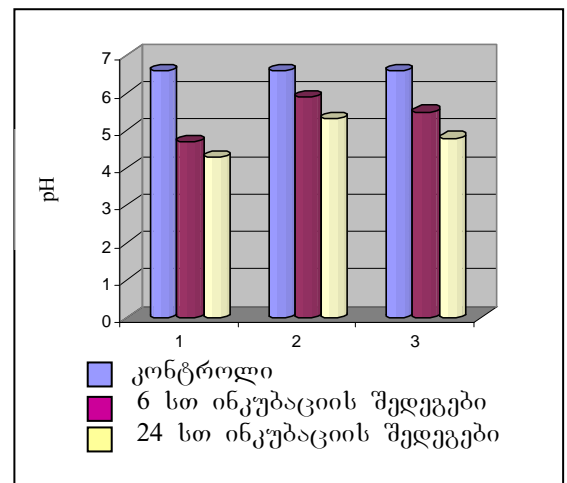
## თავი 8. მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების ფენოტიპურ თვისებების შესწავლა

### 1. მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების აციდოფიკაციური აქტივობის შესწავლა

*S. thermophilus*-ის 49 შტამის აციდოფიკაციური აქტივობა შეფასებული იყო ცხიმმობდილ რძეში 42°C 6 და 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ. სტერილური რძის საწყისი pH იყო 6,58 (1%-ინოკულუმის შედეგად pH 6,56) (ცხრილი 2).

მიღებული შედეგების თანახმად, შესწავლილი შტამები დაიყო 3 ჯგუფად (დიაგრამა 1).

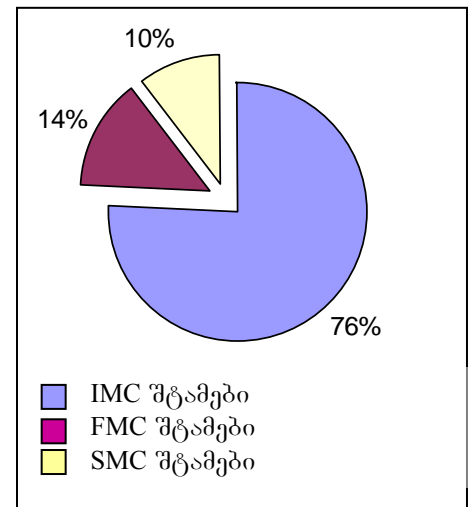
პირველ ჯგუფში გაერთიენებული 11 შტამისათვის (23%) დამახასიათებელი იყო ძლიერი აციდოფიკაციური აქტივობა: pH-ის ცვლილება მაქსიმალური იყო როგორც 6 ასევე 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ( $\Delta$ pH 1,9 და  $\Delta$ pH 2,3 შესაბამისად). 6 შტამი (12%) ავლენდა სუსტ აქტივობას, ამ ჯგუფის შემთხვევაში 6 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ pH მცირდებოდა 5,9-მდე, ხოლო 24 საათიანის შემდეგ 5,3-მდე.



**დიაგრამა 1** მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების აციდოფიკაციური აქტივობა  
 1 - ძლიერი აციდოფიკაციური აქტივობის მქონე შტამები (23%);  
 2 - სუსტი აქტივობის მქონე შტამები (12%);  
 3 - სამესამე, ყველაზე მრავალრიცხოვან შუალეო აქტივობის მქონე შტამები (65%)

ჯგუფში (32 შტამი, 65%) შედიოდა საშუალო აქტივობის მქონე შტამები (6 საათის შემდეგ  $\Delta\text{pH}=1,1$ ; 24 საათის შემდეგ  $\Delta\text{pH} =1,8$ ).

ჩვენს მიერ აგრეთვე შესწავლილი იყო *S. thermophilus*-ის შტამების რძის შედედების უნარი. აღმოჩნდა, რომ შტამების 76% რძეს ადედებს 12-24 საათიან ინტერვალში, 10%-ის შემთხვევაში რძის შედედება შეინიშნება მხოლოდ 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ხოლო მხოლოდ 7 შტამი რძის კოაგულაციას მინიმალურ დროში – 6 საათში იწვევს (ცხრილი 2) მიღებული შედეგების მიხედვით გამოკვლეული შტამები დაიყო 3 ჯგუფად (დიაგრამა 2):



**დიაგრამა 2.** მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების რძის შედედების უნარი

FMC (fast milk coagulation) შტამების ჯგუფი - რძეს ადედებს 0-12 საათში;

IMC (intermediate milk coagulation) შტამების ჯგუფი - რძეს ადედებს 12-24 საათში;

SMC (slow milk coagulation) შტამების ჯგუფი - რძეს ადედებს 24 სთ-ის შემდეგ.

გარდა ამისა, შესწავლილი იყო *S. thermophilus*-ის მიერ სინთეზირებული რძემჟავას კონფიგურაცია, რის შედეგად დადგინდა, რომ ყველა გამოკვლეული შტამი წარმოქმნის ლაქტატის LL – ოპტიკურ იზომერს.

ცხრილი 2. *S.thermophilus*-ის შტამების ფენოტიპური დახასიათება

1	შტამი	ავიდოფიკაციური აქტივობა ცხიმოხდილ რქეში			რძის შედეგების უნარი	გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარი	ურეაზული აქტივობა	EPEPeps-ბის წარმოქმნის უნარი	კაზეინის ჰიდროლიზის უნარი		
		საწყისი pH	pH 6 სთ ინკუბაციის შემდეგ	pH 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ					0,1M Tris-HCl-ის ბუფერში (pH8)	2mM CaCl <sub>2</sub> -ის თანაობისას	10mM CaCl <sub>2</sub> -ის თანაობისას
1	3202	6,59	4,74	4,32	IMC	+w	p	-	-	-	-
2	3203	6,59	5,49	4,82	IMC	+w	p	-	-	-	-
3	3206	6,6	5,52	4,81	IMC	-	p	-	-	-	-
4	3207	6,54	4,70	4,29	FMC	-	w	-	+	+	+
5	3210	6,55	5,55	4,88	IMC	+w	p	-	-	-	-
6	3211	6,7	5,50	4,81	IMC	-	p	-	-	-	-
7	3212	6,68	5,51	4,80	IMC	+	p	-	-	-	-
8	3213	6,68	4,69	4,30	FMC	-	w	-	+	+	+
9	3217	6,54	5,50	4,80	IMC	+w	p	-	-	-	-
10	3219	6,53	5,57	4,83	IMC	-	p	+p	-	-	-
11	3221	6,54	5,50	4,85	IMC	-	w	-	-	-	-
12	3222	6,61	4,7	4,31	FMC	-	p	+p	-	+	+
13	3225	6,48	4,77	4,33	FMC	-	p	-	-	-	-
14	3229	6,6	5,53	4,79	IMC	-	p	-	-	-	-
15	3232	6,54	5,56	4,82	IMC	+w	w	-	-	-	-
16	3233	6,54	4,71	4,32	FMC	+w	p	+p	-	+	+
17	3235	6,55	5,55	4,84	IMC	-	p	-	-	-	-
18	3236	6,58	4,70	4,32	FMC	+w	p	-	-	-	-
19	3238	6,58	4,73	4,31	IMC	-	w	-	-	-	-
20	3239	6,7	5,50	4,81	IMC	+	p	+	-	-	-
21	3240	6,63	5,52	4,85	IMC	+	p	-	-	-	-
22	3242	6,51	4,75	4,32	IMC	-	p	-	-	-	-
23	3245	6,51	4,78	4,29	IMC	-	p	-	-	-	-
24	3248	6,54	5,54	4,83	IMC	+w	p	-	-	-	-
25	3252	6,55	5,56	4,83	IMC	-	p	-	-	-	-
26	3261	6,6	5,50	4,82	IMC	+w	p	-	-	-	-
27	3263	6,58	5,92	5,31	SMC	-	p	-	-	-	-
28	3265	6,54	5,94	5,32	SMC	-	w	-	-	-	-
29	3266	6,49	5,89	5,30	SMC	-	p	-	-	-	-
30	3270	6,57	5,91	5,32	SMC	-	p	+	-	-	-
31	3271	6,63	5,51	4,83	IMC	-	n	-	-	-	-

ცხრილი 2 გაგრძელება

	შტამი	აციდოფიკაციური აქტივობა ცხიმოხდილ რძეში			რძის შედეგების უნარი	გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარი	ურეაზული აქტივობა	მკს-ბის წარმოქმნის უნარი	კაზეინის ჰიდროლიზის უნარი		
		საწყისი პ	პ 6 სთ ინკუბაციის შემდეგ	პ 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ					0,1 ორის-ჩლ-ის ბუფერში (პ 8)	28 ჩაჩლ <sub>2</sub> -ის თანაობისას	108 ჩაჩლ <sub>2</sub> -ის თანაობისას
32	3273	6,61	5,51	4,81	IMC	-	p	-	-	-	-
33	3275	6,58	5,91	5,30	SMC	-	w	+p	-	-	-
34	3276	6,66	5,92	5,29	IMC	-	p	-	-	-	-
35	3278	6,64	4,77	4,31	FMC	-	p	-	-	-	-
36	3279	6,49	5,54	4,81	IMC	-	p	-	-	-	-
37	1B	6,54	5,49	4,86	IMC	-	p	-	-	-	-
38	1D	6,55	5,50	4,84	IMC	-	p	+	-	-	-
39	3B	6,58	5,52	4,84	IMC	-	p	-	-	-	-
40	4A	6,63	5,50	4,85	IMC	-	p	-	-	-	-
41	4B	6,67	5,55	4,80	IMC	-	p	-	-	-	-
42	5B	6,59	5,54	4,80	IMC	-	p	-	-	-	-
43	6A	6,59	5,50	4,86	IMC	-	p	-	-	-	-
44	10B	6,54	5,48	4,82	IMC	-	p	+p	-	-	-
45	10C	6,51	5,57	4,80	IMC	-	p	+	-	-	-
46	11A	6,58	5,50	4,80	IMC	-	p	-	-	-	-
47	12A	6,58	5,50	4,84	IMC	+w	p	+p	-	-	-
48	13B	6,63	5,52	4,82	IMC	-	p	+	-	-	-
49	1720	6,51	5,55	4,81	IMC	-	p	+	-	-	-

**შენიშვნა:**  
 + - დადებითი შედეგი; - - უარყოფითი შედეგი;  
**FMC** – შტამები, რომლებიც რძეს ადედებდა 0-12 საათში;  
**IMC** - შტამები, რომლებიც რძეს ადედებდა 12-24 საათში;  
**SMC** - შტამები, რომლებიც რძეს ადედებდა 24 სთ–ის შემდეგ;  
**p** – ურეაზა-დადებითი შტამები; **w** – სუსტი ურეაზული აქტივობის მქონე შტამები;  
**n** – ურეაზა-უარყოფითი შტამები;  
**+w** – შტამი, რომელიც გალაქტოზის ფერენტაციას სუსტად ახდენდა;  
**+p** - ვარდისფერი კოლონიების მქონე eps-წარმოქმნელი შტამები.

## 2. მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების გალაქტოზის უტილიზაციის უნარის შესწავლა

მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების გალაქტოზის უტილიზაციის უნარი შესწავლილი იყო BSM არეზე, მანის მიერ შემოთავაზებული მეთოდის თანაბრად [56].



გამოვლინდა, რომ გამოკვლეული შტამების 74% არ შესწევს გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარი. მხოლოდ 13 შტამს აბასიათებდა გალაქტოზის შემცველი არის აციდოფიკაციის უნარი. 12 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ერთი შტამი (*S. thermophilus* 3240) ავლენდა გალაქტოზის დაშლის უნარს, 24 საათის შემდეგ კი დადებითი რეაქცია შეინიშნებოდა 12 შტამის შემთავებაში, თუმცა აღსანიშნავია, რომ მხოლოდ 2 შტამისთვის *S. thermophilus* 3239, 3240 დამაბასიათებელი იყო ძლიერი აქტივობა (ცხრილი 2).

მიღებული შედეგები ადასტურებს სუკანასკნელ წლებში გამოქმულ მოსაზრებებს [81,130] იმის შესახებ, რომ *S. thermophilus*-ის ზოგიერთ შტამს ჩვეულებრივ შესწევს გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარი და ამ თვისების გამოვლენა არ საბიროებს შტამების კულტივირებას განსაკუთრებულ სელექციურ პირობებში. შესაბამისად, ეს ფენოტიპური თვისება შეიძლება განაწილდეს იქნას როგორც ვარიანტული შიდასაბიროვი ტაქსონომიური კრიტერიუმი.

### 3. მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების ურეაზული აქტივობა

ჩვენი გამოკვლევის მიზანს წარმოადგენდა მაწვნის დედობიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის 49 შტამის ურეაზული აქტივობის განსაზღვრა და ურეაზა-ნეგატიური ან სუსტი აქტივობის მქონე სტარტერული შტამების კოლექციის შექმნა.

შტამების ურეალიზური ფენოტიპი შესწავლილი იყო ლანის მიერ შემოთავაზებული მეთოდით [111].

მიღებული შედეგების თანახმად შესწავლილი შტამების უმეტესობა (84%) ავლენს შარდოვანას აიდროლიზის უნარს. დადებითი რეაქცია აღინიშნებოდა 2-3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ. რვა შტამისთვის (16%) დამაბასიათებელი იყო სუსტი აქტივობა, კერძოდ დადებითი რეაქცია ვლინდებოდა 10-12 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ. მხოლოდ ერთი შტამის (*S. thermophilus* 3271) შემთავებაში მიღებული იყო უარყოფითი შედეგი (ცხრილი 2).

აღსანიშნავია, რომ შარდოვანას აიდროლიზის დონე იზრდება საკვებ არეში  $Ni^{2+}$  დამატებით. ამ შემთავებაში, სუსტი აქტივობის მქონე შტამები დადებით შედეგს

ავლენდა 3-საათის განმავლობაში, აბლო ურეაზა-ნეგატიური შტამი კი 12-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ. ეს ფაქტი ადასტურებს მოსაზრებას იმის შესახებ, რომ ბაქტერიული ურეაზების უმეტესობა გააქტივებისათვის საჭიროებს არეში  $Ni^{2+}$  იონების თანაობას. ურეაზას სინთეზზე პასუხისმგებელი სტრუქტურული *ureC* გენის სკრინინგისთვის გამოვიყენეთ

*შ. სალივარიუს*-ის ურეაზული გენების კლასტერის სექვენირების საფუძველზე შექმნილი ურეიდფ და ურეიდრ პრაიმერები. ელექტროფორეზის შედეგად ყველა შტამის (მათ შორის ფენოტიპურად ურეაზა-ნეგატიურის) შემთავებაში აღრიცხული იყო *ურეაზ*-ის დამაბასიათებელი 2500 ბპ ფრაგმენტი (სურათი 5).

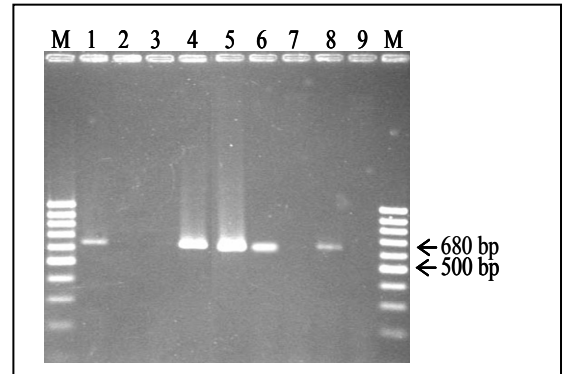
შარდოვანას ჰიდროლიზი ერთის მხრივ დადებითად აისახება სხვადასხვა პროდუქტის (მათ შორის მაწვნის, იოგურტის ან სხვ.) დამზადების პროცესზე რადგან, *S. thermophilus* მიერ შარდოვანას დაშლის შედეგად გამოყოფილი  $CO_2$ -ი ხელსაყრელ გარემოს ქმნის *L. delbrueckii*-ის განვითარებისათვის. მეორე მხრივ ჰიდროლიზი აფერხებს რძის pH-ის შემცირებას ანუ აციდოფიკაციის პროცესს და შესაბამისად იწვევს რძის შედედების პროცესის შეწყვეტას. აქედან გამომდინარე სტარტერული კულტურების შერჩევის მიზნით უპირატესობა მივანიჭეთ სუსტი აქტივობის მქონე *S. thermophilus* 3207, 3213, 3221, 3232, 3238, 3265, 3275 შტამებს.

#### 4. მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების კაზეინის დაშლის უნარი

შესწავლილი იყო მაწვნიდან გამოყოფილი 49 სტრუქტოკოკული შტამის კაზეინის დაშლის უნარი.

პირველ ეტაპზე ჩატარებული იყო შტამების სკრინინგი უჯრედულ კედელთან ასოცირებული PrtS პროტეინაზას სინთეზზე პასუხისმგებელი გენის შემცველობაზე.

*prtS* გენის PCR-ამპლიფიკაციის შემდეგ დადებითი შედეგები მიღებული იყო 18 შტამის (37%) შემთხვევაში. მიღებული ფრაგმენტების ზომა აღმატებოდა მოსალოდნელ სიდიდეს. გენთა ბანკში არსებული მონაცემების თანახმად მოსალოდნელი ზომა უნდა ყოფილიყო 581 bp, ჩვენს შემთხვევაში კი მიღებული იყო 680 bp ზომის დნმ-ის ფრაგმენტები (სურათი 6).



**სურ. 6** *prtS* გენის PCR-ის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ელექტროფორეგრამა  
**1 - 9** - მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამები  
**M** - დნმ-ის მასის მარკერი  
 (Mass Ruler DNA Ladder, Low Range marker)

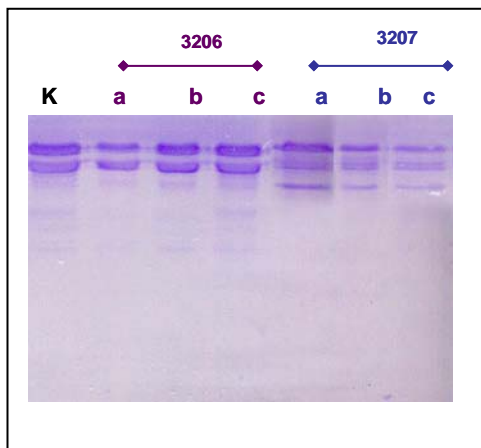
ლიტერატურაში არსებული მონაცემების თანახმად, *S. thermophilus*-ის შტამებისათვის ძირითადად დამახასიათებელი 581 bp ფრაგმენტები. ანომალური ზომა გამოწვეულია კატალიზური PR დომენის წინ მდებარე პრეპროტეინურ დომენში (PP) 96 ნუკლეოტიდის ჩართვით. თუმცა, განსხვავება ნორმალური და ანომალური ფრაგმენტების მქონე შტამების პროტეოლიზურ აქტივობას შორის აღნიშნული არ იყო [66]. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ ანომალური ფრაგმენტები წარმოადგენს მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის ყველა ენდემური შტამისათვის დამახასიათებელ თავისებურებას, რაც კიდევ ერთხელ მიგვანიშნებს მაწვნის უნიკალურობაზე, თუმცა ამ მოსაზრების დასამტკიცებლად საჭიროა შტამების უფრო მეტი რაოდენობის დაწვრილებითი გამოკვლევა.

მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების კაზეინის დაშლის უნარი შეფასებული იყო თვისობრივად, PrtS-თვის ოპტიმალური pH-ის (5.5-5.8) პირობებში, როგორც  $Ca^{2+}$  თავისუფალ, ასევე კალციუმის ქლორიდის (2 მმოლ და 10 მმოლ) შემცველ საინკუბაციო არეში (ცხრილი 2).

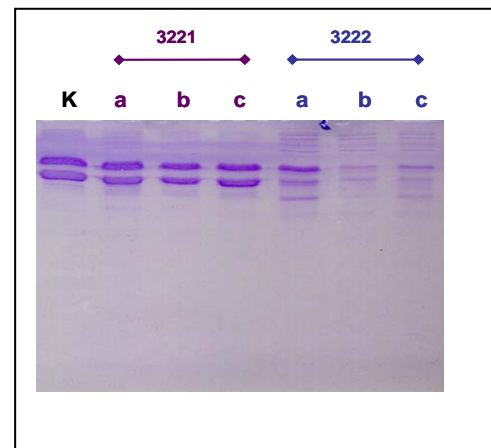
კაზეინის დაშლის ხარისხს ვსაზღვრავდით 4-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ნატრიუმდოდეცილსულფატის პოლიაკრილამიდის გელ-ელექტოფორეზის მეთოდით.

კაზეინოლიზური აქტივობა აღნიშნული იყო მხოლოდ ოთხი შტამის შემთხვევაში (*S. thermophilus* 3207, 3213, 3222, 3233). კონტროლად გამოყენებული იყო “კაზეინი + 10

მმლ  $\text{CaCl}_2$ -ის” ხსნარი. როგორც სურათი 7 ჩანს აქტიური PrtS-ის მქონე *S. thermophilus* 3207 შტამი ახდენს კაზეინის დეგრადაციას, რის შედეგადაც კაზეინის ფრაქციების რაოდენობა იზრდება, წარმოიქმნება უფრო დაბალი მოლეკულური მასის მქონე ფრაქციები. უარყოფითი აქტივობის მქონე შტამის *S. thermophilus* 3206, 3221 შემთხვევაში, კაზეინის ფრაქციები რჩება უცვლელი. ორი შტამის (*S. thermophilus* 3222, 3233) შემთხვევაში კაზეინის დეგრადაციის დონე დამოკიდებული იყო  $\text{CaCl}_2$ -ის მოლარულ კონცენტრაციაზე (სურათი 8). ეს შეიძლება აიხსნას იმით, რომ  $\text{Ca}^{2+}$ -ის თანაობისას PrtS იძენს აქტიურ კონფორმაციას და ინარჩუნებს თერმოსტაბილურობას, რაც დაკავშირებულია *S. thermophilus*-ის ადაპტაციასთან რძემჟავა პროდუქტებში არსებულ პირობებთან.



**სურ. 7** კაზეინის ჰიდროლიზის ტესტის ელექტროფორეგრამა  
**K** – კონტროლი  
 (კაზეინი + 10mM  $\text{CaCl}_2$ )  
**a** -  $\text{CaCl}_2$ -ის გარეშე  
**b** - 2mM  $\text{CaCl}_2$ -ის დამატებისას  
**c** - 10mM  $\text{CaCl}_2$ -ის დამატებისას



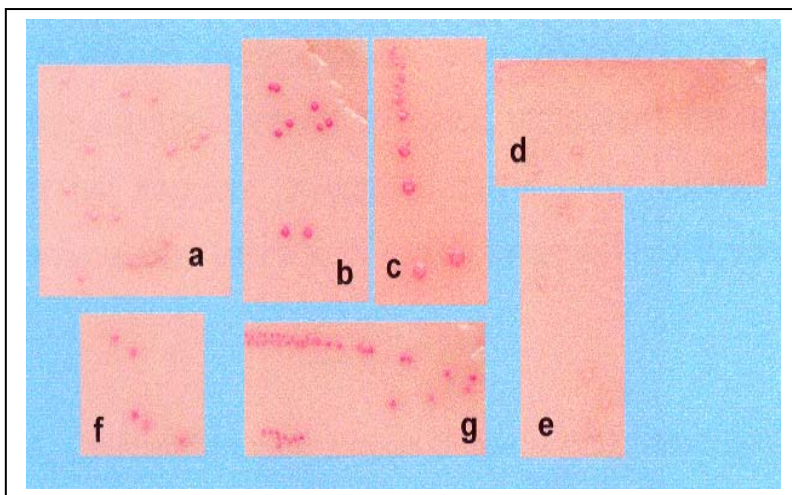
**სურ. 8** კაზეინის ჰიდროლიზის ტესტის ელექტროფორეგრამა  
**K** – კონტროლი  
 (კაზეინი + 10mM  $\text{CaCl}_2$ )  
**a** -  $\text{CaCl}_2$ -ის გარეშე  
**b** - 10mM  $\text{CaCl}_2$ -ის დამატებისას  
**c** - 2mM  $\text{CaCl}_2$ -ის დამატებისას

აღსანიშნავია, რომ ოთხივე შტამი (*S. thermophilus* 3207, 3213, 3222, 3233) *prtS* გენის PCR-ამპლიფიკაციის შედეგად გვაძლევდა დადებით შედეგს (სურათი 6).

## 5. მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამებში ეგზოპოლისაქარიდების (*eps*) წარმოქმნის უნარის შესწავლა

ეგზოპოლისაქარიდების წარმოქმნის უნარი შესწავლილი იყო რუთენიუმის წითელის შემცველ არეზე. ამ არეზე კულტივირების შედეგად *S. thermophilus*-ის შტამები წარმოქმნიდა ოთხი ტიპის კოლონიას: თეთრს, წითელს, ვარდისფერს და წითელს თეთრი ცენტრით (სურათი 9). მიღებული შედეგების საფუძველზე გამოთქმული იყო მოსაზრება, რომ eps პროდუცენტი (წითელი კოლონიები) და არაპროდუცენტი (თეთრი კოლონიები) შტამების გარდა ამ სახეობის ფარგლებში გვხდება შუალედური მაჩვენებლების (ვარდისფერი და თეთრი ცენტრის მქონე წითელი კოლონიები) მქონე შტამები.

მიღებული შედეგები შეიძლება აიხსნას იმით, რომ *S. thermophilus*-ის ზოგიერთი შტამის (ე.წ. ლორწოვანი ანუ ropy strains) მიერ წარმოქმნილი eps, ქმნის უჯრედულ კედელთან ასოცირებულ კაპსულას. ასეთ შემთხვევაში რუთენიუმის წითელი ვერ ღებავს უჯრედულ კედელს და წარმოქმნილი კოლონიები არის თეთრი. იმ შემთხვევაში თუ eps სინთეზის დონე დაბალია ან შტამი ახდენს საკუთარი ეგზოპოლისაქარიდების დაშლას, კოლონიები არის ღია ვარდისფერი. eps სინთეზის უნარს მოკლებული შტამები (ე.წ. არალორწოვანი ანუ nonropy strains) კაპსულას არ წარმოქმნის და შესაბამისად ხასიათდება წითელი ფერის (ან წითელი თეთრი ცენტრით) კოლონიებით.



**სურ. 9** *S. thermophilus*-ის შტამების eps-ის წარმოქმნის უნარი RRM არეზე

- a** –ვარდისფერი კოლონიები
- b, c** –თეთრი ცენტრის მქონე წითელი კოლონიები
- f, g** – წითელი კოლონიები
- d, e** –თეთრი კოლონიები

ექსპერიმენტის შედეგად აღმოჩნდა, რომ eps-ის სინთეზის უნარი ახასიათებს გამოკვლეული შტამების 24%-ს (12 შტამი), აქედან ექვსი შტამისთვის დამახასიათებელი იყო ღია ვარდისფერი, ხოლო მეორე ნახევრისათვის თეთრი ფერის კოლონიები (ცხრილი 2).

ამ ბიოქიმიურ თვისებას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება იოგურტისა და მაწვნის დამზადების პროცესში, რადგან ეგზობოლისაქრიდები განაპირობებს პროდუქტის სტრუქტურის ჩამოყალიბებას (სიბლანტეს) და შრატის გამოყოფის (სინერეზისის) შემცირებას. ამიტომ ჩვენს მიერ მაწვნის სტარტერულ კულტურებად შემოთავაზებული იყო eps სინთეზის უნარის მქონე 6 შტამი: *S. thermophilus* 3239, 3270, 1D, 10C, 13B და 1720.

### თავი 9. მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus* შტამების გენოტიპური დახასიათება

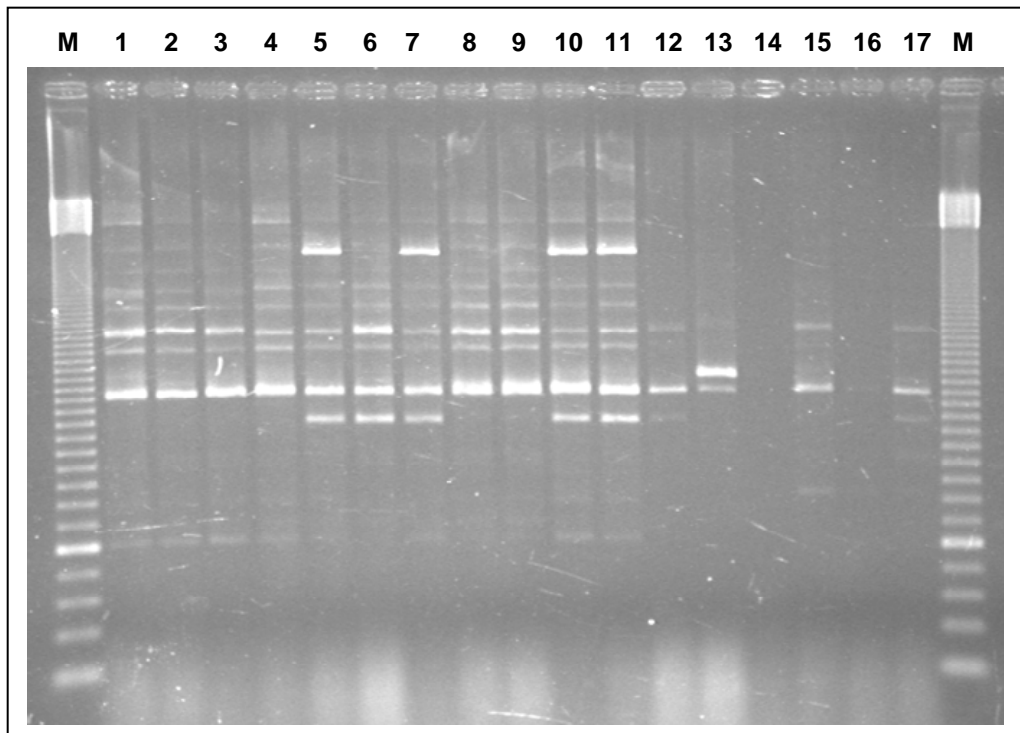
მაწვნიდან გამოყოფილი შტამების გენოტიპური დახასიათება განხორციელდა მოლეკულური ტიპირების Rep-PCR-ს მეთოდით. Rep-PCR-სთვის გამოყენებული იყო ჩვეულებრივი და 6-FAM ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნული BOX-A1R პრაიმერები.

ჩვეულებრივი პრაიმერების გამოყენებით ჩატარებული Rep-PCR-ით მიღებული ფრაგმენტების გელ-ელექტროფორეზის შედეგები ანალიზისათვის ნაკლებად წარმატებული აღმოჩნდა, რადგან მიღებული სურათების მიხედვით შესაძლებელი არ იყო ყველა ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის ზუსტი აღრიცხვა. მიღებული ფრაგმენტების რაოდენობა მერყეობდა 2-დან (შტამი 3278) 10-მდე (შტამი 3238), ზომა კი 250 bp-დან 2000 bp-მდე. Rep-PCR-ით მიღებული დნმ-ის “თითის ანაბეჭდების” ანალიზის შედეგად 49 შტამს შორის გამოვლენილი იყო მხოლოდ 5 მეტნაკლებად განსხვავებული გენოტიპის მქონე შტამთა ჯგუფები (სურათი 10).

ფლუორესცენტული პრაიმერების გამოყენებით კი შესაძლებელი გახდა Rep-PCR-ს შედეგების ავტომატიზირებული დამუშავება (კაპილარული ელექტროფორეზის ABI-Prism 310 სისტემის გამოყენებით).

კაპილარული ელექტროფორეზის შედეგად მიღებული იყო ელექტროფეროგრამები, რომლის თითოეული პიკი შეესაბამებოდა კონკრეტული

სიდიდის მქონე დნმ-ის ფრაგმენტებს. ელექტროფეროგრამების სურათზე აბცისათა ღერძზე აღნიშნული იყო პიკების ზომა, ხოლო ორდინათა ღერძზე შთანთქმის



**სურ.10** Rep-PCR-ის მეთოდით მიღებული ფრაგმენტების ელექტროფეროგრამა

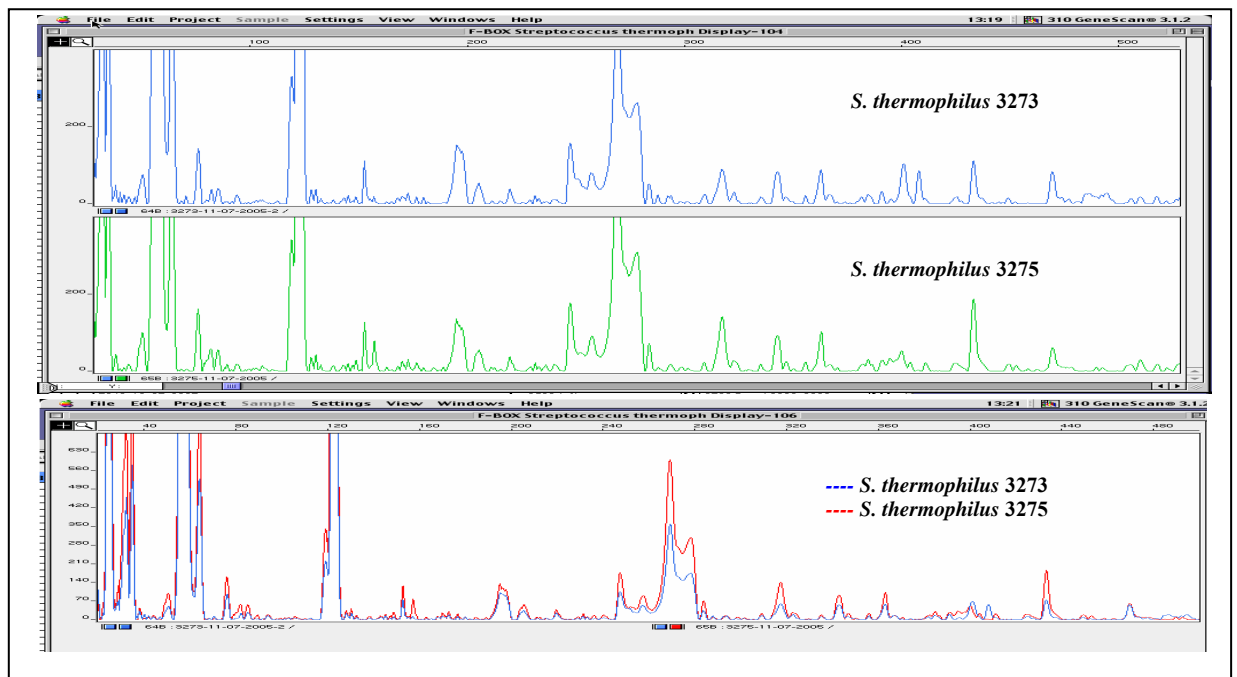
- |                                   |                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 - <i>S. thermophilus</i> 3238;  | 2 - <i>S. thermophilus</i> 11A;   | 3 - <i>S. thermophilus</i> 12A;   |
| 4 - <i>S. thermophilus</i> 1D;    | 5 - <i>S. thermophilus</i> 3B;    | 6 - <i>S. thermophilus</i> 4A;    |
| 7 - <i>S. thermophilus</i> 5B;    | 8 - <i>S. thermophilus</i> 10B;   | 9 - <i>S. thermophilus</i> 10C;   |
| 10 - <i>S. thermophilus</i> 4B;   | 11 - <i>S. thermophilus</i> 6A;   | 12 - <i>S. thermophilus</i> 13B;  |
| 13 - <i>S. thermophilus</i> 3278; | 14 - <i>S. thermophilus</i> 3229; | 15 - <i>S. thermophilus</i> 3217; |
| 16 - <i>S. thermophilus</i> 3212; | 17 - <i>S. thermophilus</i> 3211  |                                   |
- M** – დნმ-ის მასის მარკერი ( 50bp DNA Ladder , Pharmacia)

ინტენსივობა. მიღებულ ელექტროფეროგრამებზე აღრიცხული პიკების რაოდენობა მერყეობდა 11-დან (შტამი 3211) 28-მდე (შტამი 3232 და 3276), ზომა კი 119 bp-დან 539 bp-მდე. იდენტური გენოტიპების მქონე შტამების ელექტროფეროგრამებზე პიკების რაოდენობა და ზომა ერთნაირი იყო (სურათი 11). მსგავსი გენოტიპების მქონე შტამების ელექტროფეროგრამები მეტ-ნაკლებად განსხვავდებოდა (სურათი 12,13).

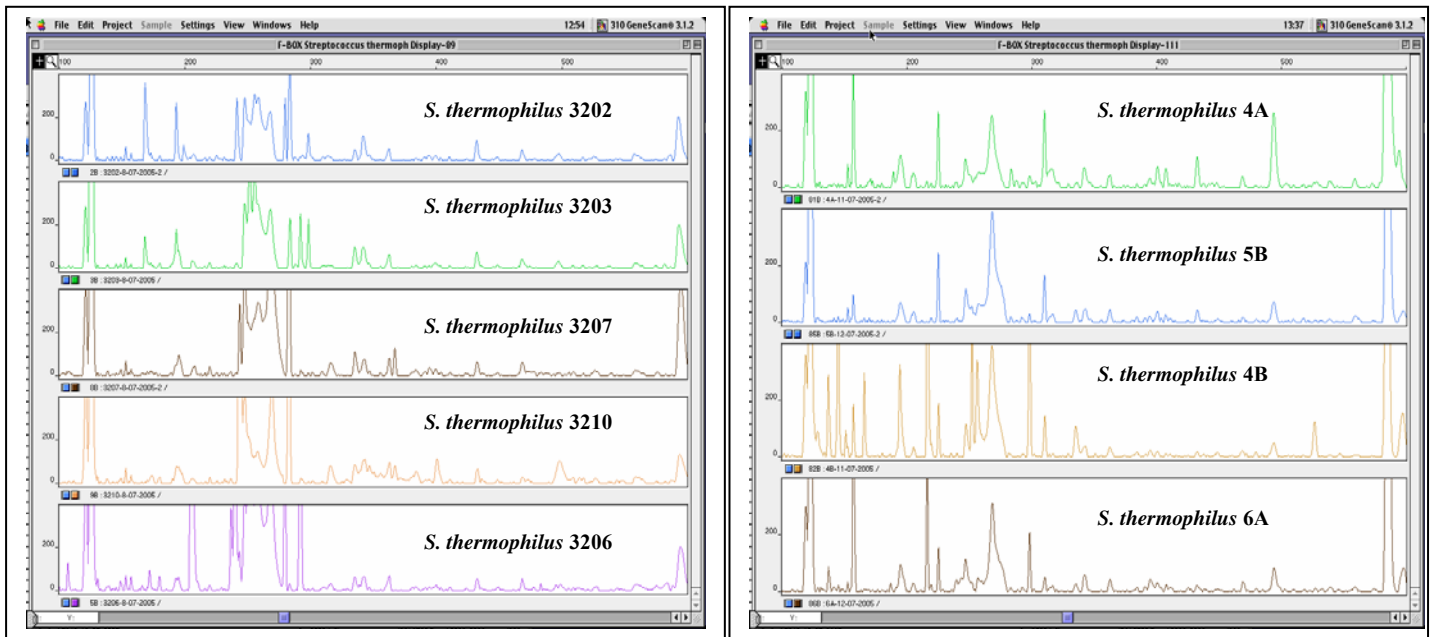
ელექტროფეროგრამების ანალიზის (UPGMA) მეთოდის საშუალებით აგებულ იქნა დენდროგრამა, რომელიც მიღებულ გენოტიპებს შორის მსგავსების ხარისხს გამოხატავდა (სურათი 14). მსგავსი ელექტროფეროგრამების (გენოტიპების) მქონე შტამები გაერთიანდა კლასტერებად. იდენტურად ითვლებოდა იმ შტამების გენოტიპები, რომელთა ელექტროფეროგრამების ანუ დნმ-ის “თითის ანაბეჭდების”

მსგავსების კოეფიციენტი  $r_j \geq 0,82$ . ამ გზით 49 შტამს შორის გამოვლენილი იქნა 41 განხვავებული გენოტიპი. ეს ფაქტი მაწვნიდან გამოყოფილი თერმოფილური სტრეპტოკოკების გენოტიპური პოლიმორფიზმის მაღალ დონეზე მიუთითებს.



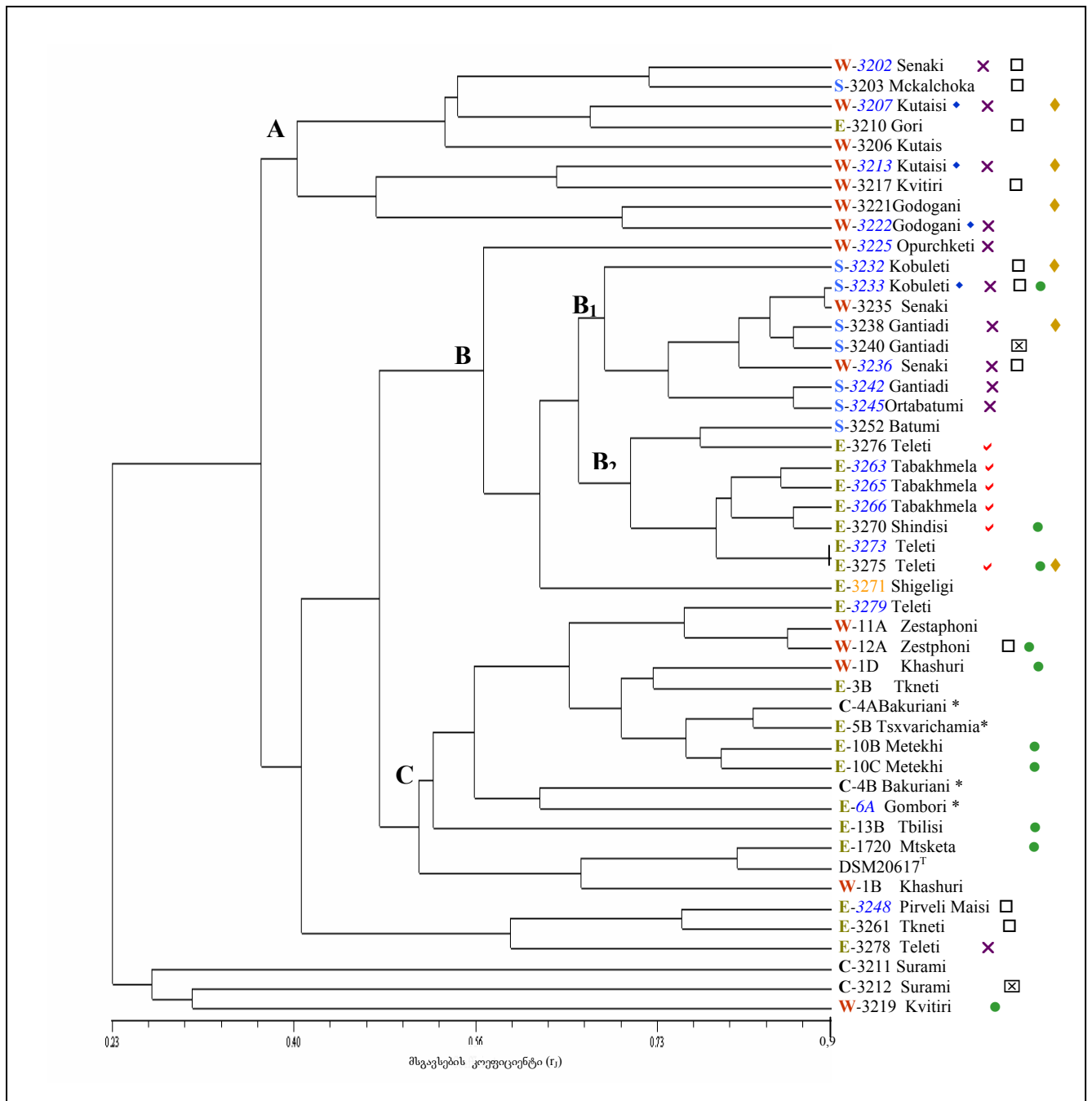


სურ. 11 იდენტიური გენოტიპების მქონე შტამების F-Rep-PCR-ის პროდუქტების ელექტროფეროგრამები



სურ. 12 მსგავსი გენოტიპების მქონე შტამების F-BOX-PCR-ის პროდუქტების ელექტროფეროგრამები (A კლასტერი)

სურ. 13 მსგავსი გენოტიპების მქონე შტამების F-BOX-PCR-ის პროდუქტების ელექტროფეროგრამები (C კლასტერი)



**სურ. 14** საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების F-Rep-PCR-ზე დაფუძნებული გენეტიკური მსგავსების ამსახველი UPGMA დენდროგრამა

xxx - PtrS<sup>+</sup> შტამები; ♦ - კაზეინის დაშლის უნარის მქონე შტამები; ● - ეგზობოლისაქარიდების პროდუცენტი შტამები; b - გალაქტოზის ფერმენტირების უნარის მქონე შტამები (o - სუსტი აქტივობა); 3271 - ურეაზა-ნეგატიური შტამი; ტ - სუსტი ურეაზული აქტივობის შტამები; ა- სუსტი აციდოფიკაციური აქტივობის შტამები; რ - ძლიერი აციდოფიკაციური აქტივობის შტამები

მაწვნის დედოების მოპოვების ადგილები აღნიშნულია შემდეგი ლათინური ასოებით:

**W** - დასავლეთ საქართველო; **S** - დასავლეთ საქართველოს ზღვისპირა რეგიონები; **E** - აღმოსავლეთ

დენდროგრამა (სურათი 14) გვიჩვენებს, რომ F-Rep-PCR-ით მიღებული დნმ-ის “თითის ანაბეჭდების” მსგავსების მიხედვით შტამები 3 კლასტერად დაჯგუფდა.

A კლასტერში გაერთიანდა დასავლეთ საქართველოს არაზღვისპირა ზონაში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამების უმეტესობა. ამ კლასტერში აგრეთვე შევიდა დასავლეთ საქართველოს ზღვისპირა ზონაში (სოფელი წყავჩოკა) მოპოვებული დედოს ერთი შტამი (*S. thermophilus* 3203) და გეოგრაფიულად დაშორებულ რეგიონში (ქ. გორი) მოპოვებული შტამი (*S. thermophilus* 3210).

მეორე მსხვილი (B) კლასტერი ორ ქვეკლასტერს შეიცავს: B<sub>1</sub> - შავი ზღვის სანაპირო ზოლის რეგიონებში მოპოვებული მაწვნიდან გამოყოფილი შტამების ჯგუფი; B<sub>2</sub> - აღმოსავლეთ საქართველოს რამდენიმე რეგიონში მოპოვებული მაწვნებიდან გამოყოფილი შტამები. B<sub>1</sub> კლასტერში აგრეთვე გაერთიანდა სენაკში მოპოვებული მაწვნის დედოდან გამოყოფილი ორი შტამი (*S. thermophilus* 3235, 3240). *S. thermophilus* 3235 შტამის გენოტიპი *S. thermophilus* 3233 შტამის გენოტიპის იდენტური აღმოჩნდა.

მესამე (C) კლასტერი ხასიათდება ჰეტეროგენურობით, მასში გაერთიანებული შტამების უმეტესობა გამოყოფილია აღმოსავლეთ საქართველოში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან, თუმცა აქვე შედის გეოგრაფიულად დაშორებულ რეგიონების - ზესტაფონის, ხაშურის და ბაკურიანის მაწვნის შტამები. აღსანიშნავია, რომ მსგავსება გამოვლინდა ამ კლასტერში გაერთიანებული, მაღალმთიანი რეგიონებიდან გამოყოფილი შტამების გენოტიპებს შორის: სოფელ ბაკურიანში მოპოვებული ერთი შტამი დაჯგუფდა სოფელ ცხვარიჭამიაში მოპოვებულ შტამთან ( $r_j=0.79$ ), მეორე ბაკურიანული შტამი კი გაერთიანდა გომბორულ შტამთან, თუმცა, ამ შემთხვევაში მსგავსების კოეფიციენტი მნიშვნელოვნად დაბალი იყო ( $r_j=0.58$ ). ამავე კლასტერში შევიდა DSM კოლექციის *S. thermophilus* 20617<sup>T</sup> სტანდარტული შტამი. ჩვენს მიერ გამოყოფილი შტამებიდან *S. thermophilus* DSM 20617<sup>T</sup>-ის მსგავსი გენოტიპი ახასიათებდა მცხეთის მაწვნიდან გამოყოფილ შტამს ( $r_j=0.79$ ).

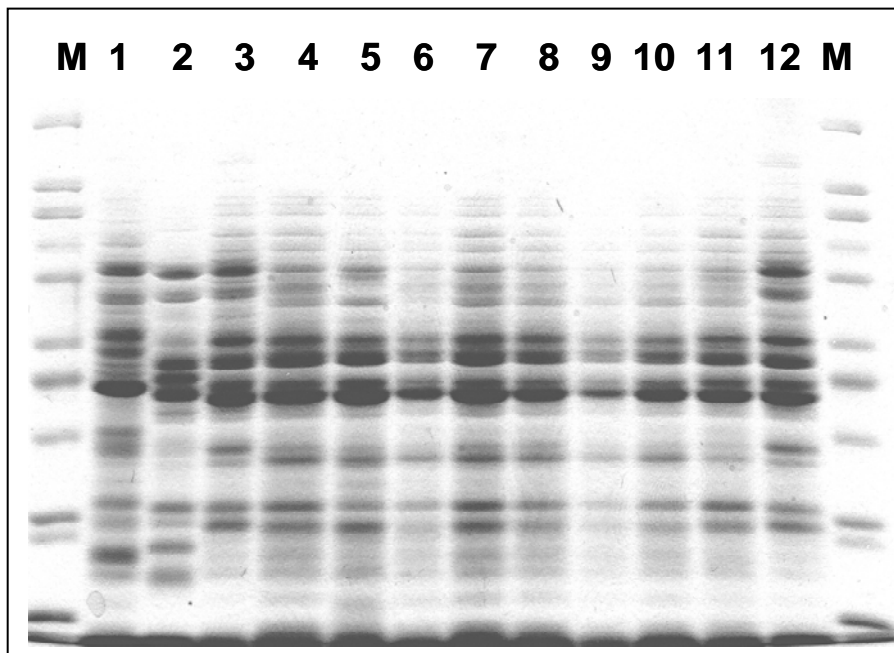
49 გენოტიპირებული შტამიდან კლასტერებად არ დაჯგუფდა მხოლოდ სამი, კერძოდ სოფელ კვითირის მაწვნის დედოს ერთი შტამი (*S. thermophilus* 3219) და სურამში მოპოვებული მაწვნის ორი შტამი (*S. thermophilus* 3211 და 3212). მიუხედავად

იმისა, რომ ეს შტამები გამოყოფილი იყო ერთი გეოგრაფიული რეგიონის დედობიდან ამ ორი შტამის გენოტიპები მკვეთრად განსხვავდება ( $r=0,26$ ).

### თავი 10 მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების ტიპირება

საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში მოპოვებული მაწვნის დედობიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების ტიპირებისათვის გამოყენებული იყო უჯრედული ცილების ელექტროფორეზის მეთოდი (SDS-PAGE of WCP) [149].

ელექტროფორეზის შედეგად *E. durans*-ის ყველა შტამის შემთხვევაში მიღებული იყო აბსოლუტურად იდენტური ცილოვანი “თითის ანაბეჭდები” (სურათი 15) რაც იმაზე მიუთითებს, რომ მოცემული მეთოდი ენტეროკოკების შიდასახეობრივი პოლიმორფიზმის გამოსავლენად ეფექტური არ არის.

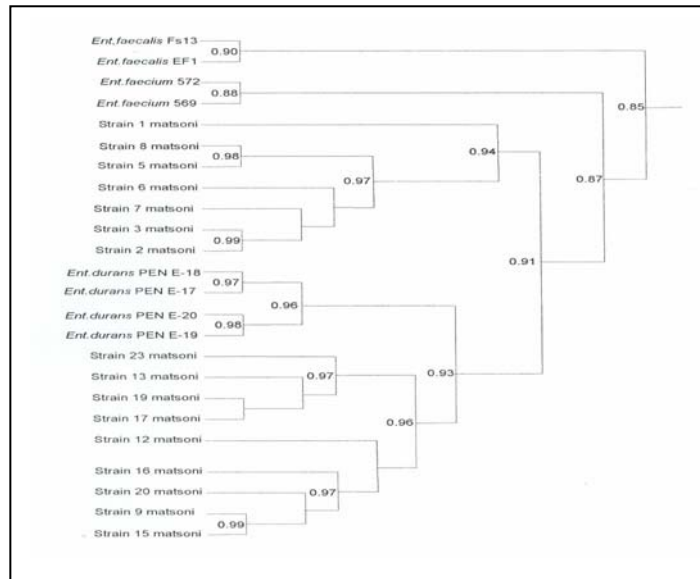


**სურ. 15** უჯრედული ცილების ელექტროფორეგრამა  
 1- *E. faecalis* ATCC14433; 2- *E. faecium* ATCC14434; 3- *E. durans* LMG 10746  
 4-12 - მაწვნიდან გამოყოფილი შტამები  
 M - მოლეკულური მასის მარკერი  
 (6,500 - 205,000 Dalton, Marker Wide Range, Sigma).

მიღებული ცილოვანი “თითების ანაბეჭდების” პროცესინგი და სტატისტიკური დამუშავება მოვახდინეთ Diversity Database™ კომპიუტერული პროგრამის მეშვეობით.

გამოთვლილი იყო პირსონის კორელაციის კოეფიციენტი ( $r_p$ ), რომელიც გამოვიყენეთ მსგავსების მატრიცის შესაქმნელად.

მსგავსების მატრიცის კლასტერული ანალიზის (UPGMA) საფუძველზე აგებული დენდროგრამა (სურათი 16) გვიჩვენებს, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი ენტეროკოკული შტამების ცილოვანი პროფილები მსგავსების საკმაოდ მაღალი კოეფიციენტით ( $r_p > 0,91$ ) ხასიათდება.



**სურ. 16.** დენდროგრამა, რომელიც გამოხატავს მსგავსების ხარისხს ( $r_p$  - პირსონის კორელაციის კოეფიციენტის მიხედვით) ენტეროკოკების სტანდარტულ და მაწვნიდან გამოყოფილ შტამების ცილოვან პროფილებს შორის

დენდროგრამიდან გამომდინარე, *E. durans*-ის ენდემური შტამების ცილოვანი პროფილები *E. durans*-ის სტანდარტულ შტამების ცილოვანი პროფილების იდენტური აღმოჩნდა (იდენტურად ითვლება ის ცილოვანი პროფილები, რომლის  $r_p \geq 0,85$ ). შესაბამისად, შეგვიძლია აღვნიშნოთ, რომ ეს მეთოდი შეიძლება იყოს გამოყენებული ენტეროკოკების ზუსტი სახეობრივი ინდენტიფიკაციისათვის.

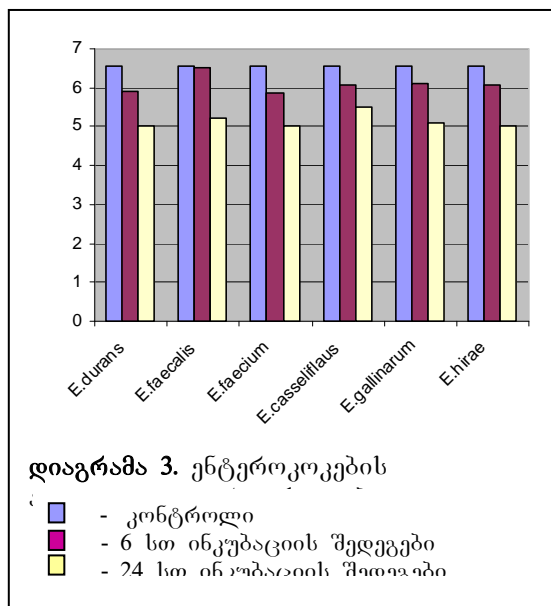
თავი 11 მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების ფენოტიპური თვისებების შესწავლა

რადგან მაწვნის ნიმუშების უმრავლესობაში აღინიშნებოდა ენტეროკოკების არსებობა, მიზანშეწონილად ჩაითვალა მათი ბიოქიმიური როლის გარკვევა მაწვნის ფერმენტაციის, საბოლოო პროდუქტის სტრუქტურისა და გემოს ჩამოყალიბებაში.

მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის ფენოტიპური ნიშან-თვისებები შედარებული იქნა სხვა რძემჟავა პროდუქტებიდან გამოყოფილი სხვადასხვა სახეობის ენტეროკოკების (*E. durans* 4 შტამი, *E. faecalis* -19 შტამი, *E. faecium*- 8 შტამი, *E. gallinarum*-1 შტამი, *E. hirae* -1 შტამი, *E. casseiflavus*-1შტამი) თვისებებთან.

### 1. ენტეროკოკების აციდოფიკაციური აქტივობის შესწავლა

ენტეროკოკების აციდოფიკაციური აქტივობა შეფასებული იყო ცხიმმობდილ რძეში 37°C 6 და 24-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ (ცხრილი 3). სტერილური რძის საწყისი pH იყო 6,58 (1%-ინოკულუმის შედეგად pH 6,56).



მიღებული შედეგების თანახმად 6-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების შემთხვევაში pH მცირდებოდა 5,99-მდე, მსგავსი შედეგები მოგვცა DBDAF კოლექციის შტამებმაც: *E. durans*-ის შტამებმა pH შეამცირეს 5,89-მდე, *E. faecium* – 5,86-მდე, ყველაზე სუსტი აციდოფიკაციური უნარი აღინიშნა *E. faecalis*-ის შემთხვევაში (pH შემცირდა 6,21-მდე). pH ის ცვლილება აგრეთვე უმნიშვნელო იყო 24 საათის შემდეგ -  $\Delta\text{pH} = 1,9$  (დაიგრამა 3).

აციდოფიკაციური აქტივობის შესწავლასთან ერთად სხვადასხვა სახეობის ენტეროკოკებში გამოკვლეული იყო რძის შედეგების უნარი (ცხრილი 3). აღმოჩნდა, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების უმეტესობა (89%) რძის შედეგების უნარს ავლენს 24-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ.

რძის სწრაფი (0-12 საათში) შედეგების უნარი დაფიქსირდა მხოლოდ ერთი შტამის (*E. faecalis* ATCC14433) შემთხვევაში. *E. faecalis*-ის დანარჩენი შტამები რძეს ან არ ადელებს (58%) ან ადელებს მხოლოდ 24 საათის შემდეგ (31,5%). *E. faecium*-ის რვა შტამიდან ოთხს არ შესწევს რძის შედეგების უნარი, ოთხს კი რძის შედეგების სუსტი უნარი ახასიათებს.

გარდა ამისა, შესწავლილი იყო ენტეროკოკების მიერ სინთეზირებული რძემჟავას კონფიგურაცია, რის შედეგად დადგინდა, რომ ენტეროკოკების ხუთივე სახეობის შტამები ლაქტოზის ფერმენტაციის შედეგად წარმოქმნის LL –რძემჟავას.

ცხრილი 3 ენტეროკოკების აციდიფიკაციური აქტივობა და რძის შედეგების უნარი

№	შტამი	ცხიმობდილი რძის pH-ის ცვლილება			რძის შედეგების უნარი
		საწყისი pH	pH 6 სთ ინკუბაციის შემდეგ	pH 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ	
1	<i>E. faecalis</i> ATCC14433	6,59	6,09	5,54	IMC
2	<i>E. faecalis</i> 84	6,59	5,88	4,69	FMC
3	<i>E. faecalis</i> 85	6,63	5,92	5,11	-
4	<i>E. faecalis</i> 97	6,59	6,09	5,31	-
5	<i>E. faecalis</i> 79	6,52	6,12	5,31	-
6	<i>E. faecalis</i> 160	6,49	6,04	5,32	-
7	<i>E. faecalis</i> 166	6,55	6,02	5,24	-
8	<i>E. faecalis</i> 192	6,52	6,10	5,48	-
9	<i>E. faecalis</i> 233	6,53	6,11	5,23	SMC
10	<i>E. faecalis</i> 234	6,51	6,02	5,09	SMC
11	<i>E. faecalis</i> PEN A-14	6,52	6,11	4,97	SMC
12	<i>E. faecalis</i> PEN A-15	6,52	6,18	5,14	SMC
13	<i>E. faecalis</i> PEN A-16	6,51	6,11	5,08	SMC
14	<i>E. faecalis</i> PEN-A17	6,49	6,10	4,55	SMC
15	<i>E. faecalis</i> PEN A-19	6,55	6,12	5,18	-
16	<i>E. faecalis</i> 1F7	6,68	5,3	4,58	-
17	<i>E. faecalis</i> 1F2	6,74	6,55	6,22	-
18	<i>E. faecalis</i> 1E10	6,7	5,93	4,95	-
19	<i>E. faecalis</i> 4A8	6,83	6,29	6,14	-
20	<i>E. faecium</i> ATCC14434	6,55	6,05	5,35	SMC
21	<i>E. faecium</i> 96	6,52	5,65	4,61	SMC
22	<i>E. faecium</i> 191	6,47	6,02	5,21	SMC
23	<i>E. faecium</i> 221	6,59	5,84	4,84	SMC
24	<i>E. faecium</i> 222	6,55	6,05	5,28	-
25	<i>E. faecium</i> PEN D-2	6,54	6,08	5,34	-
26	<i>E. faecium</i> 2C6	6,77	5,62	4,85	-
27	<i>E. faecium</i> 2G2	6,7	5,55	4,64	-
28	<i>E. durans</i> 98	6,53	5,97	5,10	SMC
29	<i>E. durans</i> LMG 10746	6,54	5,96	4,84	-
30	<i>E. durans</i> PEN E-16	6,53	6,03	5,17	-
31	<i>E. durans</i> PEN E-17	6,52	5,94	5,02	-
32	<i>E. durans</i> 1	6,53	5,79	5,01	SMC
33	<i>E. durans</i> 2	6,54	5,79	4,98	SMC
34	<i>E. durans</i> 3	6,54	5,81	4,98	SMC
35	<i>E. durans</i> 5	6,61	5,97	5,07	SMC
36	<i>E. durans</i> 6	6,61	5,91	5,04	SMC

37	<i>E. durans 7</i>	6,62	5,89	5,03	SMC
38	<i>E. durans 8</i>	6,63	5,95	5,08	SMC
39	<i>E. durans 9</i>	6,63	5,90	5,04	SMC
40	<i>E. durans 10</i>	6,62	5,94	5,05	SMC
41	<i>E. durans 12</i>	6,61	5,90	5,07	SMC
42	<i>E. durans 13</i>	6,65	5,89	5,05	SMC
43	<i>E. durans 15</i>	6,64	5,88	5,03	SMC
44	<i>E. durans 16</i>	6,61	5,90	4,98	SMC
45	<i>E. durans 17</i>	6,60	5,90	4,93	SMC
46	<i>E. durans 18</i>	6,61	5,89	4,92	SMC
47	<i>E. durans 19</i>	6,60	5,88	4,96	SMC
48	<i>E. durans 20</i>	6,59	5,86	4,91	-
49	<i>E. durans 23</i>	6,57	5,96	5,01	-
50	<i>E.gallinarum 263</i>	6,53	6,09	5,50	-
51	<i>E. casseliflavus 264</i>	6,55	6,06	5,11	SMC
52	<i>E. hiraе 266</i>	6,55	6,08	5,02	SMC

შენიშვნა: FMC - შტამები, რომლებიც რძეს ადევებდა 0-12 საათში;  
 IMC - შტამები, რომლებიც რძეს ადევებდა 12-24 საათში;  
 SMC - შტამები, რომლებიც რძეს ადევებდა 24 სთ-ის შემდეგ.

## 2. ენტეროკოკების პროტეოლიზური აქტივობის შესწავლა

ენტეროკოკების პროტეოლიზური აქტივობის რაოდენობრივი შეფასებისთვის გამოყენებულ იქნა Cd-ნიჩჰიდრინის მეთოდი. თავისუფალი ამინომჟავების კონცენტრაცია ისაზღვრებოდა 37°C 24-საათიანი და 7-დღიანი ინკუბაციის შემდეგ შედეგების შესაფასებლად აგებული იყო ლეიცილის სტანდარტული მრუდი (გრაფიკი 1). შედეგები (თავისუფალი ამინომჟავების კონცენტრაცია) გამოსახული იქნა ლეიცილის ექვივალენტური რაოდენობით მგ/ლ-ში (ცხრილი 4).

აღმოჩნდა, რომ ენტეროკოკების სამივე სახეობის შტამები (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*) ხასიათდება ეგზოგენური პროტეინაზების დაბალი აქტივობით. 37°C 24-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ თავისუფალი ამინომჟავების ყველაზე მაღალი კონცენტრაცია შეინიშნებოდა *E. faecalis*-ის შემთხვევაში (საშუალო მაჩვენებელი - 20-25 მგ/ლ) მაშინ როდესაც საშუალო პროტეოლიზური აქტივობის მქონე რძემჟავა ბაქტერიები მაგ., *L. casei* იდენტურ პირობებში პროტეოლიზის შედეგად თავისუფლებს ამინომჟავების უფრო დიდ რაოდენობას (46-50 მგ/ლ) [124]. უფრო დაბალი მაჩვენებლები აღრიცხული იყო *E. faecium* და *E. durans*-ის პროტეოლიზური აქტივობის ექსპერიმენტული შესწავლისას. სხვადასხვა მაჩვენის დედოდან გამოყოფილი *E. durans*-ის აქტივობა საშუალოდ შეადგენდა 16-18 მგ/ლ (დიაგრამა 4).



თავისუფალი ამინომჟავების კონცენტრაციას აგრეთვე ვსაზღვრავდით 37°C-ზე 7-დღიანი ინკუბაციის შემდეგ. ამ შემთხვევაშიც ყველაზე მაღალ პროტეოლიზურ აქტივობას ავლენდა *E. faecalis*-ის შტამები. აღსანიშნავია, რომ ამ სახეობის ფარგლებში შეინიშნებოდა მიღებული მაჩვენებლების საკმაოდ ფართო სპექტრი - 22-62 მგ/ლ. ჩატარებული ექსპერიმენტის პირობებში *E. durans*-ის შტამები *E. faecium*-ის მსგავსად ავლენდა სუსტ აქტივობას, ორივე სახეობის შემთხვევაში ლეიცილის კონცენტრაცია არ აღემატებოდა 24 მგ/ლ (დიაგრამა 5).

**ცხრილი 3.** Cd-ნიწიდრინის მეთოდით განსაზღვრული ენტეროკოკების პროტეოლიზური აქტივობა

24 საათიანი ინკუბაცია					7 დღიანი ინკუბაციის შემდეგ			
შტამი	fd*	OD 507nm	mM	mg/L	fd*	OD 507nm	mM	mg/L
კონტროლი (რძე)	1	<b>0.446</b>	<b>0.096963</b>	<b>12.71963</b>	1	<b>0.446</b>	<b>0.096963</b>	<b>12.71963</b>
<i>E. faecalis</i> 14433	1	0.522	0.1136224	14.90498643	1	0.562	0.1223904	16.05517267
<i>E. faecalis</i> 84	1	1.822	0.3985824	52.28603923	2	1.698	0.7428032	97.44092378
<i>E. faecalis</i> 85	1	0.569	0.1239248	16.25645526	1	0.922	0.2013024	26.40684883
<i>E. faecalis</i> 97	1	0.671	0.1462832	19.18943018	1	0.759	0.1655728	21.7198399
<i>E. faecalis</i> 79	1	0.505	0.109896	14.41615728	1	0.895	0.195384	25.63047312
<i>E. faecalis</i> 160	1	0.578	0.1258976	16.51524717	1	0.486	0.1057312	13.86981882
<i>E. faecalis</i> 166	1	0.56	0.121952	15.99766336	1	0.955	0.208536	27.35575248
<i>E. faecalis</i> 192	1	0.443	0.0963056	12.63336861	1	0.635	0.138392	18.15426256
<i>E. faecalis</i> 233	1	0.689	0.1502288	19.70701398	1	0.969	0.2116048	27.75831766
<i>E. faecalis</i> 234	1	0.543	0.1182256	15.50883421	1	0.85	0.18552	24.3365136
<i>E. faecalis</i> PENA14	1	0.586	0.1276512	16.74528442	1	1.003	0.2190576	28.73597597
<i>E. faecalis</i> PENA15	1	0.571	0.1243632	16.31396458	1	0.884	0.1929728	25.3141719
<i>E. faecalis</i> PENA16	1	0.629	0.1370768	17.98173462	1	0.931	0.2032752	26.66564074
<i>E. faecalis</i> PENA17	1	0.608	0.1324736	17.37788685	1	0.908	0.1982336	26.00428365
<i>E. faecalis</i> PENA19	1	0.656	0.1429952	18.75811034	1	0.92	0.200864	26.34933952
<i>E. faecalis</i> 1E10	1	1.024	0.2236608	29.33982374	1	1.175	0.25676	33.6817768
<i>E. faecalis</i> 1F2	1	1.194	0.2609248	34.22811526	1	1.125	0.2458	32.244044
<i>E. faecalis</i> 1F7	1	1.5	0.328	43.02704	1	1.566	0.3424672	44.9248473
<i>E. faecalis</i> 14434	1	1.616	0.3534272	46.3625801	1	1.578	0.3450976	45.26990317
<i>E. faecium</i> 82	1	0.572	0.1245824	16.34271923	1	0.463	0.1006896	13.20846173
<i>E. faecium</i> 96	1	0.97	0.211824	27.78707232	1	1.134	0.2477728	32.5028359
<i>E. faecium</i> 191	1	0.496	0.1079232	14.15736538	1	0.462	0.1004704	13.17970707
<i>E. faecium</i> 221	1	0.874	0.1907808	25.02662534	1	1.308	0.2859136	37.50614605
<i>E. faecium</i> 222	1	0.279	0.0603568	7.917605024	1	0.478	0.1039776	13.63978157
<i>E. faecium</i> PEND2	1	0.427	0.0927984	12.17329411	1	0.338	0.0732896	9.614129728
<i>E. faecium</i> 2C6	1	0.84	0.183328	24.04896704	1	0.914	0.1995488	26.17681158
<i>E. faecium</i> 2G2	1	0.999	0.2181808	28.62095734	1	1.125	0.2458	32.244044
<i>E. durans</i> PENE16	1	0.523	0.1138416	14.93374109	1	0.529	0.1151568	15.10626902
<i>E. durans</i> PENE17	1	0.608	0.1324736	17.37788685	1	0.469	0.1020048	13.38098966
<i>E. durans</i> 1	1	0.501	0.1090192	14.30113866	1	0.597	0.1300624	17.06158563
<i>E. durans</i> 2	1	0.507	0.1103344	14.47366659	1	0.939	0.2050288	26.89567798
<i>E. durans</i> 3	1	0.538	0.1171296	15.36506093	1	1.184	0.2587328	33.9405687
<i>E. durans</i> 5	1	0.481	0.1046352	13.72604554	1	0.626	0.1364192	17.89547066
<i>E. durans</i> 6	1	0.541	0.1177872	15.4513249	1	0.629	0.1370768	17.98173462
<i>E. durans</i> 7	1	0.544	0.1184448	15.53758886	1	0.626	0.1364192	17.89547066
<i>E. durans</i> 8	1	0.418	0.0908256	11.91450221	1	0.631	0.1375152	18.03924394
<i>E. durans</i> 9	1	0.546	0.1188832	15.59509818	1	1.055	0.230456	30.23121808
<i>E. durans</i> 10	1	0.452	0.0982784	12.89216051	1	1.074	0.2346208	30.77755654
<i>E. durans</i> 12	1	0.495	0.107704	14.12861072	1	1.234	0.2696928	35.3783015
<i>E. durans</i> 13	1	0.312	0.0675904	8.866508672	1	0.734	0.1600928	21.0009735

<i>E. durans</i>	15	1	0.515	0.112088	14.70370384	1	0.648	0.1412416	18.52807309
<i>E. durans</i>	16	1	0.571	0.1243632	16.31396458	1	0.649	0.1414608	18.55682774
<i>E. durans</i>	17	1	0.564	0.1228288	16.11268198	1	1.147	0.2506224	32.87664643
<i>E. durans</i>	18	1	0.565	0.123048	16.14143664	1	0.718	0.1565856	20.54089901
<i>E. durans</i>	19	1	0.512	0.1114304	14.61743987	1	0.662	0.1443104	18.93063827
<i>E. durans</i>	20	1	0.521	0.1134032	14.87623178	1	0.687	0.1497904	19.64950467
<i>E. durans</i>	23	1	0.596	0.1298432	17.03283098	1	0.644	0.1403648	18.41305446
<i>E. gallinarum</i>	263	1	0.826	0.1802592	23.64640186	1	1.368	0.2990656	39.23142541
<i>E. casseliflavus</i>	264	1	0.583	0.1269936	16.65902045	1	0.655	0.142776	18.72935568
<i>E. hirae</i>	266	1	1.293	0.2826256	37.07482621	1	1.778	0.3889376	51.02083437

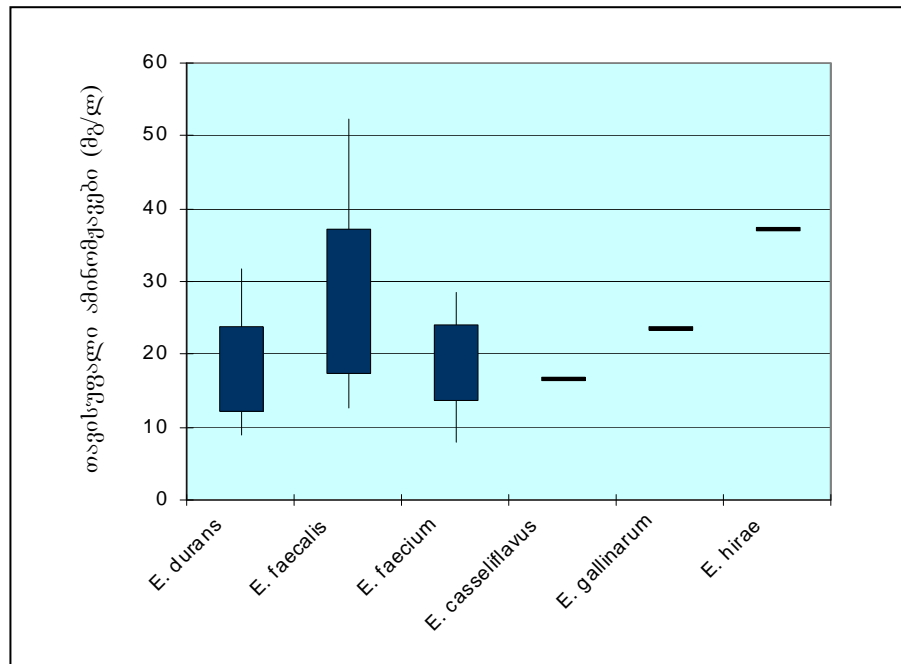
**შენიშვნა:**

**fd** – განზავების ინდექსი;

**OD 507 nm** – სინჯის ოპტიკური სიმკვრივე განსაზღვრული 507 ნმ სიგრძის ტალღაზე;

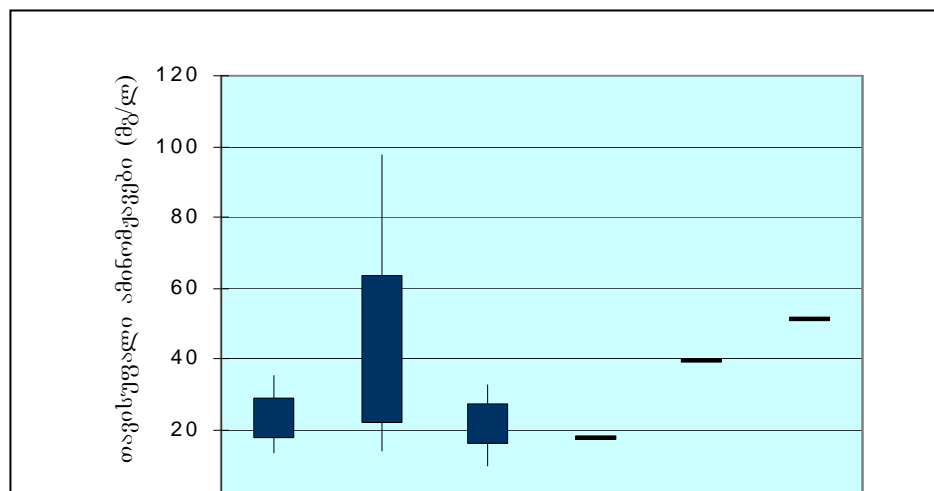
**mM**- ამინომჟავების მოლური კონცენტრაცია;

**mg/l** – თავისუფალი ამინომჟავების კონცენტრაცია.



**დიაგრამა 4** ენტეროკოკების პროტეოლიზური აქტივობა

განსაზღვრული 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ



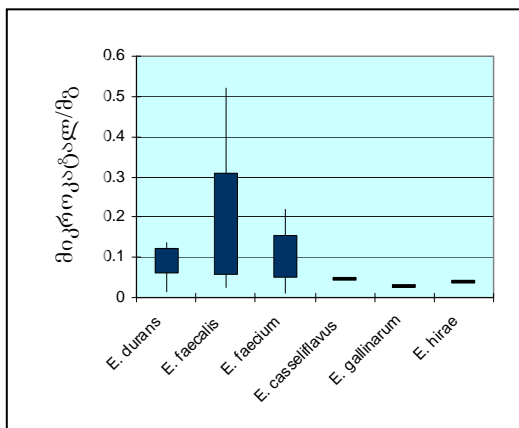
### 3. ენტეროკოკების პეპტიდაზური აქტივობის შეფასება

რძემჟავა ბაქტერიების პეპტიდაზური სისტემა საკმაოდ რთულ კომპლექსს წარმოადგენს. მასში, როგორც წესი, გაერთიანებულია მრავალი ფერმენტი. ენტეროკოკების ბიოტექნოლოგიური ღირებულების შესაფასებლად განსაზღვრული იყო ყველაზე მნიშვნელოვანი პეპტიდაზების აქტივობა:

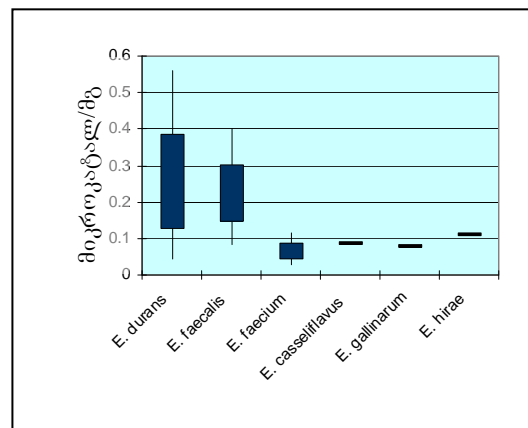
- 1) ფართო მოქმედების მქონე, ზოგადი ამინოპეპტიდაზების - PepN და PepC;
- 2) გლუტამინის და ასპარაგინის მჟავების შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზის უნარის მქონე სპეციფიკური ამინოპეპტიდაზების - PepA;
- პროლინის შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზის უნარის მქონე:
- 3) პროლილდიპეპტიდილამინოპეპტიდაზებისა - PepX და
- 4) პროლინამინოპეპტიდაზების – PepI.

ფერმენტების ხვედრითი კატალიზური აქტივობა გამოსახული იყო მიკროკატალ/მგ (ცილების საერთო რაოდენობაზე გადანგარიშებით), სადაც 1 კატალი წარმოადგენს ფერმენტის იმ რაოდენობას, რომელსაც შესწევს უნარი 1 წამში გარდაქმნას სუბსტრატის 1 მოლი (ცხრილი 5).

ჩატარებული გამოკვლევების შედეგად აღმოჩნდა, რომ PepN და PepC ყველაზე მაღალი აქტივობის შტამები გვხვდება *E. faecalis*-ის ჯგუფის ფარგლებში. ამავე ჯგუფში აღინიშნება PepN და PepC აქტივობის მაჩვენებლების მკაფიო ვარიაბილურობა. ზოგადი ამინოპეპტიდაზების ყველაზე სუსტი აქტივობით ხასიათდება *E. durans*-ის შტამები (დიაგრამა 6).

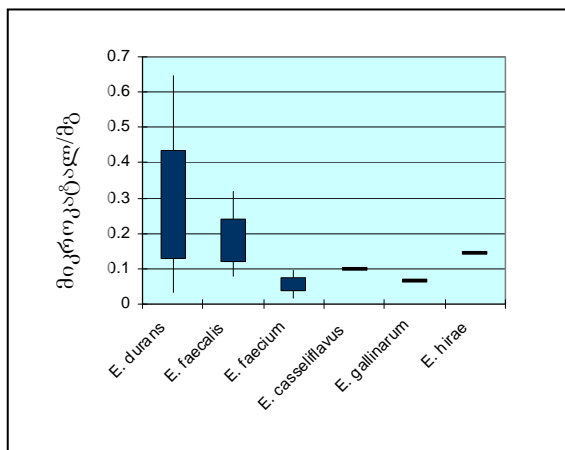


დიაგრამა 6 ზოგადი ამინოპეპტიდაზების PepN და PepC აქტივობა

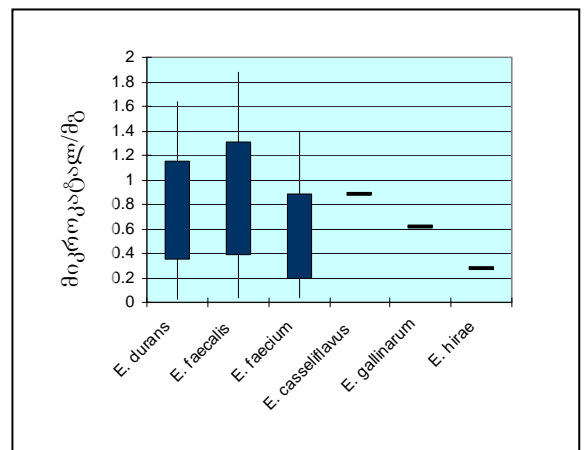


დიაგრამა 7 გლუტამილამინოპეპტიდაზის (PepA) აქტივობა

მიღებული მონაცემების თანახმად გლუტამილამინოპეპტიდაზა PepA-ს მაღალი აქტივობით ხასიათდება *E. durans*-ის შტამები. ამ ჯგუფის ფარგლებში PepA ხვედრითი კატალიზური აქტივობა საშუალოდ უდრიდა 0,25 მიკროკატალ/მგ ცილაზე, მაგრამ გვხდებოდა უფრო მაღალი აქტივობის მქონე (0,39 მიკროკატალ/მგ ცილაზე) და ძალიან დაბალი აქტივობის (0,13 მიკროკატალ/მგ ცილაზე) მქონე მაჩვენებლებიც. PepA-ს აქტივობა ძალიან სუსტი იყო *E. faecium* შტამებში (0,06-0,08 მიკროკატალ/მგ ცილაზე). ამ ორ სახეობას შორის შუალედურ მდგომარეობას იკავებს *E. faecalis*-ის გლუტამილამინოპეპტიდაზა (დიაგრამა 7).



დაგრამა 8 პროლინამინოპეპტიდაზის (PepI) აქტივობა



დაგრამა 9 პროლილდიპეპტიდილამინოპეპტიდაზის (PepX) აქტივობა

PepI და PepX ფერმენტული აქტივობის შესწავლისას გაირკვა, რომ ენტეროკოკების სამივე სახეობა (განსაკუთრებით კი *E. faecalis*) გამოირჩევა პროლილდიპეპტიდილამინოპეპტიდაზა PepX-ის საკმაოდ მაღალი აქტივობით Arg-Pro-pNA სუბსტრატის მიმართ. PepI-ის მაღალი აქტივობა დამახასიათებელია *E. durans*-ის შტამების უმრავლესობისათვის. PepI აქტივობის ყველაზე დაბალი მაჩვენებლები კი აღინიშნება *E. faecium*-ის ჯგუფის ფარგლებში (დიაგრამა 8,9). კაზეინში შემავალ ამინომჟავებს შორის ყველაზე ხშირ კომპონენტს პროლინი წარმოადგენს. აღსანიშნავია, რომ ზოგადი ამინოპეპტიდაზები ამ ამინომჟავას შემცველი სუბსტრატების მიმართ დაბალ ჰიდროლიზურ აქტივობას ავლენს. პროლინის შემცველი პეპტიდების დაშლას ახდენს მხოლოდ სპეციფიკური PepX და PepI პეპტიდაზა [65].

#### A4. pH-ის ცვლილების გავლენა ენტეროკოკების აუტოლიზურ აქტივობაზე

აუტოლიზის ფენომენი შეიძლება განპირობებული იყოს სხვადასხვა ფაქტორებით: ტემპერატურით, pH-ით, NaCl-ის კონცენტრაციით, ზოგიერთ შემთხვევაში სპონტანური ლიზისის მიზეზს ბაქტერიოფაგები წარმოადგენს [102].

ჩვენს მიერ შესწავლილ იყო ენტეროკოკების აუტოლიზური აქტივობა სხვადასხვა pH-ის (7,0; 5,5; 5,1) მქონე ბუფერულ ხსნარებში. აუტოლიზური აქტივობა ფასდებოდა ორი პარამეტრის მიხედვით: აუტოლიზის სიჩქარე RA (Rate of Autolysis) და აუტოლიზის ხარისხი EA (Extent of autolysis) (ცხრილი 6).

pH 7.0-ის მქონე ბუფერში კულტურების ინკუბაციის შედეგად მიღებული მონაცემების თანახმად RA ყველაზე მაღალი მაჩვენებლები დამახასიათებელი იყო *E. faecium*-ის შტამებისთვის, ამავე ჯგუფის ფარგლებში აღინიშნებოდა მაჩვენებლების მაღალი ვარიაბილურობა. ყველაზე დაბალი სიჩქარით აუტოლიზი მიმდინარეობდა *E. faecalis*-ის შემთხვევაში, მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამები კი შუალედურ მდგომარეობას იკავებდა.

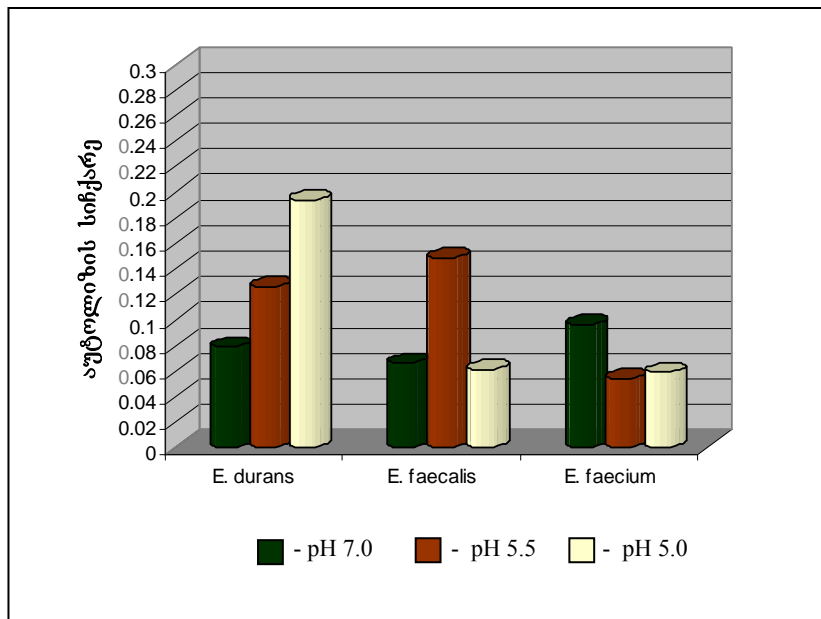
საპირისპირო შედეგები მივიღეთ pH 5,1-ის მქონე ბუფერში: ყველაზე მაღალი RA დაფიქსირებული იყო *E. durans*-ის შემთხვევაში, ყველაზე მგრძობიარე კი pH 5,1-ის მიმართ აღმოჩნდა *E. faecium* შტამები.

pH 5.5-ზე ყველაზე დაბალი სიჩქარის აუტოლიზი აღნიშნული იყო *E. faecium*-ის წარმომადგენლებში (დიაგრამა 10).

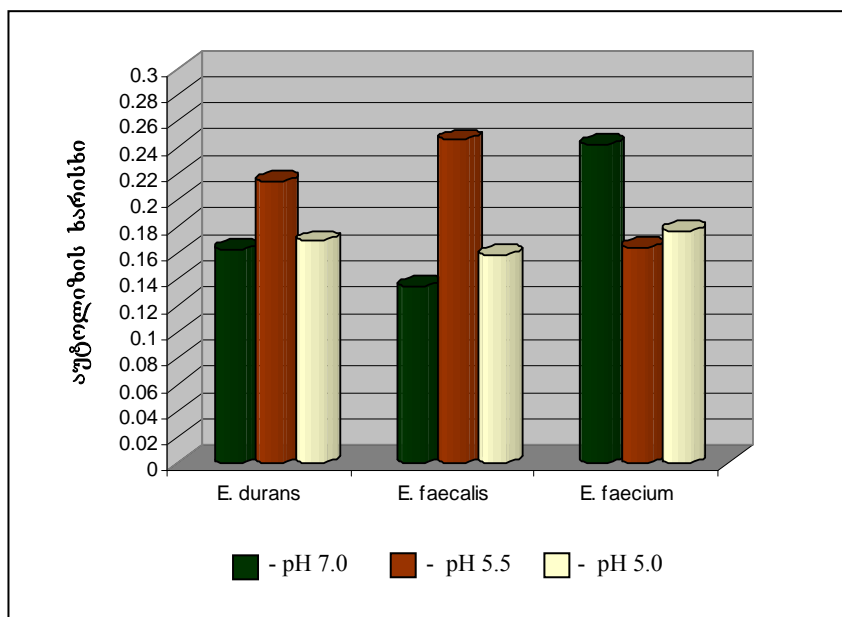
მიღებული შედეგების საფუძველზე შეიძლება ითქვას, რომ *E. durans*-ის შტამები ყველაზე სწრაფ აუტოლიზს განიცდის pH 5,1-ის მქონე არეში, მაშინ როდესაც სტარტერული რძემჟავა ბაქტერიების უმეტესობა (მაგ., *L. casei*, *L. paracasei*) სწრაფ აუტოლიზს განიცდის pH 7.0-ზე [194].

რაც შეეხება *E. durans*-ის შტამების აუტოლიზის ხარისხს, EA-ს ყველაზე მაღალი მაჩვენებლები აღნიშნული იყო pH 5.5 მქონე ბუფერში, დაბალი კი, pH 7.0-ზე. pH 7.0 მქონე ბუფერში 3-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ მაღალი აუტოლიზური აქტივობა გამოვლინდა *E. faecium*-ის შტამებში; ხოლო pH 5.5-ის მქონე ბუფერში *E. faecalis*-ში. pH

5.1 მქონე არეში კულტივირების შედეგად სამივე სახეობის EA მაჩვენებლები მეტ-ნაკლებად მსგავსი აღმოჩნდა (დიაგრამა 11).



**დიაგრამა 10** ენტეროკოკების აუტოლიზის სიჩქარე განსაზღვრული სხვადასხვა pH-ის მქონე ბუფერულ ხსნარებში



**დიაგრამა 11** ენტეროკოკების აუტოლიზის ხარისხი განსაზღვრული სხვადასხვა pH-ის მქონე ბუფერულ ხსნარებში

### 5. ენტეროკოკებში პოლისაქარიდების წარმოქმნის უნარის შესწავლა

პოლისაქარიდების წარმოქმნის უნარი შესწავლილი იყო საქაროზას შემცველ MRS არეზე. პოლისაქარიდების, კერძოდ დექსტრანის წარმოქმნის უნარი არცერთი შტამის შემთხვევაში არ გამოვლინდა.

### 6. ენტეროკოკებში ბიოგენური ამინების სინთეზის უნარის შესწავლა.

ბიოგენური ამინების, კერძოდ, ტირამინის, სინთეზის უნარის შესწავლის შედეგად გაირკვა, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების უმეტესობა (82%) ტიროზინის დეკარბოქსილირების შედეგად წარმოქმნის ტირამინს. ტირამინის სინთეზის უნარი აგრეთვე დამახასიათებელი აღმოჩნდა *E. faecalis*-ის (47%) და *E. faecium*-ის (62,5%) შტამებისათვის (ცხრილი 7).

ბიოგენური ამინების სინთეზი ტექნოლოგიური თვალსაზრისით შტამის უარყოფით თვისებას წარმოადგენს, რადგან ფერმენტირებულ პროდუქტებში ამ ამინების დაგროვება მრავალი არასასურველი რეაქციის მიზეზი შეიძლება იყოს (მაგ., ტირამინის მაღალი კონცენტრაციის მქონე რძემჟავა პროდუქტების მიღებამ შეიძლება გამოიწვიოს თავის ტკივილი, ჰიპერმგრძნობელობის რეაქციები და სხვ.) [157].

**ცხრილი 7.** ენტეროკოკების ტიროზინიდან ტირამინის წარმოქმნის უნარი

შტამი	ტირამინი	შტამი	ტირამინი
<i>E.durans 1</i>	-	<i>E.faecalis79</i>	-
<i>E.durans 2</i>	+	<i>E.faecalis 160</i>	-
<i>E.durans 3</i>	+	<i>E.faecalis 166</i>	-
<i>E.durans 5</i>	+	<i>E.faecalis 192</i>	+
<i>E.durans 6</i>	+	<i>E.faecalis 233</i>	-
<i>E.durans 7</i>	-	<i>E.faecalis 234</i>	+
<i>E.durans 8</i>	+	<i>E.faecalis PEN A-14</i>	+
<i>E.durans 9</i>	-	<i>E.faecalis PEN A-15</i>	+
<i>E.durans 10</i>	+	<i>E.faecalis PEN A-16</i>	-
<i>E.durans 12</i>	+	<i>E.faecalis PEN A-17</i>	+
<i>E.durans 13</i>	+	<i>E.faecalis PEN A-19</i>	+
<i>E.durans 15</i>	+	<i>E.faecalis 1E10</i>	-
<i>E.durans 16</i>	+	<i>E.faecalis 1F2</i>	-
<i>E.durans 17</i>	+	<i>E.faecalis 1F7</i>	+
<i>E.durans 18</i>	+	<i>E.faecalis 4A8 1</i>	-
<i>E.durans 19</i>	+	<i>E. faecium ATCC14434</i>	+
<i>E.durans 20</i>	+	<i>E. faecium 96</i>	-
<i>E.durans 23</i>	+	<i>E. faecium 191</i>	-
<i>E.durans 98</i>	+	<i>E. faecium 221</i>	+
<i>E.durans LMG 10746</i>	+	<i>E. faecium 222</i>	+
<i>E.durans E16</i>	+	<i>E. faecium PEND2</i>	+
<i>E.durans E17</i>	+	<i>E. faecium 2C6</i>	-
<i>E.faecalis ATCC14433</i>	-	<i>E. faecium 2G2</i>	+

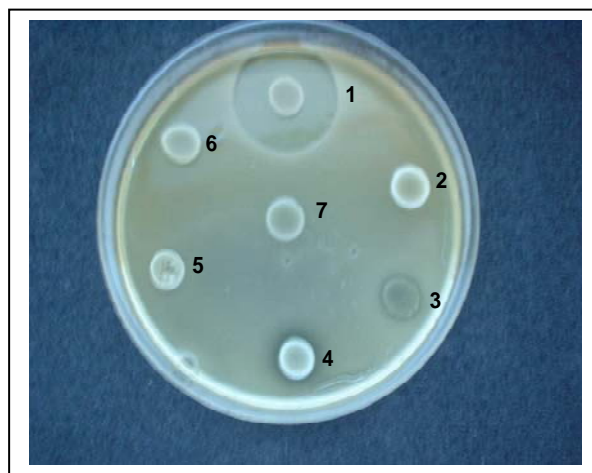
<i>E. faecalis</i> 84	+	<i>E. gallinarum</i> 263	-
<i>E. faecalis</i> 85	-	<i>E. cassei</i> 264	-
<i>E. faecalis</i> 97	+	<i>E. hiraе</i> 266	-

თავი 12 მაწვნიდან გამოყოფილი რქემყავა კოკების ანტაგონისტური აქტივობის შესწავლა

შესწავლილი იყო მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის 49 შტამის ანტაგონისტური უნარი *S. aureus*-ის (3 შტამი), *P. aeruginosa*-ას (5 შტამი), *E. coli* (4 შტამი) და *Shigella flexneri*-ის (1 შტამი) მიმართ. შესწავლილი შტამებიდან არცერთი შტამი არ ავლენდა ანტაგონისტურ თვისებებს ზემოთ აღნიშნული პათოგენური შტამების მიმართ.

ენტეროკოკების 52 შტამის ანტაგონისტური აქტივობა შესწავლილი იყო შემდეგი ინდიკატორულ კულტურების მიმართ: *L. lactis* ATCC11454; *L. plantarum* DSM20174; *L. innocua* BL86/26; *M. luteus* DSM1790.

დადებითი შედეგი აღინიშნებოდა მხოლოდ *M. luteus*-ის მიმართ მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის 7 შტამის შემთხვევაში (39%). შვიდივე შტამი (*E. durans* 2, 5, 9, 13, 18, 20, 23) წარმოქმნიდა, ვიწრო ინჰიბიტორულ ზონას (~0,2 სმ) (სურათი 17). დადებით კონტროლად გამოყენებული იყო სტანდარტული შტამი ანტაგონისტი - *L. plantarum* ISLCPT57.



სურ 17. *E. durans*-ის ანტაგონისტური აქტივობა *M. luteus* მიმართ

- 1 – დადებითი კონტროლი - *L. plantarum* ISLCPT57
- 2-6 - მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans* შტამები



ფერმენტებით (ტრიპსინით, ქიმოტრიპსინით და პრონაზათი) ტესტ-შტამების შემდგომმა დამუშავებამ უარყოფითი შედეგები მოგვცა.

ვიწრო ინჰიბიტორული ზონა და აგრეთვე ინჰიბიტორული აგენტის რეზისტენტულობა ფერმენტების მიმართ მეტყველებს ინჰიბიტორული აგენტის არაცილოვან ანუ არაბაქტერიოცინოგენურ ბუნებაზე.

### თავი 13. ლიზოგენური შტამების გამოვლენა ფისკას მეთოდით

ჩვენს მიერ ლიზოგენურობაზე ტესტირებული იყო *S. thermophilus*-ის 49 და *E. durans*-ის 18 შტამი. ფაგის გამოყოფა არცერთ შემთხვევაში არ დაფიქსირდა.

ფერმენტაციულ პროცესებში ლიზოგენური სტარტერული კულტურების გამოყენებამ შეიძლება გამოიწვიოს არასასურველი შედეგები. კერძოდ, სპონტანურად გამოყოფილი ბაქტერიოფაგი იწვევს სტარტერული კულტურების სიკვდილს, რის შედეგად შეიძლება დაირღვეს მაწვნის (ან სხვა რძის პროდუქტის) “დაყენების” პროცესი. ამიტომ, სტარტერული კულტურების სელექციისას აუცილებელია ლიზოგენური შტამების გაცხრილვა [167].

### კვლევის შედეგების განხილვა

2001-2004 წლებში ჩატარებული ექსპედიციების შედეგად საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში მოპოვებულ იქნა შინაური მაწვნის დედოს 40 ნიმუში. სამუშაოდ შერჩეული დედოების ცალკეულ კომპონენტებად დაშლის შედეგად გაირკვა, რომ მაწვნის წამყვან მიკროფლორას *L. delbrueckii ssp. lactis*-ის წარმომადგენლებთან ერთად რძემჟავა ბაქტერიების კოკოვანი ფორმები, კერძოდ კი *S. thermophilus* და *E. durans* წარმოადგენს, რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს წინამორბედი მკვლევარების მიერ მიღებულ მონაცემებს [38].

ვინაიდან ლიტერატურული მონაცემებით ცნობილია, რომ პრაქტიკულად ყველა რძემჟავა პროდუქტში კოლტის წარმოქმნისა და გემოვნებითი თვისებების ჩამოყალიბების პროცესში წამყვან როლს *S. thermophilus* ასრულებს, კვლევის ძირითადი მიმართულება მაწვნის ამ კომპონენტზე გამახვილდა. გამოკვლევების მთავარ მიზანს

წარმოადგენდა *S. thermophilus*-ის როგორც ფენოტიპური, ასევე გენოტიპური დახასიათება.

ამავე დროს, რადგან მაწვნის ნიმუშების უმრავლესობაში აღინიშნებოდა ენტეროკოკების არსებობა, მიზანშეწონილად ჩაითვალა მათი ბიოქიმიური როლის გარკვევა მაწვნის ფერმენტაციის, საბოლოო პროდუქტის სტრუქტურისა და გემოს ჩამოყალიბებაში. ენდემური შტამების მნიშვნელოვანი ფენოტიპური თვისებების შესწავლის შედეგად, (აციდოფიკაციური, ურეაზული, პროტეოლიზური, პეპტიდაზური და აუტოლიზური აქტივობა) შესაძლებელი ხდება ბიოტექნოლოგიურად მნიშვნელოვანი მახასიათებლების მქონე სტარტერული კულტურების სელექცია, რომელთა გამოყენება მიზანშეწონილი იქნება არა მარტო მაწვნის, არამედ სხვა რძემჟავა პროდუქტების წარმოებისათვის.

გამოკვლევის საწყის ეტაპზე მიზნად დავისახეთ მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus* შტამების ბიოტექნოლოგიურად მნიშვნელოვანი ფენოტიპური ნიშან-თვისებების შესწავლა.

პირველ რიგში შესწავლილი იყო სტარტერული კულტურებისთვის მნიშვნელოვანი ისეთი თვისება, როგორცაა აციდოფიკაციური აქტივობა. აციდოფიკაციური აქტივობა განპირობებულია მიკროორგანიზმების უნარით ლაქტოზის მეტაბოლიზმის შედეგად წარმოქმნას რძემჟავა, რომელიც რძის pH-ის დაწვეის და შედეგების ძირითად მიზეზს წარმოადგენს [10].

როგორც გაირკვა, მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus* შტამების უმეტესობა (65%) ხასიათდება საშუალო დონის აციდოფიკაციური აქტივობით, თუმცა, შტამების 23% ავლენს სწრაფი აციდოფიკაციის უნარს.

მიღებული შედეგების შეჯამებისას დადგენილი იქნა გარკვეული კორელაცია აციდოფიკაციის პროცესის სიჩქარესა და რძის შედეგების უნარს შორის. კერძოდ გამოვლინდა, რომ სუსტი აციდოფიკაციური აქტივობის მქონე შტამები რძეს მხოლოდ 24 საათის შემდეგ ადედებს, მაშინ როდესაც ძლიერი აციდოფიკაციური აქტივობის მქონე შტამების უმრავლესობა (7 შტამი 11 დან) რძის შედეგებას მინიმალურ დროში (6 საათი) ახორციელებს. რადგან აციდოფიკაციის სიჩქარე უშუალოდ დაკავშირებულია

რძის შედედების პროცესთან, ძლიერი აციდოფიკაციის უნარის მქონე შტამები შეიძლება ეფექტურად იყოს გამოყენებული მაწვნის სტანდარტული დედოს ერთ-ერთი კომპონენტად.

გარდა ამისა, შესწავლილი იყო *S. thermophilus*-ის მიერ სინთეზირებული რძემჟავის სივრცითი კონფიგურაცია, რის შედეგად დადგინდა, რომ ყველა გამოკვლეული შტამი წარმოქმნის ლაქტატის L - ოპტიკურ იზომერს. L-ლაქტატი ადამიანის ნივთიერებათა ცვლის შუალედურ პროდუქტს წარმოადგენს, ამიტომ ადვილად გარდაიქმნება და სწრაფად მოინელება როგორც ზრდასრულ ორგანიზმში, ასევე ახალშობილებში. ამ ფაქტის გათვალისწინებით, რძემჟავა პროდუქტების (განსაკუთრებით ბავშვთა საკვების) დედობის შექმნისათვის მიზანშეწონილია სწორედ ისეთი კულტურების შერჩევა, რომლებიც L-რძემჟავას წარმოქმნის [10].

აციდოფიკაციური აქტივობა დაკავშირებულია ლაქტოზის ჰიდროლიზის შედეგად მიღებული გლუკოზის და გალაქტოზის გარდაქმნის რეაქციებთან. მიუხედავად იმისა, რომ ლაქტოზა ადვილად ტრანსპორტირდება უჯრედის შიგნით და *S. thermophilus*-ის სახეობის ბაქტერიები ეფექტურად ახდენს მის ჰიდროლიზს გლუკოზად და გალაქტოზად, ამ სახეობის შტამების უმეტესობას მხოლოდ გლუკოზის ფერმენტაციის უნარი შესწევს [125]. E

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გამოავლინა, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი შტამების უმეტესობას აგრეთვე არ შესწევს გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარი. გალაქტოზის დაშლის უნარი გამოკვლეული შტამების მხოლოდ 26%-ში აღინიშნა. მიღებული შედეგები ადასტურებს უკანასკნელ წლებში გამოთქმულ მოსაზრებებს იმის შესახებ, რომ *S. thermophilus*-ის ზოგიერთ შტამს, ჩვეულებრივ, შესწევს გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარი და ამ თვისების გამოვლენა არ საჭიროებს შტამების კულტივირებას განსაკუთრებულ სელექციურ პირობებში [81,131]. შესაბამისად, ეს ფენოტიპური თვისება შეიძლება განხილულ იქნას როგორც ვარიანტული შიდასახეობრივი ტაქსონომიური კრიტერიუმი.

გალაქტოზის სრული უტილიზაციის უნარი რძემჟავა პროდუქტების ინდუსტრიაში სასურველ თვისებას წარმოადგენს, რაც აიხსნება სხვადასხვა გარემოებით. რძეში ჭარბი გალაქტოზის აკუმულირება ხელს უწყობს იმ არასასურველი

ჰეტეროფერმენტული ლაქტობაქტერიების გამრავლებას, რომლებიც პროდუქტების გემოვნებით და სხვა დეფექტებს იწვევს [135,173]. გარდა ამისა, გალაქტოზა ლპობის გამომწვევი და პათოგენური ბაქტერიებისათვის ენერჯის (ნახშირბადის) წყაროს წარმოადგენს, რაც ხელს უწყობს მათ გამრავლებას [94]. გარდა ამისა, გალაქტოზის მაღალი შემცველობის მქონე ფერმენტირებული რძის პროდუქტები მავნეა ადამიანის ჯანმრთელობისათვის, რადგან გალაქტოზის ჭარბი კონცენტრაცია იწვევს ქსოვილების უჯრედებში ტოქსიური გალაქტიტოლის დაგროვებას [57].

ზოგიერთი მკვლევარის აზრით, გალაქტოზის მეტაბოლიზმი უშუალოდ არის დაკავშირებული ეგზოპოლისაქარიდების პროდუქციასთან. გამოთქმული იყო მოსაზრება, რომ *S. thermophilus*-ის eps-ის წინამორბედი მოლეკულების (პრეკურსორების) ფორმირება დამოკიდებულია ლაქტოზის ჰიდროლიზის შედეგად მიღებულ და ლეილორის გზით გარდაქმნილ გალაქტოზის რაოდენობაზე [114]. თუმცა, ჩვენი გამოკვლევებით კავშირი eps წარმოქმნასა და გალაქტოზის ფერმენტირების უნარს შორის გამოვლენილი არ იყო.

ყოველივე ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, ჩვენს მიერ შერჩეული გალაქტოზის დეგრადაციის უნარის მქონე *S. thermophilus*-ის შტამები რეკომენდირებულია, როგორც მაწვნის სტანდარტული დედოს ერთ-ერთი კომპონენტი.

როგორც ლიტერატურული წყაროებიდან არის ცნობილი, ურეაზული აქტივობა წარმოადგენს ერთ-ერთ ფაქტორს, რომელიც უარყოფითად მოქმედებს სტარტერული კულტურის აციდოფიკაციურ აქტივობაზე. სტარტერულ ლაქტობაქტერიებს Aშორის ურეაზული აქტივობა მხოლოდ *S. thermophilus*-ისთვის არის დამახასიათებელი [173]. რძის შედედებისას *S. thermophilus*-ის ურეაზული შტამების გამოყენება შარდოვანას ჰიდროლიზს იწვევს, რაც, თავის მხრივ, რძის pH-ის მომატებას და აციდოფიკაციის პროცესის შენელებას განაპირობებს [147]. ამიტომ სტარტერული კულტურების შერჩევისას დიდი ყურადღება ექცევა ურეაზული აქტივობას მქონე შტამების გამოვლენას.

მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის 49 შტამის ურეაზული აქტივობის შესწავლისას მხოლოდ ერთი ურეაზა-ნეგატიური შტამი გამოვლინდა. შტამების 16%-თვის დამახასიათებელი იყო სუსტი აქტივობა. მათი აქტივობა მკვეთრად იზრდებოდა

საინკუბაციო არეში  $Ni^{2+}$  იონების დამატებისას. ეს ფაქტი ადასტურებს მოსაზრებას იმის შესახებ, რომ ბაქტერიული ურეაზების უმეტესობის გააქტივებისათვის არეში  $Ni^{2+}$  არსებობაა საჭირო [127].

*ureC* გენის PCR-ამპლიფიკაციის შედეგად ყველა შტამის შემთხვევაში, მათ შორის ფენოტიპურად ურეაზა-ნეგატიურისაც, იდენტიფიცირებული იყო ურეაზას სინთეზზე პასუხისმგებელი სტრუქტურული *ureC* გენის შესაბამისი ფრაგმენტები.

ბუნებაში ურეაზა-ნეგატიური *S. thermophilus*-ის შტამების არსებობა იმაზე მეტყველებს, რომ ამ ფერმენტებს ამ სახეობის ზრდა-განვითარებაში არსებითი როლი არ აკისრია. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ მათ ეს თვისება ევოლუციის შედეგად ჩამოუყალიბდათ, როგორც თავდაცვითი რეაქცია ძლიერ აციდოფიკაციულ სახეობებთან ერთდროული კულტივირებით გამოწვეული კონკურენციის შედეგად.

შარდოვანას ჰიდროლიზი, ერთის მხრივ, დადებითად აისახება სხვადასხვა პროდუქტის (მათ შორის მაწვნის, იოგურტის ან სხვ.) დამზადების პროცესზე, რადგან *S. thermophilus*-ის მიერ შარდოვანას დაშლის შედეგად გამოყოფილი  $CO_2$  ხელსაყრელ გარემოს ქმნის *L. delbrueckii* განვითარებისათვის. მეორე მხრივ, შარდოვანას ჰიდროლიზი აფერხებს რძის pH-ის შემცირებას, ანუ აციდოფიკაციის პროცესს და, შესაბამისად, იწვევს რძის შედედების პროცესის შენელებას [131,147]. ამ ფაქტის გათვალისწინებით, სტარტერული კულტურების სელექციისას განსაკუთრებული ყურადღება უნდა მიექცეს სუსტი ურეაზული აქტივობის მქონე შტამების შერჩევას.

რძეში ბაქტერიების გამრავლების შედეგად აზოტის წყაროს (პეპტიდების, ამინომჟავების) შემცირება თრგუნავს სტარტერული ბაქტერიების ზრდა-გამრავლებას, რაც აციდოფიკაციის პროცესის შენელების კიდევ ერთ მიზეზს წარმოადგენს. რძემჟავა ბაქტერიების ოპტიმალური ზრდა მათ პროტეოლიზურ სისტემაზე, პირველ რიგში კი რძის კაზეინის ჰიდროლიზის უნარზეა დამოკიდებული. ამ პროცესზე უჯრედულ კედელთან ასოცირებული ე.წ. CEP პროტეინაზები აგებს პასუხს, რადგან მხოლოდ მათ შესწევს კაზეინის საწყისი დეგრადაციის უნარი [128].

მიუხედავად იმისა, რომ *S. thermophilus*-ის შტამები ფართოდ გამოიყენება რძემჟავა პროდუქტების წარმოებაში, მათი CEP (PrtS პროტეინაზების) შესახებ მცირე ინფორმაცია

არსებობს. ამ სახეობის შტამების უმეტესობას CEP-ის სინთეზის უნარი არ შესწევს ან CEP-ის პროდუქციის დაბალი დონე ახასიათებს [66].

მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამებს შორის კაზეინის დაშლის უნარის მქონე შტამების გამოვლენის მიზნით, ჩვენს მიერ განხორციელებული იყო შტამების სკრინინგი უჯრედულ კედელთან ასოცირებული PrtS პროტეინაზას სინთეზზე პასუხისმგებელი *prtS* გენის შემცველობაზე. დადებითი შედეგი აღნიშნული იყო შტამების 37%-ში. საინტერესოა, რომ *prtS* გენის PCR-ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ზომა, მოსალოდნელ სიდიდეს აღემატებოდა. გენთა ბანკში არსებული მონაცემების თანახმად მოსალოდნელი ზომა უნდა ყოფილიყო 581 bp, ჩვენს შემთხვევაში კი მიღებული იყო 680 bp ზომის დნმ-ის ფრაგმენტები. ლიტერატურაში არსებული მონაცემების თანახმად, *S. thermophilus*-ის შტამებისათვის ძირითადად დამახასიათებელია 581 bp ფრაგმენტები, უფრო იშვიათად გვხვდება ანომალური ზომის ფრაგმენტის მქონე შტამები. თუმცა, განსხვავება ნორმალური და ანომალური ფრაგმენტების მქონე შტამების პროტეოლიზურ აქტივობას შორის აღნიშნული არ იყო [66]. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ ანომალური ფრაგმენტები წარმოადგენს მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის ყველა ენდემური შტამისათვის დამახასიათებელ თავისებურებას, რაც კიდევ ერთხელ მიგვანიშნებს მაწვნის უნიკალურობაზე, თუმცა ამ მოსაზრების დასამტკიცებლად საჭიროა შტამების უფრო მეტი რაოდენობის დაწვრილებითი გამოკვლევა.

მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების კაზეინის დაშლის უნარის თვისობრივი შეფასების შედეგად აღმოჩნდა, რომ მხოლოდ ოთხ შტამს შესწევს კაზეინის დეგრადაციის უნარი. ოთხიდან ორი შტამის შემთხვევაში კაზეინის დეგრადაციის დონე დამოკიდებული იყო  $\text{CaCl}_2$ -ის მოლარულ კონცენტრაციაზე. აქედან გამომდინარე, შეიძლება გამოთქმულ იქნას მოსაზრება, რომ *L. lactis ssp. cremori*-ის PI-III პროტეინაზების მსგავსად *S. thermophilus*-ის კატალიზურად აქტიური PrtS-ის პროდუქცირება დამოკიდებულია არეში  $\text{Ca}^{2+}$  იონების არსებობაზე, კერძოდ,  $\text{Ca}^{2+}$  თანაობისას PrtS აქტიურ კონფორმაციას იძენს და თერმოსტაბილურობას ინარჩუნებს [64].

რაც შეეხება დანარჩენ prtS<sup>+</sup> შტამებს, შესაძლებელია, რომ მათ შემთხვევაში კაზეინოლიზური აქტივობის გამოსავლენად სხვა პირობების შექმნა გახდეს საჭირო, მაგალითად, საინკუბაციო პერიოდის გახანგრძლივება ან ლიზისის გამომწვევი დესტაბილიზატორების დამატება. ასეთი პირობების დაცვა ჩვენს ინტერესებს არ შეესაბამებოდა, რადგან მაწვნის დამზადების პროცესი საკმაოდ მოკლეა და მხოლოდ 3-4 საათი გრძელდება, ამდენად გამოკვლევის ინტერესებში სწრაფი პროტეოლიზური აქტივობის მქონე სტარტერული *S. thermophilus*-ის შტამების შერჩევა იყო. დესტაბილიზატორების გამოყენება არასასურველია, რადგან მან შეიძლება კონკრეტული პროდუქტის დამზადების პროცესის მიმართულება და მისთვის დამახასიათებელი თვისებების შეცვლა გამოიწვიოს.

ზოგიერთი მკვლევარის მიერ დადგენილ იქნა კავშირი უჯრედულ კედელთან ასოცირებულ PrtS პროტეინაზების აქტივობასა და სწრაფად მიმდინარე აციდოფიკაციას შორის [165]. მსგავსი კორელაცია აღნიშნული იყო ჩვენს მიერ გამოკვლეული შტამების მაგალითზეც. კაზეინოლიზური აქტივობა აღნიშნებოდა სწრაფმჟავაწარმომქმნელ შტამების შემთხვევაში. მათ რიცხვს მიეკუთვნება *S. thermophilus*-ის 3207, 3213, 3222 და 3233 შტამები, რომლებმაც 6-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ΔpH-ის მაქსიმალური მაჩვენებელი მოგვცა. ეს ფაქტი იმით შეიძლება აიხსნას, რომ ამ შტამების უჯრედულ კედელთან ასოცირებული აქტიური პროტეინაზები კულტივირების საწყის ეტაპზე იწყებს კაზეინის დაშლას, აზოტოვანი ნაერთებით ამდიდრებს რძეს, რითაც ხელს უწყობს სტარტერული კულტურების ოპტიმალური ზრდა-განვითარებას. შესაბამისად ხდება აციდოფიკაციის პროცესის აქტივაცია.

ბიოტექნოლოგიური თვალსაზრისით რძემჟავა ბაქტერიებისთვის დამახასიათებელ კიდევ ერთ მნიშვნელოვან ფენოტიპურ თვისებას ეგზოპოლისაქარიდების წარმოქმნის უნარი წარმოადგენს. eps-წარმომქმნელი რძემჟავა ბაქტერიები სხვადასხვა ფერმენტირებული რძის პროდუქტის მისაღებად გამოიყენება (მაგ., იოგურტი, კეფირი, პროსტოკვაშა, აციდოფილინი, არაჟანი და ა.შ). ბაქტერიული წარმოშობის eps წარმოადგენს ბუნებრივ ემულსიფიკატორებს, რომლებსაც დიდი მნიშვნელობა გააჩნია რძემჟავა პროდუქტების ტექსტურის ჩამოყალიბებაში. eps-ის პროდუცენტ შტამებს განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება დიეტური (ცხიმის

დაბალი შემცველობის) იოგურტის წარმოებაში. არსებობს მოსაზრება იმის შესახებ, რომ სტარტერული კულტურების მიერ გამოყოფილი eps უკავშირდება რძის ცილებს, ქმნის მაღალი ჰიდროფილობის კომპლექსებს, რომლებიც დადებითად მოქმედებს პროდუქტების კონსისტენციაზე [9,59].

მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების შესწავლისას გაირკვა, რომ ეგზოპოლისაქარიდების სინთეზის უნარი გამოკვლეული შტამების 24% ახასიათებს. ეგზოპოლისაქარიდები განაპირობებს პროდუქტის სტრუქტურის ჩამოყალიბებას (სიბლანტეს) და შრატის გამოყოფის (სინერეზისის) შემცირებას, აქედან გამომდინარე, eps-ის წარმოქმნის უნარის მქონე შტამებს დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მაწვნის დამზადების პროცესში. ჩვენს მიერ მაწვნის სტარტერულ კულტურებად შერჩეული იქნა eps-ის სინთეზის უნარის მქონე 6 შტამი: *S. thermophilus* 3239, 3270, 1D, 10C, 13B და 1720.

ამგვარად, მიუხედავად იმისა, რომ ყველა გამოკვლეული შტამი გამოყოფილი იყო ერთი ტიპის პროდუქტიდან – მაწვნიდან, სხვადასხვა ბიოქიმიური თვისების შესწავლის შედეგად გამოვლენილი იქნა *S. thermophilus*-ის შტამებისთვის დამახასიათებელი ფენოტიპური პოლიმორფიზმი. ჩვენმა გამოკვლევებმა კიდევ ერთხელ დაადასტურა მოსაზრება იმის შესახებ, რომ არაინდუსტრიული “საოჯახო” რძემწავა პროდუქტებიდან გამოყოფილი ბაქტერიული შტამები, სტანდარტული საწარმოო შტამებისგან განსხვავებით, შიდასახეობრივი მრავალფეროვნებით ხასიათდება, რაც ცვალებად გარემო პირობებში განვითარებასთან არის დაკავშირებული. სწორედ ეს მრავალფეროვნება ქმნის იმ ბუნებრივ რეზერვს, რომლიდანაც შეიძლება სასურველი თვისებების მქონე შტამების შერჩევა და მათი საწარმო დანიშნულებით გამოყენება.

ჩვენი გამოკვლევების მორიგ მიზანს წარმოადგენდა გეოგრაფიულად დაშორებულ რეგიონებში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამების გენოტიპური პოლიმორფიზმის შესწავლა. გენოტიპური დახასიათებისათვის გამოყენებულ იქნა მოლეკულური ტიპირების ისეთი თანამედროვე მეთოდი, როგორცაა Rep-PCR.



ჩვეულებრივი პრაიმერების გამოყენებით ჩატარებული Rep-PCR-ით მიღებული ფრაგმენტების გელ-ელექტროფორეზის შედეგები ანალიზისათვის ნაკლებად წარმატებული აღმოჩნდა. Rep-PCR-ის მეთოდით მიღებული დნმ-ის “თითის ანაბეჭდების” ანალიზის შედეგად 49 შტამში გამოვლენილი იყო მხოლოდ 5 მეტ-ნაკლებად განსხვავებული გენოტიპის მქონე შტამთა ჯგუფები.

ფლუორესცენტული პრაიმერების გამოყენებით კი შესაძლებელი გახდა Rep-PCR-ის შედეგების ავტომატიზირებული დამუშავება (კაპილარული ელექტროფორეზის ABI-Prism 310 სისტემის გამოყენებით). კაპილარული ელექტროფორეზის შედეგად მიღებული იყო ელექტროფეროგრამები, რომელთა თითოეული პიკი შეესაბამებოდა კონკრეტული სიდიდის მქონე დნმ-ის ფრაგმენტს. UPGMA მეთოდის გამოყენებით მიღებული ელექტროფეროგრამების ანალიზის შედეგად აგებულ იქნა დენდროგრამა, რომელიც მიღებულ გენოტიპებს შორის მსგავსების ხარისხს გამოხატავდა. ამ გზით 49 შტამს შორის გამოვლენილ იქნა 41 განსხვავებული გენოტიპი. ეს ფაქტი მაწვნიდან გამოყოფილი თერმოფილური სტრეპტოკოკების გენოტიპური პოლიმორფიზმის მაღალ დონეზე მიუთითებს.

გენოტიპებს შორის მსგავსების კოეფიციენტის გამოთვლის გზით, შესაძლებელი გახდა შტამების დაჯგუფება 3 ძირითად კლასტერად. აღსანიშნავია, რომ შტამების დაჯგუფების შედეგად გამოვლინდა გარკვეული დამოკიდებულება მსგავსი გენოტიპების მქონე შტამებსა და მათ “გეოგრაფიული წარმოშობას” ანუ მაწვნის მოპოვების ადგილებს შორის.

UPGMA დენდროგრამიდან გამომდინარე პირველ (A) კლასტერში გაერთიანდა დასავლეთ საქართველოს არაზღვისპირა ქალაქებსა და სოფლებში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამები. მეორე (B) კლასტერი ორი ქვეკლასტერს მოიცავდა. პირველი მათგანში (B<sub>1</sub>), ძირითადად, დასავლეთ საქართველოს ზღვისპირა ზოლში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამები, ხოლო მეორეში (B<sub>2</sub>) კი, აღმოსავლეთ საქართველოს რეგიონებში მოგროვებული მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი შტამები შევიდა. მესამე ყველაზე მრავალრიცხოვანი (C) კლასტერი ხასიათდებოდა ჰეტეროგენობით, თუმცა ამ კლასტერში გაერთიანებული შტამების

უმრავლესობა აგრეთვე აღმოსავლეთ საქართველოში მოპოვებული მაწვნის დედოებიდან იყო გამოყოფილი.

მაწვნიდან გამოყოფილი თერმოფილური სტრეპტოკოკების გენოტიპური და ფენოტიპური შიდასახეობრივი პოლიმორფიზმის გამოვლენის შემდეგ ჩვენი გამოკვლევის მიზანს წარმოადგენდა შესაძლო კორელაციის დადგენა ფენოტიპურ მახასიათებლებსა და გენოტიპებს შორის.

მიღებული შედეგების საფუძველზე შეინიშნებოდა ზოგიერთი კანონზომიერება თერმოფილური სტრეპტოკოკების ცალკეულ ფენოტიპურ ნიშან-თვისებასა და გენოტიპს შორის, თუმცა მკაცრი კორელაციის დადგენა მაინც არ მოხერხდა. კერძოდ, აღმოჩნდა, რომ აღმოსავლეთ საქართველოს დედოებიდან გამოყოფილი და B<sub>2</sub> კლასტერში გაერთიანებული ყველა შტამი ამავდროულად სუსტი აციდოფიკაციური აქტივობით ხასიათდება. კაზეინის დაშლის უნარის მქონე ოთხი შტამიდან სამი AA კლასტერში შევიდა, ხოლო შტამები, რომლებშიც PrtS პროტეინაზას სინთეზზე პასუხისმგებელი გენი იყო იდენტიფიცირებული, ძირითადად ლოკალიზებული აღმოჩნდა B კლასტერში. გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარის მქონე შტამები უმეტესად გამოყოფილი იყო დასავლეთ საქართველოს არაზღვისპირა (A კლასტერი) და ზღვისპირა რეგიონების დედოებიდან (B<sub>2</sub> კლასტერი). ეგზოპოლისაქარიდების სინთეზის უნარის მქონე შტამების უმეტესობა (6 შტამი) C კლასტერში აღმოჩნდა მოთავსებული. სუსტი ურეაზული აქტივობის მქონე შტამები თანაბრად გადანაწილდა A და B კლასტერებს შორის. B კლასტერში აღმოჩნდა აგრეთვე ატიპური ურეაზა-უარყოფითი შტამი *S. thermophilus* 3271 (სურ. 14).

ამგვარად, შეიძლება ითქვას, რომ F-Rep-PCR-ის მეთოდი საკმაოდ ეფექტური აღმოჩნდა საქართველოს სხვადასხვა რეგიონის მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი თერმოფილური სტრეპტოკოკების გენოტიპური მრავალფეროვნების გამოსავლენად.

უნდა აღინიშნოს, რომ მოცემული მეთოდი საქართველოში გამოყოფილი რძემჟავა ბაქტერიების შტამების მოლეკულური ტიპირებისათვის პირველად იქნა გამოყენებული. ამ მიმართულებით შესრულებული შემდგომი გამოკვლევები არა მარტო გააღრმავებს ცოდნას ენდემური შტამების გენოტიპური მრავალფეროვნების

შესახებ, არამედ დაგვეხმარება შტამ-სპეციფიური მოლეკულური მარკერების იდენტიფიცირებაში. მიღებული ცოდნის საფუძველზე შესაძლებელი გახდება ბიოტექნოლოგიური მნიშვნელობის მქონე შტამების გამოვლენა, მათი სხვადასხვა პროდუქტის დამზადების პროცესში ჩართვა და დაპატენტება.

როგორც უკვე აღინიშნა, საქართველოს სხვადასხვა რეგონში მოპოვებული მაწვნის დედოების მიკროფლორის ხშირ კომპონენტებს *E. durans* შტამები წარმოადგენდა.

*E. durans* შტამების ტიპირებისათვის გამოყენებული იყო უჯრედული ცილების ელექტროფორეზის მეთოდი (SDS-PAGE of WCP). როგორც აღმოჩნდა, ეს მეთოდი ენტეროკოკების სახეობების ზუსტი იდენტიფიკაციის საშუალებას იძლევა, მაგრამ ამავე დროს იგი არაეფექტურია შიდასახეობრივი პოლიმორფიზმის გამოსავლენად.

ბიოტექნოლოგიური თვალსაზრისით “სასარგებლო“ შტამების შერჩევის მიზნით მაწვნის დედოებიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის ფენოტიპური დახასიათება მოვახდინეთ შემდეგი მნიშვნელოვანი ბიოქიმიური კრიტერიუმების მიხედვით: აციდოფიკაციური აქტივობა, პროტეოლიზური და პეპტიდაზური აქტივობა, აუტოლიზური აქტივობა, პოლისაქარიდების და ბიოგენური ამინების სინთეზის უნარი. მაწვნიდან გამოყოფილი ენტეროკოკების ბიოქიმიური თვისებები შედარებულ იქნა სხვადასხვა რძემჟავა პროდუქტებიდან გამოყოფილი ენტეროკოკების (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. casseiflavus*) თვისებებთან.

აციდოფიკაციური აქტივობის შესწავლის შედეგად გაირკვა, რომ *E. durans*-ის შტამების აქტივობა უფრო მაღალია ენტეროკოკების სხვა სახეობებთან შედარებით. თუმცა, მაწვნიდან გამოყოფილ თერმოფილურ სტრეპტოკოკებთან შედარებით, ენტეროკოკების აციდოფიკაციური აქტივობა მკვეთრად უფრო სუსტი აღმოჩნდა. შესაბამისად *E. durans*-ის შტამების გამოყენება მაწვნის დამზადების პროცესში გამართლებული არ არის, რადგან Yმათ შორის ყველაზე ძლიერი აციდოფიკატორებიც კი რძის pH-ს 4,9-მდე მხოლოდ 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ამცირებს. მაწვნის დამზადება კი ხანმოკლე (3-4 სთ) პროცესია, ამდენად სწრაფი მჟავაწარმოქმნელი შტამები დედოს შესაქმნელად გაცილებით უფრო შესაფერისია.

მიღებული შედეგები ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს, რომელთა თანახმად სხვადასხვა ენტეროკოკების მიერ ლაქტოზის დეგრადაციის პროცესი უფრო ნელა ხორციელდება ვიდრე *L. paracasei*-ის შემთხვევაში, რომელიც თავისთავად სუსტ მჟავაწარმომქნელს წარმოადგენს [73].

დადგინდა, რომ ენტეროკოკების ხუთივე სახეობის შტამი ლაქტოზის ფერმენტაციის შედეგად LL-რძემჟავას წარმოქმნის.

ენტეროკოკების პროტეოლიზური აქტივობის რაოდენობრივი შეფასების შედეგად დადგენილ იქნა, რომ ყველა შესწავლილი სახეობის შტამი ხასიათდება ეგზოგენური პროტეინაზების დაბალი აქტივობით. მათ შორის ყველაზე მაღალი პროტეოლიზური აქტივობა შენიშნული იყო *E. faecalis*-ის შტამებში, თუმცა, ცნობილია, რომ საშუალო პროტეოლიზური აქტივობის მქონე სტარტერული რძემჟავა ბაქტერიები (მაგ., *L. casei*) იდენტურ პირობებში პროტეოლიზის შედეგად ამინომჟავების 2-ჯერ უფრო მეტ რაოდენობას ათავისუფლებს [124].

პროტეოლიზური აქტივობის შესწავლას დიდი პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს, ვინაიდან მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის მქონე შტამებისგან შემდგარი სტარტერული კულტურები დაბალი აქტივობის კულტურების სტიმულირებას ახდენს. ეს აჩქარებს რძემჟავა პროდუქტების მიღების პროცესს. მეორე მხრივ, პროტეოლიზის შედეგად გამოთავისუფლებული პეპტიდები და ამინომჟავები მნიშვნელოვან ზემოქმედებას ახდენს პროდუქტის ორგანოლეპტურ თვისებების ფორმირებაზე [10,91].

რძემჟავა ბაქტერიების პროტეოლიზური სისტემის მნიშვნელოვან კომპონენტს სპეციფიური მოქმედების პეპტიდაზები წარმოადგენს. ენტეროკოკების ბიოტექნოლოგიური ღირებულების შესაფასებლად შესწავლილი იყო: ფართო მოქმედების სპექტრის მქონე ზოგადი ამინოპეპტიდაზების (PepN და PepC), გლუტამინის და ასპარაგინის მჟავების შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზის უნარის მქონე სპეციფიური ამინოპეპტიდაზების (PepA); პროლინის შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზის უნარის მქონე პროლილდიპეპტიდილამინოპეპტიდაზების (PepX) და პროლინამინოპეპტიდაზების (PepI) ხვედრითი კატალიზური აქტივობა.

აღმოჩნდა, რომ ენტეროკოკების შესწავლილ სახეობებში ყველაზე მაღალი აქტივობით გამოირჩევა პროლინის შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზის უნარის მქონე

პროლილდიპეპტიდილამინოპეპტიდაზები (PepX და PepI), ხოლო ყველაზე დაბალი აქტივობით ზოგადი ამინოპეპტიდაზები - PepN და PepC. *E. durans*-ის შტამებისთვის დამახასიათებელია გლუტამინის და ასპარაგინის მჟავების შემცველი პეპტიდების ჰიდროლიზის უნარის მქონე PepA ამინოპეპტიდაზების და პროლინამინოპეპტიდაზების – PepI მაღალი აქტივობა. სხვა სახეობებთან შედარებით ოთხივე ტიპის პეპტიდაზების შედარებით სუსტი აქტივობა აღინიშნება *E. faecium*-ის შტამებში.

რემეჩავა პროდუქტების სენსორული (გემოვნებითი) თვისებების ჩამოყალიბებაში თავისუფალი ამინომჟავები გარკვეულ როლს ასრულებს. მაგ., შვეიცარული ყველისთვის დამახასიათებელი მოტკბო გემო, ძირითადად, განპირობებულია ყველში თავისუფალი პროლინის არსებობით. პროლინი კაზეინის შემადგენლობაში შემავალ ამინომჟავებს შორის ყველაზე ხშირ კომპონენტს წარმოადგენს. აღსანიშნავია, რომ ზოგადი ამინოპეპტიდაზები ამ ამინომჟავას შემცველი სუბსტრატების მიმართ დაბალ ჰიდროლიზურ აქტივობას ავლენს. პროლინის შემცველი პეპტიდების დაშლა მხოლოდ სპეციფიური PepX და PepI პეპტიდაზებით ხორციელდება [65]. გლუტამინის მჟავა პროდუქტს ბულიონის მსგავს გემოს ანიჭებს, არგინინი კი არასასიამოვნო სიმწარეს [2,32]. აღსანიშნავია, რომ ზოგადი ამინოპეპტიდაზები მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ე.წ. ”მწარე” პეპტიდების დაშლაში [65].

ამ ფაქტებისა და ენტეროკოკების პეპტიდაზური აქტივობის განსაზღვრისას მიღებული შედეგების გათვალისწინებით, შესაძლებელია ამა თუ იმ პროდუქტის წარმოებისთვის „სასარგებლო“ სტარტერული კულტურების შერჩევა. კერძოდ PepI, PepX, PepN და PepC-ს მაღალი მაჩვენებლების, ხოლო PepA-ს დაბალი მაჩვენებლების მქონე *E. durans*-ის შტამები, შეიძლება რეკომენდირებულ იქნას ყველის წარმოებისათვის დამატებითი (მეორადი) სტარტერული კულტურების სახით.

ამა თუ იმ პროდუქტის დამზადებისას რძის pH-ის რეგულირების გზით შესაძლებელია ბაქტერიული უჯრედების აუტოლიზის გამოწვევა. ეს საშუალებას გვაძლევს პროტეოლიზი გავაძლიეროთ ან/და პროდუქტი ვიტამინებით გავამდიდროთ. აუტოლიზის გამომწვევი პირობები თითოეული ბაქტერიული სახეობისთვის ინდივიდუალურია [102]. დადგინდა, რომ *E. durans*-ის შტამები ინტენსიურ აუტოლიზს

განიცდის pH 5.1-ზე, მაშინ როდესაც *E. faecium*-ის წარმომადგენლები pH 7.0 და *E. faecalis*-ის - pH 5.5-ზე.

ბიოგენური ამინების, კერძოდ, ტირამინის, სინთეზის უნარის შესწავლის შედეგად გაირკვა, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების უმეტესობა (82%) ტიროზინის დეკარბოქსილირების შედეგად წარმოქმნის ტირამინს. ტირამინის სინთეზის უნარი აგრეთვე დამახასიათებელი აღმოჩნდა *E. faecalis*-ის (47%) და *E. faecium*-ის (62,5%) შტამებისათვის.

ბიოგენური ამინების სინთეზი ტექნოლოგიური თვალსაზრისით შტამის უარყოფით თვისებას წარმოადგენს, რადგან ფერმენტირებულ პროდუქტებში ამ ამინების დაგროვება მრავალი არასასურველი რეაქციის მიზეზი შეიძლება იყოს (მაგ., ტირამინის მაღალი კონცენტრაციის მქონე რძემჟავა პროდუქტების მიღებამ შეიძლება გამოიწვიოს თავის ტკივილი, ჰიპერმგრძნობელობის რეაქციები და სხვ.) [157].

მაწვნიდან გამოყოფილი სტრუპტოკოკებისგან განსხვავებით არცერთ ენტეროკოკულ შტამს არ ახასიათებს პოლისაქარიდების წარმოქმნის უნარი.

ამგვარად, *E. durans*-ის ბიოქიმიური თვისებების დეტალური შესწავლის შედეგად, დადგინდა ამ მიკროორგანიზმების მნიშვნელობა რძემჟავა პროდუქტების, კერძოდ, კი მაწვნის დამზადების ტექნოლოგიაში. ჩვენს მიერ შესწავლილი შტამების სუსტი აციდოფიკაციის უნარი, დაბალი პროტეოლიზური და პეპტიდაზური აქტივობა, ტირამინის სინთეზის უნარი იმაზე მეტყველებს, რომ მათი მაწვნის სტარტერულ კულტურებად გამოყენება გამართლებული არ არის. პროტეოლიზური აქტივობის შედარებით მაღალი მაჩვენებლების მქონე ზოგიერთი შტამი შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას როგორც დამატებითი (მეორადი) სტარტერული კულტურა სხვადასხვა ტიპის ყველის წარმოებისთვის, მაგრამ ამ შემთხვევაში საბოლოო სელექცია აუცილებლად უნდა ითვალისწინებდეს ენტეროკოკების პოტენციური ვირულენტობის ფაქტორს.

წინა წლებში ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად დადგენილი იქნა, რომ მაწვნის ძლიერად გამოხატული პრობიოტიკული თვისებები, სავარაუდოდ უნდა იყოს განპირობებული მისი ძირითადი მიკრობული კომპონენტის *Lactobacillus delbrueckii ssp.*

*Lactis* ანტაგონისტური თვისებებით სხვადასხვა პათოგენურ მიროორგანიზმების მიმართ [37].

ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა მაწვნის სხვა წამყვანი კომპონენტის *S. thermophilus*-ის ანტაგონისტური აქტივობა *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* და *Shigella flexneri* სახეობების მიმართ. დადგენილი იქნა, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამები ზემოთ აღნიშნული პათოგენების მიმართ ანტაგონისტურ აქტივობას არ ავლენს.

ენტეროკოკების ანტაგონისტური აქტივობა შესწავლილ იქნა *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. innocua*, *M. luteus* ინდიკატორული კულტურების მიმართ. გაირკვა, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი *E. durans*-ის შტამების 39% შესწევს *Microccus luteus* –ის ზრდის დათრგუნვის უნარი. აღსანიშნავია, რომ ანტაგონისტური აქტივობის განმსაზღვრელი აგენტი ბაქტერიოცინების ჯგუფს არ ეკუთვნის.

ბაქტერიული კულტურების ერთ-ერთ მნიშვნელოვან დამახასიათებელ თვისებას – ლიზოგენობა წარმოადგენს. ეს თვისება განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია იმ შტამებისათვის, რომლებიც რძის მრეწველობაში გამოიყენება, რადგანაც ბაქტერიოფაგის სპონტანური გამრავლება წარმოებისთვის მრავალ პრობლემას წარმოშობს და ხშირად ეკონომიკურ ზარალთანაც არის დაკავშირებული. ამიტომ ასეთ შტამებს ერთ-ერთ აუცილებელ პირობად არალიზოგენურობას და ფაგის მიმართ გამძლეობას უყენებენ [167]. ამ გარემოების გათვალისწინებით ჩვენს მიერ გამოყოფილი შტამები შევამოწმეთ უჯრედშიდა ფაგის შემცველობაზე. სპონტანური ლიზისის გამოვლენის მეთოდით ტესტირებული იქნა *S. thermophilus*-ის 49 და *E. durans*-ის 18 შტამი. უჯრედშიდა ფაგის შემცველობა არცერთ შემთხვევაში არ დაფიქსირებულა.

## დასკვნები

1) არასაწარმოო ანუ “საოჯახო” რძემჟავა პროდუქტებიდან გამოყოფილი ბაქტერიული შტამები სტანდარტულ საწარმოო შტამებისაგან განსხვავებით შიდასახეობრივი მრავალფეროვნებით ხასიათდება, რაც მათი ცვალებად გარემო პირობებში განვითარებით აიხსნება.

2) F-Rep-PCR მეთოდის საშუალებით გამოვლენილ იქნა მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ისთვის დამახასიათებელი გენოტიპური პოლიმორფიზმი.

3) დადგენილ იქნა გარკვეული კორელაცია *S. thermophilus*-ის კონკრეტული გენოტიპების მქონე შტამებსა და მათ “გეოგრაფიულ წარმოშობას“ (მაწვნის დედოს მოპოვების რეგიონებს) შორის, რაც მნიშვნელოვანია ენდემური რძემჟავა ბაქტერიების სტარტერული კულტურების მარკირებასა და დაპატენტებისათვის.

4) *E. durans*-ის შტამების ტიპირებისათვის გამოყენებული უჯრედული ცილების გელ-ელექტროფორეზის მეთოდი (WCP-ის SDS-PAGE) ენტეროკოკების სახეობების ზუსტი იდენტიფიკაციის საშუალებას იძლევა, თუმცა ამავე დროს იგი არაეფექტურია შიდასახეობრივი პოლიმორფიზმის გამოსავლენად.

5) მაწვნიდან გამოყოფილი *S. thermophilus*-ის შტამები აკმაყოფილებს რძის მრეწველობაში საწარმოო შტამების მიმართ საერთაშორისო სტანდარტებით წაყენებულ მოთხოვნებს: ხასიათდება მაღალი აციდოფიკაციური აქტივობით და რძის შედედების აქტიური უნარით; გააჩნია ეგზოპოლისაქარიდების სინთეზის უნარი; არ შეიცავს უჯრედშიდა ფაგს.

6) სუსტი აციდოფიკაციის უნარის, დაბალი პროტეოლიზური აქტივობისა და ტირამინის სინთეზის უნარი გამო *E. durans*-ის შტამების გამოყენება მაწვნის სტარტერულ კულტურებად არ არის გამართლებული.

7) ნატურალური მიკროფლორის ფენოტიპური და გენოტიპური მრავალფეროვნების გამო ეთნიკური პროდუქტი მაწონი იმ ბუნებრივ რეზერვს (“ბანკს”) წარმოადგენს, რომლიდანაც შესაძლებელია სასურველი ნიშან-თვისებების მქონე შტამების შერჩევა, მათი შემდგომი გამოყენება როგორც მაწვნის, ასევე სხვა რძემჟავა პროდუქტების სტანდარტულ საწარმოო დედოების შესაქმნელად და ფერმენტაციის პროცესის მიზანმიმართული წარმართვისათვის.

### პრაქტიკული რეკომენდაციები

- დეტალური ფენოტიპური და გენოტიპური დახასიათების შედეგად შექმნილი იყო ზუსტად იდენტიფიცირებული ენდემური შტამების კოლექცია და



მრავალჯერადი ექსპერიმენტებით დადასტურებული მონაცემთა ბაზა, რომელიც შეიძლება გამოყენებულ იქნას სხვადასხვა რძემჟავა პროდუქტების წარმოებისათვის საჭირო სტარტერული კულტურების შერჩევისთვის.

- მაწვნის სტანდარტული სტარტერის ერთ-ერთი კომპონენტად რეკომენდირებულია ბიოქიმიური ნიშან-თვისებების მიხედვით შერჩეული თერმოფილური სტრეპტოკოკების ორი შტამი - *S. thermophilus* 3233 და 3213.
- გარდა ამისა, მაწვნის საწარმოო დედოების შესადგენად ეფექტურად შეიძლება იქნას გამოყენებული სწრაფი აციდოფიკაციის უნარის მქონე *S. thermophilus*-ის 7 შტამი (3207, 3213, 3222, 3225, 3233, 3236, 3278), რომლებიც რძის შედედებას მინიმალურ დროში - 6 საათში ახორციელებს, აგრეთვე კაზეინის დეგრადაციის უნარის მქონე 4 შტამი (*S. thermophilus* 3207, 3213, 3222, 3233).
- ეგზოპოლისაქარიდების სინთეზის უნარის მქონე სტარტერული კულტურები ხელს უწყობს პროდუქტის სტრუქტურის (სიბლანტის) ჩამოყალიბებას და შრატის გამოყოფის (სინერეზისის) შემცირებას. ამ მხრივ განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია *S. thermophilus*-ის 3239, 3270, 1D, 10C, 13B და 1720 შტამები.
- შედარებით მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის და აგრეთვე PepI, PepX, PepN და PepC პეპტიდაზების მაღალი მაჩვენებლების, ხოლო PepA დაბალი მაჩვენებლების მქონე *E. durans*-ის შტამების გამოყენება რეკომენდირებულია დამატებითი (მეორადი) სტარტერული კულტურის სახით სხვადასხვა ტიპის ყველის წარმოებისთვის. მაგრამ ამ შემთხვევაში საბოლოო სელექცია აუცილებლად უნდა ითვალისწინებდეს ენტეროკოკების პოტენციური ვირულენტობის ფაქტორს.
- მოლეკულური ტიპირების F-Rep-PCR მეთოდი მიზანშეწონილია საკვებისეული წარმოშობის *S. thermophilus*-ის შტამების გენოტიპირებისათვის.

### ციტირებული ლიტერატურა

1. ალექსიძე ნ. 2005. ზოგადი ბიოქიმიის სფუძვლები. თბილისის უნივერსიტეტის გამომცემლობა, 520 გვ.

2. გონაშვილი ა.შ. 1963. "რძისა და რძის პროდუქტების ქიმია და ანალიზი". სახელმწიფო გამომცემლობა, სს. თბილისი.
3. დალაქიშვილი ი., დათოშვილი გ., ლელაშვილი ნ. 1996. მაწვნისმაგვარი რძე-მჟავა პროდუქტის მიღების ხერხი. პატენტი № 253.
4. Банникова Л.А. 1975. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. М.: «Пищевая промышленность».255 с.: ил.
5. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф.1987. Микробиологические основы молочного производства: Справочник. М.: Агропромиздат. 400 с: ил.
6. Борчхадзе Л., Натрошвили Г., Порчхидзе К., Гиორგაძე Н., Чანიшვილი Н. 1999. Сравнение активности бактериального антагонизма различных молочно-кислых штаммов по отношению к некоторым патогенным кишечным видам. 8-ой кавказский симпозиум по медико-биологическим наукам. Тезисы. Тбилиси, стр. 121-122.
7. Буланова П.А. Колешко О.И. 1969.Общая микробиология. «Высш. школа». 264с: ил.
8. Гогоберидзе Р. 1971. Изучение симбиотической закваски мацони. Молочное дело. №3; 16-20
9. Горбатова К. К. 2004. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов. СПб.: ГИОРД. 352с.: ил.
10. Горбатова К.К. 2004. Биохимия молока и молочных продуктов. СПб.: ГИОРД. 313с.: ил.
11. Демуришвили М.Г. 1930. Кислое молоко «мацони». Молочное хозяйство. №2-3.
12. Джандиери Е., Схиртладзе М. 1935. Микрофлора мацони, роль и взаимоотношение микроорганизмов. Тр. Зак. КНИИЖ, вып 6, 333-365.
13. Ерзинкян Л.А. 1971. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Изд. Академии Наук Армянской ССР. Ереван, 236с.
14. Калантар А. 1907. Простокваша, мацун, ягурт. В Ерзинкян Л.А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Изд. Академии Наук Армянской ССР. Ереван, 1971. 236с.
15. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. 1975. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: изд. «Наука», 384с.: ил.
16. Ломсадзе Р.Н., Демуришвили Л.И., Манджавидзе Н.П., Едиберидзе Е.Г. 1977. Приготовление симбиотической закваски мацони для приготовления этого продукта. III конференция по микробиологии и вирусологии. сс. 80-81.

17. **Мазманишвили Р.Г.** 1988. Клиническая оценка ферментированного кисломолочного продукта, обогащенного витамином С, используемого при вскармливании. Афтореферат . Тбилиси.
18. **Определитель бактерий Берджи.** 1997. В 2-х т., пер. с англ. Под ред. Дж. Хоулта, Н.Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир.
19. **Покровский В.И.** 1999. Медицинская Микробиология. М.: ГЭОТАР МЕДЕЦИНА, 1200с.:ил.
20. **Таблашвили С.Г.** 1989. Медико-биологические основы эффективности кисломолочных продуктов питания детей. Афтореферат. Москва.
21. **ACNFP.** 1996. Report on *Enterococcus faecium strain K77D*. MAFF Advisory Committee on Novel Foods and Process, Report, Ergon House c/o Nobel House, 17Smith Square, London SW1 3JR, UK.
22. **Aktypis A., Kalantzopoulos G.** 1998. Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACADC 0040. *J. Appl. Microbiol.* 84: 568–576.
23. **Atrin A., Rekhif N., Milliere J., Lefebvre G.** 1993. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum C19*. *Can. J. Microbiol.* 39: 1173-1179.
24. **Barefoot S., Klaenhammer T.** 1984. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus acidophilus* B. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* 26: 328-334.
25. **Becker A., Katzen F., Pühler A., Ielpi L.** 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 145-152.
26. **Beimfohr C., Krause A., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.** 1993. *In situ* identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. System. *J. Appl. Microbiol.* 16: 450-456.
27. **Benoit V., Mathis R., Lefebvre G.** 1994. Characterization of Brevicin 27, a bacteriocin synthesized by *Lactobacillus brevis* SB27. *Current Microbiology* 28: 53-61.
28. **Bent S. J., Gucker C. L., Oda Y.** 2003. Spatial distribution of *Rhodopseudomonas palustris* ecotypes on a local scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5192-5197.
29. **Berg G., Roskot N., Steidle A., Eberl L., Zock A., Smalla K.** 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3328-3338.
30. **Buistet G., Kok J., Dabrowska M., Venema G.** 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglikan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidaze needed for cell separation. *J. of Bacteriol.* 177/6: 1554-1563.

31. **Caplice E., Fitzgerald G.F.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Intern. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
32. **Casalta E., Zennaro R.** 1997. Effect of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venaco and Corsican soft cheese. *Sciences del Aliments* 17: 79-94.
33. **Centeno J., Menéndez S., Rodriguez-Ortero J.L.** 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese (Northwest Spain). *Int. J. of Food Microbiology*, 33:307-313.
34. **Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud, M., Landon M.** 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* 10: 255-260.
35. **Cerning J.** 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 113-130.
36. **Chanishvili N., Tilsala-Timisjarvi A., Forsman P., Merabishvili M., Zviadadze N., Porchkhidze K., Natroshvili G., Alatosava T.** 1996. Microbial study of matsoni, the traditional endemic Caucasian milk product, G10, Abstract, 5<sup>th</sup> Symposium on Lactic Acid Bacteria, Veldhoven, The Netherlands.
37. **Chanishvili N., Merabishvili M., Porchkhidze K., Natroshvili G.** 2001. The Caucasian product Matsoni: its bacterial composition and properties. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, 163, №2: 302-305.
38. **Chanishvili N.** 2001. Identification of the lactic acid bacterial cultures isolated from the samples of the Caucasian Matsoni. *Proc.georgian Acad.Sci., Biol.Ser.*, vol.27, №1-3: 91-95.
39. **Chen Y., Weaver C., Burne R.** 2000. Dual function of *Streptococcus salivarius* urease. *J. of Bacteriology* 182: 4667-4669.
40. **Cherif A., Brusetti L., Borin S., Rizzi A., Boudabous A., Khyami-Horani H., Daffonchio D.** 2003. Genetic relationship in the “*Bacillus cereus* group” by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* 94:1108-1119.
41. **Chiaruttini C., Milet M.** 1993. Gene Organization, Primary Structure and RNA Processing Analysis of a Ribosomal RNA Operon in *Lactococcus lactis*. *Journal of Molecular Biology* 230/1:57-76.
42. **Cho J-C., Tiedje J. M.** 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5448-5456.
43. **Christensen J., Dudley E., Peterson J., Steele G.** 1999. Peptidase and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 217-246.
44. **Chung T., Axelsson L., Lindgren S., Dobrogosz W.** 1988. *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Micr. Eco. Health & Dis.* 2: 137-144.

45. **Collins C., Gutman D., Laman H.** 1993. Identification of nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. *Molecular Microbiology*.8: 187-198.
46. **Coppola T., Parente J., Dumontet S., La Peccerella A.** 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait*. 68: 295-310.
47. **Corroler D., Mangin I., Desmaures N., Gueguen M.** 1998. An ecological study of Lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese Registered Designation of Origin area. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4729-4735.
48. **Courtin P., Monnet V.** 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*. 148:3413–3421.
49. **Daeschael M., Mckenney M., McDonald L.** 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.* 7: 91-98.
50. **Daffonchio D., Cherif A., Borin S.** 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the “*Bacillus cereus* group”. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5460-5468.
51. **Daffonchio D., Cherif A., Brusetti L., Rizzi A., Mora D., Boudabous A., Borin S.** 2003. Nature of Polymorphisms in 16S-23S rRNA Gene Intergenic Transcribed Spacer Fingerprinting of *Bacillus* and Related Genera. *J. of Applied Bacteriology*, 69/9: 5128-5137.
52. **Dasen S., LiPuma J., Kostman J., Stull T.** 1994. Characterization of PCR-ribotyping for Burkholderia (*Pseudomonas*) cepacia. *J Clin Microbiol.* 32(10): 2422–2424.
53. **Davidson B., Kordias N., Dobos M., Hilier A.** 1996. Genomic organisation of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 161-183.
54. **De Mann, J., Rogosa M., Sharpe M.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. of Applied Bacteriology* 23: 130–135.
55. **Difco Manual.** 11<sup>th</sup> Edition. Difco Laboratories. Maryland, USA, pp.862.
56. **De Mann, J., Rogosa M., Sharpe M.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. of Applied Bacteriology* 23: 130–135
57. **De Vin F., Radstrom P., de Vuyst L.** 2005. Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles. *J. Appl. Environ. Microbiol* 71/7: 3659-3667.
58. **De Vos W.M.** 1996. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70: 223–242.

59. **De Vuyst L., Vanderveken F., Van de Ven S., Degeest B.** 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol* 84: 1059-1068.
60. **De Vuyst L., Degeest B.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
61. **Dovat A., Reinbold G., Hammond E., Vedamuuthu E.** 1970. Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic acid group streptococci isolated from young Cheddar cheese. *J. of Milk and Food Technology* 33:365-372.
62. **Dombek P., Johnson L., Zimmerley S., Sadowsky M.** 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2572-2577.
63. **Eaton K., Brooks C., Morgan D., Krakowka S.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity* 59: 2470-2475.
64. **Exterkate F., Alting A.** 1999. Role of calcium in activity and stability of the *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1390–1396.
65. **Fernandes de Palencia P., Lopez de Felipe F., Requena T., Pelaez C.** 2000. The aminopeptidase C (PepC) from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. A comparative study of PepC from lactic acid bacteria. *Eur. Food Res. Technol.* 212:89-94.
66. **Fernandez-Espla M., Garault P., Monnet V., Rul F.** 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase, release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 66: 4772-4778.
67. **Fisk R.** 1942. Studies on staphylococci. 1. Occurrence of bacteriophage carriers among strains of staphylococcus aureus. *J.Infect. Dis.* 71, 153-161.
68. **Folkertsma B., Fox P.** 1992. Use of Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during riping. *J. of Dairy Research* 59:217-224.
69. **Forsén R., Heiska E., Herva E., Arvilommi H.** 1987. Immunobiological effects of *Streptococcus cremoris* from cultured milk 'viili'; application of human lymphocyte culture techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 5: 41-47.
70. **Franz C., Worobo R., Quadri L., Schillinger U., Holzappel W., Stiles M.** 1996. Purification of Enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE900. 5th Symp. on LAB Genetics, Metabolism and Applications. Abstr. C27. Veldhoven, The Netherlands.
71. **Franz C., Holzappel W., Stiles M.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? A Review. *Int. J. of Food Microbiology* 47: 1-24.

72. **Fredrich B., Magasanik B.** 1977. Urease in *Klebsiella aerogenes*: control of synthesis by glutamine synthetase. *J. of Bacteriology* 131: 446-452.
73. **Frietas A., Pintado A., Pintado M., Macalta F.** 1999. Organic acids produced by lactobacilli, enterococci and yeasts isolated from Picante cheese. *European Food Research and Tecnology* 209, 434-438.
74. **Fuler R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. of Appl. Bacteriol.* 66, 365-78.
75. **Gancel F., Novel G.** 1994. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. *J. Dairy Sci.* 77, 689-695.
76. **Gassem M., Schmidt K., Frank J.** 1997. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *J. Food Sci.* 62/207 171-173.
77. **Genov N., Filippi B., Dolashka P, Wilson K., Betzel C.** 1995. Stability of subtilisins and related proteinases (subtilases). *Int. J. Pept. Protein Res.* 45:391–400.
78. **Gilland S.** 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbial Revies* 87, 175-183.
79. **Chmielewski R., Wieliczko A., Kuczkowski M., Mazurkiewicz M.** 2002. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* Enteritidis isolates from Poland. *J. Vet. Med.* 49:163-168.
80. **Ginka I., Frengova D., Simova R., Zhelyasko I.** 2002. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. *Z. Naturforsch.* 57c, 805-810.
81. **Giraffa G., Paris A., Valcavi L., Gatti M., Neviani E.** 2001. Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. of Appl. Microbiology* 91, 937–943.
82. **Giraffa G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Revies.* 26/2, pp.163-171.
83. **Giraffa G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. of Food Microbiol.* 88, 215-222.
84. **Gobetti M., Lanciotti R., De Angelis M., Corbo M., Massimi R., Fox P.** 1999. Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *Int. Dairy Journal* 9, 865-875.
85. **Grimont F., Grimont P.** 1995. Determination of rRNA gene restriction patterns. In: Howard J, Whitcombe D M., Diagnostic bacteriology protocols. Totowa, N.J: Humana Press, Inc.; pp. 149–164.
86. **Grossiord B., Vaughan E., Luesink E., de Vos W.** 1998. Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Le Lait* 78:77–84.

87. **Gtari M., Brusetti L., Skander G., Mora D., Boudabous A., Daffonchio D.** 2004. Isolation of *Elaeagnus*-compatible *Frankia* from soils collected in Tunisia. *FEMS Microbiol. Lett.* 234:349-355.
88. **Guedon G, Pebay M, Colmin C, Simonet JM, Decaris B.** 1992. The 23S-5S spacer of two rRNA loci of *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* includes a promoter. *Biochimie.* 74(6):585-8.
89. **Gurtler V.** 1993. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *J Gen Microbiol.* 139(12):3089-97.
90. **Hammes W., Vogel R.** 1995. The Genus *Lactobacillus*, pp.19-54. In, B.J.B.Wood and W.H. Holzapfel (eds). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Chapman&Hall, London.
91. **Hassan N., Frank J.F.** 2001. Starter culters and their use, pp.151-206. In E.H.Marsh and J.L. Steele (eds). *Applied Dairy Microbiology*, 2<sup>nd</sup> edition. Marcel Dekker, Inc, New York.
92. **Husson-Kao C., Mengaud J., Cesselin B., Benbadis L.** 2000. The *Streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from leaky prophage. *Appl. Environ. Microbiol* 66/ 2: 558-565.
93. **Hutkins R., Morris H., McKay L.** 1985. Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:777-780.
94. **Hutkins R., Halambeck S., Morris H.** 1986. Use of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Swiss, Mozzarella, and short-methods Cheddar cheese. *J. of Dairy Science* 69, 1-8.
95. **Isolauri E., Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Virtanen E., Arvilommi H.** 1993. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105: 1643-50.
96. **Ivanova, I., Miteva V., Stefanova Ts, Pantev A., Budakov I, Danova S., Moncheva P., Kotova N., Dousset X, Boyaval P.** 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int. J. Food Microbiol.* 42:147-158.
97. **Janssen D., Habets W., Marugg J., Van der Drift C.** 1982. Nitrogen control in *Pseudomonas aeruginosa*: mutants affected in synthesis of glutamine synthetase, urease and NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *J. of Bacteriology* 151: 22-28.
98. **Jamenes-D, Ruiz-Barba J., Cathcart D., Holo H., Nes I., Sletten K., Warner P.** 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459-4463.
99. **Jay James M.** 1982. Antimicrobial Properties of Diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol* 44/3, 525-532.



100. **Jensen M., Webster J., Straus N.** 1993. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59/ 4, 945-952.
101. **Joosten H.M.** 1988. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 3. Factors influencing the amounts formed. *Netherlands Milk Dairy Journal* 41, 329-357.
102. **Kang O., Venezina P., Laberge S., Simard E.** 1997. Some factor influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Science* 81, 639-646.
103. **Kitazawa H., Yamaguchi T., Itoh T.** 1992. B-cell mitogenic activity of slime produced from slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* 75, 2946-2951.
104. **Klaenhammer T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
105. **Kok J.** 1990. Genetics of proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 76: 2056–2064.
106. **Kunji S, Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings N.** 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 187-221.
107. **Laan H., Tan E., Bruinenberg P., Limsowtin G., Brom M.** 1998. Amonopeptidase activities of starter and non-starter lactic acid bacteria under simulated Cheddar cheese ripening conditions. *Int.l Dairy Journal* 8, 267-274.
108. **Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
109. **Laloi P., Atlan D., Blanc B., Gilbert C., Portalier R.** 1991. Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397, differential extraction, purification and properties of the enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 196-204.
110. **Landa B., Mavrodi O., Raaijmakers J., McSpadden Gardener B., Thomashow L., Weller D.** 2002. Differential ability of genotypes of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3226-3237.
111. **Lanyi B.** 1987. Classical and rapid identification: methods for medically important bacteria. In *Methods in Microbiology*, Vol. 19 ed. Colwell, R.R. and Grigorova, R. pp. 1–67. New York: Academic Press.
112. **Leohg-Morgenthaler P., Ruettener C., Mollet B., Hottinger H.** 1990. Construction of phisical map of *Lactobacillus bulgaricus*. *Proc.Third Symp. Lactic Acid Bact.* A28.

113. **Letort C., Nardi M, Garault P., Monnet V., Juillard V.** 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3162-316.
114. **Levander F., Radstrom P.** 2001. Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharide biosynthesis in glucose- and lactose-utilizing *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2734–2738.
115. **Levander F., Svensson M., Radstrom P.** 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:784–790.
116. **Lick S., Keller, Bokelmann M., Jochem Heller K.** 1996. Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* strains. *System. and Appl. Microbiology* 19, 74–77.
117. **Limsowtin G., Powell I., Parente E.** 1996. Type of starters, Cap.3. *Dairy Culture Starter*, Edited by Cogan T.M. & Accolas J.P, 103-113.
118. **Louaileche H., Bracquart P.** 2001. Carbon dioxide production by morphological variants of *Streptococcus thermophilus* CNRZ 368. *Milchwissenschaft – Milk Science International* 56, 187–190.
119. **Maeno M., Yamamoto N., Takano T.** 1996. Identification of a hypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lb. helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 79:1316–1321.
120. **Marciset G., Jeronimus-Stratingh M., Mollet B., Poolman B.** 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.* 272:14277–14284.
121. **Martin B., Coulon J., Chamba J., Bugaud C.** 1997. Effect of milk urea content on characteristics of matured Reblochon cheeses. *Lait* 77, 505–514.
122. **Mathot A., Beliard E., Thuault D.** 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 Produces a Bacteriocin Potentially Suitable for Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Hard Cheese. *J. Dairy Sci.* 86:3068-3074.
123. **Matsuu M., Shichijo K., Okaichi K.** 2003. The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. *J. Radiat. Res.* 44: 111-115.
124. **McSweeney P., Fox P.** 1997. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77: 41-76.
125. **Mercenier A.** 1990. Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 61-78.
126. **Metchnikoff E.** 1908. *The Prolongation of Life*, 1st edition. G.P. Putnam’s Sons, NY.

127. **Mobley H., Island M., Hausinger R.** 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451–480.
128. **Monnet V., Le Bars D., Gripon J.** 1987. Partial characterization and comparison of cell wall proteinases from 5 strains of *Streptococcus lactis*. *Lait* 67, 51-61.
129. **Monnet. G., Corrieu A., Sepulchre C., Pernoud S.** 2004. Selection and Properties of *Streptococcus thermophilus* Mutants Deficient in Urease. *J. Dairy Sci.* 87:1634–1640.
130. **Mora D., Fortina M., Parini C., Ricci G., Gatti M., Giraffa G., Manachini P.** 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. of Applied Microbiology* 93: 278–287.
131. **Mora D., Maguin E., Masiero M., Manachini P., Daffonchio D.** 2004. Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *J. of Applied Microbiology* 96: 209-219.
132. **Morea M., Baruzzi F., Cocconcelli P.** 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *J. of Applied Microbiology* 87, 574-582.
133. **Morris J., Shay D., Hebden J.** 1995. *Enterococci* resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. *Annals. of Int. Medicine* 123/4: 250-259.
134. **Mozzi F., Savoy De Giori G., Oliver G., Font De Valdez G.** 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Biotechnol. Lett.* 18: 435- 439.
135. **Mukherjee K. K.** 1994. Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 77:2839–2849.
136. **Nakajima H., Suzuki Y., Kaizu H., Hirota T.** 1992. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J. Food Sci.* 57, 1327-1329.
137. **Nes I., Bao Diep D., Havarstein L., Brurberg M., Eijsink V., Holo H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
138. **Nissen-Meyer J, Larsen A., Sletten K., Daeschel M., Nes I.** 1993. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J.Gen.Microbiol.*139:1973-1978.
139. **Oda M., Hasegawa H., Komatsu S., Kambe M., Tsuchiya F.** 1983. Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* ssp. *Agric. Biol. Chem.* 47: 1623-1625.
140. **Oda Y., Star B., Huisman L. A., Gottschal J. C.** 2003. Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5186-5191.
141. **O’Keeffe T., Ross P., Hill C.** 1996. Enterocin 1146, a bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*. 5th Symp. on LAB Genetics, Metabolism and Applications. Abstr. C37. Veldhoven, The Netherlands.

142. **O’Leary V., Woychik J.** 1976. Utilization of lactose, glucose and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 89–94.
143. **Ouwehand A., Salminen S., Isolari E.** 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-280.
144. **Parente E., Rota A., Ricciardi A., Clementi F.** 1997. Characterization of Natural Starter Cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). *Int. Dairy Journal* 7:775-783.
145. **Parente E.** 1998. Il ruolo dei microrganismi nella maturazione dei formaggi. *Caseus*, 3, (1), 13.
146. **Parente E, Ricciardi A.** 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52(5):628-38.
147. **Pernoud S., Fremaux C., Sepulchre A., Corrieu G., Monnet C.** 2004. Effect of the metabolism of urea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 87:550–555.
148. **Porchkhidze K., Natroshvili G., Zviadadze N., Kurtsia N., Merabishvili M., Tediashvili M., Chanishvili N.** 1999. Comparison of extent of the natural bacterial antagonism of probiotic strains of *Bifidobacterium bifidum*, *Lb. plantarum* and *Lb. delbrueckii ssp.lactis* against newly emerged pathogens such as MRSA and VRE. 6<sup>th</sup> Scientific Meeting of European Society of Chemotherapy-Infectious Diseases. Istanbul, May 20-22. Program and Abstract Book., H9, p.121.
149. **Pot B., Vandamme P., Kessters K.** 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. Goodfellow M., O’Donnell A.G., eds. *Modern microbiological methods. Chemical methods in Prokaryotic systematics*. Chister, England: John Wiley and Sons, 493-521.
150. **Ray Bibek.** 1996. Fundamental food microbiology. CRC Press LLC.p.516.
151. **Rammelsberg M., Müller E., Radler F.** 1990. Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiol.* 154: 249-252.
152. **Robijn G.W.** 1996. Structural studies on exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Utrecht University, The Netherlands.
153. **Roller S., Dea I.** 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 261-277.
154. **Rosenberg C.** 1999. Probiotics. Continuing Education Module. Bastyr University.
155. **Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

156. **Sanders M.E.** 2000. Consideration for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* 130: 384S-90S.
157. **Sarantinopoulos P., Andrighetto C., Georgalaki M.** 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy Journal* 11: 621-647.
158. **Schleifer K., Ludwig W.** 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria, p.p. 7-18. In, B.J.B. Wood and W.H. Holzapel (eds). Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
159. **Schleifer K., Kilpper-Bolz R.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. System. Bact.* 34: 31-34.
160. **Schlöter M.** et al. 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 647-660.
161. **Sepulchre A., Monnet C.** 2001. Use of strains of *Streptococcus thermophilus* which are incapable of hydrolysing urea in dairy products. European Patent EP 12 11947.
162. **Sikkema J., Oba T.** 1998. Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. *Snow Brand R&D Reports* 107, 1-31.
163. **Sneath P., Sibal R.** 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: WH Freeman and company.
164. **Spigaglia P., and Mastrantonio P.** 2003. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 41:2454-2457.
165. **Shabhal S., Hemme D., Desmazeaud M.** 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H strains) correlated with high acidification rate in milk. *Lait* 71: 351-357.
166. Stackebrandt E., Teuber M. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70. 317-324.
167. **Stiles M.E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 331-345.
168. **Stingle F., Neeser J., Mollet B.** 1996. Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* 178: 1680-1690.
169. **Sullivan A., Nord C.E.** 2002. The place of probiotics in human intestinal infections. *Int. J. of Antimicrobial Agents.* 20: 313-319.
170. **Sutherland I.W.** 1990. Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

171. **Tavan E, Cayuela C., Trugnan G., Chaugier C., Cassand P.** 2002. Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23/3: 477-483.
172. **Thomas T., Crow V.** 1984. Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:186–191.
173. **Tinson W., Broome M., Hillier A., Jago G.** 1982. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. *Australian Journal of Dairy Technology* 37: 14–16.
174. **Urzi C., Brusetti L., Salamone P., Sorlini C., Stackebrandt E., Daffonchio D.** 2001. Biodiversity of *Geodermatophilaceae* isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin. *Environ. Microbiol.* 3: 471-479.
175. **Vaillancourt K., Moineau S., Frenette M., Lessard C., Vadeboncoeur C.** 2002. Galactose and lactose genes from the galactose-positive bacterium *S.salivarius* and the phylogenetically related galactose-negative bacterium *Streptococcus thermophilus* organization, sequence, transcription, and activity of the *gal* gen products. *Journal of Bacteriology* 184: 785-793.
176. **Valence F., Lortal S.** 1995. Zymogram and preliminary characterization of *Lactobacillus helveticus* autolysins. *Appl. and Environ. Microbiology* 61:3391-3399.
177. **Van Belkum A., Scherer S., Van Alphen L., Verbrugh H.** 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol, Mol. Biol. Rev.* 62:275-293.
178. **Van den Berg D., Smits A., Pot B., Ledebouer A., Kersters K., Verbakel J., Verrips C.** 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnol.* 7, 189-205.
179. **Van den Berg D., Robijn G., Janssen A., Giuseppin M., Vreeker R., Kamerling J.** 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. and Environ. Microbiol.* 61: 2840-2844.
180. **Vanechoutte M.** 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classifications and nomenclature. *Review. Molecular Biotechnology* 6/2: 115-142.
181. **Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L.** 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. and Environ. Microbiol.* 70: 900–912.
182. **Van Kranenburg R., Marugg J., van Swam I., Willem N., de Vos W.** 1997. Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 24: 387-397.

183. **Vaughan E., Van den Bogaard P., Catzeduu P., Kuipers O., De Vos W.** 2001. Activation of silent *gal* genes in the lac-gal regulation of *Streptococcus thermophilus*. *J. of Bacteriol.* 183: 1184-1194.
184. **Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F., Lupski J.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* 5:25-40.
185. **Versalovic J., Kapur V., Koeuth T., Mazurek G. H., Whittam T. S., Musser J. M., Lupski J. R.** 1995. DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119:23-29.
186. **Villani F., Pepe O., Mauriello G., Salzano G., Moschetti G., Coppola S.** 1995. Antilisterial activity of thermophilin 347, abacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *Int. Food Microbiol.* 25:179–190.
187. **Von Krush U, Lompe A.** 1982Schnellest zum qualitativen Nachweiss von L (+) and D (-) Milchsäure für die Bestimmung von Milchsäurebakterien. *Milchwissenschaft:* 37:65–68.
188. **Ward D., Somkuti G.** 1995. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST 134. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:330–335.
189. **Weiss N., Schillinger U., Kandler O.**1983. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmanii* and *Lactobacillus bulgaricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 552-557.
190. **Williams G., Felipe X., Banks M.** 1998. Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobacillus spp.* and Non-starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy Journal* 8: 255-266.
191. **Wolfson L., Summer S.** 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase systems:a review, *J. Food Prot.* 56: 887.
192. **Wrink ten B., Minekus M., van der Vossen J., Leer R., Huis in't Veld J.** 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* 77:140-148.
193. **Yamamoto N, Akino A., Takano T.** 1995. Presence of Active and Inactive Molecules of a Cell Wall-Associated Proteinase in *Lactobacillus helveticus* CP790. *Appl. Envir. Microbiol.* 61: 698-701.
194. **Zambonelli C., Ranieri S., Chiavari C., Montanari G., Benevelli M., Grazia L.** 2000. Autolysis of Yeasts and Bacteria in Fermented Foods. *Int. Journal of Food* 12: 9-21.

195. **Zourari A., Desmazeaud M.J.** 1991. Characterization of lactic acid bacteria isolated from greek yogurts. 1. *Streptococcus thermophilus* strains. *Le Lait* 71; 445–461. 2. Strains of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and mixed cultures with *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. *Le Lait* 71: 463–482.