

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი  
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამა  
ბიოლოგია

ელენე კაკაბაძე

საქართველოში გამოყოფილი რბემყავა ბაქტერიების  
ბიომრავალფეროვნების, ბიოტექნოლოგიური და პრობიოტიკური  
პოტენციალის შესწავლა-დახასიათება

მისანიჭებელი კვალიფიკაცია - ბიოლოგიის დოქტორი

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ნინა ჭანიშვილი  
ბიოლ. მეც. დოქტორი

თბილისი  
2020 წელი

**Title of the dissertation thesis**

**Study and Characterization of Biodiversity, Biotechnological and Probiotic  
Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated in Georgia**

**Elene Kakabadze**

The thesis work is performed to obtain a PhD academic degree in Biology

Scientific Supervisor: Nina Chanishvili  
PhD

Tbilisi  
2020 Year

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University  
Faculty of Exact and Natural Sciences

Doctoral Program: Biology

## აბსტრაქტი

ფერმენტირებული რძის პროდუქტები ადამიანის კვების რაციონის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ნაწილია. კვებით ღირებულებასთან ერთად ისინი ადამიანის ორგანიზმისთვის სასარგებლო ცოცხალი მიკროორგანიზმების წყაროა. ასწლეულების მანძილზე მსოფლიოს სხვადასხვა კულტურებში ფერმენტირებული რძის პროდუქტების დამზადების სპეციფიკური წეს-ჩვეულებები ყალიბდებოდა, რამაც ტრადიციული ფერმენტირებული პროდუქტების უნიკალური მიკრობიოტების შექმნა განაპირობა. დღეს ბიოტექნოლოგიურ და ინდუსტრიულ წარმოებაში გამოყენებადი ბაქტერიების უმრავლესობა სწორედ ასეთი პროდუქტებიდან არის მიღებული.

ტრადიციული ფერმენტირებული რძის პროდუქტების მიკრობიოტა უმეტეს წილად გადადედებით ნარჩუნდება, ამიტომ ეს ძალზედ მგრძობარე ეკოსისტემა ადამიანის ქმედებებზე არის დამოკიდებული. არტიზანული პროდუქტების დამზადების სიხშირის კლება განაპირობებს სისტემატიური გადადედებით ჩამოყალიბებული მიკრობული ეკოსისტემების დეგრადაციას. ამიტომ, ლოკალური პროდუქტის დაცვის და პროდუქტის უვნებლობის უზრუნველსაყოფად აუცილებელია ტრადიციული წესით დამზადებული ფერმენტირებული რძის პროდუქტების მიკრობიოტების დაწვრილებითი შესწავლა, კულტურათა იზოლაცია და იდენტიფიკაცია. კარგად დახასიათებული ადგილობრივი რძემწავა ბაქტერიების კოლექციების შექმნა უზრუნველყოფს ბიოტექნოლოგიურად და პრობიოტიკულად ღირებული ახალი კულტურების აღმოჩენის შესაძლებლობას და მიკრობული ბიომრავალფეროვნების შენარჩუნებას.

საქართველოში რძის პროდუქტების წარმოების მრავალსაუკუნოვანი ტრადიცია არსებობს. ფერმენტირებული პროდუქტების მრავალფეროვნება, რეგიონალური ნაირსახეობები და მათი დამზადების ტრადიციული ტექნოლოგიები საქართველოს არამატერიალური კულტურის ძეგლებად არის აღიარებული. ამგვარი ფაქტიზი კულტურულ-გეოგრაფიული მემკვიდრეობის დასაცავად, საქართველოს ინტელექტუალური საკუთრების სააგენტომ (საქპატენტი) ტრადიციული რძემწავა პროდუქტი „საქართველოში რეგისტრირებული გეოგრაფიული აღნიშვნები“ კატეგორიის ქვეშ მოათავსა ([www.sakpatenti.gov.ge](http://www.sakpatenti.gov.ge)). თუმცა ადგილობრივი რძემწავა ბაქტერიების კულტურათა კოლექციის არარსებობის გამო, ქართული ყველების და

მაწვნის ინდუსტრიული წარმოებისას ამჟამად იმპორტირებული მონოკულტურები გამოიყენება, რაც დადგენილი რეგულაციებს ეწინააღმდეგება. კომერციული სტარტერების ტრადიციული წესლით დამზადებულ პროდუქტში ინვაზიამ კი შესაძლებელია პროდუქტის მიკრობული მრავალფეროვნების თანმიმდევრული დეგრადაცია და ღირებული ადგილობრივი კულტურების გაქრობა გამოიწვიოს.

მოცემული კვლევის ფარგლებში მაწვნის უნიკალური მიკრობიოტის შესწავლის, შენარჩუნების და პროდუქტის უვნებლობის უზრუნველყოფისთვის შემდეგი ამოცანები დაისახა: საქართველოს სხვადასხვა კუთხეში დამზადებული მაწვნის სინჯების შეგროვება, პროდუქტის მიკრობიოლოგიური უვნებლობის ანალიზი, დომინანტური კულტურების იზოლაცია, მათი მოლეკულური იდენტიფიკაცია და ტიპირება, მიღებული ბიოტიპების ბიოგეოგრაფიული განაწილების შესწავლა, კულტურების ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის, პრობიოტიკური მახასიათებლების და ფაგომგრძობელობის შესწავლა, მაწვნის მიკრობიოტის მონაცემთა ბაზის და ავტოქტონური მრავალკომპონენტური დედოს შემუშავება.

შედეგად, საქართველოს ათ რეგიონში, შემთხვევითად შერჩეული ორმოცდაექვსი წერტილიდან შეგროვებულ იქნა სამოცდათორმეტი ტრადიციული წესლით დამზადებული მაწვნის სინჯი. რძემჟავა კულტურების იზოლაციის და იდენტიფიკაციის შედეგად მიღებული იქნა ექვსი სახეობის და ორი ქვესახეობის წარმომადგენელი ორას სამი უნიკალური ბაქტერიული კულტურა. შერჩევის სიმძლავრის მრუდის აგების საშუალებით დადასტურდა, რომ შეგროვებული სინჯების რაოდენობა ნამდვილად საკმარისი არის სინჯებში არსებული ბაქტერიული სახეობების მრავალფეროვნების გამოსავლენად. RAPD პჯრ-ის, 500აწ 16S რ-რნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრის, სახეობა სპეციფიური პჯრ-ის და რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით დამუშავების მეთოდების გამოყენებით იდენტიფიცირებული იქნა *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus*, *Lb. rhamnosus*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, და *Lb. vaginalis*-ის სახეობები. მათ შორის *Lb. rhamnosus* და *Lb. vaginalis* მაწვნის მიკრობიოტიდან პირველად იქნა გამოყოფილი. შტამების მრავალფეროვნება მათი გენოტიპების, კერძოდ კი UPGMA კლასტერიზაციის საფუძველზე მიღებული ე.წ. ბიოტიპების მიხედვით იქნა შესწავლილი. M13 პრაიმერის გამოყენებით გენერირებული

პოლიმორფული დნმ ამპლიკონების პროფილების და მათი იერარქიული აგლომერაციული კლასტერიზაციით აგებული მონაცემთა ბაზის საფუძველზე შესაძლებელი გახდა მოცემული კოლექციის შტამების გენოტიპებზე დაფუძნებული ბიოტიპირება. აღწერილი მეთოდოლოგიის გამოყენებით საშუალება მოგვცა კულტურების ბიომრავალფეროვნების ანალიზი სუბ-ქვესახეობების დონეზე. შედეგად შესაძლებელი გახდა შტამების ბიოგეოგრაფიული განაწილების შესწავლა, მათი მრავალფეროვნების დაწვრილებითი ანალიზი და სხვა კულტურებთან მათი ნათესაობის (კავშირების) დადგენა, რამაც მაწვნის მიკრობიოტაში მიმდინარე პროცესებზე სიღრმისეული დაკვირვების საშუალება მოგვცა.

დადგინდა, რომ მაწვნის დედო კულტურების სახეობების, ქვესახეობების, ბიოტიპების განაწილებასა და მათ გეოგრაფიულ ადგილ წამოშობას შორის კორელაცია არ არის. დედო კულტურების განაწილება შემთხვევითია და სინჯ-სპეციფიურ ხასიათს ატარებს. ამავდროულად ბიოტიპების დაწვრილებითი შესწავლის შედეგად დადგინდა, რომ ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის მიკრობიოტებსა და კომერციულ პროდუქტებს შორის მიკროორგანიზმების მიმოცვლა ფიქსირდება.

მაწვნის ავტოქტონური დედო კულტურების შესაქმნელად, შერჩეულ იქნა მაღალი ბიოტექნოლოგიური და პრობიოტიკული პოტენციალის მქონე კულტურები. საპილოტო საწარმოო ექსპერიმენტის სამჯერ წარმატებით გამეორების შედეგად დადგინდა მიღებული მრავალკომპონენტური ავტოქტონური ცოცხალი დედო კულტურების ეფექტურობა და საწარმოო პროცესში გამოყენების ვალიდურობა. მიღებულმა პროდუქტმა დადგენილი ვარგისიანობის ვადის ფარგლებში, შესაბამისი შენახვის პირობებში, შეინარჩუნა პროდუქტისთვის დადგენილი ცოცხალი რემეჩავა ბაქტერიების ტიტრი და მჟავიანობის დონე.

შედეგად მოცემული კვლევის საფუძველზე შეიქმნა საქართველოს სხვადასხვა კუთხეში დამზადებული მაწვნების მიკრობიოტების მონაცემთა ბაზა, შესწავლილ იქნა მიღებული შტამების უვნებლობა, ბიომრავალფეროვნება და ბიოგეოგრაფიული განაწილება. დადგინდა ავტოქტონური დედო კულტურების ბიოტექნოლოგიური და პრობიოტიკული პოტენციალი, რის საფუძველზეც შემუშავდა მრავალკომპონენტური მაწვნის ცოცხალი დედო.

## Abstract

In this study, a database of Matsoni microbiotas from different parts of Georgia was created and the safety, biodiversity and biogeographical distribution of the strains were studied. The biotechnological and probiotic potential of autochthonous mother cultures has been evaluated and a live starter composition for Matsoni has been developed.

Fermented dairy products are one of the most relevant elements of the human diet. Along with their nutritional value, they are a source of beneficial live microorganisms. Over the centuries, societies around the globe have developed specific habits of fermented food production, which has led to the creation of unique microbiotas of traditional fermented products. Today, most of the bacteria used in biotechnology and industrial production are derived from such products.

The microbiotas of traditional fermented dairy products is largely maintained by back-slopping, and thus the preservation of this highly sensitive ecosystem depends on human actions. A decrease of the production of artisanal products lead to the degradation of microbial ecosystems formed by systematic back-slopping. Therefore, in order to protect biodiversity and ensure the safety of the local products, it is necessary to carefully study the microbiotas of traditional goods. The creation of well-characterized local lactic acid bacterial collections provides an opportunity to discover biotechnologically valuable and new probiotic strains, while preserving microbial biodiversity.

There is a millenia-old tradition of dairy production in Georgia. The regional varieties of fermented products and traditional technologies of their production are recognized as intangible culture heritage of Georgia. In order to protect such a delicate culture-geographical asset, the Intellectual Property Agency of Georgia has placed the traditional lactic acid products such as Georgian Cheese and the yogurt like product Matsoni under the category of "Protected with Designation of Origin" ([www.sakpatenti.gov.ge](http://www.sakpatenti.gov.ge)). However, due to the absence of a local collections of autochthonouse lactic acid bacteria, currently imported monocultures are used in the industrial production of those goods, which contradicts the established regulations. Invasion of commercial starters in the traditional products can lead to a persistent degradation of the microbial diversity and the disappearance of valuable local strains.

This study aimed at the identification, characterisation and preservation of the Matsoni microbiota. For this purpose the following tasks were performed: collection of artisanal Matsoni samples made in different parts of Georgia, analysis of the microbiological safety of the product, isolation, molecular identification and genotyping of dominant cultures, study of biogeographical distribution of the biotypes, assessment of biotechnological and probiotic potential as well as phage susceptibility of the obtained strains, development of Matsoni microbiota database and the construction of an autochthonous multicomponent starter mixture.

Seventy-two artisanal Matsoni samples were collected in forty-six randomly selected locations in ten regions of Georgia. In total, two hundred and three unique lactic acid bacterial cultures represented by six species and two subspecies were isolated and identified. By constructing a sampling effort curve, it has been shown that the number of samples collected were sufficient to detect the diversity of bacterial species in the samples. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus*, *Lb. rhamnosus*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, and *Lb. vaginalis* were identified using RAPD-PCR, 500 bp 16S r-RNA nucleotide sequencing, species-specific PCR and restriction endonuclease analysis methods. *Lb. rhamnosus* and *Lb. vaginalis* were isolated from the Matsoni microbiota for the first time. The biodiversity of the strains were studied based on their biotypes generated from UPGMA genotype clustering. A hierarchical agglomeration-based database was constructed based on M13 primer-generated polymorphic DNA amplicon profiles, which allowed biotyping of the given collection based on the generated DNA fingerprint clusters. Using the described methodology, we were able to analyze the biodiversity of strains at the sub-subspecies level. Therefore, it was possible to study the biogeographical distribution of the strains, analyze their diversity in detail, and to establish their relations with other cultures, allowing in-depth observations of the processes in the Matsoni microbiota.

As a result, no correlation has been observed between the distribution of the species, subspecies or biotypes and their geographical location. The distribution of cultures is random and sample-specific. At the same time, a detailed study of biotypes revealed the exchange of microorganisms between Artisanal samples microbiota and commercial products: six biotypes were shared between artisanal and commercial samples.

In an effort to conserve Matsoni biotype diversity and to counteract the invasion of industrial strains in traditional production, autochthonous cultures with high biotechnological and probiotic potential were selected to create a starter culture for Matsoni. A triple repetition of the pilot-production experiment has demonstrated the effectiveness of the designed autochthonous live starter and the validity of their use in the manufacturing process. The obtained product retained the titer of live lactic acid bacteria and acidity level established for the product under the appropriate storage conditions within the prescribed shelf life.



სარჩევი

შესავალი..... 1

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა..... 4

1.1. მიკროორგანიზმების მნიშვნელობა ..... 4

1.1.1. მიკრობული ბიოგეოგრაფია..... 4

1.1.2. ადამიანის მიკრობიომი..... 6

1.1.3. მიკრობები საკვებ პროდუქტებში..... 8

1.2. რძემჟავა ბაქტერიების ზოგადი დახასიათება..... 11

1.2.1. მეტაბოლიზმი და ენერჯის მიღების ხერხები ..... 12

1.2.2. ლაქტობაცილუსის გვარის კომპლექსი..... 15

1.2.3. გვარები *Streptococcus*, *Lactococcus* და *Enterococcus* ..... 20

1.3. საქართველოში გავრცელებული რძემჟავა პროდუქტები ..... 25

1.3.1. მაწონი ..... 28

1.3.2. მაწონის კვლევის მიმოხილვა ..... 29

1.4. რძემჟავა ბაქტერიების ბიოტექნოლოგიური მახასიათებლები ..... 32

1.5. რძემჟავა ბაქტერიების პრობიოტიკური მახასიათებლები..... 36

1.6. ბაქტერიოფაგები და მათი როლი ფერმენტირებული საკვები პროდუქტების წამოებაში. 40

1.6.1. ლიზოგენიზაცია ..... 41

1.6.2. ფაგური კონტამინაცია..... 42

1.6.3. ფაგორეზისტენტობა..... 42

1.6.4. ფაგების დადებითი როლი კვების ინდუსტრიაში..... 45

თავი II. მასალა და მეთოდები ..... 48

2.1. მაწონის სინჯების შეგროვება..... 48

2.2. მაწონის დედო კულტურების გამოყოფა..... 48

2.3. ბაქტერიული კულტურების იდენტიფიკაცია და გენოტიპირება..... 48

2.3.1. დნმ-ის ექსტრაქცია Chelex-ის - რეზინის მეთოდით გრამ-დადებითი და მჟავა-გამძლე (acid-fast) ბაქტერიებისთვის..... 48

2.3.2. შემთხვევითად ამპლიფიცირებული პოლიმორფული დნმ პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (RAPD პჯრ)..... 49

2.3.3. 500აწ 16S რ-რნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრა..... 52

2.3.4. სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ი ..... 54

2.3.5. ქვესახეობრივი იდენტიფიკაცია რესტრიქციური ენდონუკლეაზების გამოყენებით. 56

2.4. ბიომრავალფეროვნების ანალიზი ..... 57

2.5. ბიოტექნოლოგიური თვისებების შესწავლა ..... 58

2.5.1. აციდოფიკაციის სიჩქარის განსაზღვრა ..... 59

2.5.2. პროტეოლიზური აქტივობა.....	59
2.5.3. ვისკოზურობის შეფასება .....	60
2.6. რძემჟავა ბაქტერიების ფაგომგრძნობელობის და ლიზოგენურობის შესწავლა.....	60
2.6.1. დედო კულტურების ფაგორეზისტენტულობის განსაზღვრა.....	61
2.6.2. ლიზოგენური კულტურების გამოვლენა პროფაგის ინდუქციის გზით.....	62
2.6.3. <i>Enterococcus</i> spp. სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, გასუფთავება და კონცენტრირება .....	63
2.6.4. <i>De novo</i> ბაქტერიოფაგების დახასიათება.....	65
2.6.5. <i>Enterococcus</i> spp. ფაგომგრძნობელობის განსაზღვრა.....	65
2.7. პრობოტიკული პოტენციალის შეფასება.....	66
2.7.1. ნაღვლის მიმართ რეზისტენტობა.....	66
2.7.2. ნაღვლის მარილების დაშლა .....	67
2.7.3. ჰიდროფობულობა.....	67
2.7.4. საფუვრის უჯრედზე აგლუტინაცია .....	68
2.8. მაწვნის დედოს კონსტრუირება.....	68
2.8.1. ანტაგონისტური აქტივობის დადგენა .....	68
2.8.2. კომბინაციების აციდოფიკაციის სიჩქარის განსაზღვრა.....	69
2.8.3. კულტურების კომბინაციების ნადედის ორგანოლეპტიკური პროფილის შეფასება ..	69
2.9. საპილოტო-საწარმო ექპერიმენტი.....	69
2.9.1. ტიტრირებადი მჟავიანობის დადგენა (°T).....	70
2.9.2. პროდუქტში ცოცხალი რძემჟავა კულტურების ტიტრის დადგენა და კონტამინაციის მონიტორინგი .....	70
თავი III. მიღებული შედეგები .....	72
3.1. მაწვნის სინჯების შეგროვება.....	72
3.2. მაწვნის დედო კულტურები .....	73
3.3. კულტურათა იდენტიფიკაცია და გენოტიპირება.....	74
3.4. ბიომრავალფეროვნება.....	79
3.4.1. ბიოტიპები .....	82
3.5. ბიოტექნოლოგიური მახასიათებლები .....	89
3.5.1. აციდოფიკაციის სიჩქარე.....	90
3.5.2. პროტეოლიზი .....	93
3.5.3. ვისკოზურობა .....	95
3.6. ფაგი-ბაქტერიის ურთიერთქმედება .....	96
3.6.1. დედო კულტურების ლიზოგენურობა და ფაგორეზისტენტობა.....	96
3.6.2. მაწვნიდან გამოყოფილი <i>Enterococcus</i> spp. ფაგომგრძნობელობა.....	97

3.7. პრობიოტიკური პოტენციალი .....	103
3.7.1. ნაღვლის მარილების მიმართ მგრძობელობა.....	103
3.7.2. ნაღვლის მარილების დაშლა .....	103
3.7.3. ჰიდროფობულობა.....	104
3.7.4. საფუვრის უჯრედზე აგლუტინაცია .....	105
3.8. მაწვნის დედოს კონსტრუირება.....	105
3.9. საპილოტო-საწარმო ექპერიმენტი.....	107
თავი IV. შედეგების განხილვა .....	110
დასკვნები და რეკომენდაციები.....	117
გამოყენებული ლიტერატურა.....	119

## შესავალი

ფერმენტირებული რძის პროდუქტები ადამიანის კვების რაციონის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ნაწილია. კვებით ღირებულებასთან ერთად ისინი ადამიანის ორგანიზმისთვის სასარგებლო ცოცხალი მიკროორგანიზმების წყაროა. ასწლეულების მანძილზე მსოფლიოს სხვადასხვა კულტურებში ფერმენტირებული რძის პროდუქტების დამზადების სპეციფიკური წეს-ჩვეულებები ყალიბდებოდა, რამაც ტრადიციული ფერმენტირებული პროდუქტების უნიკალური მიკრობიოტების შექმნა განაპირობა (Steensels *et al.* 2019). დღეს ბიოტექნოლოგიურ და ინდუსტრიულ წამოებაში გამოყენებადი ბაქტერიების უმრავლესობა სწორედ ასეთი პროდუქტებიდან არის მიღებული. ამგვარ ბაქტერიებს დომესტიფიცირებულ კულტურებს უწოდებენ (Gallone *et al.* 2018).

ტრადიციული ფერმენტირებული რძის პროდუქტების მიკრობიოტა უმეტეს წილად გადადებებით ნარჩუნდება, ამიტომ ეს ძალზედ მგრძობარე ეკოსისტემა ადამიანის ქმედებებზე არის დამოკიდებული. პროგრესირებადი ურბანიზაციის პირობებში ადამიანის ცხოვრების სტილი მკვეთრად იცვლება. შესაბამისად იცვლება ფერმენტირებული პროდუქტების წარმოების წეს-ჩვეულებები. არტიზანული პროდუქტების დამზადების სიხშირის კლება განაპირობებს სისტემატიური გადადებებით ჩამოყალიბებული და შენარჩუნებული მიკრობული ეკოსისტემების დეგრადაციას და მიკრობული დომესტიფიკაციის პროცესის შეფერხებას (Steensels *et al.* 2019). ასევე ქრება მათი ტრადიციული რეზერვუარები, მაგალითად თიხის ჭურჭელის მიკროსტრუქტურული აგებულების წყალობით მის ზედპირზე ხდება მიკროორგანიზმების სედიმენტაცია და მდგრადი ადჰეზია, რაც განაპირობებს ჭურჭელში დედო კულტურების დეპონირებას, რის საშუალებასაც შუშის და პოლიპროპილენის მასალები არ იძლევა (Kebede *et al.* 2007).

ამიტომ ლოკალური პროდუქტის დაცვის და პროდუქტის უვნებლობის უზრუნველსაყოფად აუცილებელია ტრადიციული წესით დამზადებული ფერმენტირებული რძის პროდუქტების მიკრობიოტების დაწვრილებითი შესწავლა, კულტურათა იზოლაცია და იდენტიფიკაცია. კარგად დახასიათებული ადგილობრივი რძემჟავა ბაქტერიების კოლექციების შექმნა უზრუნველყოფს

ბიოტექნოლოგიურად და პრობიოტიკულად ღირებული ახალი კულტურების აღმოჩენის შესაძლებლობას და მიკრობული ბიომრავალფეროვნების შენარჩუნებას.

საქართველოში რძის პროდუქტების წარმოების მრავალსაუკუნოვანი ტრადიცია არსებობს. ფერმენტირებული პროდუქტების მრავალფეროვნება, რეგიონალური ნაირსახეობები და მათი დამზადების ტრადიციული ტექნოლოგიები საქართველოს არამატერიალური კულტურის ძეგლებად არის აღიარებული. ამგვარი ფაქტიზი კულტურულ-გეოგრაფიული მემკვიდრეობის დასაცავად, საქართველოს ინტელექტუალური საკუთრების სააგენტომ (საქპატენტი) ტრადიციული რძემჟავა პროდუქტი „საქართველოში რეგისტრირებული გეოგრაფიული აღნიშვნები“ კატეგორიის ქვეშ მოათავსა ([www.sakpatenti.gov.ge](http://www.sakpatenti.gov.ge)). ამ პროდუქტებისთვის განისაზღვრა დამზადების ადგილ-მდებარეობა, წესი, ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრები და ეტიკეტირების მოთხოვნები. თუმცა რადგან ამ პროდუქტების მიკრობიოტის შედგენილობა და დედო-კულტურების მახასიათებლები ფუნდამენტალურად არ არის შესწავლილი, დოკუმენტში არსებული მიკრობიოლოგიური მახასიათებლები და შესაბამისი მოთხოვნები ზედაპირული და არასრულია. „საქართველოში რეგისტრირებული გეოგრაფიული აღნიშვნები“ მოიცავს 12 ყველის სახეობას და ერთი იოგურტის ტიპის რძემჟავა პროდუქტს: მაწონს. საქპატენტის განსაზღვრების თანახმად (2012) მაწონი „ქართული ტრადიციული რძემჟავა პროდუქტია, რომელიც ძროხის, კამეჩის, თხის და იშვიათად, ცხვრის რძისაგან, ან მათი ნარევისაგან მიიღება. რძის რძემჟავურ დუღილს წარმართავს საქართველოს ტერიტორიულ სივრცეში გამოყოფილი, ადგილობრივი რძემჟავა ბაქტერიების შტამებისაგან შემდგარი დედო.“

ადგილობრივი რძემჟავა ბაქტერიების კულტურათა კოლექციის არარსებობის გამო, მაწვნის ინდუსტრიული წარმოებისთვის ამჟამად იმპორტირებული მონოკულტურები გამოიყენება. დედოს შენახვის ტრადიციული წეს-ჩვეულებების ცვლილებებთან ერთად, მაწვნის შინაურული წესით (არტიზანულად) დამზადებისას ხშირად კომერციული პროდუქტების გადადედება ხდება. კომერციული დედო კულტურების (სტარტერების) ტრადიციული წესლით დამზადებულ პროდუქტში ინვაზიამ კი შესაძლებელია პროდუქტის მიკრობული მრავალფეროვნების თანმიმდევრული დეგრადაცია და ღირებული ადგილობრივი კულტურების გაქრობა გამოიწვიოს.



სურათი 1. მაწვნის დასამზადებლად და შესანახად გამოყენებადი ჭურჭელი. მარცხენა: თიხის ქოთანის, გამოიყენებოდა XX საუკუნის დასაწყისამდე. შუა: შუშის ქილა, გამოიყენებოდა XX საუკუნის განმავლობაში, მარჯვენა: პოლიპროპილენის ერთჯერადი ქილა, აქტიურად გამოიყენება XXI-დან როგორც ინდუსტრიულ წამოებაში ასევე არტიზანული პროდუქტის დასამზადებლად.

საქართველოს სხვადასხვა კუთხიდან მოპოვებული ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის სინჯების მიკრობიოტის შესწავლა, დომინანტური კულტურების იზოლაცია და მოლეკულური იდენტიფიკაცია, მათი ბიოტექნოლოგიური და პრობიოტიკული პოტენციალის განსაზღვრა და კულტურათა კოლექციის შექმნა მაწვნის უნიკალური მიკრობიოტის შენარჩუნების და პროდუქტის უვნებლობის უზრუნველყოფისთვის აუცილებელი ნაბიჯებია.

ამ მიზნის მისაღწევად დაისახა შემდეგი ამოცანების შესრულება:

- საქართველოს სხვადასხვა კუთხეში დამზადებული მაწვნის სინჯების შეგროვება
- დომინანტური კულტურების იზოლაცია, მოლეკულური იდენტიფიკაცია და ტიპირება
- პროდუქტის მიკრობიოლოგიური უვნებლობის ანალიზი
- მიღებული ბიოტიპების ბიოგეოგრაფიული განაწილების შესწავლა
- მაწვნის მიკრობიოტის მონაცემთა ბაზის და კოლექციის შექმნა
- მიღებული კულტურების ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის განსაზღვრა
- შერჩეული კულტურების პრობიოტიკური მახასიათებლების შესწავლა
- ავტოქტონური მრავალკომპონენტური მაწვნის დედოს შემუშავება

მიღებული შედეგები და გამოცდილება კვლევის ეტაპობრივი გაგრძელების საშუალებას მოგვცემს. ქართული ტრადიციული ფერმენტირებული პროდუქტების მიკრობიოტების ბიომრავალფეროვნების აღწერა და შენარჩუნება მიკრობული ბიოტექნოლოგიების ეფექტური განვითარების ერთ-ერთი მთავარი წინაპირობაა.

## თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა

### 1.1. მიკროორგანიზმების მნიშვნელობა

მიკროორგანიზმები დედამიწის ეკოსისტემის ერთ-ერთი უმთავრესი და უძველესი ნაწილია. ნავარაუდებია, რომ პროკარიოტები დედამიწაზე სიცოცხლისთვის დასაშვები პირობების შექმნის თანავე აღმოცენდნენ. ამაზე 3.5 მილიარდი წლით დათარიღებული ციანობაქტერიის უძველესი ნამარხიც მიუთითებს (Golubic and Seong-Joo 1999). ბაქტერიული ბიომასის წილი დედამიწის მთლიანი ბიომასის ნახევარს შეადგენს. მათი აქტივობის შედეგად ხდება ატმოსფერული გაზების წარმოქმნა, CO<sub>2</sub>-ის და N<sub>2</sub>-ს ფიქსაცია, რთული ორგანული ნაერთების ბიოდეგრადაცია და სხვა მრავალი პლანეტარული მნიშვნელობის პროცესი (Wheeler 2011). სიცოცხლის განვითარებასთან ერთად, პროკარიოტებსა და სხვა ცოცხალ ორგანიზმებს შორის მუტუალისტური, კომენსალური და პარაზიტული ურთიერთქმედების მრავალი ვარიანტი ჩამოყალიბდა. ამიტომ ადამიანების და მიკრობების ურთიერთქმედების შესწავლა სამეცნიერო კვლევების ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი და კომპლექსური საკითხია. პროკარიოტური ორგანიზმების ბიოგეოგრაფიული განაწილების, ადამიანის მიკრობიომში მათი როლის შესწავლა და ანთროპოგენური ფაქტორების ზეგავლენის შეფასება მიკრობულ ეკოსისტემებზე, საშუალებას გვაძლევს უკეთესად შევიცნოთ და შევისწავლოთ ჩვენი უჩინარი თანამგზავრები.

#### 1.1.1. მიკრობული ბიოგეოგრაფია

ბიოგეოგრაფიის დარგი აღწერს და შეისწავლის ბიოლოგიური მრავალფეროვნების სივრცული განაწილების მოდელებს და ამ მოდელების ცვლილებას დროში. პროკარიოტების მცირე ზომის და სწრაფი ცვალებადობის გამო, მათი ბიოგეოგრაფიული განაწილების განსაზღვრა კომპლექსური და რთული საკითხია. მიკრობთა ჰომოგენური განაწილების პირობებში მათი გლობალური ბიომრავალფეროვნების პროგნოზირება ერთი პოპულაციის შესწავლის და ამ მონაცემების განზოგადოების შედეგად იქნებოდა შესაძლებელი. რა თქმა უნდა ეს ასე არ არის (Fierer 2008). მიკრობთა ბიოგეოგრაფიული განაწილება გენოტიპურად და

ფენოტიპურად ჰეტეროგენულია. ნაჩვენებია, რომ მრავალ მიკრობულ ტაქსონს განსაზღვრული ბიოგეოგრაფიული მიკუთვნილობა ახასიათებს (Cho and Tiedje 2000).

მიკრობული ეკოლოგიის კლასიკური თეორიის თანახმად, მიკროორგანიზმები გლობალურად არიან გავრცელებული და მრავლდებიან მხოლოდ მათთვის ხელსაყრელ პირობებში. ეს თეორია თავდაპირველად მარტინუს ვილემ ბეიჟერინკმა შეიმუშავა, ხოლო მოგვიანებით ლორენს გერჰარდ მარინუს ბაას-ბეკინგის მიერ პოსტულატის სახით იქნა შემოთავაზებული: "ყველაფერი ყველგან არის, მაგრამ სელექციას გარემო ახდენს" (Baas-Becking 1934). ბიოგეოგრაფიის ეს დებულება მიკრობთა მორფო-ბიოქიმიურ მახასიათებლებზე აგებული ტაქსონების განაწილებაზე დაყრდნობით შემუშავდა. შესაბამისად ფენოტიპების სივრცული განაწილებების კვლევისას, მათი გენოტიპური მრავალფეროვნება გაუთვალისწინებელი რჩებოდა (De Wit and Bouvier 2006), რაც რა თქმა უნდა მიკრობიოტების მხოლოდ ზედაპირული აღწერას განაპირობებდა.

პროკარიოტული ორგანიზმების გენომების დაწვრილებითი შესწავლის და მიკრობიოტების მეტაგენომურ ანალიზის შედეგად მიღებულმა ინფორმაციამ, მიკრობულ ევოლუციაში და ეკოსისტემების ფორმირებაში გენტა ჰორიზონტალური გადაცემის მნიშვნელობა გამოავლინა (O'Malley 2008). დადგინდა, რომ ბაქტერიულ პოპულაციებში რეკომბინაციების მაღალი სიხშირე ხელს უწყობს ნიშა-სპეციფიკური ვარიაციების ჩამოყალიბებას, რომლებიც როგორც დეტერმინისტული (გარემო) ასევე სტოქასტური (გენტა ლატერალური გადაცემა) პროცესების ზეგავლენის ქვეშ ყალიბდება (Martiny *et al.* 2006). შესაბამისად მიკრობთა გეოფილოგენეტიკური ვარიაციების ჩამოყალიბებაში გეოგრაფიულ გამოყოფა, გარემო პირობებს და შიდაპოპულაციურ ლატერალურ ადაპტაციებს თანაბარი მნიშვნელობა მიენიჭა (Cho and Tiedje 2000). ამ თვალსაზრისიდან გამომდინარე ენდემური ვარიაციების წარმოქმნა და შენარჩუნება ალბათური ხდება. კონკრეტული მიკროორგანიზმის გავრცელების პოტენციალს მისი ბიოლოგიური მახასიათებლები და გარემოს მიმართ ადაპტაციები განსაზღვრავს, ამიტომ დროის მონაკვეთი როდესაც მიკრობი ენდემურ გენოტიპად შეიძლება ჩაითვალოს რთული განსასაზღვრია (Falush *et al.* 2003).

ვიწრო ლოკალური ვარიაციების ანუ მიკრობული ენდემიზმის შესწავლა უმეტესად ეპიდემიოლოგიური კუთხიდან მომდინარეობს, სადაც ენდემურად



მიიჩნევა ინფექციები რომლებიც კონკრეტულ პოპულაციაში, გარემოში ან რეგიონშია გავრცელებული და მუდმივად ინარჩუნებს ბაზისურ სიხშირეს. ვინაიდან რიგ პათოგენურ მიკროორგანიზმებს გავრცელების სპეციფიკური გეოგრაფიული არეალი გააჩნიათ, მიკროორგანიზმების ენდემიზმის მხარდამჭერი არგუმენტებიც უმეტეს შემთხვევაში სწორედ ამგვარი ინფექციურ დაავადებათა მაგალითებიდან გამომდინარეობს (Hedlund and Staley 2004). ამის ყველაზე მკაფიო მაგალითია ამერიკის კონტინენტებზე ევროპელი კოლონილისტების მიერ ჩატანილი დაავადებები: ჩუტყვავილას ვირუსი, წითელას და გრიპის ვირუსები, *Vibrio cholerae* (ქოლერა) და *Yersinia pestis* (შავი ჭირი), რომლებმაც ადგილობრივი მოსახლეობის >95%-მე მეტის ინფიცირება და სიკვდილი გამოიწვიეს (Leidy 1999). ეს სამწუხარო ფაქტი მეტყველებს იმაზე რომ, ზემოთ ჩამოთვლილ დაავადებათა გამომწვევები ამერიკის კონტინენტებისთვის ადვენტიური და ინვაზიური ორგანიზმები აღმოჩნდნენ.

დღეს ბაქტერიული სახეობების განაწილების შესწავლისას, მხედველობაში მიიღება დაშვება, რომ მიკრობული კომპლექსები და მათი გენოტიპური კლასტერები შესაძლოა ექვემდებარებოდეს როგორც ეკოლოგიურ, ასევე გეოგრაფიულ გაყოფას. ბაქტერიები ხასიათდება არაშემთხვევითი ლანდშაფტური განაწილებით (Cho and Tiedje 2000) და ექვემდებარება სახეობა-არეალის ურთიეთქმედების პრინციპს: დაკვირვების არეალის ზრდასთან ერთად მატულობს განსხვავებული ტაქსონების (გენოტიპების/ფენოტიპების/ბიოტიპების) რაოდენობა (Vostrikov *et al.* 2000). ეს მიდგომა გამართლებულია როგორც თავისუფლად მცხოვრები ასევე პატრონ უჯრედთან ასოცირებულ მიკროორგანიზმებისთვის (Martiny *et al.* 2006).

### 1.1.2. ადამიანის მიკრობიომი

ადამიანის სხეული მრავალი მიკროორგანიზმის ჰაბიტატია. ინდივიდის ორგანიზმში მყოფი ბაქტერიული უჯრედები, რომლებიც საჭმლის მომწელებელ სისტემაში, პირის ღრუში, კანზე, შარდ-სასქესო და სასუნთ სისტემებში სახლობენ, რაოდენობრივად ადამიანის სომატურ უჯრედებს უტოლდება (Sender *et al.* 2016). დადგენილია რომ ადამიანის მიკრობიომი, ნებისმიერ მომენტში, 500-1000 სხვადასხვა სახობის ბაქტერიას მოიცავს, ხოლო უნიკალური გენოტიპების რაოდენობა შესაძლოა მრავალჯერ აღემატებოდეს ამ ციფრს (Locey and Lennon 2016). რადგან თითოეული ბაქტერიული სახეობის გენომი საშუალოდ 2000 გენს ითვლის, ადამიანის

მიკრობიოტებში მათი სახეობრივი მრავალფეროვნება ჯამურად (200 გენი X 1000 სახეობა) არანაკლებ 2000000 გენს უტოლდება, რაც ადამიანის გენომზე (20000 გენი) 100-ჯერ მეტია (Turnbaugh *et al.* 2007). აღსანიშნავია, რომ ეს მნიშვნელობები არ ითვალისწინებს სხეულში არსებულ ვირუსულ და სოკოვან ბიომს, რომელიც ეუკარიოტების ვირუსებისა და ბაქტერიოფაგების შემთხვევაში, შესაძლებელია პროკარიოტებს ათობითი რიგით აღემატებოდეს (Reyes *et al.* 2010).

ადამიანის მიკრობიომის ფორმირება განგრძობითი და დინამიური პროცესია. დაბადებისთავანვე ახალშობილის ექსპოზიცია დედისეულ და გარემოს მიკრობებთან ხდება, რაც ნაწლავური ბიოტის ფორმირებას უქმნის საფუძველს. სიცოცხლის პირველი წლების განმავლობაში, ორგანიზმში დაახლოებით  $10^{13}$ - $10^{14}$  პროკარიოტული ორგანიზმის შემოტანა ხდება. პირველი სამი წლის მანძილზე მათი სახეობრივი შემადგენლობა ძლიერ ფლუქტუაციებს განიცდის. ბუნებრივი კვებიდან (ძუძუთი კვება) მყარ/ჩვეულ კვებით რაციონზე გადასვლის შემდეგ, ნაწლავური მიკრობიოტის შემადგენლობის სტაბილიზაცია იწყება. ადამიანის ზრდასთან ერთად, მიკრობიოტები სხეულის ადგილ-სპეციფიურ ტრაექტორიას მისდევს, შესაბამისად ადამიანის სხეულის ყოველ ნაწილში ყალიბდება სპეციფიკური მიკრობული ბიოგეოგრაფია. ზრდასრული ასაკის მიღწევის შემდეგ, ჯანმრთელ ინდივიდებში მიკრობიომი ფუნდამენტალურად აღარ იცვლება (Koenig *et al.* 2011).

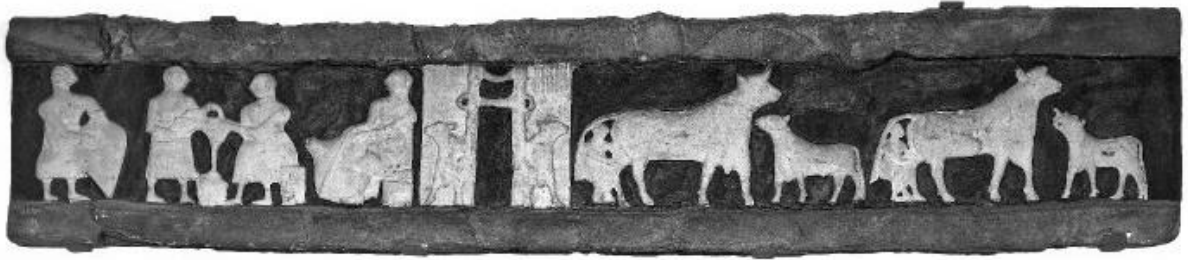
უკანასკნელი კვლევების თანახმად, თითოეული ადამიანი განსხვავებული და უნიკალური მიკრობიომის მატარებელია. თუმცა ცოტა რამ არის ცნობილი იმის შესახებ, თუ რა განაპირობებს ამ ვარიაციებს და რა არეგულირებს მათ (Gilbert *et al.* 2018). ვარაუდობენ, რომ ადამიანის მიკრობიომზე ინდივიდის გენომს შეზღუდული ზეგავლენა აქვს და ბიომი ძირითადად გარეგანი ფაქტორების ზეგავლენით ყალიბდება (Lax *et al.* 2014). ნაჩვენებია, რომ კვებითი რაციონის ცვლილებამ შესაძლოა გამოიწვიოს კუჭ-ნაწლავის სისტემის მიკრობული შემადგენლობის სტრუქტურის დრმა ცვლილებები (David *et al.* 2014). არა მარტო კვებითი რაციონი, არამედ კუჭ-ნაწლავის სისტემაში საკვების გავლის დროც კი დიდ გავლენას ახდენს ნაწლავურ სისტემაში კომენსალური მიკრობული შემადგენლობის ჩამოყალიბებაზე. მაგალითად საკვების სწრაფი გავლა ხელს უწყობს ბიოფილმის წარმომქმნელი ან სწრაფი გამრავლების უნარის მქონე ბაქტერიების სელექციას (Vandeputte *et al.* 2016). ეს

ფაქტები ცხადყოფს საკვები პროდუქტების მიკრობული შემადგენლობის უმნიშვნელოვანეს ზეგავლენას ადამიანის მიკრობიომსა და ჯანმრთელობაზე. საჭმლის მომნელებელი სისტემის მიკრობიოტა, რომელიც ინდივიდის გენეტიკური პროფილის, იმუნური სტატუსის, გარემო პირობების და უპირველეს ყოვლისა, მიღებული საკვები პროდუქტების შესაბამისობით ყალიბდება უდიდეს როლს თამაშობს ადამიანის კეთილდღეობაში (Frank *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2015).

### 1.1.3. მიკრობები საკვებ პროდუქტებში

მსოფლიოს მრავალ კულტურაში ცოცხალი მიკრობების შემცველი ფერმენტირებული საკვები პროდუქტები ყოველდღიური საკვები რაციონის ნაწილია. მათი მეშვეობით კი ადამიანის ორგანიზმი მუდმივად იღებს ახალ მიკროორგანიზმებს (Ni *et al.* 2017).

ფერმენტირებული საკვები რთული მიკრობული შემადგენლობით ხასიათდება. ეს ეკოსისტემები კი ადამიანთან კოევოლუციის პირობებში ყალიბდება. 12 000 წლის წინათ „ნეოლთური რევოლუციის“ შემდეგ, მიწადმოქმედების და მეცხოველეობის განვითარებასთან ერთად, ადამიანი საკვების ინტენსიურ დამუშავებას იწყებს, შესაბამისად ყალიბდება პირველი ანთროპოგენური მიკრობული ეკოსისტემები, სადაც სპეციფიკური მიკროორგანიზმები საკვები პროდუქტების მზადების და კონსერვაციის განუყოფელი ნაწილი ხდება (Lazaridis *et al.* 2016). ამის დამადასტურებელი მრავალი ბიოარქეოლოგიური ფაქტი არსებობს. როგორცაა მაგალითად უძველესი არქეოლოგიური ბიომოლეკულური და არქეობოტანიკური მტკიცებულება ყურძნის ღვინის არსებობის შესახებ, რომელიც ჩვენ წელთაღრიცხვამდე 6000-5800წ. ადრეული ნეოლითური პერიოდის ჩრდილოეთ კავკასიის, საქართველოს ტერიტორიაზე აღმოჩენილ ქვევრის სინჯებში დადგინდა (McGovern *et al.* 2017). ეს აღმოჩენა ადასტურებს უკვე ადრეულ ნეოლითურ კულტურაში ფერმენტაციის წეს-ჩვეულებების და აღჭურვილობის არსებობას.



სურათი 2. კირქვაზე ამოტვიფრული ბითუმისანი რელიეფი. ასახულია ძროხის წველის, რძის გადაწურვის და დამუშავების ეპიზოდები. ერაცის ტერიტორია, თელ ელ-უბეიდი, ნინურსაგის ტაძარი, ძ.წ. 2500 წელი.

ფერმენტირებული საკვები პროდუქტების დამზადების ათასწლოვან პრაქტიკასთან ერთად, მიკრობების დომესტიფიკაციაც მიმდინარეობდა (Gallone *et al.* 2016). ზოგადი განმარტებით დომესტიფიკაცია ველური სახეობების სელექციის გზით, ადამიანის მიერ შექმნილი ნიშების და პირობების მიმართ ადაპტირებული ვარიანტების გამოყვანას გულისხმობს. ამგვარი სახეობები ადამიანის და ინდუსტრიის მოთხოვნილებებზე არის მორგებული და წარმატებით ვითარდება ანთროპოგენულ პირობებში. დომესტიფიკაციასთან ასოცირებული რიგი გენოტიპური და ფენოტიპური მახასიათებლები აღწერილია მარცვლეულის კულტურებში, პირუტყვისა და შინაურ ცხოველებში, ლაბორატორიულ დროზოფილებსა და ნემატოდებში (Sterken *et al.* 2015).

მიკროორგანიზმების დომესტიფიკაცია სპონტანური ფერმენტაციიდან - კონტროლირებად ე.წ. „გადადედებით“ წარმოებულ ფერმენტაციაზე გადასვლისას იწყება. უწყვეტი სერიული გადადედების (ფერმენტირებული მასალის და მიკრობების გადატანა შესაბამის ახალ სუბსტრატში) პროცესთან ერთად დაიწყო მიკრობების გაუცნობიერებელი მაგრამ კონტროლირებადი სელექცია (Steensels *et al.* 2019). სერიული გადადედების პროცესის შედეგად ხდება შტამების გენეტიკური დიფერენციაცია და იზოლაცია, წამოიქმნება გენების ლიმიტირებული ნაკადი რაც ხელს უწყობს განსხვავებული სუბ-პოპულაციების ან სახეობების წამოქმნას. ხშირ შემთხვევაში ამ პროცესში მიკროორგანიზმები კარგავენ თავიანთ ბუნებრივ (თავდაპირველ) ეკოსისტემებში ცხოველმყოფელობისთვის აუცილებელ გენებს. შედეგად კულტურები ნაწილობრივ დამოკიდებულნი ხდებიან ახალი გარემოს მიმართ შექმნილ ადაპტაციებზე. შედეგად წამოიქმნება ფერმენტირებული საკვები

პროდუქტების უნიკალური მიკრობიოტები რომელთა ერთადერთი ჰაბიტატი ადამიანის მიერ შექმნილი გარემოა.

მიკრობების დომესტიფიკაციის პროცესი XX საუკუნემდე გაუცნობიერებელად მიმდინარეობდა. ეს გასაკვირი არც არის, რადგან თავად მიკროორგანიზმების არსებობა მხოლოდ გვიანდელ XVII საუკუნეში, ლევენჰუკის მიერ იქნა აღმოჩენილი. ხოლო მიკრობების როლი ყურძნის ფერმენტაციის, რძის დამჟავების და ხორცის ლპობის პროცესში მხოლოდ XIX საუკუნეში დადგინდა, როდესაც ლუი პასტერმა ექსპერიმენტალურად დაადასტურა სიცოცხლის სპონტანური თვითშობადობის თეორიის მცდარობა და საკვების ფუჭების პროცესი ბაქტერიულ კონტამინაციას დაუკავშირა (Farley *et at.* 1974). მხოლოდ ამ აღმოჩენების შემდეგ იწყება საკვებთან ასოცირებული მიკროორგანიზმების ცნობიერი კონტროლი. მიკროორგანიზმების „კომენსალური“ (უნებლიე) დომესტიფიკაციიდან ადამიანი ნაწილობრივ „მიმართული“ სელექციის პროცესზე გადადის, სადაც ახლად გამოყოფილი სახეობები ინდუსტრიული გამოყენებისთვის მუშავდება.

დღეს საკვებთან ასოცირებულ ბაქტერიებს, საფუვრებს და ობის სოკოებს ორმხრივი მნიშვნელობა აქვთ:

1. ისინი საკვებში გვხვდებიან როგორც ინფექციურ-ტოქსიკური დაავადებების და საკვები პროდუქტების ლპობის გამომწვევები.
2. და ასევე გვხვდება სასარგებლო მიკროორგანიზმების სახით, რადგან ისინი გამოიყენება საკვები პროდუქტების, პრობიოტიკების და საკვები პროდუქტების დანამატების საწარმოებლად.

მიკროორგანიზმების ამგვარი დუალისტური როლის გათვალისწინებით, პროდუქტებში მათი შემადგენლობა და შემცველობა კონტროლს და მონიტორინგს ექვემდებარება. მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნებში, კულტურულ-სპეციფიკური და რეგულატორული გარემოებებიდან გამომდინარე, არტიზანული თუ ინდუსტრიული წესით დამზადებულ ფერმენტირებულ პროდუქტებში მრავალი სხვადასხვა სახეობის მიკროორგანიზმი გამოიყენება. პროკარიოტულ ორგანიზმებს შორის, რძემჟავა ბაქტერიებს ფერმენტირებული პროდუქტების წარმოებაში წამყვანი ადგილი უკავიათ.

## 1.2. რძემჟავა ბაქტერიების ზოგადი დახასიათება

მეოცე საუკუნის დასაწყისში, ტერმინი რძემჟავა ბაქტერიები მხოლოდ „რძის-დამამჟავებელ“ მიკრობებთან მიმართებაში გამოიყენებოდა. ბაქტერიოლოგიის განვითარებასთან ერთად ეს ცნება თანდათანობით გაფართოვდა. ახლა რძემჟავა ბაქტერიები ყველა ტიპის ფერმენტირებულ საკვებ პროდუქტებთან ასოცირდება. მათი გამოყოფა შესაძლებელია მცენარეული მასალებიდან, სხვადასხვა საკვები პროდუქტებიდან და ადამიანის და ცხოველების მიკრობიოტებიდან. გამოიყენება ხორცის, ბოსტნეულის, ხილის, სხვადასხვა ტიპის სასმელის და რძის პროდუქტების ფერმენტაციაში (Schleifer *et al.* 1995).

რძემჟავა ბაქტერიების თანამედროვე კლასიფიკაციას 1919 წელს ორლა-იენსენის მიერ შექმნილი მონოგრაფია დაედო საფუძვლად (Heineman 1920). მოცემულ ნაშრომში ორგანიზმები უჯრედის მორფოლოგიის, ფერმენტაციის ტიპის, ზრდის ტემპერატურული ზღვრების და შაქრების უტილიზაციის მიხედვით აღიწერებოდა. რძემჟავა ბაქტერიების მორფოლოგიურ და ფიზიოლოგიურ მახასიათებლებზე დაფუძნებული ფენოტიპური კლასიფიკაცია 1970-იან წლებამდე მიმდინარეობდა. იშვიათად ტაქსონების დაზუსტებისთვის დამატებით დნმ-ში %GC შემადგენლობის, დნმ/დნმ ჰიბრიდიზაციის და უჯრედის კედლის პეპტიდოგლიკანების ინტერპეპტიდური ხიდების დახასიათების მეთოდებს იყენებდნენ (Pot *et al.* 1994). 1980-იანი წლებიდან დნმ/დნმ და დნმ/რ-დნმ ჰიბრიდიზაციის მეთოდების განვითარებასთან ერთად შესაძლებელი ხდება აქამდე უცნობი გვარების და სახეობების იდენტიფიკაცია, რამაც არსებული ტაქსონების გადასინჯვა განაპირობა. მაგალითად *Streptococcus*-ის გვარი განისაზღვრა ჰეტეროგენულ ტაქსონად (Kilpper-Bälz *et al.* 1982), რის შედეგადაც მას გამოეყო *Enterococcus*-ის და *Lactococcus*-ის გვარები (Schleifer and Kilpper-Bälz 1984).

დღეს რძემჟავა ბაქტერიების ფილოგენეტიკური კლასტერიზაცია მათი ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობების მსგავსებაზე დაყრდნობით მიმდინარეობს. თანამედროვე განამარტებით რძემჟავა ბაქტერიები წარმოადგენენ ფილოგენეტიკურად დაკავშირებული, გრამ-დადებითი, სპორა არ წამომქმნელი, ფაკულტატურად ანაერობული, ჰომო ან ჰეტეროფერმენტატიური მიკროორგანიზმების ფუნქციონალურ ჯგუფს, რომელთაც ნახშირწყლების

ფერმენტაციის შედეგად რძემჟავის წარმოქმნის უნარი აქვთ. მიკუთვნებიან *Firmicutes* ტიპის, *Bacilli* კლასის *Lactobacillales* რიგს, რომელიც მოიცავს ექვს ოჯახს: *Aerococcaceae* (9 გვარი), *Carnobacteriaceae* (17 გვარი), *Enterococcaceae* (7 გვარი), *Lactobacillaceae* (4 გვარი), *Leuconostocaceae* (5 გვარი) და *Streptococcaceae* (4 გვარი) (Parte *et al.* 2018).

ვარაუდობენ, რომ რძემჟავა ბაქტერიების საერთო წინაპარი, ნიადაგის ჩხირისებრი ბაქტერია იყო, რომელმაც საკვები ნივთიერებებით მდიდარ გარემოსთან განიცადა ადაპტაცია და შედეგად დაკარგა რიგი გენები და მათთან ასოცირებული ფიზიოლოგიური ფუნქციები. რძემჟავა ბაქტერიების შემდგომი ნიშა-სპეციფიკური ადაპტაციების შედეგად ჩამოყალიბდა უამრავი ვარიაცია, რომელთა ბიომრავალფეროვნება და სახეობრივი კუთვნილება დღესაც აქტიური კვლევის საგანია (Vinderola *et al.* 2019).

### 1.2.1. მეტაბოლიზმი და ენერჯის მიღების ხერხები

რძემჟავა ბაქტერიებს არ გააჩნიათ ჰემის ბიოსინთეზის უნარი (Carr *et al.* 2002). ეს ძალზედ მნიშვნელოვანი პორფირინი, რომელიც გვხვდება ციტოქრომში, პეროქსიდაზასა და კატალაზაში, აუცილებელია როგორც აერობული, ასევე ანოქსიური სუნთქვისთვის და ჟანგბადის რადიკალების დეტოქსიფიკაციისთვის. ცხოველური პატრონი უჯრედებიდან, ჰემოლიზის მეშვეობით ჰემის მიღების უნარი რძემჟავა ბაქტერიების უმეტესად პათოგენურ სახეობებს, მათ შორის *Streptococcus*-ის გვარის წარმომადგენლებს გააჩნიათ. ჰემის ციტოქრომში ჩართვით შესაძლებელია ფუნქციონალური სუნთქვითი ჯაჭვის შექმნა, რაც *Streptococcus*-ს სწრაფი მეტაბოლიზმის საშუალებას აძლევს (Eichenbaum *et al.* 1996). რძემჟავა ბაქტერიების ჯგუფში შემავალი სხვა სახეობები ენერჯის მიღებას ნაკლებად გამოსავლიანი გზით, კერძოდ კი ფერმენტაციით ახორციელებენ.

სუბსტრატის-დონის ფოსფორილაციისას რძემჟავა ბაქტერიები ენერჯიას ჰექსოზების ფერმენტაციის ორი მთავარი გზის გამოყენებით მოიპოვებენ: გლიკოლიზზე დაფუძნებული ჰომოფერმენტაციით (ემბდენ-მეიერჰოფ-პარნასის გზა), რომლის საბოლოო პროდუქტი მხოლოდ რძის მჟავაა, ან ჰეტეროფერმენტაციის მეშვეობით (პენტოზას ფოსფოკეტოლაზის გზა, ჰექსოზ მონიფოსფატის გზა, 6-ფოსფოგლუკონატის გზა), სადაც რძის მჟავასთან ერთად წამოიქმნება CO<sub>2</sub>, ეთანოლის, აცეტატის ან ფორმატის მნიშვნელოვანი რაოდენობა. ობლიგატორული

ჰომოფერმენტატიული რძემჟავა ბაქტერიების სახეობები, მაგალითად *Lactobacillus (Lb.) delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. farciminis*, *Lb. johnsonii*... წარმოქმნიან მხოლოდ 100% რძემჟავას, ხოლო ფაკულტატურად ჰომოფერმენტატიური სახეობები მაგ.: *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei*, *Lb. zae*, *Lb. versmoldensi*... ან ობლიგატორი ჰეტეროფერმენტატიური სახეობები *Lb. brevis*, *Lb. durianis*, *Lb. fermentum*, *Lb. hammesii*, *Lb. reuteri*... რძის მჟავასთან ერთად, სხვადასხვა პროცენტულობით წარმოქმნიან ეთანოლს და ძმარმჟავას. ორივე ჰომო- და ჰეტეროფერმენტატიური დუღილისას, ყოველ მოლ მეტაბოლირებულ შაქარზე, პენტოზას ფერმენტაცია იძლევა ორ მოლ ადენოზინტრიფოსფორმჟავას (ატფ), ჰექსოზის დაშლისას ემბდენ-მეიერჰოფ-პარნასის გზა იძლევა ორ მოლ ატფ-ს, ხოლო ჰეტეროფერმენტირებისას მიიღება მხოლოდ ერთი მოლი. ამიტომ უმეტესი სახეობებისთვის ჰექსოზების ჰომოფერმენტაცია უფრო მომგებიანია (Prückler *et al.* 2015).

ასევე აღსანიშნავია, რომ რძემჟავა ბაქტერიებს აქვთ ორი სტერეოსპეციფიკური ლაქტატის დეჰიდროგენაზა, რის მეშვეობითაც წარმოქმნიან რძემჟავის ორ L(+) ან D(-) იზომერს. *Lactobacillus*-ის გვარის ზოგიერთ წარმომადგენელი წარმოქმნის მხოლოდ L(+) ფორმას, რომლის აკუმულირებისას ხდება რაცემაზას ინდუცირება, რის შედეგადაც L(+) გარდაიქმნება D(-) იზომერად (Kuipers *et al.* 2000). წარმოქმნილი იზომერების ვარიანტები და პროცენტულობა უმეტეს შემთხვევაში სახეობა სპეციფიკურია, თუმცა არსებობს გამონაკლისებიც. მაგალითად გარემოში ნატრიუმის აცეტატის არსებობა-არარსებობის მიხედვით *Lactobacillus sakei* -ს მიერ წამოქმნილი L(+) ან D(-) იზომერების თანაფარდობა მკვეთრად იცვლება (Iino *et al.* 2001).

რადგან რძემჟავული დუღილის შედეგად მიღებული ატფ არ არის საკმარისი ეფექტური ზრდის უზრუნველსაყოფად, რძემჟავა ბაქტერიების ზოგიერთმა სახეობამ ენერჯის მიღების ალტერნატიული სტრატეგიები განივითარეს. მათ გააჩნიათ ენერჯის მიღების სამი დამატებითი გზა: ამინომჟავების დეკარბოქსილირება (*Oenococcus (O.) oeni*, *Lb. hilgardii*, *Pediococcus (P.) parvulus* ), ვაშლმჟავას დეკარბოქსილირება (*O. Oeni*) და არგინინის დემირმაცია (*Streptococcus (St.) mutans*, *St. salivarius*, *St. gordonii*, *Lb. sakei*, *Lactococcus (L.) lactis*). ეს გზები ენერჯის მიწოდებასთან ერთად, ამონიუმის წარმოქმნის ხარჯზე არეში pH-ის რეგულაციას უზრუნველყოფს (Pessione *et al.* 2010).



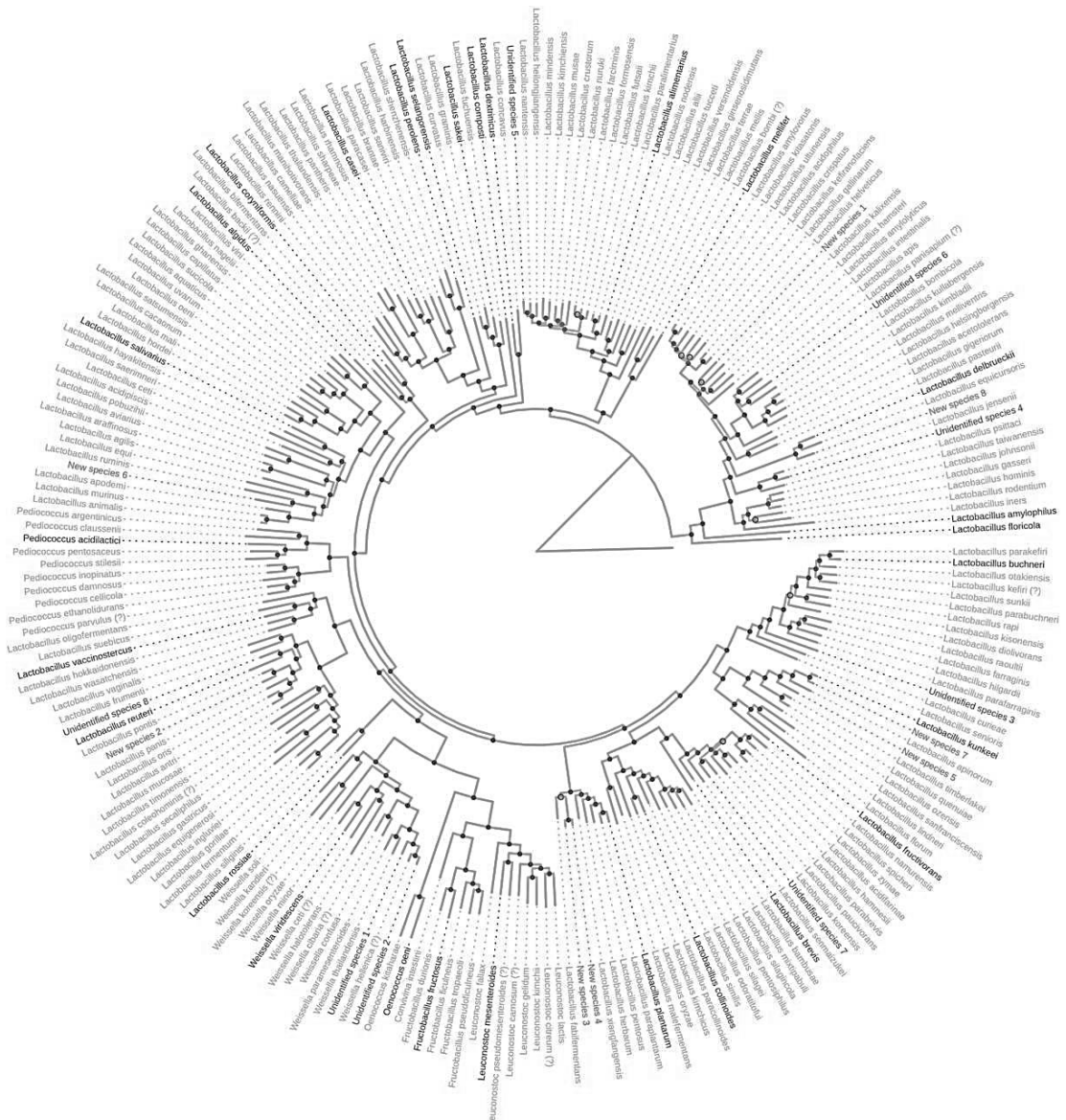
რძემჟავა ბაქტერიები აეროტოლერანტულები არიან. რადგან მათ არ გააჩნიათ ჰემის სინთეზის უნარი, ჟანგბადის რადიკალებისგან დასაცავად სხვადასხვა სტრატეგიებს იყენებენ. ძირითადად გამოიყენებენ ნიკოტინამიდადენინდინუკლეოტიდ-H (ნად-H) ოქსიდაზურ და პეროქსიდაზურ სისტემებს. ასევე შეუძლიათ წამოქმნან ჟანგბადის რადიკალების გამანეიტრალებელი რამდენიმე ფლავოპროტეინ-ოქსიდაზური ფერმენტი, Mn-დამოკიდებული სუპეროქსიდ-დისმუტაზა, ხოლო იშვიათ შემთხვევაში კი ჰემ-დამოკიდებული (*Streptococcus* spp.) და Mn-დამოკიდებული კატალაზა (Zotta *et al.* 2017). ამ ფერმენტებისა და ნად-H პეროქსიდაზას საშუალებით O<sub>2</sub> და H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ს შაქრების ფერმენტაციიდან ელექტრონის მიღების საშუალება ეძლევა, შესაბამისად ამ პროცესს ზომიერი ეფექტი აქვს ბაქტერიის მეტაბოლიზმზე. ამიტომ აერობულ და ანაერობულ პირობებში მიმდინარე მეტაბოლიზმი შესაძლოა განსხვავდებოდეს: ენერჯის და ბიომასის გამოსავლიანობის, შაქრის დაშლის საბოლოო-პროდუქტების და მეტაბოლირებადი სუბსტრატების დიაპაზონის მიხედვით (Archibald *et al.* 1981). ასევე რძემჟავა ბაქტერიებში ჟანგბადის რადიკალებისგან თავდაცვის ერთ-ერთ საინტერესო მექანიზმს მეტალების ბიოაკუმულაცია წამოადგენს. რიგ სახეობებს მანგანუმის (25 mM), სელენის და თუთიის მაღალი კონცენტრაციების შიდაუჯრედული აკუმულაციის უნარი გააჩნიათ, სადაც მანგანუმი სუპეროქსიდ-დისმუტაზას მსგავსად მოქმედებს, სელენი სელენოციტინაზის სისტემებში რადიკალების კატალიზატორის როლს ასრულებს, ხოლო თუთია იონური მახის ფუნქციას ითავსებს. ეს თვისება მიუთითებს რძემჟავა ბაქტერიების მძიმე მეტალების ადსორბციის და ბიოაკუმულაციის მაღალ პოტრენციალზე (Brioukhanov *et al.* 2007).

დღეს რძემჟავა ბაქტერიები ფართოდ გამოიყენება ადამიანის და ცხოველთა კვებაში, ფარმაციაში და ქიმიურ ინდუსტრიაში. კვებით ინდუსტრიაში რძემჟავა ბაქტერიები გამოიყენება იოგურტების, ყველების, არაჟნის, კარაქის, პურების, სხვადასხვა ბოსტნეულის მწნილების, ფერმენტირებული თევზის და ხორცის, ლუდის, ღვინის და სხვა მრავალი პროდუქტის დასამზადებლად. რძემჟავა ბაქტერიების მიერ წარმოქმნილი ფუნქციონალური ოლიგოსაქარიდები გამოიყენება როგორც პრებიოტიკები, ნუტრაცეფტები, დამატკბილებლები, დამატენიანებლები, კონსერვანტები და იმუნოსტიმულატორები (Satyanarayana *et al.* 2012). ამგვარი

მნიშვნელობის მქონე რძემჟავა ბაქტერიები ძირითადად მოიცავს *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* და *Streptococcus* გვარებს.

## 1.2.2. ლაქტობაცილუსის გვარის კომპლექსი

*Lactobacillus*-ის გვარი *Lactobacillaceae*-ს ოჯახის ერთ-ერთი ყველაზე ფართო და მნიშვნელოვანი წარმომადგენელია. გვხვდება მრავალ სხვადასხვაგვარ გარემოში, უმეტესად კი მცენარეებისა და ნიადაგის საკვები ნივთიერებით მდიდარ ნიშებში ან პატრონი ორგანიზმების მუკოზურ გარემოში. *Lactobacillus*-ის გავრცელების ამგვარი მრავალფეროვნება მათ ფილოგენეტიკურ დივერსიფიკაციაში აისახება, შესაბამისად ეს გვარი ძლიერი სახეობათაშორისი გენეტიკური დიქოტომიით ხასიათდება (Canchaya *et al.* 2006). მთლიანი გენომის ნუკლეოტიდური მიმდევრობის განსაზღვრის მეთოდების განვითარებასთან ერთად, ცხადი გახდა, რომ *Lactobacillus*-ის პოლიფილეტური გვარია (Sun *et al.* 2015). მისი ევოლუციური ხე მოიცავს *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* და *Fructobacillus* გვარებს, რადგან ეს ტაქსონებიც *Lactobacillus*-ის უკანასკნელი საერთო წინაპრის შთამომავლები არიან. ეს ექვსივე გვარი ერთად ქმნის მონოფილეტურ ტაქსონს, რომელსაც „ლაქტობაცილუსის გვარის კომპლექსი“ ეწოდება (Lactobacillus Genus Complex (LGC)) (Duar *et al.* 2017; Rossi *et al.* 2019; Wittouck *et al.* 2019). თუმცა უნდა გვახსოვდეს, რომ ბაქტერიული სახეობები ადამიანის მიერ შექმნილი კონცეფციაა და ტაქსონები პირობითად შეთანხმებული ზღვრების ფარგლებში თავსდება. ბუნებაში ბაქტერიული გენომები მაღალი სიხშირით იცვლება და ჰორიზონტალური ადაპტაციების ზეგავლენით უწყვეტად ვარიირებს. შესაბამისად ბაქტერიების კატეგორიზაციის მცდელობები ცდომილების და ტენდენციების მატარებელია.



სურათი 3. „ლაქტობაცილუსის გვარის კომპლექს“-ში შემავალი გენომური კლასტერების მსგავსების მაქსიმალური ფილოგენეტიკური ხე (Wittouck et al. 2019).

თავად **Lactobacillus**-ი აშეამად 239 სხვადასხვა სახეობას მოიცავს (Parte et al. 2018). *Lactobacillus* spp. გვხვდება როგორც საკვებ პროდუქტებში ასევე ადამიანის ნორმალური მიკრობიოტების შემადგენლობაში. მათ შორის *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. rhamnosus* და *Lb. salivarius* ბიოტექნოლოგიური, პრობიოტიკური და კომერციული თვალსაზრისით მნიშვნელოვან სახეობებს წამოადგენენ (Doyle et al. 2019).

როგორც ადამიანის მიკრობიომის ნაწილი, *lactobacillus* -სი პირის ღრუმში, კანზე, კუჭ-ნაწლავის და შარდ-სასქესო სისტემაში გვხვდება. პირის ღრუმში *Lactobacilli*-ის სხვადასხვა სახეობები, მათ შორის *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri* და *Lb. casei* ნერწყვსა და

კბილის ნადებში ბინადრობენ (Yang *et al.* 2010). მათ შესაძლოა მავნე მიკროორგანიზმებისგან დამცავი ფუნქციები ქონდეთ, თუმცა როგორც მჟავა-წამომქმნელ ორგანიზმებს მათ ასევე წვლილი მიუძღვით კბილის ეროზიაში (Haukioja *et al.* 2008). *Lactobacillus*-ის გვარი ასევე გვხვდება ადამიანის კუჭ-ნაწლავის სისტემაში. ნაწლავური და ფეკალური სინჯებიდან *Lactobacillus*-ის მრავალი სახეობა არის გამოყოფილი და აღწერილი. დადგენილია რომ მათი ტიპური შემადგენლობა ვარირებს ინდივიდებს შორის, თუმცა მათ შორის მხოლოდ *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* და *Lb. reuteri* მიიჩნევა ზოგად-ტიპურ ფეკალურ კულტურებად. *Lactobacillus*-ის გვარი ბიომში შედარებით დაბალი რაოდენობით არის წამოდგენილი და მთლიანი ფეკალური მიკრობიომის 0.2–1.0%-ს წამოადგენს (Mueller *et al.* 2006). *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri* და *Lb. salivarius* -ის წამომადგენლები გვხვდება ქალის რძის ნატურალური მიკრობიომის ბუნებრივ შემადგენლობაში (Martín *et al.* 2007). როგორც ცნობილია დედის რძე გადამწყვეტ როლს თამაშობს ახალშობილის ნაწლავური ბიოტის ფორმირებაში, შესაბამისად ეს სახეობები ახალშობილის საწყის მიკრობიომშიც გვხვდება (Martín *et al.* 2003). ასევე *Lactobacillus*-ი ჯანმრთელი რეპროდუქციული ასაკის ქალის ვაგინალური მიკრობიომის უმნიშვნელოვანესი და დომინანტური ნაწილია. ჩატარებული კვლევების თანახმად ამ ბიოტის წამყვან სახეობებს *Lb. iners*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri* და *Lb. jensenii* წარმოადგენენ, თუმცა დადგენილია, რომ სახეობების განაწილება და სიმჭიდროვე ვარირებს ეთნიკურ ჯგუფებს შორის (Ravel *et al.* 2011). ვაგინალური რძემჟავა ბაქტერიების მიკრობიოტა დიდ როლს თამაშობს სხვადასხვა უროგენიტალური ინფექციების განვითარების პრევენციაში. ეს დამცავი ფუნქცია ძირითადად *Lb. iners*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri* და *Lb. jensenii*-ს სახეობებს მიეწერება. მათი მონოკულტურების ეკოლოგიური კონკურენტუნარიანობა, რძის მჟავის წარმოქმნის შედეგად გარემოს pH-ის კლება და სხვადასხვა ტიპის ბაქტერიოსტატიკური თუ ბაქტერიოციდური კომპონენტების სინთეზის უნარი ხელს უშლის არასასურველი მიკრობიომის განვითარებას (Dominguez-Bello and Gloria 2019).

ბუნებრივი ნიშების გარდა *Lactobacilli* ფართოდ არის გავრცელებული ადამიანთა და ცხოველთა საკვებში. გამოირჩევა პრობიოტიკური მახასიათებლებით და ხშირად გვხვდება სასარგებლო ფერმენტირებულ პროდუქტებში, ამიტომ საზოგადოების მიერ

სასურველ საკვებ კომპონენტად აღიქმება. მსოფლიოში გავრცელებულ სხვადასხვა სახის ფერმენტირებულ რძის პროდუქტებში, *Lactobacillus*-ის სახეობათა დიდი მრავალფეროვნებაა წარმოდგენილი. მაგალითად, *Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus*-ის გარდა, რომელიც *St. thermophilus*-ის სიმბიოტურ კულტურებთან ერთად ბულგარული და ბერძნული ტიპის იოგურტების კლასიკური დედოს კომპონენტებია, *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis* გამოიყენება არაჟნის და კუმისი დასამზადებლად, *Lb. plantarum*-ი - ინდონეზიური დადიაჰის და ირანული ჰალდის, *Lb. paracasei* - იაპონური იაკულტის, *Lb. helveticus* და *Lb. acidophilus* კი - კავკასიურ და სლავურ კულტურებში პოპულარული კეფირების დასამზადებლად გამოიყენება (Yam *et al.* 2015). რძის ფერმენტირებული პროდუქტების გარდა *Lactobacilli*-ი მოიხმარება ბოსტნეულის, ხორცის და თევზის ფერმენტაციისთვის. მაგალითად *Lb. sakei* ახალი ხორცისა და თევზეულის ბუნებრივი ბიომის ნაწილია და ასევე ამ პროდუქტების ფერმენტაციისთვის გამოიყენება (Chaillou *et al.* 2005). ალკოჰოლურ სასმელებში *Lactobacillus*-ის გვარის წარმომადგენლები შესაძლოა არომატის და გემოს მიმცემ კომპონენტად გამოიყენებოდეს (*Lb. plantarum*-ი წითელი ღვინის ვაშლმჭავური დუღილისას), თუმცა უმეტეს შემთხვევაში ისინი ალკოჰოლურ სასმელებში კონტამინანტების სახით გვევლინება (Pozo-Bayón *et al.* 2005).

*Pediococcus*-ის გვარი 11 სახეობას მოიცავს (Parte *et al.* 2018). მათი ჰაბიტატი *Lactobacillus*-ის გვარის წარმომადგენლების მსგავსია. გვხვდებიან როგორც დამუშავებულ და დაუმუშავებელ საკვებ პროდუქტებში, ასევე ადამიანის და ცხოველების კუჭ-ნაწლავის სისტემაში. *Pediococcus*-ის წარმომადგენლებს შორის, მათი ეკოლოგიური და ბიოტექნოლოგიური მნიშვნელობის გამო *P. acidilactici* და *P. pentosaceus* ყველაზე კარგად შესწავლილი სახეობებია. ისინი მცირე რაოდენობით გვხვდება ნედლ ბოსტეულში, ხილში და მარცვლეულში, თუმცა სილოსის, კომბოსტოს, ლობიოს, კიტრის, ზეთისხილის და ხორბლეულის სპონტანური ფერმენტაციისას მათი რაოდენობა მკვეთრად მატულობს და წარმოიქმნა *Pediococcus* spp.-ს სტაბილური მიკრობული კომუნები. როგორც სტარტერული კულტურები *Pediococcus*-ები გამოიყენება ყველის, ღვინის, ცხოველების საკვების, უმეტეს წილად კი ფერმენტირებული ხორცპროდუქტების დასამზადებლად. *P. pentosaceus* და *P. acidilactici* რიგ შტამებს *Listeria monocytogenes* მიმართ ანტაგონიზმი ახასიათებთ და

ამიტომ აქტიურად გამოიყენებიან მშრალი სოსისების წარმოებაში (Hugas and Monfort 1997). *P. damnosus*, *P. clausenii* და *P. Inopinatus* ხასიათებთ სვიის მიმართ მაღალი ამტანობა, ამიტომ ისინი ხშირად ლუდსა და ლუდსახარში ქარხნების გარემოში გზვდება (Iijima et al. 2007). მათ შორის *P. damnosus* ლუდის მნიშვნელოვანი მალფუქებელი მიკრობია, იწვევს რა პროდუქტის ვისკოზურობის მატებას, ამღვრევას, განაპირობებს მჟავე გემოს და დიაცეტილის წარმომქმნელი შტამების შემთხვევაში ლუდის არასასიამოვნო სურნელს (Walling et al. 2005).

*Leuconostoc*-ის გვარი მოიცავს 14 სახეობას (Parte et al. 2018). ეს გვარი ძირითადად ასოცირდება მცენარეულ და ხრწნად მცენარეულ მასალებთან. გზვდება მწვანე ვეგეტაციაში, მცენარეთა ფესვებში და მრავალი ტიპის ფერმენტირებულ ბოსტნეულში (Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004), მათ შორის *Leuconostoc (Le.) mesenteroides* გამოიყენება კიძის, კიტრის, კომბოსტოს და ზეთისხილის მწნილების დასამზადებლად (Mäki 2004). მცენარეული მასალების გარდა *Leuconostoc*-ის გვარის წარმომადგენლები გზვდება ნედლ რძეში და ფერმენტირებულ რძის პროდუქტებში, ხორცეულსა და თევზეულში, მათგან *Le. carnosum*, *Le. gasicomitatum* და *Le. gelidum* საკვების ფუჭებასთან ასოცირებული სახეობებია. *Leuconostoc*-ი იშვითად გზვდება ჯანმრთელი თბილსისხლიანი ცხოველების მიკრობიომში, თუმცა ხშირად გამოიყოფა თევზების კუჭ-ნაწლავის სისტემიდან (Ringø and Gatesoupe 1998).

*Weissella* აერთიანებს 22 სახეობას (Parte et al. 2018). მათი გავრცელების არე ვარიაბელურია და მოიცავს გრუნტს, ბოსტნეულს და ფერმენტირებულ საკვებს. *Weissella (W.) confusa* ადამიანის მიკრობიოტის ნორმალურ ნაწილად მიიჩნევა (Walter et al. 2001). *W. viridescens*, *W. halotolerans* და *W. hellenica* ხორცპროდუქტებთან ასოცირებული სახეობებია, მათგან *W. viridescens* გამოირჩევა მაღალი მდგრადობით თერმული დამუშავების მიმართ და იწვევს შებოლილი ხორცპროდუქტების გაფუჭებას (Diez et al. 2009).

*Oenococcus* სულ სამ სახეობას მოიცავს. ესენია: *Oenococcus alcoholitolerans*, *O. kitaharae*, *O. oeni*. თავდაპირველად ეს სახეობები *Leuconostoc*-ის გვარს მიეკუთნებოდნენ, თუმცა მათი ატიპიური აციდოფიკაციის უნარის შესწავლის და 16S - 23S რ-რნმ ანალიზის შედეგად მიღებული ინფორმაციის საფუძველზე მათ თავისი ფილოგენეტიკური ხაზი მიენიჭათ. მეღვინეობასთან ასოცირებულ რძემჟავა

ბაქტერიებს შორის მხოლოდ *Oenococcus* გვარის წარმომადგენლებს ახასიათებთ ეთანოლის მიმართ მდგრადობა. *O. oeni* ღვინის წამოებისას გამოიყენება მეორეული ანუ ვაშლმჟავური (მალოლაქტური) დუდილის წარსარმართად. შერჩეული *O. oeni* სტარტერული შტამები L-ძმარმჟავას L(+)-რძემჟავად გარდაქმნიან, რაც განაპირობებს ღვინის pH-ის მცირედ კლებას და პროდუქტის სენსორული პროფილის ცვლილებას. თუმცა ზოგიერთი ბუნებრივი *O. oeni* შტამი დუდილის პროცესში წარმოქმნის ბიოგენურ ამინებს (ჰისტამინს ჰისტიდინიდან), რაც უარყოფით გავლენას ახდენს ღვინის ხარისხზე (Bartowsky 2005). საინტერესოა რომ დაუმუშავებელი ყურძნიდან *O. oeni*-ს გამოყოფის ფაქტი არ არის დოკუმენტირებული და მისი ბუნებრივი ჰაბიტატი ჯერაც უცნობია (Lorentzen and Lucas 2019).

*Fructobacillus*-ს გვარი ხუთ სახეობას მოიცავს. ესენია: *Fructobacillus durionis*, *F. ficulneus*, *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus* და *F. tropaeoli*. ამ გვარის წარმომადგენლებს ფრუქტოზას ფერმენტაციის უნარი აქვთ და მათი ჰაბიტატები მოიცავს ბანანებს და კაკაოს (*F. pseudoficulneus*), ფერმენტირებულ დურანს (*F. durionis*), ლედვს (*F. ficulneus* და *F. pseudoficulneus*) და ყვავილებს (*F. fructosus* და *F. tropaeoli*). ასევე გვხვდება მექსიკური პალმის წვენში (*F. durionis* და *F. fructosus*). მათი ქრომოსომების შედარებით მცირე ზომა (1.41–1.55 Mb) მიუთითებს ნიშა-სპეციფიკური ადაპტაციის შედეგად გენების შემცირებაზე, რამაც განაპირობა *Fructobacillus* ჰაბიტატის შეზღუდვა ფრუქტოზით მდიდარი გარემოთი (Endo and Dicks 2014).

### 1.2.3. გვარები *Streptococcus*, *Lactococcus* და *Enterococcus*

*Streptococcus*-ის გვარის წარმომადგენელთა უმრავლესობა ძუძუმწოვართა ლორწოვან გარსზე მცხოვრები ობლიგატორული პარაზიტები არიან. *Streptococcus*-ის გვარი მოიცავს:  $\alpha$ -ჰემოლიზის მქონე პნევმოკოკებსა და *Streptococcus viridans* ჯგუფს; ლანსფილდის ჯგუფის  $\beta$ -ჰემოლიზურ A, B, C, G პიოგენურ და F, H ტიპის სტრეპტოკოკებს. აღწერილი 105 სახეობიდან უმეტესობა ადამიანის ზედა სასუნთქი სისტემის, ნაწლავური და სასქესო გზების ნიშა-სპეციფიკური ადაპტაციების მქონე კომენსალური და ოპორტუნისტული მიკროორგანიზმებია. *St. salivarius* subsp. *thermophilus*-ი (სინონიმი *St. thermophilus*) იშვიათი - საკვებთან ასოცირებული გამონაკლისია. ვარაუდობენ, რომ *St. thermophilus* დომესტიფიკაცია ცხოველთა მოშინაურებასთან და რძის გამოყენებასთან ერთად, დაახლოებით 10000 წლის წინათ

დაიწყო. *St. thermophilus* მიეკუთვნება *Streptococcus viridans* ჯგუფს. ეს არის  $\alpha$ -ჰემოლიზური, კომენსალური სტრეპტოკოკები. ამ ჯგუფში შემავალი სახეობების უმრავლესობა ადამიანის და ცხოველების პირის ღრუს, მუკოზური ზედაპირების და ნაწლავური სისტემის კომენსალია (*St. sanguis*, *St. bovis*, *St. mutans*, *St. mitis*, *St. salivarius*, *St. anginosus* *St. vestibularis*). თუმცა *St. thermophilus* ბუნებრივი რეზერვუარი იდენტიფიცირებული ჯერაც არ არის, მისი დეტექცია ყველაზე ხშირად ფერმენტირებულ რძის პროდუქტებში ხდება (Michaylova *et al.* 2007).

*St. thermophilus*-ის გენომის შესწავლამ უჩვენა, რომ გენების ჰორიზონტალური გადაცემა უმნიშვნელოვანეს როლს თამაშობს ამ სახეობის დომესტიფიკაციაში. რძის შემცველ გარემოში გამრავლების ოპტიზაციისთვის *St. thermophilus*-მა განიცადა ნიშა-სპეციფიკური ადაპტაცია და დაკარგა პათოგენუზთან ასოცირებული ფუნქციონალური გენები. მაგალითად *St. thermophilus* ეგზოპოლისაქარიდების წარმოქმნელი გენები *St. pneumoniae* და *St. agalactiae* კაპსულის სინთეზე პასუხისმგებელი გენების ორთოლოგიურია (Bolotin 2004). რეკომბინაციების გზით *St. thermophilus*-მა შეიძინა რძის გარემოში არსებობისთვის აუცილებელ გენები (Delorme 2008; Rasmussen *et al.* 2008) და მეტაბოლიზმი მოერგო რძეში არსებული ენერჯის მთავარი წყაროს - ლაქტოზას მაღალგამოსავლიან უტილიზაციას (Iyer *et al.* 2011).

საკვებ პროდუქტებში ხანგრძლივი და უსაფრთხო გამოყენების ისტორიის გამო *St. thermophilus* მიენიჭა „საზოგადოდ აღიარებული როგორც უსაფრთხო“ (Generally Recognized as Safe - (GRAS)) ა.შ.შ-ში და „უსაფრთხოების კვალიფიცირებული შეფასება“ (Qualified Presumption of Safety - QPS)) -ის სტატუსი ევროკავშირის წევრ ქვეყნებში. დღეს *St. thermophilus*-ი მთელს მსოფლიოში მრავალი მნიშვნელოვანი რძეყავა პროდუქტის დასამზადებლად გამოიყენება. მათ შორის იხმარება იოგურტების, შვეიცარული, ლიმბერგის და ბრიკის ყველების, პროვოლონეს, მოცარელას, ჩედერის და ასაგოს სტარტერულ კულტურებად. წარმოების პროცესში *St. thermophilus* მრავალი ფუნქციონალური დატვირთვა გააჩნია. პირველ რიგში *St. thermophilus* კულტურები გამოიყენება რძის სწრაფი დამჟავებისთვის (Xanthopoulos *et al.* 2001). აციდოფიკაციის სიჩქარე შტამ-დამოკიდებული თავისებურებაა და მასზე კულტურის მიერ ლაქტოზ-გალაქტოზას მეტაბოლიზმის უნარი, პროტეოლიზური და ურეაზული აქტივობა და სხვა მრავალი მახასიათებელი ახდენს ზეგავლენას. შესაბამისად საწარმოო



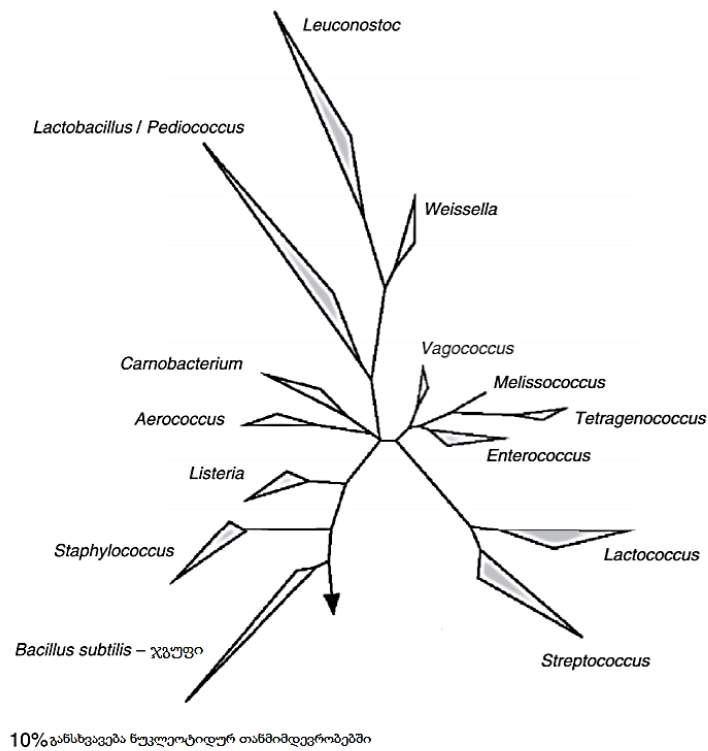
პროცესებისთვის შტამები ამ მახასიათებლებზე დაყრდნობით შეირჩევა. მეორეული ფუნქციები მოიცავს: ექსტრაუჯრედული პოლისაქარიდების მეშვეობით პროდუქტის ვისკოზურობის ამაღლებას, არასასურველი მიკროფლორის დათრგუნვას ბაქტერიოცინების გამოყენებით და პროდუქტების კვებითი ღირებულების გამდიდრებას ვიტამინების სინთეზის უნარის მქონე კულტურების გამოყენებით (Iyer *et al.* 2011). ასევე ნაჩვენებია, რომ *St. thermophilus* შეუძლია მცირე რაოდენობით აცეტონის, დიაცეტილის, აცეტალდეჰიდის და აცეტატის წამოქმნა, რაც პროდუქტის სენსორული პროფილის გამდიდრების საშუალებას იძლევა (Ott *et al.* 2000).

**Lactococcus** : 1985 წელს საკვებთან ასოცირებულ სტრეპტოკოკების უმრავლესობას, ცალკეული ფილოგენეტიკური გვარი მიენიჭათ (Schleifer *et al.* 1985). ახლა *Lactococcus*-ის გვარი (ყოფილი N ჯგუფის *Streptococci*) მოიცავს ჩვიდმეტ სახეობას: *L. allomyrinae*, *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. hircilactis*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. laudensis*, *L. nasutitermitis*, *L. petauri*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. reticulitermitis*, *L. taiwanensis* და *L. termiticola*. ეს მეზოფილური, ჰექსოზ-ჰომო-მაფერმენტირებელი, L(+)-რძემჟავას წარმომქმნელი მიკროორგანიზმებია. გვხვდება ბოსტნეულში, ნედლ რძეში და რძის პროდუქტებში, სხვადასხვა ტიპის ცხოველურ მასალებსა და ადამიანის ნაწლავურ სისტემაში (Cai *et al.* 2011). *L. lactis* რძის ინდუსტრიაში ყველაზე ფართოდ გავრცელებული სახეობაა. ვარაუდობენ რომ ის რძეში ფურაჟით კონტამინაციის შედეგად ხვდება. *L. lactis* subsp. *lactis* და *L. lactis* subsp. *cremoris* ტრადიციულად რძის წარმოებაში გამოიყენება და მინიჭებული აქვს QPS და GRAS სტატუსები. ამ ქვესახეობების მთავარი განმანსხვავებელი არგინინის ჰიდროლიზის უნარი და მარილების მიმართ ტოლერანტულობაა. ეს ორივე მახასიათებელი ტიპიურია *L. lactis* subsp. *lactis*-თვის და არ ახასიათებთ *L. lactis* subsp. *cremoris*-ს შტამებს. *L. lactis* subsp. *lactis* დიაცეტილის წარმომქმნელ ვარიანტებს *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ეწოდებათ და ფართოდ გამოიყენება სარძეო მეურნეობაში პროდუქტებისთვის კარაქის არომატის მისაცემად. ფერმენტირებული რძის და ყველის ინდუსტრიულ წამოებაში *L. lactis* subsp. *cremoris* ხშირად *Leuconostoc mesenteroides* ერთად გამოიყენება (Stanley 1998).

**Enterococcus**-ის გვარის წარმომადგენლები ადამიანის მიკრობიოტეხში, საკვებ პროდუქტებში, გარემოსა და სხვადასხვა ცხოველურ წყაროებში გვხვდება. მათ

გარემოს სტრესული პირობების მიმართ მაღალი გამძლეობა ახასიათებთ, ცხოველმყოფელობას ინარჩუნებენ ექსტრემალური ტემპერატურების (5–65°C), pH-ის (4.5-10.0) და NaCl მაღალი კონცენტრაციების პირობებშიც კი, რაც მათ მრავალი სხვადასხვაგვარი ნიშის კოლონიზაციის საშუალებას აძლევს. დღეს *Enterococcus*-ს გვარი 59 სახეობას აერთიანებს (Parte *et al.* 2018).

თავდაპირველად სახელი *Enterococcus* 1903 წელს ტიერელსინის და ჯოჰაუდიმიერის მიერ იქნა შემოთავაზებული, თუმცა 1984 წლამდე ისინი D ჯგუფის ფეკალურ სტრუქტოკოკებად განიხილებოდნენ (Stiles and Holzapfel 1997). ტრადიციული მეთოდები: ბიოტიპირება, სეროტიპირება და ფაგოტიპირება ღიად ტოვებდა კითხვებს ენტეროკოკების ფილოგენეტიკური კუთვნილების შესახებ (Saeedi *et al.* 2002). *Enterococcus*-ის ცალკეულ გვარად აღიარება მხოლოდ დნმ-ჰიბრიდიზაციის და 16S რ-რნმ მიმდევრობების ანალიზის შედეგად გახდა შესაძლებელი (Ludwig *et al.* 1984; Moreno *et al.* 2006).



სურათი 4. *Enterococcus* გვარის ფილოგენეტიკური პოზიციის მაჩვენებელი 16S რ-რნმ დენდროგრამა (Fisher and Phillips 2009).

XX საუკუნის შუა წლებამდე *Enterococcus* გვარის წარმომადგენლები ფართოდ გამოიყენებოდა კვებით ინდუსტრიაში როგორც: დედო კულტურები ან ბაქტერიოცინების წარმომქმნელი პრობიოტიკები, რომელთა ანტაგონისტური აქტივობის სპექტრი მოიცავდა - *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* და *Bacillus subtilis* შტამებს (Nami *et al.* 2019). ხმელთაშუა ზღვის ქვეყნებში *Enterococcus* spp. ახლაც გამოიყენება ზოგიერთი პროდუქტის დასამზადებლად (Eaton and Gasson 2001). თუმცა დღეს *Enterococcus* spp. გამოყენების და უსაფრთხოების საკითხები დებატების საგანია. 1970-იანი წლებიდან მოყოლებული *Enterococcus* spp.-ს მიერ გამოწვეული დაავადებების სიხშირემ მკვეთრად იმატა, შესაბამისად მათი საკვები პროდუქტების მიკრობულ შემადგენლობაში ჩართვა არამიზანშეწონილად მიიჩნევა. *Enterococcus* spp. ასოცირებული ენდოკარდიტის, საშარდე გზების ანთების და ნოზოკომიალური ინფექციების შემთხვევების მატებას მესამე თაობის ცეფალოსპორინების გამოყენების ინტენსივობის მატებას უკავშირებენ. ამ ანტიბიოტიკების მიმართ *Enterococcus* გვარის წარმომადგენლებს ბუნებრივი რეზისტენტობა ახასიათებთ (Moreno *et al.* 2006). ამასთან *Enterococcus* spp. ხშირი მუტაციების, პლაზმიდების და ტრანსპოზონების მიმოცვლის ხარჯზე ანტიბიოტიკორეზისტენტურობის გამომუშავების სწრაფი უნარი გააჩნიათ (Hanchi *et al.* 2018). შედეგად *Enterococcus* შტამებში სწრაფად მატულობს გლიკოპეპტიდური ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა. მაგალითად მსოფლიოს ჯანდაცვის ორგანიზაციის მიერ 2017 წელს გამოქვეყნებული საფრთხის შემცველი და პრობლემური ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიების გლობალური პრიორიტეტის სიაში, ვანკომიცინ-რეზისტენტური *Enterococcus (E.) faecium*-ი მაღალი რისკის მქონე პათოგენების კატეგორიაში მოათავსეს (Tacconelli *et al.* 2017).

დადგენილია, რომ *Enterococcus*-ის ვირულენტობის ფაქტორები ჰემოლიზის და კაფსულის ფორმირების (ჟელატინაზას პროდუქცია), ზედაპირული ცილების, ბიოფილმების ფორმირების და აგრეგაციული სუბსტანციების სინთეზის უნარს მოიცავს, რაც მათ პათოგენურობის მაღალ პოტენციალზე მიუთითებს (Lopes *et al.* 2005). საყურადღებოა, რომ დღემდე აღწერილი კლინიკური იზოლატების ანტიბიოტიკორეზისტენტულობის და ვირულენტური ფაქტორების სპექტრი

აღმატება საკვები პროდუქტებიდან გამოყოფილი შტამების მაჩვენებლებს (Graham and Rea 2020).

შესაბამისად *Enterococcus* გვარის წამომადგენლების ბიოტექნოლოგიური თუ პრობიოტიკური აგენტების სახით გამოყენება რისკის შემცველია. უტილიზაციამდე აუცილებელია სამიზნე კულტურის შტამ-სპეციფიკური იდენტიფიკაცია, გენომის ანალიზი და რელევანტური ანტიბიოტიკორეზისტენტობის (ამპიცილინი, ვანკომიცინი) და ვირულენტურობის ფაქტორების განმსაზღვრელი გენების (*IS16*, *hylEfm*, *esp gel*, *ace*, *as*, *efaA*, *hyl* და *cylA*) სკრინინგი და გამორიცხვა (Hanchi *et al.* 2018).

### 1.3. საქართველოში გავრცელებული რძემჟავა პროდუქტები

საქართველოში რძის პროდუქტების წარმოების მრავალსაუკუნოვანი ტრადიცია არსებობს. ფერმენტირებული პროდუქტების მრავალფეროვნება, რეგიონალური ნაირსახეობები და მათი დამზადების ტრადიციული ტექნოლოგიები საქართველოს არამატერიალური კულტურის ძეგლებად არის აღიარებული. ამგვარი ფაქტში კულტურულ-გეოგრაფიული მემკვიდრეობის დასაცავად, საქართველოს ინტელექტუალური საკუთრების სააგენტომ (საქპატენტი) ტრადიციული რძემჟავა პროდუქტი „საქართველოში რეგისტრირებული გეოგრაფიული აღნიშვნები“ კატეგორიის ქვეშ მოათავსა. ამ პროდუქტებისთვის განისაზღვრა დამზადების ადგილ-მდებარეობა, წესი, ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრები და ეტიკეტირების მოთხოვნები.

„საქართველოში რეგისტრირებული გეოგრაფიული აღნიშვნები“ მოიცავს 12 ყველის სახეობას: „ჩოგი“, „ტენილი“, „ქართული ყველი“, „აჭარული ჩლეჩილი“, „მესხური ჩეჩილი“, „მეგრული სულგუნი“, „სულგუნი“, „სვანური სულგუნი“, „კობი“, „გუდა“, „იმერული ყველი“, „დამბალხაჭო“ და ერთი იოგურტის ტიპის რძემჟავა პროდუქტს: „მაწონი“.

ქვემოთ მოცემულია აღნიშნული ყველების მოკლე დახასიათება და საქპატენტის ([www.sakpatenti.gov.ge](http://www.sakpatenti.gov.ge)) მიერ 2020 წლისთვის დადგენილი შეზღუდვები წარმოების არეალთან დაკავშირებით:

**ჩოგი** მზადდება ივლისსა და აგვისტოს თვეებში მოწველილი ცხვრის მაღალცხიმიანი რძისაგან, ახასიათებს კარაქის მაგვარი კონსისტენცია და მოყვითალო ფერი. იწარმოება მხოლოდ თუშეთის საზაფხულო საძოვრებიდან მიღებული რძიდან.

**ტენილი** მზადდება ცხვრისა და ძროხის მაღალცხიმოვანი რძისაგან, აქვს დაწნული წვრილი ძაფების ფორმა, იწარმოება მხოლოდ სამცხე-ჯავახეთის რეგიონში და ქვემო ქართლის რეგიონის დმანისის მუნიციპალიტეტში.

**ქართული ყველი** მზადდება ძროხის, ცხვრის, თხისა ან კამეჩის რძისაგან და/ან მათი ნარევისაგან. ნარევი რძის შემთხვევაში ძროხის რძის შემცველობა არ უნდა იყოს 50%-ზე ნაკლები. ეს არის ზომიერად მარილიანი, სუსტი მომჟავო, ოდნავ ცხარე, სასიამოვნო რძემჟავა გემოს მქონე ცილინდრის ფორმის ყველი. მის დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება და ყველის წარმოება ხორციელდება აღმოსავლეთ საქართველოში სამცხე-ჯავახეთის, შიდა ქართლის, მცხეთა მთიანეთის, ქვემო ქართლისა და კახეთის რეგიონების ტერიტორიაზე.

**აჭარული ჩლეჩილი** მზადდება ძროხის მოხდილი რძისაგან, ძირითადად ზაფხულის პერიოდში, აქვს მკვრივი, ძაფისებრი, დაჩლეჩილი ფორმა. დასამზადებლად საჭირო რძეს მიიღებენ, გადამუშავებენ და ყველი ამოჰყავთ აჭარის ავტონომიური რესპუბლიკის ტერიტორიაზე.

**მესხური ჩეჩილი** მზადდება ძროხის მოხდილი რძისაგან, ყველის მასა არის თეთრი ფერის, ძაფოვანი, შეკრული ან დაწნული ფორმის, ძაფები მკვრივია და საკმაოდ მყარი გაწელვისას. დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება და ყველის წარმოება ხორციელდება სამცხე-ჯავახეთის რეგიონის ტერიტორიაზე.

**სულგუნი** არის გადაზელილი ყველი რომელიც მზადდება ნედლი ან პასტერიზებული, მოუხდელი ან ნორმალიზებული ძროხის, კამეჩის ან თხის რძისაგან, ან მათი ნარევისაგან. იგი შეიძლება იყოს ჭყინტი, მშრალი, დავარგებული, შებოლილი. დაცული გეოგრაფიული აღნიშვნა „სულგუნი“ იწარმოება საქართველოს მთელ ტერიტორიაზე. დასამზადებლად გამოყენებული რძის წარმოშობის ქვეყანა უნდა იყოს საქართველო.

**მეგრული სულგუნის** დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება და ყველის წარმოება ხორციელდება სამეგრელოს რეგიონში, მარტვილის, სენაკის, აბაშის, ხობის, ზუგდიდის, წალენჯიხისა და ჩხოროწყუს მუნიციპალიტეტებში, ფოთის ადმინისტრაციულ ტერიტორიაზე, ასევე გალისა და ოჩამჩირის მუნიციპალიტეტების საზღვრებში.

**სვანური სულგუნის** დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება და ყველის წარმოება ხორციელდება სვანეთის რეგიონში მდებარე ლენტეხისა და მესტიის მუნიციპალიტეტებში, სადაც ნოყიერი და მრავალფეროვანი მცენარეული საფარია.

**კობი** არის ოდნავ გაწეული, ცილინდრის ფორმის ყველი. მზადდება ძროხის რძიდან ან ძროხის და ცხვრის რძის ნარევიდან. აქვს მარილწყლოვანი ყველისათვის დამახასიათებელი, პიკანტური, ოდნავ მოცხარო გემო. კობის დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება და ყველის წარმოება ხორციელდება სტეფანწმინდის მუნიციპალიტეტის ფარგლებში.

**გუდა** მზადდება ძროხისა და ცხვრის რძისაგან ან მათი ნარევისაგან. ნარევის შეიძლება დაემატოს თხის რძეც. ყველის მომწიფება ხორციელდება ცხვრის, თხის ან ხბოს ტყავისაგან დამზადებულ გუდაში (გაკრეჭილი ბეწვით შიგნითა მხრიდან). გუდას დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება და ყველის წარმოება ხორციელდება აღმოსავლეთ საქართველოს კახეთის, ქვემო ქართლის, სამცხე-ჯავახეთისა და მცხეთა-მთიანეთის რეგიონებში.

**იმერული ყველი** მზადდება ძროხის რძისაგან, რომელსაც შესაძლებელია 20%-მდე შეერიოს კამეჩის ან თხის რძე. ახასიათებს სუფთა რძემჟავური სუნის და გემო, ოდნავ რბილი, ელასტიკური, მომრგვალებულკიდეებიანი ფორმით. იმერული ყველის დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება და ყველის წარმოება ხორციელდება იმერეთის რეგიონში. მიუხედავად ამისა, 2021 წლის 1 იანვრამდე დასაშვებია დასახელება "იმერული ყველი" ეწოდოს საქართველოს სხვა რეგიონებში მსგავსი მეთოდით ნაწარმოებ ყველსაც. 2021 წლის 1 იანვრიდან იმერეთის რეგიონის ფარგლებს გარეთ წარმოებულ ყველს შეიძლება ეწოდოს მხოლოდ "ახალი ყველი" ან/და "ჭყინტი ყველი" ან რაიმე სხვა სახელი.

**დამბალხაჭო** მზადდება ძროხის რძის დოსგან. აქვს დაბალი კონუსური ან ოვალური, თხელი კვერის ფორმა. კონსისტენცია ოდნავ რბილი, ერთგვაროვანი, გლესვადი. სუნი და გემო გამოხატულად სპეციფიკური, პიკანტური, მოცხარო. ფერი - რუხი მოყავისფრო, ობის მოლურჯო კვალით, შიგნით ოდნავ მოყვითალო თეთრი. დამბალხაჭოსათვის საჭირო დოს მოგროვება და ყველის დამზადება ხდება მცხეთა-მთიანეთის რეგიონში მდებარე ფშავისა და თიანეთის მხარეებში.

### 1.3.1. მაწონი

მაწონი კავკასიური რძემჟავა პროდუქტია, რომელიც თავისი ორგანოლეპტიკური თვისებებით სამხრეთული ტიპის შერეული დუღილის რძემჟავა პროდუქტებს მიეკუთვნება. საუკუნეების განმავლობაში მაწვნის მეტნაკლებად მდგრადი მიკრობიოტა ჩამოყალიბდა, რომელიც გადადედების მეშვეობით ნარჩუნდება. 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. მაგალითად კამეჩის მაწონიდან შრატი ნაკლები რაოდენობით გამოიყოფა, ვიდრე ძროხის რძიდან დამზადებული ანალოგიური პროდუქტიდან. საქართველოს კუთხეებში მაწონი სხვადასხვა სახელწოდებით მოიხსენიება: ქიზიყში მაწონს წველას ეძახიან, სვანეთში და სამეგრელოში - მარწვენ, საინგილოში - წოლას, რომელსაც ცხვრის მაწვნის გადაწურვით ამზადებდნენ და ცხვრის გუდაში ათავსებდნენ.

საქპატენტის განსაზღვრების თანახმად (2012) მაწონი „ქართული ტრადიციული რძემჟავა პროდუქტია, რომელიც ძროხის, კამეჩის, თხის და იშვიათად, ცხვრის რძისაგან, ან მათი ნარევისაგან მიიღება. რძის რძემჟავურ დუღილს წარმართავს საქართველოს ტერიტორიულ სივრცეში გამოყოფილი, ადგილობრივი რძემჟავა ბაქტერიების შტამებისაგან შემდგარი დედო“, რის შედეგადაც მიიღება „თეთრი შეფერილობის, თანაბრად მკვრივი კონსისტენციის ნაღედი (დასაშვებია მცირე რაოდენობით შრატის გამონაყოფი). იგი ხასიათდება სპეციფიკური, სასიამოვნო რძემჟავა გემოთი და სურნელით. ძროხის, თხისა და ცხვრის "მაწვნის" მჟავიანობაა 80-105°T, ხოლო კამეჩის - 120-150°T“.

საქპატენტის თანახმად მაწვნის დასამზადებლად საჭირო რძის მიღება, გადამუშავება, რძემჟავური დუღილის წარმართვა და მაწვნის წარმოება ხორციელდება საქართველოს მთელ ტერიტორიაზე. რძემჟავური დუღილისათვის გამოიყენება მხოლოდ ადგილობრივი რძემჟავა ბაქტერიების შტამებისაგან შემდგარი დედო.

მაწვნის დამზადების ტრადიციული წესი ბარბარე ჯორჯაძის 1874 წლის „ქართული სამზარეულო“-ში შემდეგნაირად არის აღწერილი: „რძე რომ აადულოთ, ისე გააგრილეთ, რომ ნეკს არა სწვაგდეს, ჩაასხით ქილაში; ერთი ჩაის კოვზი მაწონი გახსენით რძეში და ჩაასხით ამ ქილაში, თბილად შეახვიეთ და დადგით. ზაფხულში დედა ცოტა უნდა უყოთ ვინემ ზამთარში, შეხვევაც ზამთარში უფრო თბილად უნდა, ვიდრე ზაფხულში“. ამგვარ „მინაურულ“ მეთოდებზე დაფუძნებით საქპატენტის მიერ შემუშავდა მაწვნის დამზადების სტანდარტიზირებული საწარმოო მეთოდოლოგიის სტანდარტი:

„მაწვნის“ დასამზადებლად განკუთვნილი რძის მჟავიანობა არ უნდა იყოს  $19^{\circ}\text{T}$ -ზე მეტი, ხოლო სიმკვრივე  $1,030$ -ზე ნაკლები, ხოლო კამეჩის რძის შემთხვევაში –  $25^{\circ}\text{T}$ -ზე მეტი, სიმკვრივე –  $1,035$ -ზე ნაკლები. პასტერიზებულ რძეს ადედებენ  $41-45^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე. შესადეებლად გამოიყენება რძემჟავა ბაქტერიების დედო, რომელიც შედგება თერმოფილური და მეზოფილური სტრეპტოკოკებისა და თერმოფილური მაწვნის ჩხირებისაგან. დედოდ შეიძლება 1 ან 2 დღის მაწვნის გამოყენება. შედედება ხორციელდება  $41-45^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე 3-4 საათის განმავლობაში. სასურველი მჟავიანობის ( $70-75^{\circ}\text{T}$ ) მიღწევის შემდგომ "მაწონი" გადააქვთ გასაცივებლად  $4-6^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე და აყოვნებენ მოსამწიფებლად  $12-20$  საათის განმავლობაში, რის შემდგომაც "მაწონი" მზადაა რეალიზაციისათვის“.

მოცემული მეთოდოლოგიიდან გამომდინარე, მაწვნის დედო შესაძლოა შეიცავდეს მხოლოდ თერმოფილურ სტარტერულ კულტურებს, როგორცაა *St. thermophilus* და *Lactobacillus spp.*, რადგან როგორც ცნობილია *Lactococcus*-ის გვარის წარმომადგენლების ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა  $30^{\circ}\text{C}$ -ია.

### 1.3.2. მაწვნის კვლევის მიმოხილვა

მაწვნის შესწავლა 1930-იან წლებში დაიწყო, როდესაც დემურიშვილმა მაწვნის სინჯებში საფუვრებთან ერთად ბაქტერიების ჩხირისებრი და კოკოვანი ფორმები დააფიქსირა (Demurishvili 1930). შემდგომ კვლევებში მაწვნის დომინანტურ კულტურებად *Thermobacterium bulgaricum* (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) და *St. thermophilus*-ი დასახელდა. ჯანდიერმა და სხირტლაძემ აჩვენეს, რომ მაწონში საფუვრის კულტურების განვითარება ამ პროდუქტისთვის არატიპური, ეთერული გემოს გამოვლინებას იწვევს, ამიტომ დღესაც საფუვრები მაწონში არასასურველ



მიკრობიოტად, კონტამინანტებად მიიჩნევა (Jandieri and Skhirtladze 1935). მომდევნო კვლევები ამ შედეგებთან თანხმობაში იყო, ამიტომ მაწონს კლასიკური ბულგარული იოგურტის ნაირსახეობად მიიჩნევენ (Gogoberidze 1971; Omsadze *et al.* 1977).

გვიანდელ XX საუკუნეში, მოლეკულურ მეთოდოლოგიებზე დაფუძნებულმა კვლევებმა, მაწვნის მიკრობიოტის მრავალფეროვნების უკეთესი აღწერის და ანალიზის საშუალება მოგვცა. პირველი ფართომასშტაბიანი კვლევის ფარგლებში 2001 წელს ჭანიშვილის და კოლეგების მიერ 13 სხვადასხვა ლოკაციიდან შეგროვებულ იქნა ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის 20 სინჯი. გამოყოფილი შტამები ინდეტიფიცირებული იქნა სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ის და 16-23S რ-რნმ ინტერგენული ლოკუსების თანმიმდევრობის ანალიზის (სექვენირების) მეშვეობით. ანალიზმა მაწვნის სინჯებში *Lb. delbruekii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *St. thermophiles*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *E. durans*, *Saccharomyces cerevisiae* და *Candida lucitania* სახეობები გამოავლინა. დაფიქსირდა სინჯთაშორისი სახეობრივი მრავალფეროვნების მაღალი დონე. მაწვნის მიკრობიოტის კომპოზიცია ვარირებდა 5-დან-9 კომპონენტამდე, სადაც *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* და *St. thermophilus* დომინანტური კულტურებად დაფიქსირდნენ. ასევე გამოვლინდა *Enterococcus* spp. მაღალი სიხშირე, თუმცა მათი ფუნქციონალური მახასიათებლების შესწავლა არ განხორციელებულა (Chanishvili *et al.* 2001). შემდგომი კვლევებისთვის ბრუსეტის და კოლეგების მიერ 24 სხვადასხვა ლოკაციაში 40 მაწვნის სინჯი იქნა შეგროვებული, იზოლატების იდენტიფიკაცია 16S რ-რნმ სექვენირების, *lacZ* გენის პჯრ-ის, განმეორებადი პალინდრომული ელემენტების ფლურესცენტური პჯრ -ის (F-Rep-PCR) და ნატრიუმის დოდეცილ სულფატის პოლიაკრილამიდური გელის ელექტროფორეზის (SDS-PAGE) მეთოდების გამოყენებით განხორციელდა. იდენტიფიცირებული იქნა *Lb. delbruekii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus* და *E. durans* სახეობები. ნაჩვენები იქნა, რომ მაწვნიდან გამოყოფილ *E. durans*-ის შტამებს ახასიათებთ ბიოგენური ამინის - თირამინის აქტიური სინთეზის უნარი და სუსტი აციდოფიკაციის და პროტეოლიზური აქტივობა, რაც მათ უარყოფით თვისებებზე მიუთითებს (Brusetti *et al.* 2008). ამავდროულად უჩიდას და კოლეგების მიერ შესწავლილი იქნა 6 სხვადასხვა ლოკაციაში მოპოვებული 26 მაწვნის სინჯი, სადაც შტამების იზოლაცია ზრდის ტემპერატურულ ტესტთან (15-45°C) პარალელურად

განხორცილდა. მეზოფილური და თერმოფილური კულტურების გამოსავლენად შემუშავებულ ოპტიმალურ ტემპერატურულ ზღვრებში მიღებული კულტურების 16S რ-რნმ იდენტიფიკაციის შედეგად, მხოლოდ: *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და *Lb. helveticus* სახეობები გამოვლინდა (Uchida *et al.* 2007). მოცემულ შედეგებს ეთანხმება იმავე პერიოდში მორეას მიერ ჩატარებული კვლევა, სადაც მაწვნის დომინანტურ მიკრობიოტად *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *St. thermophilus* და *Lb. helveticus* შტამები, ხოლო იშვიათ იზოლატებად *Lb. paracasei*, *Le. Lactis* და *L. raffinolactis* სახეობები დაფიქსირდა (Morea 2008). მოცემულ კვლევაში შტამების იდენტიფიკაციისთვის გამოყენებული იქნა სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ი, 16S რ-რნმ იდენტიფიკაცია და შემთხვევითად ამპლიფიცირებული პოლიმორფული დნმ პჯრ (RAPD-PCR). მოცემული მეთოდების ნაკრები ასევე გამოყენებულ იქნა ქუეროს და კოლეგების მიერ მცირე ზომის მეურნეობებიდან მიღებული 16 მაწვნის სინჯის ანალიზისას. სინჯებში რძემჟავა ბაქტერიების საერთო რაოდენობა  $10^5$ - $10^8$  კვ/მლ შეადგენდა, სადაც დომინანტურ სახეობებად კვლავაც *St. thermophilus* და *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* განისაზღვრა, *Lb. helveticus*, *Lb. paracasei* და *Le. Lactis* კი მეორეულ მიკრობიოტას მიაკუთვნეს (Quero *et al.* 2014). 2015 წელს გამოქვეყნებულ კვლევაში აღწერილია კულტურა-დამოუკიდებელი მეთოდით, მეტაგენომური ანალიზის საფუძველზე შესწავლილ კავკასიის რეგიონში გავრცელებული ტრადიციული იოგურტის ტიპის ფერმენტირებული რძის პროდუქტები, მათ შორის 44 მაწვნის სინჯი საქართველოს 30 სხვადასხვა წერტილიდან (10 - ძროხის რძის, 10 - კამეჩის რძის, 16 - თხის რძის და 8 ცხვრის რძის მაწვნის სინჯები) შეგროვდა. 16S რ-რნმ მარკერ-გენების სკრინინგის საფუძველზე განისაზღვრა მაწვნის ბუნებრივ სინჯებში არსებული ბაქტერიული გვარები. სინჯების უმრავლესობაში *Lactobacillus* და *Streptococcus* გვარები დომინირებდა (>80% კომბინირებული ფარდობითი სიხშირე), *Lactococcus* და *Enterococcus* მცირე პოპულაციებით. ასევე გამოიკვეთა სინჯებში *Pseudomonas*, *Rummeliibacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Erwinia*, *Wautersiell* და *Yersinia* გვარების დაბალი სიხშირით არსებობა (Bokulich *et al.* 2015).

კვლევის დასახელება	გამოქვეყნების წელი	ცნობარი
Кислое молоко мацони	1930	Демуришвили М. "Кислое молоко мацони". <i>Молочное хозяйство</i> М. (1930): 2-3
Микрофлора мацони, роль и взаимоотношение микроорганизмов	1935	Джаңдиери, Е., and М. Схиртладзе. "Микрофлора мацони, роль и взаимоотношение микроорганизмов." <i>Тр. Зап. КНИИЖ</i> 6 (1935): 333-365.
изучение симбиотической закваски мацони	1971	Гогоберидзе Р. "Изучение симбиотической закваски мацони". <i>Молочное дело</i> no.3 (1971): 16-20
Приготовление симбиотической закваски мацони для приготовления этого продукта	1977	Омсадзе Р.Н., Демуришвили Л.И., Манцжвидзе Н.П., and Е.Г. Едиберидзе. "Приготовление симбиотической закваски мацони для приготовления этого продукта". <i>III конференция по микробиологии и вирусологии.</i> (1977): 980-81.
Identification of the lactic acid bacterial cultures isolated from the samples of the Caucasian Matsoni	2001	Merabishvili, M. "Identification of the lactic acid bacterial cultures isolated from the samples of the Caucasian Matsoni." <i>Proceedings of the Georgian Academy of Sciences</i> 27 (2001): 91-95.
The Caucasian product Matsoni: its bacterial composition and properties	2001	Chanishvili, N., M. Merabishvili, K. Porchkhidze, and G. Natroshvili. "The Caucasian product Matsoni: its bacterial composition and properties." <i>Bull. Georgian Acad. Sci</i> 163 (2001).
Major microbiota of lactic acid bacteria form Matsoni, a traditional Georgian fermented milk	2007	Uchida, Kenji, Tadasu Urashima, Nino Chanishvili, Ikita Arai, and Hidemasa Motoshima. "Major microbiota of lactic acid bacteria from Matsoni, a traditional Georgian fermented milk." <i>Animal science journal</i> 78, no. 1 (2007): 85-91.
Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography	2008	Brusetti, Lorenzo, Iana Malkhazova, Maher Gtari, Isabella Tamagnini, Sara Borin, Maya Merabishvili, Nina Chanishvili, Diego Mora, Francesca Cappitelli, and Daniele Daffonchio. "Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography." <i>BMC microbiology</i> 8, no. 1 (2008): 220.
Searching for functional beverages produced in Eastern European Countries	2008	Morea, Maria. "Searching for functional beverages produced in Eastern European Countries." <i>Journal of Nutrition &amp; Food Sciences</i> 37 (2008): 33-44.
Microbiological, physico-chemical, nutritional and sensory characterization of traditional Matsoni: Selection and use of autochthonous multiple strain cultures to extend its shelf-life	2014	Quero, Grazia Marina, Vincenzina Fusco, Pier Sandro Cocconcilli, Lubomila Owczarek, Mehlika Borcakli, Cecilia Fontana, Sylvia Skapska, Urszula T. Jasinska, Tarik Ozturk, and Maria Morea. "Microbiological, physico-chemical, nutritional and sensory characterization of traditional Matsoni: Selection and use of autochthonous multiple strain cultures to extend its shelf-life." <i>Food microbiology</i> 38 (2014): 179-191.
Microbial biogeography of the transnational fermented milk Matsoni	2015	Bokulich, Nicholas A., Lia Amiranashvili, Karine Chitchyan, Narine Ghazanchyan, Karen Darbinyan, Nino Gagelidze, Tinatin Sadunishvili et al. "Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni." <i>Food microbiology</i> 50 (2015): 12-19.

ცხრილი 1. მაწვნის მიკრობიოტასთან დაკავშირებული კვლევების ქრონოლოგიური ჩამონათვალი.

#### 1.4. რძემჟავა ბაქტერიების ბიოტექნოლოგიური მახასიათებლები

ადამიანის მიერ შექმნილ ახალ და სპეციფიკურ ნიშებში, მაგალითად ყველებში, იოგურტის ტიპის პროდუქტებში, მწნილებში და სხვა ფერმენტირებულ საკვებ პროდუქტებში განსხვავებული მიკრობული მრავალფეროვნება წარმოიქმნა. ამგვარ გარემოში მრავალ რძემჟავა ბაქტერიას, მათ შორის *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* გვარების წარმომადგენლებს სწრაფი ადაპტაციის და დივერსიფიკაციის საშუალება მიეცათ. ფერმენტირებული პროდუქტების

კონტროლირებად გარემოში რძემჟავა ბაქტერიების მეტაბოლური მოთხოვნილებები რეგულარული და პროგნოზირებადი გახდა, ფსევდოგენიზაციის, ინტერსპეციფიკური ჰიბრიდიზაციის, გენების დუბლიკაციის და ჰორიზონტალური გადაცემის საშუალებით შტამების სწრაფი გენომური სპეციალიზაცია მიმდინარეობდა, რის შედეგადაც დომესტიფიცირებულ შტამებს გაძლიერებული ფერმენტაციული შესაძლებლობები, მოცემული ნუტრიენტების ეფექტური გამოყენების, ინდუსტრიული სტრეს-ფაქტორების მიმართ მაღალი გამძლეობის გამოუმუშავდათ (Gallone *et al.* 2018). ამგვარი ადაპტაციების მაგალითებია: *Lb. sakei* სტარტერული შტამები, რომელთაც ცვალებადი ჟანგვა-აღდგენის პოტენციალის და ოქსიდაციური სტრესის მიმართ მაღალი გამძლეობა აქვთ. ან *Lb. bulgaricus*, რომელმაც დაკარგა ამინომჟავების ბიოსინთეზის და მცენარეული შაქრების უტილიზაციის უნარი და *L. lactis* მსგავსად შეიძინა კაზეინის დაშლის უნარი (Van de Guchte *et al.* 2006). საწარმოო პროცესისთვის ამგვარი შტამების მოპოვება, მათი ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის განსაზღვრა და ოპტიმიზაცია კვების ინდუსტრიის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი გამოწვევაა.

რძის ფერმენტირებული პროდუქტების წარმოებისთვის დედო კულტურები შეირჩევა შემდეგი მახასიათებლების გათვალისწინებით: რძის სწრაფი აციდოფიკაციის უნარი, ფაგორეზისტენტობა და არალიზოგენურობა, პროტეოლიზური აქტივობა, ეგზოპოლისაქარიდების წარმოქმნის უნარი, ბაქტერიოცინების წარმოქმნის უნარი, უარყოფითი ურეაზული აქტივობა, გალაქტოზის ფერმენტაციის უნარი, ანტაგონისტური აქტივობა, სტრესისადმი მაღალი გამძლეობა და ა.შ. ამგვარი კრიტერიუმების მქონე შტამები მაღალი ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის მქონე კულტურებად განიხილება (Leroy and Vuyst 2004).

**რძის აციდოფიკაცია.** შტამის მიერ რძის დამჟავების სიჩქარე (ლაქტოზის გლიკოლიზის შედეგად რძემჟავის იზომერების მიღება) ფერმენტირებული რძის პროდუქტების ინდუსტრიული წარმოების ერთ-ერთი მთავარი კრიტერიუმია. პროცესის დასაწყებად ხშირად *St. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* და *L. lactis* კულტურები გამოიყენება (Kilara and Shahani 1976). მჟავიანობის მატებასთან ერთად, იზოთერმული წერტილის (pH-4.6) მიღწევას კაზეინი კარგავს სტაბილურობას და კოაგულირდება.

წყალბადური ბმების მეშვეობით კაზეინის მიცელიალური ბოჭკოების ქსელში შრატის დენატურირებული ცილების ფიქსაცია ხდება და იქმნება რძის კოლტი. წარმოქმნილი ნადედის სტრუქტურა დამოკიდებულია რძის ტიპსა და ხარისხზე, რძის წინასწარი თერმული დამუშავების პირობებზე და გამოყენებულ სტარტერულ კულტურებზე (Damin *et al.* 2009). ინდუსტრიულ ფერმენტაციულ პროცესებში, რძის აციდოფიკაციის სიჩქარე *St. thermophilus*-ის უმთავრესი ტექნოლოგიური მახასიათებელია. დადგენილია, რომ ამ სახეობაში რძის აციდოფიკაციის მთავარი დეტერმინანტი უჯრედის კედლის პროტეინაზა (PrtS)-წარმოადგენს. PrtS ფერმენტი მჭიდროდ არის დაკავშირებული უჯრედის კედელთან და იწვევს რძის კაზეინის დაშლას მცირე ზომის ოლიგოპეპტიდებად. PrtS არსებობა არარსებობა *St. thermophilus*-ის შტამებს ორ ფენოტიპურ ჯგუფად: სწრაფი და ნელი აციდოფიკაციის უნარის მქონე კულტურებად ყოფს (Dandoy *et al.* 2011).

**პროტეოლიზური აქტივობა.** რძემჟავა ბაქტერიებს რიგი ამინომჟავების სინთეზის უნარი არ გააჩნიათ. ამის კომპენსირება აქტიური პროტეოლიზური სისტემებით ხდება. რძის მეტაბოლიზმისას პროტეოლიზური სისტემა კაზეინის დაშლის გზით უჯრედს უზრუნველყოფს აუცილებელი ამინომჟავებით, განაპირობებს შტამების სწრაფ გამრავლებას და რძის დამჟავების სიჩქარის ზრდას. პროდუქტის წამოებისას დედო კულტურის პროტეოლიზური აქტივობა გავლენას ახდენს პროდუქტის ორგანოლეპტიკური მახასიათებლების ჩამოყალიბებაზე (Savijoki *et al.* 2006). კაზეინის დაშლა უჯრედის კედლის პროტეინაზების მეშვეობით იწყება, წარმოქმნილი ოლიგოპეპტიდები შედის უჯრედში, სადაც ჰიდროლიზი შიდაუჯრედული პეპტიდაზების მეშვეობით გრძელდება. როგორც წესი რძემჟავა ბაქტერიებს მხოლოდ ერთი უჯრედის კედლის პროტეინის მაკოდირებელი გენი გააჩნიათ, თუმცა ზოგიერთ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ს შტამში ორი ან მეტი მაკოდირებელი გენია აღმოჩენილი, რაც ამ სახეობის მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის მაჩვენებელია (Christensen *et al.* 1999).

**ვისკოზურობა.** იოგურტის ტიპის ნაწარმში, რძემჟავური დუღილის შედეგად მიღებული ნადედის კოლტის სიმკვრივე (ნადედის ვისკოზურობა) მნიშვნელოვანი ორგანოლეპტიკური მახასიათებელია. რძის ფიზიკო-ქიმიურ მახასიათებლებთან ერთად კოლტის სტრუქტურას დედო-კულტურის მიერ წარმოქმნილი

ეგზოპოლისაქარიდები (ეპს) განსაზღვრავს. კაზეინის მიცელიუმის ქსელთან ჯვარედინი კავშირის დამყარებით ეგზოპოლისაქარიდები ამცირებენ სინერეზის წამოქმნის ალბათობას და მკვეთრად ზრდიან პროდუქტის ვისკოზურობას (Li *et al.* 2012).

რძემჟავა ბაქტერიებს და განსაკუთრებით *St. thermophilus*-ს ეპს-ის ფართო სპექტრის წარმოქმნის უნარი გააჩნიათ. ეგზოპოლისაქარიდებს უჯრედისთვის უმეტესად დამცავი ფუნქციები აქვს, აფერხებს რა ბაქტერიის კედელზე ბაქტერიოფაგების ადსორბციას, ასევე აუმჯობესებს უჯრედის ადჰეზიის უნარს. კულტურის მიერ ეპს-ის წარმოქმნის უნარი განისაზღვრება შტამის ფენოტიპით და კულტივაციის პირობებით. ბაქტერიული კულტურის საკვებ არეში ნახშირწყლების მაღალი კონცენტრაციები ხელს უწყობს შტამის მიერ წარმოქმნილი ეპს-ის რაოდენობის ზრდას. თუმცა საკვები არის შაქრებით გამდიდრება შტამ-სპეციფიურ ეფექტს იძლევა, ამიტომ ეპს-ის მოსავლიანობის გასაზრდელად, საკვები არის ნახშირწყლების და შაქრების შემადგენლობა ყოველი შტამისთვის ინდივიდუალურად უნდა იქნას განსაზღვრული (Ruas-Madiedo 2005).

**ანტაგონიზმი.** ფერმენტაციის პროცესში გამოყენებული დედო-კულტურების ნაკრები აუცილებლად ერთმანეთის მიმართ კომპლემენტარული უნდა იყოს. შტამებს შორის ანტაგონისტურმა აქტივობამ შესაძლოა ფერმენტაციის პროცესი დათრგუნოს. მაგალითად იოგურტის ფერმენტაციისას *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და *St. thermophilus* ტრადიციულად კომბინაციაში გამოიყენება, სადაც *St. thermophilus* მიერ წამოქმნილი ფორმიატი ასტიმულირებს *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ზრდას, რომელიც თავისმხრივ წარმოქმნის თავისუფალ ამინომჟავებს და პეპტიდებს და ხელს უწყობს *St. thermophilus* ზრდას. შედეგად მათ შორის არსებული სინერგეტიკული ურთიერთქმედება ამცირებს პროდუქტის ფერმენტაციისთვის საჭირო დროს.

მეორეს მხრივ სტარტერული კულტურების უნარი დათრგუნონ გარემოში არსებული არასასურველი მიკრობიოტა, წარმოებისთვის მეტად ღირებული მახასიათებელია. რძემჟავა ბაქტერიებს მრავალი სხვადასხვა ანტაგონისტური ნაერთის წარმოქმნის უნარი გააჩნიათ, მათ შორისაა: რიბოსომულად სინთეზირებული ანტიმიკრობული პეპტიდები ანუ ე.წ. ბაქტერიოცინები, ბენზონური მჟავა, ბიოგენური ამინები, მაღალი კონცენტრაციის რძემჟავა და წყალბადის ზეჟანგი. მათ შორის

ბაქტერიოცინებს ანტიბიოტიკების მგავსი მოქმედება აქვთ, ამიტომ ბაქტერიოცინების წარმომქმნელ კულტურებს დიდი ბიოტექნოლოგიური და სანიტარული მნიშვნელობა ენიჭება. მაგალითად, A ტიპის ლანტიბიოტიკი, რომელსაც *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* წამოქმნის ფართოდ გამოიყენება ბუნებრივი კონსერვანტის სახით (Hansen and Sandine 1994).

**ურეაზული აქტივობა.** ურეაზული აქტივობა *St. thermophilus* სტარტერული კულტურებისთვის ერთ-ერთი არასასურველი მახასიათებელია. ურეას (რომელიც რძეში საშუალოდ 0.2-0.4 გ/ლ კონცენტრაციით გვხვდება) ფერმენტული ჰიდროლიზი არა მარტო მნიშვნელოვნად ანელებს რძის აციდოფიკაციის პროცესს, არამედ ასევე ხელს უწყობს საბოლოო პროდუქტში  $\text{NH}_3$  დაგროვებას (Mora *et al.* 2002).

**გალაქტოზას ფერმენტაცია.** თუ ინდუსტრიული ფერმენტაციის პროცესებში ჩართულ სტარტერულ კულტურას არ აქვთ გალაქტოზას ფერმენტაციის უნარი, ლაქტოზის მონოსაქარიდებად დაშლის შემდეგ ხდება მხოლოდ გლუკოზის გლიკოლიზი, რაც განაპირობებს საბოლოო პროდუქტში გალაქტოზას აკუმულაციას. იოგურტის ტიპის პროდუქტებში გალაქტოზას მაღალმა კონცენტრაციამ შესაძლოა ხელი შეუწყოს პროდუქტში არასასურველი მიკრობიოტის სწრაფ განითარებას (Hickey *et al.* 1986).

## 1.5. რძემჟავა ბაქტერიების პრობიოტიკური მახასიათებლები

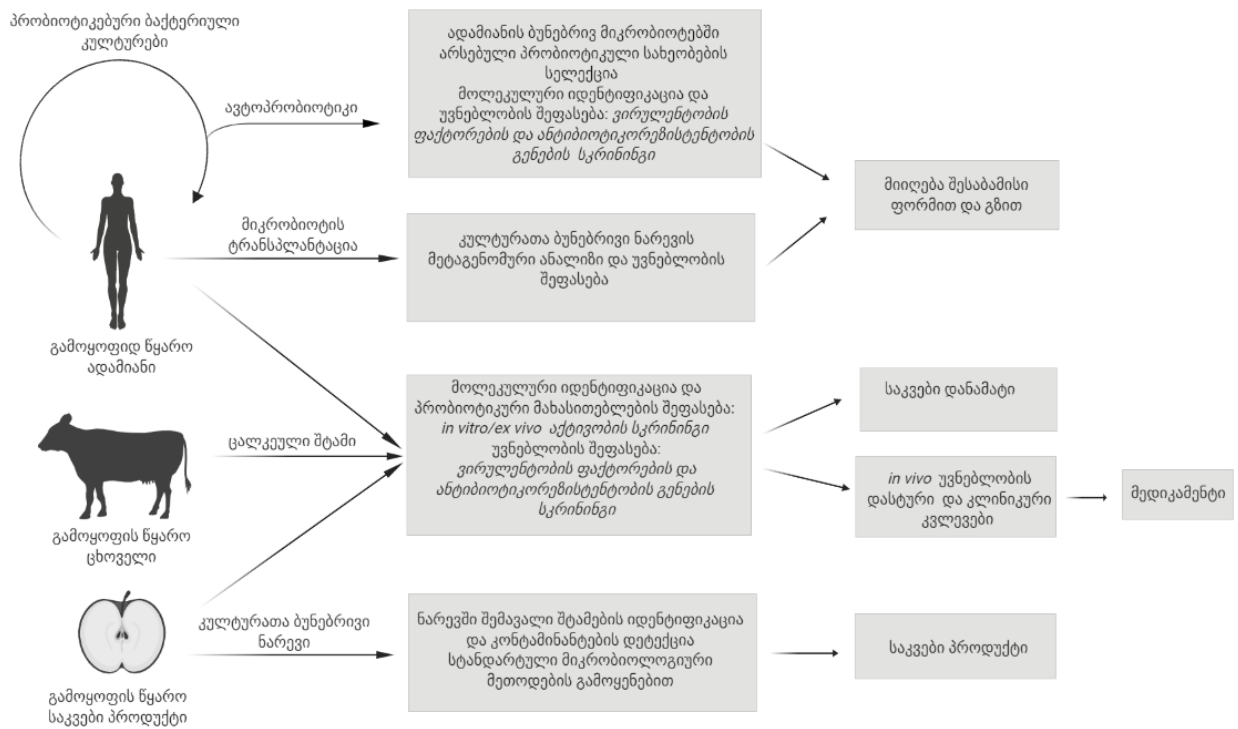
ცოცხალი მიკროორგანიზმების გამოყენებით დაავადებათა პრევენციის და მკურნალობის იდეა XX საუკუნის დასაწყისში გაჩნდა. 1907 წელს გამოქვეყნებულ მონოგრაფიაში „სიცოცხლის გახანგრძლივება“ ილია მეჩნიკოვი პირველად აღწერს რძემჟავა ბაქტერიების ჯანმრთელობისთვის სასარგებლო თვისებებს და ცოცხალი რძემჟავა მიკრობების შემცველი საკვები პროდუქტების დადებით ეფექტს კუჭ-ნაწლავის სისტემის ნორმალიზაციაზე (Metchnikoff 2004). თავად ტერმინი „პრობიოტიკი“ მოგვიანებით, 1953 წელს ვერნერ კოლაზის მიერ იქნა შემოთავაზებული და აღწერდა ჯანმრთელობისთვის სასარგებლო არაორგანულ და ორგანულ ნაერთებს (Hamilton-Miller *et al.* 2003). პრობიოტიკური ანუ სასარგებლო ბაქტერიების კონცეფციის განვითარებასთან ერთად *Lactobacillus* და *Bifidobacterium* გვარის წარმომადგენელი კულტურები მზარდ პოპულარულობას იძენდა, ხშირ შემთხვევაში არარელევანტური და მცდარი განაცხადების საფუძველზე, რამაც

პრობიოტიკური პროდუქტების სახელზე უარყოფითი ზეგავლენა იქონია (Reid 2016). მხოლოდ 2001 წელს, მსოფლიოს ჯანდაცვის ორგანიზაციის და გაეროს სურსათის და სოფლის მეურნეობის ორგანიზაციის (WHO/FAO) მიერ, შემოთავაზებულ იქნა პრობიოტიკების ზუსტი დეფინიცია, სადაც პრობიოტიკური კულტურები განისაზღვრა როგორც „ცოცხალი მიკროორგანიზმები, რომელთა ადეკვატური რაოდენობით მიღებისას, ჯანმრთელობისთვის სასარგებლო ეფექტი მიიღწევა“ (Hotel and Cordoba 2001).

დღეს რძემჟავა ბაქტერიების შემცველი პრობიოტიკური კომპოზიციები და ავტოპრობიოტიკები (როდესაც შტამების გამოყოფის წყარო და რეციპიენტი ერთი და იგივე ორგანიზმია), გაღიზიანებული ნაწლავის სინდრომის, ანტიბიოტიკოთერაპიასთან ასოცირებული დიზბაქტერიოზების, კუჭ-ნაწლავის სისტემის და ვაგინალური დიზბიოზების მკურნალობასა და პრევენციაში გამოიყენება. ბაზარზე არსებული ერთ თუ მრავალკომპონენტური პრობიოტიკური კომპოზიციების შემადგენლობაში უმეტეს წილად *Lactobacillus*-ის გვარს წარმომადგენლები შედის, მათ შორის ყველაზე გავრცელებული: *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* და *Lb. salivarius* სახეობებია (Suvorov 2013).

პრობიოტიკური რძემჟავა ბაქტერიების პირველწყარო შესაძლოა ადამიანის მიკრობიოტები, ცხოველური, მცენარეული რესურსები ან ფერმენტირებული საკვები პროდუქტი იყოს. მათი გამოყენების მეთოდი და ფორმები ასევე მრავალგვარია, იწარმოება როგორც საკვები პროდუქტები, მედიკამენტები, საკვები დანამატები და ა.შ (Sanders 2016). მათი წარმოების და რეალიზაციის ნორმატივები სოფლის მეურნეობის, ვეტერინარიის, საკვები პროდუქტების წარმოებისა და ჯანდაცვის სფეროში განისაზღვრება ქვეყნის შესაბამისი ნაციონალური მარეგულირებელი აპარატის მიერ.





სურათი 5. პრობიოტიკური კულტურების შესაძლო პირველწყაროების, ტიპების, იდენტიფიკაციის, დახასიათების მეთოდოლოგიებისა და მიწოდების ფორმების სქემატური გამოსახულება.

რძემჟავა ბაქტერიების პრობიოტიკურ ეფექტს შტამების სპეციფიკური მახასიათებლები განსაზღვრავს. ამ მახასიათებლებზე დაყრდნობით გამოყოფენ მოქმედების რამდენიმე მექანიზმს:

- *მიკრობიოტაზე მიმართული მექანიზმები*, სადაც პრობიოტიკური ეფექტი მიიღწევა შტამების ფართო ანტიმიკრობული აქტივობით, სპეციფიკური ანტაგონიზმით, სწრაფი კოლონიზაციის უნარით და ბუნებრივი მიკრობიოტის კომპოზიციის მოდულაციითა და აღდგენით (Marco *et al.* 2010).
- *ეპითელიუმის ბარიერთან ინტერაქცია*, ეპითელიუმის გამტარიანობის შემცირების, უჯრედებს შორის ფუნქციონირების გაძლიერების და უჯრედების პროლიფერაციის სტიმულაციის ხარჯზე (Karczewski *et al.* 2010).
- *იმუნური სისტემის მოდულაცია*, თანდაყოლილი და შეძენილ იმუნიტეტთან ძირითადად მონოციტებთან, მაკროფაგებთან, M-უჯრედებთან და დენდრიტულ უჯრედებთან ინტერაქციით (Lebeer *et al.* 2010).

- *სისტემური მეტაბოლური პასუხის მოდულაცია*, დაკავშირებულია ნაღველის მარილების ჰიდროლიზთან, რომელიც გავლენას ახდენს ლეპტინის და ენდოკრინულ მოდულაციაზე (Begley et al. 2006).
- *სიგნალინგი ცენტრალური ნერვული სისტემის მეშვეობით*, ხორციელდება პირდაპირი და არაპირდაპირი მექანიზმებით, მათ შორის ტრიპტოფან-ნაწარმოები პროდუქტებით, გ-ამინო-ბუტირის მჟავის ან ოქსიტოცინის წარმოქმნის სტიმულირებით (Janik et al. 2016).

პრობიოტიკური მახასიათებლები მიკროორგანიზმებში სხვადასხვა სიხშირით გხვდება. მაგალითად ზოგიერთი თვისება ტიპურია მხოლოდ *Lactobacillus* გვართვის, ხოლო ზოგიერთი კი სახეობა ან შტამ-სპეციფიკურია. სწრაფი კოლონიზაციის უნარი და პათოგენების კონკურენტული დათრგუნვა *Lactobacillus*-ის გვარის წამომადგენელთა უმრავლესობისთვის არის დამახასიათებელი, ნაღველის მარილების მეტაბოლიზმის, ვიტამინების ან ბიოაქტიური ნაერთების სინთეზის უნარი სახეობა-სპეციფიკური მახასიათებელია (*L. lactis* subsp. *lactis* მიერ ნიზინის სინთეზი) (De Vuyst 1994), ხოლო სპეციფიკური ბაქტერიოციდული ნივთიერების წამოქმნის უნარი ხშირად შტამ-სპეციფიკური თავისებურებაა (მაგალითად *Lb. johnsonii* VPI 11088 წარმოქმნის *E. faecalis*-ს მიმართ აქტიურ, თერმოსტაბილურ IIB კლასის ბაქტერიოცინ ლაქტაცინ F-ს) (De Vuyst and Leroy 2007).

პრობიოტიკების გამოყენების ყველაზე ხშირი და გავრცელებული მეთოდი პერორალური მიღებაა, ამიტომ ჯანმრთელობისთვის სასარგებლო თვისებებთან ერთად პრობიოტიკურ შტამებს კუჭ-ნაწლავის სისტემაში სიცოცხლისუნარიანობის და მაღალი გამძლეობის უნარი უნდა ქონდეთ. მაგალითისთვის მოზრდილებსა და ბავშვებში ანტიბიოტიკოთერაპიასთან ასოცირებული დიარეის პრევენციასა და მკურნალობაში ხშირად გამოყენებად პერორალურ პრობიოტიკულ მიკროორგანიზმს *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103) (Gorbache-Goldin) სწრაფი ადჰეზიის უნარი აქვს, ახასიათებს მაღალი გამძლეობა სტრესული პირობების, დაბალი pH-სა და ნაღველის მიმართ, რაც მას კუჭ-ნაწლავის სისტემაში სიცოცხლისუნარიანს ხდის (Silva et al. 1987). შესაბამისად შტამების პრობიოტიკული პოტენციალის შეფასებისას ხშირ შემთხვევაში ხდება ნაღველის მიმართ რეზისტენტობის, ნაღველის მარილების დაშლის, ჰიდროფობულობის ანუ ადჰეზიის და აგლუტინაციის უნარის შესწავლა.

## 1.6. ბაქტერიოფაგები და მათი როლი ფერმენტირებული საკვები პროდუქტების წამოებაში

ბაქტერიოფაგები (ფაგი) ანუ ბაქტერიის ვირუსი, დედამიწაზე ყველაზე გავრცელებული ბიოლოგიური ერთეულია, გვხვდება ყველა იმ ეკოლოგიურ ნიშაში, სადაც მათი პატრონი ბაქტერიები არსებობენ (Chibani-Chennoufi *et al* 2004). შედგებიან ნუკლეინის მჟავისა და ცილოვანი გარსისგან. ბაქტერიის ვირუსები მოიცავს *Caudovirales* (კუდიანი ვირუსები) რიგის *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* ორჯაჭვიანი დნმ ვირუსების ოჯახებს, მრავალწახნაგოვანი *Microviridae* ერთჯაჭვიანი დნმ, *Corticoviridae* და *Tectiviridae* ორჯაჭვიანი დნმ, *Leviviridae* ერთჯაჭვიანი რნმ და *Cystoviridae* ორჯაჭვიანი რნმ ვირუსების ოჯახებს, ძაფისებრი *Inoviridae* ერთჯაჭვიანი დნმ და პლემორფული *Plasmaviridae* ორჯაჭვიანი დნმ ვირუსებს (Ackermann 2009). დღემდე აღწერილი რძემჟავა ბაქტერიების ყველა სახეობის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგი *Caudovirales* რიგს მიეკუთვნება.

პატრონი უჯრედის დნმ-ის სინთეზის და ცილების წარმოების აპარატის გამოყენებით ბაქტერიოფაგები საკუთარი გენეტიკური მასალის რეპლიკაციას და ახალი კაფსიდების წარმოებას ახდენენ. რეპლიკაციის ტიპის მიხედვით *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* ოჯახის ვირუსებში ლითიურ და ლიზოგენურ ციკლებს ანსხვავებენ. ლითიური ციკლისას ბაქტერიოფაგის პატრონი უჯრედზე ადსორბციის და დნმ-ის ინექციის შემდეგ, უჯრედის ციტოპლაზმაში ფაგური დნმ-ის რეპლიკაცია და კაფსიდების სინთეზი მიმდინარეობს, რასაც მოსდევს ბაქტერიული უჯრედის ლიზისი და ახალი ვირულენტური ფაგური ნაწილაკების გამონთავისუფლება. ლიზოგენური ციკლისას ფაგის პატრონი უჯრედზე ადსორბციის და დნმ-ის ციტოპლაზმაში შეტანის შემდეგ, ხდება ფაგური ნუკლეინის მჟავის ინტეგრირება ბაქტერიის ქრომოსომაში. ფსევდოლიზოგენიის შემთხვევაში ფაგური დნმ არ ინტეგრირდება ბაქტერიულ ქრომოსომაში და ციტოპლაზმაში პლაზმიდის მსგავსად რეპლიცირდება. ქრომოსომაში ინტეგრაციისთვის ზომიერ ფაგებს ესაჭიროებათ ინტეგრაზები, ეს არის სპეციფიკური ფერმენტები რომლებიც გამოიყენება ერთმიმართული საიტ-სპეციფიკური რეკომბინაციისას. რეკომბინაცია მიმდინარეობს ფაგის დნმ-ის მოკლე მიმდევრობებს, ფაგის მიმაგრების საიტს attP-ს, ზოგ შემთხვევაში დამატებით კოფაქტორებს და ბაქტერიული დნმ-ის მოკლე მიმდევრობებსა და

ბაქტერიის მიმაგრების საიტს attB შორის. ინტეგრირებული ფაგის ანუ პროფაგის დნმ-ის რეპლიკაცია ხდება პასიურად ბაქტერიული უჯრედის ორობითი დაყოფისას. შტამის ლიზოგენიზაცია ანუ ზომიერი ფაგის ბაქტერიულ გენომში ინტეგრაცია და პროფაგის გამრავლების ლიზოგენური ციკლის ინიციაცია, მრავალ ფაქტორს უკავშირდება, მათ შორის, ბაქტერიული ზრდის ნაკლებად ხელსაყრელ პირობებს. ფაგური ინტეგრაცია და ექცისაზას და/ან ზოგიერთ შემთხვევაში პატრონი უჯრედის კოფაქტორების არსებობისას, სრულდება შეზღუდული რეაქცია: ფაგური დნმ-ი გამოდის ბაქტერიული ქრომოსომიდან და გადაერთვება გამრავლების ლითიურ ციკლზე. ფაგური დნმ-ის გამოსვლის რეაქცია ანუ ინდუქცია ხდება სპონტანურად ან სხვადასხვა სტრესური გარემო ფაქტორების ზეგავლენით (Groth and Calos 2004).

### 1.6.1. ლიზოგენიზაცია

ვირულენტური ფაგებისგან განსხვავებით, ზომიერი ფაგები თავიანთ პატრონ უჯრედთან ხანგრძლივ ასოციაციას ამყარებენ. ამ კონტექსტში შესაძლოა განვითარდეს მუტუალისტური ურთიერთქმედება, რომელიც ხელს უწყობს როგორც ბაქტერიის ასევე ფაგის ეფექტურ გამრავლებას. აქტიური ლიზოგენიზაციისას ფაგური გენომი ინტეგრირდება ბაქტერიული ქრომოსომის კრიტიკულ ლოკუსებში ან ოპერონებში და გავლენას ახდენს ბაქტერიული გენების ექსპრესიაზე (Feiner *et al.* 2015). მრავალი პათოგენური ბაქტერიის ვირულენტურობის ფაქტორებს სწორედ გენომში არსებული პროფაგები აკოდირებენ. ამგვარი კარგად ცნობილი პროფაგ-ასოცირებული ვირულენტური ფაქტორებია: *Vibrio cholera*-ს ციტოტოქსინები, ქოლერას ტოქსინი (CTX) და უჯრედშორის ტოქსინი (*zot*), რომლებიც CTXφ პროფაგის მიერ არის კოდირებული (Castillo *et al.* 2018). ფაგსა და ბაქტერიას შორის ამგვარ სიმბიოტურ ურთიერთქმედებას ლიზოგენური კონვერსია ეწოდება (Brüssow *et al.* 2004).

ზოგიერთ შემთხვევაში მუტაგენეზის შედეგად ხდება ფაგური დნმ-ის დეგრადაცია და ე.წ. კრიპტო-ფაგების წარმოქმნა. ეს არის პროფაგური არტეფაქტები რომელთაც დაკარგული აქვთ ლითიურ ციკლში გადასვლის აპარატი/შესაძლებლობა. კრიპტო-ფაგები ბაქტერიებისთვის პერმანენტული გენების რეზერვუარი ხდება და ხშირ შემთხვევაში ბაქტერიისთვის ხელსაყრელ გენებს აკოდირებენ (Wang and Wood 2016).

ლიზოგენური შტამების სტარტერულ კულტურებად გამოყენება წარმოების პროცესისთვის საფრთხის შემცველია. სპონტანური ინდუქცია არაკონტროლირებადი პროცესია, შესაძლოა ფერმენტაციის ნებისმიერ მომენტში განვითარდეს და მთლიანი ფერმენტორის ინფიცირება გამოიწვიოს (Zago *et al.* 2017). რადგან რძის პროდუქტების წარმოება ბაქტერიული ფერმენტაციის პროცესებზე არის დამოკიდებული, სტარტერ-სპეციფიკური ფაგური კონტამინაცია მაღალი რისკის შემცველი მოვლენაა, აფერხებს რა აციდოფიკაციის პროცესს, ცვლის პროდუქტის ორგანოლეპტიკურ მახასიათებლებს ან იწვევს მთლიანად პროდუქტის დანაკარგს. გამონაკლისს წარმოადგენს მხოლოდ სპეციფიკური ფერმენტაციის პროცესები, როდესაც სტარტერული კულტურის აუტოლიზისი აუცილებელია საჭირო პროდუქტის მისაღებად (Murphy *et al.* 2017).

### 1.6.2. ფაგური კონტამინაცია

ლიზოგენური შტამების გარდა ფერმენტორების კონტამინაცია შესაძლოა გარემოდან შემოტანილი ლითიური ფაგებით მოხდეს. ყველა ნედლი ბუნებრივი ინგრედიენტი, რომელიც საწარმოში შედის, შესაძლოა ბაქტერიოფაგებს შეიცავდეს. მათ შორის, ზოგიერთი რძემჟავა ბაქტერიის ბუნებრივი ეკოლოგიური ნიშა - ნედლი რძე ბაქტერიოფაგური კონტამინაციის ერთ-ერთი ძირითადი წყაროა. ასევე კონტამინაციის მნიშვნელოვანი წყაროები ბუნებრივი ე.წ. განუსაზღვრელი სტარტერები და გადამუშავებული რძის პროდუქტებია. მათ შორის შრატის ცილის კონცენტრატები, რომლებიც დამუშავების მეთოდებიდან გამომდინარე ხშირ შემთხვევაში ფაგების მაღალ კონცენტრაციებს შეიცავენ (Marcó *et al.* 2012). ნედლი მასალების, მოწყობილობების და პერსონალის მოძრაობა იწვევს ფაგური ნაწილაკების აეროზოლაციას და დისპერსიას. ბიოაეროზოლები ჰაერში დიდი ხნის განმავლობაში რჩება და ფაგურ კონტამინაცია მარტივად ვრცელდება. ბაქტერიოფაგების გავრცელების შეზღუდვის სირთულის გამო, ფართომასშტაბიანი წარმოებისთვის ბუნებრივად ფაგორეზისტენტული ან ფაგორეზისტენტული მუტანტი სტარტერული კულტურები შეირჩევა (Kutter and Sulakvelidze 2004).

### 1.6.3. ფაგორეზისტენტობა

ლიზოგენური კულტურების უმრავლესობას სუპერინფექციების მიმართ იმუნიტეტი გააჩნიათ. პროფაგის შემცველი უჯრედის ინფიცირებისას, პროფაგ-

კოდირებული რეპრესორების გამოყენებით ჰომოლოგიური ფაგის ლითიური ციკლის ბლოკირება ხდება (Murphy *et al.* 2017). თუმცა არალიზოგენურ რემეჩავა კულტურებსაც ფაგორეზისტენტობის დახვეწილი და მძლავრი მექანიზმები გაანჩათ, ესენია:

1. ადსორბციის და დნმ-ინექციის ბლოკატორული სისტემები
2. რესტრიქცია-მოდიფიკაციის სისტემები
3. CRISPR-Cas სისტემა
4. აბორტული ინფექციების სისტემები

**ადსორბციის და დნმ-ინექციის ბლოკატორული სისტემები.** შეტევის ქვეშ მყოფი უჯრედებისთვის ფაგის ადსორბციის და დნმ-ის ინექციის პრევენცია დაცვის პირველი საშუალებაა. ამ დროს ხდება უჯრედის რეცეპტორების ცვლილება, ექსტრაუჯრედული მატრიცის ფორმირება ან კონკურენტული ინჰიბიტორების სინთეზი (Labrie *et al.* 2010).

**რესტრიქცია-მოდიფიკაციის სისტემები.** როდესაც ფაგი წარმატებით ადსორბირდება და შეუშვებს თავის ნუკლეინის მჟავას პატრონის ციტოპლაზმაში, შეტანილი დნმ-ის დეგრადაცია შესაძლოა რესტრიქცია-მოდიფიკაციის (რ-მ) სისტემის მეშვეობით მოხდეს. რ-მ სისტემები შესწავლილი ბაქტერიების და არქეების დაახლოებით 90%-ში გხვდება (Roberts *et al.* 2010). რ-მ მექანიზმი შედგება ორი ინტრაუჯრედული ფერმენტული სისტემისგან: ენდოდეოქსირიბონუკლეაზა და დნმ-მეთილტრანსფერაზა. ცნობილია რ-მ სისტემების ოთხი ტიპი (I, II, III, და IV), რომლებიც მეთილტრანსფერაზას სუბერთეულების მოლეკულური წყობით, ჩართული ენდონუკლეაზების და კოფაქტორების ტიპებით განსხვავდება. რ-მ სისტემების ძირითადი მექანიზმი უჯრედული დნმ-ის მეთილირების გზით, შემომავალი უცხო დნმ-ის და უჯრედული დნმ-ის ერთმანეთისგან დისკრიმინაციას უზრუნველყოფს. ამის შემდეგ იწყება არამეთილირებული დნმ-ის ამოცნობა, რესტრიქციის ფერმენტების საიტ-სპეციფიური მიმაგრება და ჯაჭვის დეგრადაცია (Wilson and Murray 1991).

**CRISPR-Cas სისტემა.** ბაქტერიულ გენომში არსებული კლასტერიზებული რეგულარულად ინტერსპეისერული მოკლე პალინდრომული განმეორებადობები (CRISPR) და მასთან ასოცირებული გენების სისტემა (Cas), შემოჭრილი გენეტიკური

ელემენტების (ფაგების და პლაზმიდების) საწინააღმდეგო, შეძენილი იმუნიტეტის მსგავს სისტემას წამოადგენს. CRISPR–Cas სისტემა სამ ეტაპად მოქმედებს: ადაპტაცია, ექსპრესია და ინტერფერენცია. ადაპტაციისას შემომავალი ფაგის ან პლაზმიდის ჰომოლოგიური მოკლე ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობები (დაახლოებით 30აწ) ინტეგრირდება CRISPR ლოკუსში სპეისერების სახით. ყოველი ინტეგრაციის შემდეგ ხდება განმეორებადობის დუბლიკაცია და წარმოიქმნება ახალი განმეორებადი სპეისერული მონაკვეთი. შემომავალი დნმ-იდან პროტო-სპეისერების შერჩევა პროტო-სპეისერ-მომიჯნავე მოტივების დეტერმინაციის გზით ხდება. ექსპრესიისას წამოიქმნება CRISPR ლოკუსის პირველადი გრძელი ტრანსკრიპტები (პრე-crრნმ) და გარდაიქმნება crრნმ-ად. ამ პროცესის კატალიზაცია სუბერთეულების ენდორიბონუკლეაზებით მიმდინარეობს. ინტერფერენციისას ხდება უცხო დნმ-ის ან რნმ-ის პროტო-სპეისერული მიმდევრობების ამოცნობა და დაჭრა. CRISPR–Cas სისტემებში გამოყოფენ სამ კლასს (I, II, და III), რომლებიც აერთიანებს 11 ტიპის ქვედანაყოფს (ტიპი IA-AF, ტიპი IIA-IIC, და ტიპი IIIA-IIIB) (Makarova *et al.* 2011).

**აბორტული ინფექციების სისტემა.** სამიზნე უჯრედის მიერ კოდირებული აბორტული ინფექციების სისტემა (ა-ი-ს) არის ფაგორეზისტენტობის მექანიზმი, რომელიც პასუხს აგებს ფაგის ლითიური ციკლის კრიტიკული საფეხურების: ტრანსკრიფციის, ტრანსლაციის, დნმ რეპლიკაციის და ახალი ვირიონების შეფუთვის შეფერხებაზე (Chopin *et al.* 2005). ა-ი-ს მექანიზმების აქტივაცია ჩვეულებრივ მთავრდება ინფიცირებული უჯრედის განადგურებით, რაც აღკვეთავს ფაგის გამრავლებას და გავრცელებას, შესაბამისად ბაქტერიული პოპულაციის ინფიცირება არ ხდება. *L. lactis* სახეობაში აღწერილია პლაზმიდ-კოდირებული 23 ა-ი-ს სისტემა (AbiA-AbiZ, AbiN და AbiV) (Ainsworth *et al.* 2014).

ამგვარი მრავალფეროვანი მექანიზმების არსებობის პირობებში ფაგორეზისტენტული დედო კულტურების სპონტანური მუტანტების წამოქმნა საკმაოდ ალბათურია, თუმცა უნდა გავითვალისწინოთ, რომ ფაგი-ბაქტერიის ურთიერთქმედება კოევოლუციურად მიმდინარეობს და ბაქტერიოფაგებში რეზისტენტობის დაძლევის ახალი მექანიზმების წარმოქმნა უწყვეტად მიმდინარეობს. ამიტომ საწარმოო პირობებში რძემჟავა ბაქტერიების სპეციფიკური

ბაქტერიოფაგების გავრცელების და შტამების ფაგომგრძნობელობის მონიტორინგი კარგი საწარმოო პრაქტიკის მნიშვნელოვანი ატრიბუტია (Brüssow *et al.* 1994).

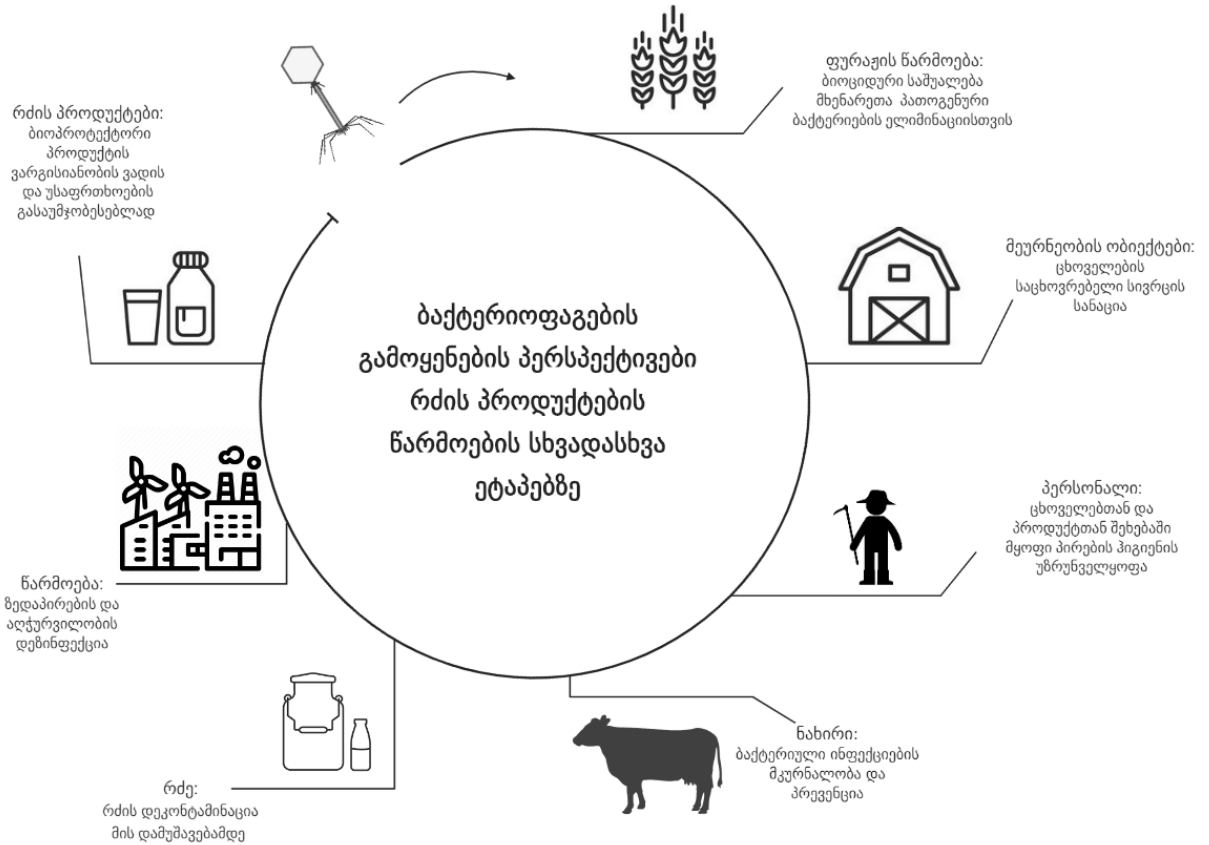
#### 1.6.4. ფაგების დადებითი როლი კვების ინდუსტრიაში

კონტამინირებული საკვები პროდუქტების მიღება ინფექციური დაავადებების გავრცელების ერთ-ერთი უმთავრესი წყაროა. რძის წარმოებაში ბაქტერიული კონტამინაციის გავრცელება მრავალ ეტაპზე შესაძლებელია, მათ შორის ინფიცირებული ცხოველებისგან ნედლეულის მიღებისას (*Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp. და ა.შ.), ნედლეულის თერმული დამუშავების შემდეგ (*Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp.) ან პროდუქტების საბოლოო მომზადების ეტაპზე (*Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp.) (Velázquez-Ordoñez *et al.* 2019). ამიტომ რძის პროდუქტების უსაფრთხოების უზრუნველყოფა ინდუსტრიის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ამოცანაა.

საკვები პროდუქტების წარმოებაში არასასურველი ბაქტერიული დაბინძურების ბიოკონტროლის მიზნით ლითიური ბაქტერიოფაგების გამოყენება მაღალსპეციფიურ, ხელმისაწვდომ და უსაფრთხო ალტერნატივად განიხილება. ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა ანტიბიოტიკების მოქმედების მექანიზმებისგან დამოუკიდებელია, ამიტომ ფაგები ეფექტურია მრავლობით-რეზისტენტული პათოგენების მიმართაც კი. ფაგების სახეობა-სპეციფიკური მოქმედების გამო მათი მიზნობრივი გამოყენება არ აფერხებს ფერმენტაციის პროცესს (Hagens and Loessner 2010). მაგალითად *Enterococcus* სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყენება შესაძლებელია წამოებაში პრობლემური ბიოგენური ამინების წარმომქმნელი *Enterococcus faecalis* პოპულაციების კონტროლისთვის, რადგან ბაქტერიოფაგებით *Enterococcus faecalis* მიზნობრივი ელიმინაციისას ფერმენტაციაში ჩართული *Lactobacillus* spp. ან სხვა კულტურების აქტივობას საფრთე არ ექმნება (Ladero *et al.* 2016).



კვებით ინდუსტრიაში ფაგური პრეპარატების გამოყენება სავარაუდო ბაქტერიული დაბინძურების შესაბამის წერტილებში არის მიზანშეწონილი (Pujato *et al.* 2019).



სურათი 6. რძის პროდუქტების წარმოების პროცესში, ბაქტერიული კონტამინანტების ბიოკონტროლის მიზნით ბაქტერიოფაგების გამოყენების ვარიანტები.

ლოკალური პროდუქტის დაცვის და პროდუქტის უვნებლობის უზრუნველსაყოფად აუცილებელია ტრადიციული წესით დამზადებული ფერმენტირებული რძის პროდუქტების მიკრობიოტების დაწვრილებითი შესწავლა, კულტურათა იზოლაცია და იდენტიფიკაცია.

კარგად დახასიათებული ადგილობრივი რძემწავა ბაქტერიების კოლექციების შექმნა უზრუნველყოფს ბიოტექნოლოგიურად და პრობიოტიკულად ღირებული ახალი კულტურების აღმოჩენის შესაძლებლობას და მიკრობული ბიომრავალფეროვნების შენარჩუნებას.

მოცემული კვლევის ფარგლებში მაწვნის უნიკალური მიკრობიოტის შესწავლის, შენარჩუნების და პროდუქტის უვნებლობის უზრუნველყოფისთვის შემდეგი ამოცანები დასისახა: საქართველოს სხვადასხვა კუთხეში დამზადებული მაწვნის სინჯების შეგროვება, პროდუქტის მიკრობიოლოგიური უვნებლობის ანალიზი, დომინანტური კულტურების იზოლაცია, მათი მოლეკულური იდენტიფიკაცია და ტიპირება, მიღებული ბიოტიპების ბიოგეოგრაფიული განაწილების შესწავლა, კულტურების ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის, პრობიოტიკური მახასიათებლების და ფაგომგეძნობელობის შესწავლა, მაწვნის მიკრობიოტის მონაცემთა ბაზის და ავტოქტონური მრავალკომპონენტური დედოს შემუშავება.

## თავი II. მასალა და მეთოდები

### 2.1. მაწვნის სინჯების შეგროვება

ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის სინჯების მოპოვება მიმდინარეობდა საქართველოს 10 რეგიონში, 2013-2015 წლების განმავლობაში. სინჯების მოგროვება განხორციელდა შემთხვევითი შერჩევის პრინციპით. ქილაში დამზადებული მაწვნის 10მლ ასეპტიკურად გადაგვქონდა სტერილურ შპრიცში და ვათავსებდით თერმოსტაბილურ ყუთში. სინჯის ლაბორატორიაში ტრანსპორტირების დრო არ აღემატებოდა 12 საათს.

### 2.2. მაწვნის დედო კულტურების გამოყოფა

ნადედიდან დომინანტური რქემჟავა კულტურების გამოსაყოფად სტრატიფიცირებული მიდგომა შეირჩა. 2მლ ნადედი გადაგვქონდა 10მლ სტერილურ გამოხდილ რქეში, შენჯღრევის შემდეგ სინჯი თავსდებოდა 42°C-ზე კოლტის წამოქმნამდე. ცალკეული კოლონიების გამოსაყოფად, მიღებული ნადედი ითესებოდა სელექტიურ MRS და M17 (Merck) მყარ საკვებ არეებზე. ინკუბაცია მიმდინარეობდა ანაერობულ პირობებში 42°C-ზე 48სთ-ს განმავლობაში. მიღებული კოლონიები გრამის წესით იღებებოდა და ხდებოდა კატალაზური აქტივობის დადგენა. გამოვლენილი გრამ-დადებითი კოკები, ესკულინის ჰიდროლიზის უნარის შესაფასებლად ითესებოდა სელექტიურ BEA (Merck) არეზე. მიღებული კატალაზა-უარყოფითი, გრამ-დადებითი ჩხირისებრი და კოკოვანი კულტურები ინახებოდა 15%-იან გლიცერინის ხსნარში -80°C-ზე.

### 2.3. ბაქტერიული კულტურების იდენტიფიკაცია და გენოტიპირება

მიღებული იზოლატების იდენტიფიკაცია და გენოტიპირება მეთოდების თანმიმდევრული გამოყენებით განხორციელდა.

#### 2.3.1. დნმ-ის ექსტრაქცია Chelex-ის - რეზინის მეთოდით გრამ-დადებითი და მჟავა-გამძლე (acid-fast) ბაქტერიებისთვის

- შესაბამის მყარ საკვებ არეზე ნაზარდი, სტაციონალური ფაზის ბაქტერიული შტამის, საშუალოდ 5 კოლონია გადაგვაქვს 245მკლ TE ბუფერში და ემატება 5მკლ (50მგ/მლ კონცენტრაციის) ლიზოციმის ხსნარი

- ხსნარი ინკუბაციისთვის თავსდება 56°C-ზე აბაზანაში, 45 წთ-ის განმავლობაში
- ინკუბაციის დასრულების შემდეგ ხსნარს ემატება TE (0.1M) - 218.7მკლ, DTT (1M) – 5მკლ, EDTA (0.5M) - 10მკლ, SDS (20%) – 12.5მკლ და პროტეინაზა K (20მგ/მლ) – 3.8მკლ
- განმეორებითი ინკუბაცია 37°C-ზე აბაზანაში, 1 საათის განმავლობაში
- ინკუბაციის დასრულებისას მყისიერად ემატება 500მკლ Chelex-ის (Bio-Rad) 5%-იანი ხსნარი
- ხელახლა თავსდება 56°C-ზე აბაზანაში, 30 წთ-ის განმავლობაში
- ინკუბაციის დასრულებისას სინჯი კარგად უნდა შეინჯღრეს 10 წამის განმავლობაში და მოთავსდეს 100°C ცხელ ბლოკზე 8 წთ-ის განმავლობაში
- შემდგომ სინჯი ცენტრიფუგირდება 10000გ-ზე, 2წთ
- ცენტრიფუგირების შემდეგ სუპერნატანტის შუა დონიდან ამოგვაქვს დნმ-ის სუსპენზია და ვაზავებთ 1:10-თან დისტილირებულ სტერილურ წყალში
- დნმ სუსპენზია ინახება -20°C-ზე, ყოველი გამოყენების წინ ხდება მისი გამოდნობა, შენჯღრევა და ცენტრიფუგირება ( $\geq 10000$ გ, 5 წთ)

აღწერილი მეთოდის გამოყენებით, მიიღება რემეჩავა კულტურის მთლიანი, გასუფთავებული დნმ-ი. მოცემული დნმ-ი გამოიყენება შემთხვევითად ამპლიფიცირებული პოლიმორფული დნმ პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (RAPD პჯრ), სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ის, რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით დამუშავების (ARDRA) და 16S რ-რნმ მიმდევრობის ანალიზისთვის.

### **2.3.2. შემთხვევითად ამპლიფიცირებული პოლიმორფული დნმ პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (RAPD პჯრ)**

მიღებული დნმ ფრაგმენტების ამპლიფიკაცია განხორციელდა RAPD პჯრ-ის საშუალებით, პრაიმერ M13-ის გამოყენებით (ნუკლეოტიდური მიმდევრობა: 5'[GAG GGT GGC GGT TCT]3'), შესაბამისი ტემპერატურული ციკლის პირობებში.

I. პჯრ სარეაქციო ხსნარის შემადგენლობა, ხსნარში რეაგენტების საბოლოო კონცენტრაციის მითითებით:

- პჯრ ბუფერი (10X PCR Buffer II, Roche) - 1X
- დეზოქსირიბონუკლეოტიდტრიფოსფატები - 0.2mM

- პრაიმერი M13 - 2 $\mu$ M
- Taq-პოლიმერაზა (AmpliTAQ, Roche)-2.5U/100მკლ
- MgCl<sub>2</sub> (Roche)- 3mM
- სინჯის დნმ-ი- 1მკლ
- ემატება დისტილირებული სტერილური წყალი (Milli-Q Water), საბოლოო სარეაქციო ხსნარის მოცულობის 25მკლ-მდე მისაყვანად.

ყოველი რეაქციის წინ მზადდება ანალიზისთვის განკუთვნილი სინჯების რაოდენობის შესაბამისი პჯრ სარეაქციო ხსნარი. უარყოფით კონტროლად გამოიყენება სარეაქციო ხსნარების შევცველი სინჯები, სადაც დნმ-ის ნაცვალად, იმავე მოცულობით, დამატებულია სტერილური დისტილირებული წყალი.

## II. თერმული ციკლი (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems)

- 94°C-2 წუთი - დენატურაცია
- 94°C-60 წამი - ანელინგი
- 45°C-20 წამი - ანელინგი
- 72°C- 120 წამი - ანელინგი
- 72°C-10 წუთი - ელონგაცია
- ციკლი მეორდება 40-ჯერ

მოკლე ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მქონე პრაიმერ M13-ის გამოყენებით განხორციელებული RAPD პჯრ-ი, შედეგად გვაძლევს კულტურების დნმ-ის ამპლიკონებს, რომელთა კლასტერიზაციის საფუძველზე შესაძლებელია შტამების ნათესაობის და ბიოტიპების განსაზღვრა.

## III. მიღებული დნმ ამპლიკონების-ანაბეჭდების ვიზუალიზაცია განხორციელდა

1.5%-იანი აგაროზ გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით

- 1.5%-იანი აგაროზ გელის დამზადება - 4.5გ აგაროზას ფხვნილი (GellyPhor EMR010500 Euroclone) და 6მლ TAE ბუფერი (50X TAE Bio-RAD) განზავდება 300მლ დეიონიზირებულ წყალში. საბოლოო კონცენტრაცია გელში: 40mM THAM, 20mM ძმარმჟავა, 1mM EDTA
- გელის ჩატვირთვა - 25მკლ დნმ ამპლიკონის სუსპენზიას ემატება 2მკლ ფერის მარკერი ბრომფენოლ ლურჯი (Sigma-Aldrich) და ნარევის 20მკლ გადაიტანება

გელის შესაბამის ღრმულებში. დასამოწმებლად ყოველ გელს ემატება დნმ მარკერი: 1 მკგ/მკლ, (+)1კბ დნმ კიბე (Invitrogen)

- ელექტროფორეზი - 20V-18 სთ (Amersham Bioscience). აბაზანის ბუფერი: 1X TAE
- ელექტროფორეზის დასრულების შემდეგ გელი იღებება ნუკლეინის მჟავის საღებავით (GelRed Nucleic acid Gel stain, 10000X, BIOTIUM) 30წთ განმავლობაში, შემდგომი რეცხვით დისტილირებულ წყალში - 30წთ
- შედეგების ვიზუალიზაცია ხდება 1D მაღალი გაფართოების TIF ფორმატით (Kodak EDAS 290, 1D Image analysis soft. Version 3.6)

გელ-ელექტროფორეზის გამოყენებით ხდება პჯრ-ის შედეგების ვიზუალიზაცია, შესაბამისი დნმ სტანდარტების (+1კბ დნმ კიბე) თანაობით. შედეგად მიიღება მაღალი გაფართოების TIF 1D დნმ ზღვრების სურათები, რის საფუძველზეც ხორციელდება პროფილების ანალიზი და კლასტერების იდენტიფიკაცია.

IV. მონაცემების ანალიზი და მონაცემების ბაზაზე მუშაობა მიმდინარეობდა BioNumerics-ის (Applied Maths) პროგრამული უზრუნველყოფის საშუალებით.

- 1D გელ-ელექტროფორეზე აღბეჭდილი პროფილების ანალიზისთვის გამოყენებულ იქნა GelCompar II პროგრამული პაკეტი. მოცემული პროგრამის საშუალებით განხორციელდა ამპლიფიცირებული დნმ-ის გელზე მიგრაციის (დადებითი მუხტის პოლუსისკენ - მოლეკულური წონის მიხედვით) შედეგად მიღებული პროფილების 1D გამოსახულების დაწვრილებითი და მრავალკომპონენტური ანალიზი. სურათის პროგრამაში ჩატვირთვის შემდეგ ხდება გამოსახულების ინვერსია და მაღალი ინტენსიობის პიქსელები აღიქმება როგორც დნმ-ზღვრები. შემდეგ ხდება დნმ-ბილიკების ამოცნობა და მონიშვნა, სპლაინების კორექცია, დნმ-მარკერების მონიშვნა და სურათის ნორმალიზაცია. ნორმალიზაციის შემდეგ შესაძლებელია დნმ ზღვრების არაავტომატური მონიშვნაც. შესაბამისი დნმ-ბილიკი მიემარგება BioNumerics-ის მონაცემთა ბაზაში წინასწარ შეტანილი შტამის ინფორმაციულ ველს. ამგვარი მონაცემთა ბაზის შექმნა საშუალებას გვაძლევს ჩვენი კოლექციის შტამები შევადაროთ, იგივე ტიპის ექსპერიმენტის (RAPD PCR M13 FINGERPRINTING) სხვა შტამებს.
- დნმ პროფილების მსგავსების კოეფიციენტი დგინდება პირსონის კორელაციის საფუძველზე, სადაც პირსონის კორელაცია ახდენს მონაცემებში გლობალური

ტრენდების შედარებას: ფოკუსირებულია სიგნალის ცვლილებაზე და ამავდროულად უგულვებელყოფს სიგნალის ამპლიტუდას და გადახრას

- მიღებული მსგავსების ანალიზი განხორციელდა შეუწონავი წყვილ-ჯგუფების მეთოდით არითმეტიკული საშუალოთი (UPGMA), სადაც მანძილი ორ კლასტერს შორის არის საშუალო მანძილი თითოეული კლასტერის ელემენტებს შორის. ეს წარმოქმნის კლასტერებს, რომლებიც ერთმხრივ და სრულ კავშირს შორის თავსდება. მიღებულ დენდროგრამაში მსგავსების ლიმიტი განისაზღვრება 80%-ზე (Rossetti and Giraffa 2005).

### 2.3.3. 500აწ 16S რ-რნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრა

უნიკალური RAPD პროფილის მქონე შტამების და UPGMA კლასტერის წარმომადგენლობითი კულტურების სახეობრივი იდენტიფიკაცია განხორციელდა 16S რ-რნმ-ის 500-აწ ფრაგმენტის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის დადგენის მეშვეობით. 16S რ-რნმ-ის 500-აწ ფრაგმენტის ამპლიფიცირება განხორციელდა შემდეგი პრაიმერების გამოყენებით:

For. RiboI - CCGAGCTCAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

GTATTACCGCGCGGCTGCTGG - Rev. 536r

- I. საწყისი პჯრ-ის სარეაქციო ხსნარის შემადგენლობა, ხსნარში რეაგენტების საბოლოო კონცენტრაციის მითითებით.
  - პჯრ ბუფერი (10X PCR Buffer Gold, Roche) - 1X
  - დეზოქსირიბონუკლეოტიდტრიფოსფატები - 0.20 mM
  - პრაიმერი For. RiboI – 0.5µM
  - პრაიმერი Rev. 536r – 0.50µM
  - Taq-პოლიმერაზა (AmpliTAQ Gold, Roche) - 2.5U/100მკლ
  - MgCl<sub>2</sub> - 2.5mM
  - სინჯის დნმ-ი- 1მკლ
  - ემატება დისტილირებული სტერილური წყალი, საბოლოო სარეაქციო ხსნარის მოცულობის 30მკლ-მდე მისაყვანად.
- II. თერმული ციკლი.
  - 95°C-10 წუთი - დენატურაცია
  - 95°C-30 წამი - ანელინგი

- 60°C-30 წამი - ანელინგი
  - 72°C- 45 წამი - ანელინგი
  - 72°C-10 წუთი - ელონგაცია
  - ციკლი მეორდება 30-ჯერ
- III. აპლიცირებული პროდუქტი ნარჩენი ნუკლეოტიდებისა და პრაიმერებისგან გასუფთავდა Exo-SAP-IT-ის (GE Healthcare) გამოყენებით. 5მკლ ამპლიცირებული დნმ-ს ემატება 2მკლ Exo-SAP-IT. აქტივაცია ხდება 37°C-ზე 15წთ-ს განმავლობაში, ხოლო შემდგომი დეაქტივაცია 80°C-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში.
- IV. შემდგომი პჯრ-ის სარეაქციო ხსნარის შემადგენლობა ერთი რეაქციისთვის.
- პჯრ ბუფერი (5X PCR Buffer Gold, Roche) - 4მკლ
  - პრაიმერი For. RiboI 1mM - 3.2მკლ
  - პრაიმერი Rev. 536r 1mM- 3.2მკლ
  - BigDye V3.1 mix (Applied Biosystems) – 4მკლ
  - დნმ-ი- 1მკლ
  - დისტილირებული სტერილური წყალი - 1.8მკლ
- V. თერმული ციკლი.
- 95°C-10 წამი
  - 50°C-5 წამი
  - 60°C-4 წუთი
  - ციკლი მეორდება 25-ჯერ
- VI. აპლიცირებული პროდუქტის ნარჩენი ფლუორესცენტური საღებავი BigDye Terminator-ისა და მარილებისგან გაწმენდა Big-Dye X-Terminator-ის (Applied Biosystems) გამოყენებით განხორციელდა. 10მკლ ამპლიცირებული დნმ-ს ემატება 45მკლ SAM ხსნარი და 10მკლ X-Terminator-ი. ნარევი შეინჯღრევა 30წთ-ის განმავლობაში და ცენტრიფუგირდება 2წთ-ის განმავლობაში 1000g-ზე.
- VII. მიღებული სინჯების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის დასადგენად 35მკლ პროდუქტი მოთავსებულ იქნა კაპილარული ელექტროფორეზის სისტემით აღჭურვილ ავტომატურ სეკვენატორში: ABI PRISM® 310 Genetic Analyze (Applied Biosystems). კონსენსუს მიმდევრობის მისაღებად FASTA ფორმატში, ნედლი მონაცემების დამუშავება და მიმდევრობების აწყობა განხორციელდა CLUSTALW



ალგორითმით და GeneScan Software - Sequence Data Module (Applied Biosystems) პროგრამული პაკეტის მეშვეობით. მიღებულ მონაცემებზე დაყრდნობით, შტამების სახეობათა იდენტიფიკაცია განხორციელდა ბიოტექნოლოგიური ინფორმაციის ნაციონალური ცენტრის (NCBI) მონაცემთა ბაზის BLASTn საძიებო სისტემის მეშვეობით.

### 2.3.4. სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ი

მცირე ზომის UPGMA კლასტერებში გაერთიანებული კულტურების წარმომადგენლობითი შტამების იდენტიფიკაცია სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ის მეშვეობით განხორციელდა.

პჯრ სარეაქციო ხსნარის შემადგენლობა, ხსნარში რეაგენტების საბოლოო კონცენტრაციის მითითებით აღწერილია ცხრილ 2-ში, ხოლო გამოყენებული პრაიმერების ნუკლეოტიდური მიმდევრობა ნაჩვენებია ცხრილ 3-ში. შესაბამისი თერმული ციკლები ჩამოთვლილია ცხრილ 4-ში. თითოეულ რეაქციას ემატება დისტილირებული სტერილური წყალი, საბოლოო სარეაქციო ხსნარის მოცულობის 20მკლ-მდე მისაყვანად.

მიღებული შედეგების ვიზუალიზაცია განხორციელდა 1%-იანი აგაროზ გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით, 1სთ - 130V გარბენით, 1კვ დნმ კიბის თანაობით.

სახეობა	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>		<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus durans</i>	
ბუფერი (X)	1		1		1		1		1		1	
dNTP (mM)	0.2		0.2		0.2		0.25		0.2		0.25	
პრაიმერი For. (μM)	DB1	1	SS1	0.4	LacZ for	0.5	FM-F1	1.5	EF-E1	2	DuHiF	1.5
პრაიმერი Rev. (μM)	SS1	1	CA1	0.4	LacZ rev	0.5	FM-F2	1.5	EF-E2	2	DuR	1.5
TAQ (U/100μl)	2.5		2.5		2.5		2.5		2.5		2.5	
MgCl2 (mM)	1.5		1.5		1.5		2.5		3		3	

კონტროლ შტამი	<i>Lb. delbrueckii</i> ATCC12315	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC7469	<i>St. thermophilus</i> ATCC19258	<i>E. faecium</i> ATCC19434	<i>E. faecalis</i> ATCC19433	<i>E. durans</i> ATCC19432
უარყოფითი კონტროლი	ATCC7469	ATCC12315	ATCC19433	ATCC19258	ATCC19258	ATCC19258

ცხრილი 2. სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ების სარეაქციო ხსნარების შემადგენლობა, ხსნარებში რეაგენტების საბოლოო კონცენტრაციის მითითებით

პრაიმერის დასახელება	პრაიმერის მიმდევრობა
<b>DB1</b>	ACCTATCTCTAGGTGTAGCGCA
<b>SS1</b>	GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTCGCTCAG
<b>CA1</b>	TGATCTCTCAGGTGATCAAAA
<b>LacZ for</b>	CACTATGCTCAGAATACA
<b>LacZ rev</b>	CGAACAGCATTGATGTTA
<b>FM-F1</b>	GGGAAAACGACAATTGC
<b>FM-F2</b>	GTACAATGCGGCCGTTA
<b>EF-E1</b>	ATCAAGTACAGTTAGTCTT
<b>EF-E2</b>	ACGATTCAAAGCTAACTG
<b>DuHiF</b>	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA
<b>DuR</b>	TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG

ცხრილი 3. სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ებში გამოყენებული პრაიმერების ნუკლეოტიდური მიმდევრობები

თერმული ციკლი	დენატურაცია		ანელინგი		ელონგაცია		ციკლების რაოდენობა
	დრო	°C	დრო	°C	დრო	°C	
<i>სს-პჯრ-Lb. delbrueckii</i>	2წთ	94	15წმ	94	10წთ	72	22
			1წთ	63			
			90წმ	72			
<i>სს-პჯრ-Lb. rhamnosus</i>	2წთ	94	15წმ	94	10წთ	72	30
			1წთ	60			
			90წმ	72			
<i>სს-პჯრ-St. thermophilus</i>	3წთ	94	30წმ	90	10წთ	72	30
			70წმ	54			
			30წმ	72			
<i>სს-პჯრ-E. faecium</i>	2წთ	94	1წთ	94	10წთ	72	30
			1წთ	54			
			1წთ	72			
<i>სს-პჯრ-E. faecalis</i>	2წთ	94	30წმ	94	10წთ	72	30
			30წმ	55			
			30წმ	72			

<i>სს-პჯრ-E. Durans</i>	2წთ	94	45წმ	94	10წთ	72	30
			45წმ	57			
			45წმ	72			

ცხრილი 4. სახეობა სპეციფიკური პჯრ-ების შესაბამისი თერმული ციკლები

### 2.3.5. ქვესახეობრივი იდენტიფიკაცია რესტრიქციური ენდონუკლეაზების გამოყენებით

*Lb. delbrueckii* სახეობის წარმომადგენელი შტამების ქვესახეობრივი იდენტიფიკაცია (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* და *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) შესაძლებელია მათი 16S რ-რნმ გენის რესტრიქციური ენდონუკლეაზებით დამუშავების შედეგად მიღებული დნმ ფრაგმენტების ანალიზის მეშვეობით (ARDRA-ს მეთოდი). 16S რ-რნმ-ის 1500-აწ ფრაგმენტის ამპლიფიცირება განხორციელდა შემდეგი პრაიმერების გამოყენებით:

RiboI - CCGAGCTCAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

GGTCGACGGTTAATACGACTCACTATAGGGATACCTTGTTACGACTT- RiboII

I. პჯრ-ის სარეაქციო ხსნარის შემადგენლობა, ხსნარში რეაგენტების საბოლოო კონცენტრაციის მითითებით.

- პჯრ ბუფერი (10X PCR Buffer Gold, Roche) -1X
- დეზოქსირიბონუკლეოტიდტრიფოსფატები -0.2mM
- პრაიმერი RiboI- 0.4μM
- პრაიმერი RiboII – 0.4μM
- Taq-პოლიმერაზა (AmpliTAQ GOLD, Roche)-2.5U/100მკლ
- MgCl<sub>2</sub> - 1.5mM
- სინჯის დნმ-ი- 1მკლ
- ემატება დისტილირებული სტერილური წყალი, საბოლოო სარეაქციო ხსნარის მოცულობის 25მკლ-მდე მისაყვანად.

II. თერმული ციკლი.

- 95°C-10 წუთი - დენატურაცია
- 95°C-30 წამი - ანელინგი
- 60°C-30 წამი - ანელინგი
- 72°C- 45 წამი - ანელინგი

- 72°C-10 წუთი - ელონგაცია
- ციკლი მეორდება 30-ჯერ

III. EcoRI-ით 16S რ-რნმ-მის 1500-აწ მონაკვეთის დამუშავება.

შერჩეულ იქნა რესტრიქციის ენდონუკლეაზა - ECO RI (რესტრიქციის მონაკვეთი: *g/aattc*). EcoRI -ის მიერ *Lb.delbrueckii* subsp. *delbruckii* და *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* 16S რ-რნმ-ის 1500-აწ მონაკვეთის რესტრიქციის მოდელირება და დადგენა Webcutter 0.2 გამოყენებით განხორციელდა. დადებით კონტროლად გამოყენებულ იქნა *Lb.delbrueckii* subsp. *delbruckii* JCM1012, *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* DSM20072 და *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC111842, ხოლო ნეგატიურ კონტროლად *Lb. helveticus* ATCC15009 იქნა შერჩეული.

ენდონუკლეაზა EcoRI-ის მიერ *Lb.delbrueckii* subsp. *delbruckii* ATCC111842 16s rRNA 1500აწ მონაკვეთის გაჭრის მოდელირებული მონაკვეთები:

#### EcoRI

gagtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcgagctgaattcaaga  
ctcaaaactaggaccgagtcctgcttgcgaccgccgcacggattatgtacgttcagctcgtcgaacttaagttct

1 – 75 აზოტოვანი ფუძე წყვილი

#### EcoRI

aagaggagagtggaattccatgtgtagcgggtgtaatgcgtagatataatggaagaacaccagtgccgaagggcgt  
ttctccttcacacttaaggtagacacatgccacattacgcatctatatacttcttgggtcaccgctccgccga

676 – 750 აზოტოვანი ფუძე წყვილი

ამპლიფიცირებული დნმ-ის 10მკლ-ს ემატება 2.5მკლ დისტილირებული სტერილური წყალი, 1.5მკლ EcoRI ფერმენტის სპეციფიკური ბუფერი და 1მკლ ფერმენტი EcoRI. ნარევი ინკუბირდება 37°C-ზე 1 საათის განმავლობაში. შედეგების ვიზუალიზაცია ხდება 2%-იან აგაროზ გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით. 1კვ და 100აწ დნმ კიბის და შესაბამისი კონტროლების თანაობით.

## 2.4. ბიომრავალფეროვნების ანალიზი

სინჯების შეგროვების ეფექტურობის დასადგენად გამოიყენება შერჩევის ძალისხმევის მრუდი (Hughes *et al.* 2001). ნიმუშების შეგროვების ძალისხმევის ზრდასთან ერთად, თანდათან მატულობს აკუმულირებული სახეობების და ბიოტიპების რაოდენობა. შერჩევის გაჯერებისას, ნიმუშების შეგროვების ძალისხმევის

ზრდა აღარ გამოიწვევს ახალი სახეობებისა და ბიოტიპების მატებას და მრუდი აღწევს ასიმპტოტს. ამ დროს შესაძლებელია დავასკვნათ რომ შერჩევამ სახეობათა და ბიოტიპთა უმრავლესობა მოიცვა.

მაწვნის სინჯებში რძემჟავა ბაქტერიების ბიომრავალფეროვნების განაწილება განისაზღვრა რიცხვობრივი სიმძლავრის, დისპერსიის ხარისხის, გავრცელების და შიდასახეობრივი მრავალფეროვნების მიხედვით.

- სახეობის რიცხვობრივი სიმძლავრის მაჩვენებელი ანუ სიმჭიდროვე, გამოითვლება შემდეგი ფორმულის მიხედვით:

$$\text{სიმჭიდროვე} = \frac{x \text{ სახეობის წარმომადგენელთა საერთო რაოდენობა შერჩევაში}}{\text{ნიმუშთა საერთო რაოდენობა}}$$

- სიხშირე ანუ არეალში სახეობათა დისპერსიის მაჩვენებელი გამოისახება შემდეგნაირად:

$$\text{სიხშირე (\%)} = \frac{x \text{ სახეობის შემცველ ნიმუშთა საერთო რაოდენობა}}{\text{ნიმუშთა საერთო რაოდენობა}} \times 100$$

- გავრცელება ანუ სხვადასხვა სახეობის წარმომადგენელთა რიცხობრივი განაწილების მაჩვენებელი მოცემულ ერთეულში, გამოითვლება შემდეგი ფორმულის მიხედვით:

$$\text{გავრცელება} = \frac{x \text{ სახეობის წარმომადგენელთა საერთო რაოდენობა}}{\text{ნიმუშთა საერთო რაოდენობა სადაც } x \text{ სახეობა დაფიქსირდა}}$$

- შიდასახეობრივი მრავალფეროვნების ანუ ბიოტიპების სიხშირის მაჩვენებელი შემდეგნაირად დადგინდა:

$$\text{ბიოტიპები (\%)} = \frac{x \text{ სახეობის წარმომადგენელთა საერთო რაოდენობა}}{x \text{ სახეობის ბიოტიპების რაოდენობა}} \times 100$$

## 2.5. ბიოტექნოლოგიური თვისებების შესწავლა

შემდგომი კვლევებისთვის მაწვნიდან გამოყოფილი რძემჟავა ბაქტერიების გენეტიკური დახასიათების საფუძველზე იდენტიფიცირებული ბიოტიპებიდან შერჩეულ იქნა 36 შტამი. წარმოებისთვის მნიშვნელოვანი, საზოგადოდ აღიარებული როგორც უსაფრთხო სახეობების: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* sunsp. *lactis*, *St. thermophilus* და პოტენციურად პრობიოტიკული სახეობის *Lb. rhamnosus*-ის წარმომადგენელი შტამები შერჩეულ იქნა წარმომადგენლობითი ბიოტიპების და გეოგრაფიული ადგილ-წარმოშობის განაწილების გათვალისწინებით.

### 2.5.1. აციდოფიკაციის სიჩქარის განსაზღვრა

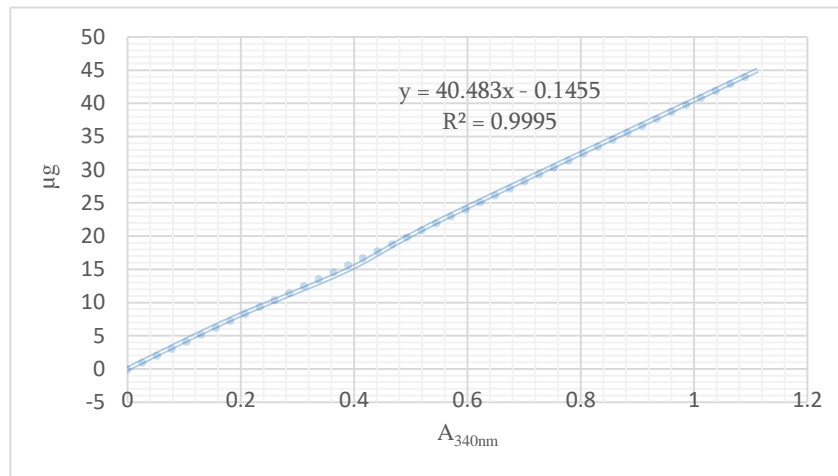
შტამების მიერ ლაქტოზას ფერმენტაციის სიჩქარის შეფასება რძის მჟავიანობის განსაზღვრის მეთოდით განხორციელდა. შერჩეული შტამები გადაგვაქვს სტერილურ გამოხდილ რძეში (SSM), 2%-იანი ინაკულუმით და თავსდება თერმოსტატში 42°C-ზე 18 საათის განმავლობაში. შემდგომ მიღებული ადრეული სტაციონალური ფაზის კულტურების 1%-იანი ინაკულუმის გადაგტანა ხდება 42°C-ზე შემთბარ, 80მლ გამოხდილ სტერილურ რძეში. რძის საწყისი pH განისაზღვრება როგორც ათვლის ნულოვანი წერტილი. ბაქტერიული კულტურების მეტაბოლური პროცესებით განპირობებული pH-ის ცვლილება, განისაზღვრება ავტომატური აღრიცხვის ფუნქციით აღჭურვილი pH-მეტრით, სადაც სინჯის მჟავიანობის ფლუქტუაცია ფიქსირდება ყოველი 2 წუთის განმავლობაში. შედეგად ვიღებთ აციდოფიკაციის სიჩქარის განმსაზღვრელ ზუსტ მრუდებს, საიდანაც შესაძლებელია რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარის ( $V_{max}$ ) გამოთვლა.

### 2.5.2. პროტეოლიზური აქტივობა

ბაქტერიული შტამის პროტეოლიზური აქტივობა განისაზღვრება O-ფთალდიალდეჰიდით (O-phthaldialdehyde) სპექტროფოტომეტრული შეფასების მეთოდით (Church *et al.* 1983).

შესაბამის საკვებ არეებში (MRS, M17) კულტივირებული ადრეული სტაციონალური ფაზის შტამების 200მკლ გადაგვაქვს 6მლ SSM-ში. 42°C-ზე 18სთ-იანი ზრდის შემდეგ, ხდება 200მკლ კულტურის რეინოკულაცია 6მლ სტერილურ გამოხდილ რძეში. 42°C-ზე 48 სთ-იანი ზრდის შემდეგ ბაქტერიული კულტურების შემცველი გამოხდილი რძის ჰომოგენიზაცია ხორციელდება ვორტექსირების საშუალებით. მიღებული ჰომოგენატის 2.5მლ გადაგვაქვს სტერილურ სინჯარაში, სადაც ემატება 0.5მლ დეიონიზირებული წყალი და 5მლ ტრიქლორმმარმჟავა (T.C.A, 0.72N), 10წთ-განმავლობაში შენჯღრევის შემდეგ და ნარევი ცენტრიფუგირდება 4500g-ზე 10 წთ განმავლობაში. მიღებული სუპერნატანტის 50მკლ გადაიტანება კვარცის კიუვეტში და ემატება 1მლ OPA-ს ხსნარი (Na-ტეტრაბორატი 0.1M, SDS 20%,  $\beta$ -მერკაპტოეთანოლი, O-ფთალდიალდეჰიდი, დეიონიზირებული წყალი). სინჯები იზომება OPA რეაქტივის დამატებიდან ზუსტად ორ წუთში, 340ნმ სიგრძის ტალღაზე სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით. საკალიბრაციო მრუდის მზადდება გლიცინის

სტანდარტების გამოყენებით (იხილეთ დიაგრამა 1.). ექსპერიმენტი მიმდინარეობს დუბლიკატების და კონტროლის თანაობით. შედეგები გამოსახება თავისუფალი  $\alpha$ -ამინომჟავის მკგ/მლ რაოდენობაში.



დიაგრამა 1. გლიცინის სტანდარტული მრუდი. თავისუფალი ამინომჟავების კონცენტრაცია ( $y_{\text{ამინო}}$ ) გამოითვლება ფორმულით  $y_{\text{ამინო}}=40.48x-0.145$ , სადაც  $x$  - ამინომჟავების მოლური კონცენტრაციაა

### 2.5.3. ვისკოზურობის შეფასება

ფერმენტაციის შედეგად მიღებული, რძის კოლტის კონსისტენცია ფასდება მისი ვისკოზურობის მაჩვენებლის მიხედვით. ვისკოზურობა განისაზღვრება მონოკულტურის მეშვეობით, გამოხდილი რძის 18 საათიანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებული ნადედიტ. კოლტის გაციების შემდეგ 4°C-ზე, ვისკოზურობის შემოწმება ხდება ვისკოზომეტრის საშუალებით, როტაციის სიჩქარის გრადიენტით 10-დან 100 rpm-მდე, შესაბამისი სპინდელის გამოყენებით, (Myr VR 3000, Viscotech Hispania, Tarragona). რბემჟავის (Merck Chemicals) საშუალებით შედეგებული გამოხდილი რძე (pH 4.6) გამოიყენება კონტროლად.

### 2.6. რბემჟავა ბაქტერიების ფაგომგრძნობელობის და ლიზოგენურობის შესწავლა

პოტენციური დედო კულტურებიდან ლიზოგენური შტამების გამორიცხვდა და მათი ფაგორეზისტენტულობის შეფასება საწარმოო სტარტერული კულტურების ვალიდაციისთვის აუცილებელი საფეხურია. ხოლო პროდუქტში არსებული არასასურველი მიკროორგანიზმების მიმართ (*Enterococcus spp.*) აქტიური ფაგების გამოვლენა, მათი ბიოკონტროლის საშუალებების შეფასების საშუალებას გვაძლევს.

### 2.6.1. დედო კულტურების ფაგორეზისტენტულობის განსაზღვრა

საწარმოო შტამების შერჩევისას უმნიშვნელოვანესია მათი ფაგების მიმართ მგრძობელობის დადგენა (Giraffa *et al.* 2018). შესაბამის საკვებ არეში (MRS/Ca<sup>2+</sup> და M17/Ca<sup>2+</sup>) 2%-იანი ინაკულუმით ინიცირებული, ადრეული სტაციონალური ფაზის (42°C, 18სთ) კულტურაში, შეგვაქვს ფაგის ლიზატი. შეტანილი ლიზატის რაოდენობა შეადგენს საბოლოო მოცულობის 5%-ს. ფაგ-ინფიცირებული კულტურები ინკუბირდება 42°C-ზე და რეგულარულ ინტერვალებში, ვიზუალური შეფასებით, ხდება ბაქტერიული ნაზარდის სიმღვრივის მონიტორინგი. ამისთვის ყოველ 1 საათში სინჯების სიმღვრივე დარდება შესაბამის კონტროლს: შტამის 2% ინოკულუმს შესაბამის საკვებ არეში MRS/Ca<sup>2+</sup> ან M17/Ca<sup>2+</sup>, ფაგის გარეშე. შეუფერხებელი ზრდის შემთხვევაში, კულტურები ექვემდებარება სუბკულტივაციას და ზრდის მონიტორინგი მიმდინარეობს შემდგომი 18 სთ-ს განმავლობაში. ლიზისის გამოვლენის შემთხვევაში, ექსპერიმენტი მეორდება ლიზატის სერიული განზავებების გამოყენებით.

ექსპერიმენტისთვის გამოყენებულ იქნა ფურაჟის და რძის პროდუქტების კვლევის ცენტრი, ლოდი, იტალია (CRA-FLC)-ის მიერ მოწოდებული შვიდი *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* სპეციფიკური, სამი-*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და ხუთი -*St. thermophilus* ლიტიური ბაქტერიოფაგი. გამოყენებული ფაგების და მათი პატრონი უჯრედების ჩამონათვალი იხილეთ ცხრილ 5.-ში.

პატრონი ბაქტერიული კულტურა	ბაქტერიოფაგი	კოლექცია
<i>St. thermophilus</i> 386	ფ33	CRA-FLC
<i>St. thermophilus</i> 385	ფ32	CRA-FLC
<i>St. thermophilus</i> 592	ფ592/2	CRA-FLC
<i>St. thermophilus</i> 593	ფ593/2	CRA-FLC
<i>St. thermophilus</i> 399	ფ46	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 342	ფPS9	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 342	ფPS17	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 342	ფAG14	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 342	ფAG8	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 342	ფAI13	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 342	ფAI9	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 1839	ფLP93042	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 1839	ფLP93050	CRA-FLC
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V	ფBYM	CRA-FLC



ცხრილი 5. რძემჟავა კულტურების მგრძობელობის დასადგენად გამოყენებული ფაგების და მათი პატრონი უჯრედების ჩამონათვალი

## 2.6.2. ლიზოგენური კულტურების გამოვლენა პროფაგის ინდუქციის გზით




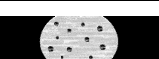


სტაციონალური ფაზის ბაქტერიული კულტურის 200მკლ გადაგვაქვს 4800მკლ 5mM/მლ  $\text{CaCl}_2$  შემცველ შესაბამის სტერილურ თხევად საკვებ არეში (MRS/ $\text{Ca}^{2+}$ , M17/ $\text{Ca}^{2+}$ , BHI/ $\text{Ca}^{2+}$ ). კულტივაცია მიმდინარეობს ტესტ-კულტურის ზრდის ოპტიმალურ პირობებში ექსპონენციალური ფაზის მიღწევამდე (2-4სთ). შემდეგ ნაზარდს საბოლოო კონცენტრაციით 0.1მკგ/მლ ემატება Mitomycin C და ინკუბირდება 24 საათის განმავლობაში. რეგულარულ ინტერვალებში, ვიზუალური შეფასებით, ხდება ბაქტერიული ნაზარდის სიმღვრივის მონიტორინგი. ამისთვის მესამე, მეექვსე, მე-18სთ-ზე და ინკუბაციის დასრულებისას სინჯების სიმღვრივე დარდება შესაბამის Mitomycin C-ით დაუმუშავებელ კონტროლს. ბაქტერიული ზრდის შეფერხება, რაც გამოიხატება კონტროლთან შედარებით სინჯის სიმღვრივის კლებაში, პროფაგის ინდუქციის ინდიკატორია. ასევე 24სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ სინჯები იფილტრება 0.45მკმ სტერილური მემბრანული ფილტრით. მიღებულ ფილტრატებში ინდუცირებული ფაგის გამოვლენა წვეთის მეთოდის გამოყენებით ხდება, სადაც ინდიკატორულ კულტურებად კოლექციაში არსებულ შესაბამისი სახეობის ფაგომგრძობიარე შტამები და თავად ტესტ-კულტურები გამოიყენება.

### წვეთის მეთოდი

თხევად საკვებ არეში კულტივირებული ადრეული სტაციონალური ფაზის კულტურების 5მკლ დაიტანება წინასწარ გამზადებულ აგარიან პეტრის ფინჯნებზე. დატანა ხდება წვეთის დაშვების ან ზოლის გავლების ტექნიკის გამოყენებით. დატანილ კულტურებზე ხდება 10მკლ-ს ბაქტერიოფაგის სუსპენზიის დაწვეთება („გარეშე ლიზისის“ ალბათობის შესამცირებლად სუსპენზიაში ფაგების ტიტრი არ უნდა აღემატებოდეს  $10^6$  უკწე/მლ). პეტრის ფინჯნების ინკუბაცია მიმდინარეობს ტესტ-კულტურის ზრდის ოპტიმალურ პირობებში 18-48სთ განმავლობაში. ბაქტერიოფაგის დატანის ზონაში ბაქტერიული ზრდის ინჰიბიცია განისაზღვრება როგორც ფაგის ლიზისური აქტივობა. ინჰიბიციის ზონების ინტერპრეტაცია და ჩაწერა

მიმდინარეობდა სურათ 7-ზე მოცემული სქემის მიხედვით (Kutter and Sulakvelidze 2004)

სურათი 7. წვეთის მეთოდის გამოყენებით მიღებული შედეგების (ფაგის ლიზისური

მოქმედების ზონის აღწერა	ზონების გრაფიკული მაგალითი	ინტერპრეტაცია	აღნიშვნა
სრული ლიზისი, ფაგის მოქმედების ზონა გამჭვირვალეა		მგრძობიარე	5
ნახევრადსრული ლიზისი, მოქმედების უბანზე აღინიშნება რეზისტენტული ბაქტერიული კოლონიების ზრდა		მგრძობიარე	4
არასრული ლიზისი, მოქმედების ზონა დაბურულია, უბანზე გამოხატულია მეორადი ბაქტერიული ზრდა		მგრძობიარე	3
მოქმედების უბანზე აღინიშნება მეორადი ბაქტერიული ზრდა და ცალკეული ბაქტერიული კოლონიების ფორმირება		მგრძობიარე	2
გამოხატული ფაგური კოლონიების ფორმირება ბაქტერიული შტამის ნაზარდზე		მგრძობიარე	1
ფაგის მოქმედების ზონაზე უწყვეტი ბაქტერიული ნაზარდი, მოქმედების უბანში არ ფიქსირდება ბაქტერიული ზრდის შეფერხების ნიშნები		რეზისტენტული	0


აქტივობის ზონების) ინტერპრეტაცია და ჩაწერის სქემა.

წვეთის მეთოდის გამოყენებით ხდება ბაქტერიული შტამების ფაგომგრძობელობის დადგენა, *de novo* ბაქტერიოფაგის გამოვლენა და ფაგების მოქმედების სპექტრის დადგენა.

### 2.6.3. *Enterococcus* spp. სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, გასუფთავება და კონცენტრირება

გამდიდრების მეთოდით ფაგის გამოსაყოფად აუცილებელია სამიზნე ბაქტერიული კულტურის შერჩევა და შესაბამისი სინჯის მოპოვება.

სავარაუდო ფაგის შემცველი სინჯები ზავდება შესაბამისი კონცენტრაციის თხევად BHI (Oxoid) საკვებ არეში, რათა მივიღოთ 100მლ 1X BHI სინჯის სუსპენზია. სუსპენზიას ემატება სტაციონალური ფაზის სამიზნე ბაქტერიების 200მკლ და ნარევი ინკუბირდება 37°C-ზე 18სთ განმავლობაში. ინკუბაციის დასრულების შემდეგ სუსპენზია იფილტრება 0.45მკმ ფორის ზომის სტერილურ მემბრანულ ფილტებში. მიღებული სუსპენზიიდან ფაგის გამოვლენა წვეთის მეთოდის გამოყენებით ხდება. ლიზისური აქტივობის არსებობის შემთხვევაში, ფაგური კოლონიების გამოსავლენად, სინჯი გრაციას მეთოდით იტიტრება.

 გრაციას მეთოდი:

სტერილურ რინგერის ხსნარში მზადდება სინჯის სერიული 10-ჯერადი განზავება ( $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ ). ადრეული სტაციონალური ფაზის კულტურების 200მკლ და სინჯის თითოეული განზავებების 1მლ შეგვსავს 4მლ, თბილ ( $\sim 39^{\circ}\text{C}$ ) ნახევრად თხევად BHI აგარში (აგარის შემცველობა 0.6%). ნელი შენჯღრევის შემდეგ მოცემული ნაზავი გადაიტანება წინასწარ გამზადებულ BHI აგარის პეტრის ფინჯნებზე, მეორე ფენად. პეტრის ფინჯნების ინკუბაცია 18სთ-ის განმავლობაში  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე მიმდინარეობს. ინკუბაციის შემდეგ ბაქტერიულ ნაზარდზე წარმოიქმნება ფაგური ანუ უარყოფითი კოლონიები (Gratia 1936).

*გრაციას მეთოდი გამოიყენება კონცენტრირებული ფაგური ლიზატის დასამზადებლად, კონცენტრატის ტიტრის დასადგენად და სუფთა ფაგური ხაზის მიღების პროცესში.*

#### **ფაგური კოლონიის გასუფთავება:**

ფაგური ხაზის გასასუფთავებლად, მიღებული უარყოფითი კოლონიების თითოეული მორფოტიპი სტერილური ნემსის საშუალებით გადაიტანება 2მლ სტერილურ BHI-ში, 1სთ განმავლობაში ყოვლზე  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე, შემდგომ ემატება 20მკლ ქლოროფორმი და თავსდება  $4^{\circ}\text{C}$ -ზე 2სთ-ით. ამის შემდეგ კოლონიის შემცველი სუსპენზია კვლავ იტიტრება გრაციას მეთოდით. სუფთა ფაგური ხაზის მისაღებად მოცემული პროცედურა მეორდება 5-ჯერ (Adams 1959).

#### **კონცენტრირებული ლიზატის დამზადება:**

ფაგის კონცენტრირებული ლიზატის დასამზადება გრაციას მეთოდზე დაფუძნებით ხდება. მიღებული სერიიდან შეირჩევა უარყოფითი კოლონიების „ბადის“ მსგავსი განაწილების მქონე ფინჯნები. მოცემულ ფინჯნებზე ინფექციების მრავლობითობის პროპორცია იძლევა აგარში იმობილიზირებული სიცოცხლისუნარიანი ვირიონების მაქსიმალურ კონცენტრაციას. ამგვარი ფინჯნებიდან ზედა შრე გადაიტანება სტერილურ სინჯარაში შემდგომი ცენტრიფუგირებით 6000 გ -ზე 30 წთ განმავლობაში. სუპერნატანტი იფილტრება 0.22 მკმ ზომის მემბრანულ ფილტრში. მიღებული ლიზატის ტიტრის დადგენა კვლავ გრაციას მეთოდის გამოყენებით ხდება, ფაგური კოლონიების ანუ ე.წ. უარყოფითი კოლონიის წარმომქმნელი ერთეულების (უკწე) დათვლის გზით. ამისთვის ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$ )

განზავებების სერიიდან შეირჩევა 30-300 უკწე შემცველი ფინჯნები. ლიზატის ტიტრი გამოითვლება შემდეგი ფრომულის მიხედვით:

$$\text{უკწე/მლ} = \frac{\text{უარყოფითი კოლონიების რაოდენობა}}{\text{განზავება } X \text{ შეტანილი ფაგის მოცულობა (მლ)}}$$

#### 2.6.4. *De novo* ბაქტერიოფაგების დახასიათება

ბაქტერიოფაგის კაფსიდის მორფოლოგიის დასადგენად, კონცენტრირებული ლიზატის სინჯის ვიზუალიზაცია ურანილ აცეტატის მეთოდზე დაფუძნებული ტრანსმისიური ელექტრონული მიკროსკოპიის (მოდელი - JEOL JEM 1400) მეშვეობით განხორციელდა (Ackermann 2009).

*De novo* ბაქტერიოფაგების მოქმედების სპექტრის შესასწავლად გამოყენებული იქნა კვლევის პროცესში მიღებული *E. faecium*, *E. faecalis* *E. durance* შტამები და გ. ელიავას სახ. ინსტიტუტის კოლექციაში არსებული *Enterococcus* spp. 46 კლინიკური იზოლატი. პატრონი უჯრედის ლიზისის სტაბილურობის შესაფასებლად გამოყენებული იქნა მოდიფიცირებული აპელმანის მეთოდი (Appelmans 1921). თითოეულ ექსპონენციალურ ფაზის პატრონ კულტურას ემატება შესაბამისი ფაგის ლიზატი ინფექციის მრავლობითობით (ი.მ.) - 0.1. (ი.მ. 0.1 ინფიცირებისას - ორი ან მეტი ფაგური ნაწილაკით ერთი ბაქტერიული უჯრედის ინფიცირების ალბათობა პოპულაციის მხოლოდ 0.5%-ზე ვრცელდება, შესაბამისად გარეშე ლიზისის და ცრუ-დადებითი შედეგის მიღება არაალბათური ხდება). ინფიცირებული კულტურები და შესაბამისი არაინფიცირებული კონტროლები ინკუბირდება თერმოსტატ-შიეიკერზე 150rpm, 37°C-ზე 24სთ-ის განმავლობაში. რეგულარულ ინტერვალებში, ვიზუალური შეფასებით, ხდება ბაქტერიული ნაზარდის სიმღვრივის მონიტორინგი.

#### 2.6.5. *Enterococcus* spp. ფაგომგრძნობელობის განსაზღვრა

*Enterococcus*-ის შტამების ფაგომგრძნობელობის დასადგენად გამოყენებული იქნა წვეთის მეთოდი. ექსპერიმენტში ჩართული იქნა გ. ელიავას სახ. ინსტიტუტის კოლექციაში არსებული *Enterococcus* სპეციფიკური, vB\_GEC-EfM\_9 (*Myoviridae*, პატრონი შტამი: *E. faecalis* 106-კლინიკური იზოლატი) და vB\_GEC-EfS\_4 (*Syphoviridae*, პატრონი შტამი: *E. faecium* 14-კლინიკური იზოლატი) ლითიური ბაქტერიოფაგები და მრავალკომპონენტიანი კომერციული ფაგური პრეპარატის „ინტესტი-

ბაქტერიოფაგის“ ორი სერია: INTESTI/R-022601#76(2017) და INTESTI/R-022601#86(2018), *Enterococcus* სპეციფიკური კომპონენტის შემცველობით არანაკლებ  $10^5$  უჯრე/მლ). ხოლო უარყოფითი კონტროლისთვის შერჩეულ იქნა *Salmonella enterica* სპეციფიკური GE\_vB\_BS ბაქტერიოფაგი. ასევე გამოყენებული იქნა კვლევის პროცესში მიღებული *de novo* ბაქტერიოფაგები.

## 2.7. პრობიოტიკული პოტენციალის შეფასება

პრობიოტიკული პოტენციალის შესასწავლად შერჩეულ იქნა *Lb. rhamnosus*-ის სახეობის წარმომადგენელი შტამები.

### 2.7.1. ნაღვლის მიმართ რეზისტენტობა

პრობიოტიკური მიკროორგანიზმების ზრდა არ უნდა ფერხდებოდეს გარემოში ნაღვლის თანაობისას. ამის დასადგენად ხდება ნაღვლის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში, შტამის ზრდის პროცენტობის შეფასება (Vinderola and Reinheimer 2003). MRS თხევად საკვებ არეში გაზრდილი, ადრეული სტაციონალური ფაზის კულტურების 3მლ ცენტრიფუგირდება 7000გ-ზე, 5წთ განმავლობაში 4°C-ზე, რის შედეგადაც მიღებული პრეციპიტატი სამჯერ ირეცხება სტერილურ ფიზიოლოგიური ხსნარში. მიღებული ბაქტერიული კულტურები გადაიტანება 0.3% 0.5% და 1% ნაღვლის (წონა/მოცულობაზე) (Bovine Bile Salts, Sigma) შემცველ MRS თხევად საკვებ არეში. 24სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ ნაზარდის ადსორბცია იზომება 560ნმ-ზე. ექსპერიმენტი მიმდინარეობს დუბლიკატების და ნაღვლისგან თავისუფალი კონტროლების თანაობით. დასამოწმებლად გამოყენებულ იქნა CRA-FLC-ის მიერ მოწოდებული პრობიოტიკული შტამი *Lb. Plantarum* 790.

ნაღვლის მიმართ რეზისტენტობა გამოითვლება შემდეგი ფორმულის მეშვეობით:  
 $\%R=(A560BILE/A560control) \times 100$ , სადაც:

- A560BILE - ნაღვლის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში კულტივირებული შტამები ადსორბცია 560ნმ-ზე
- A560control - ნაღვლის დამატების გარეშე კულტივირებული კონტროლის ადსორბცია 560ნმ-ზე

## 2.7.2. ნაღვლის მარილების დაშლა

შტამების მიერ ნაღვლის მარილების: ტეუროდეოქსიქლორატის და გლიკოდეოქსიქლორატის დაშლის უნარის შესაფასებლად გამოყენებული იქნა ინდიკატორული საკვები არეების მეთოდი (Zago *et al.* 2011).

გამოყენებული საკვები არეები: MRS აგარი-კონტროლი; MRS აგარს დამატებული 0.37გ/ლ CaCl<sub>2</sub> და 5გ/ლ ტეუროდეოქსიქლორატის მჟავა (TDCA-Taurodeoxycholate acid) და ასევე MRS აგარს დამატებული 0.37გ/ლ CaCl<sub>2</sub> და 5გ/ლ გლიკოდეოქსიქლორატის მჟავა (GDCA-Glicodeoxycholate acid)-ინდიკატორი არეები.

თითოეულ საკვებ არეზე დაიტანება 10მკლ სტაციონალური ფაზის კულტურა, ინკუბირდება 37°C-ზე, 72სთ-ის განმავლობაში, ანაერობულ პირობებში. CRA-FLC-ის მიერ მოწოდებული პრობიოტიკული შტამი *Lb. Plantarum* 813 გამოყენებული იქნა დადებით კონტროლად. მიღებული შედეგების ინტერპრეტაცია ხდება კოლონიის ზრდის მახასიათებლების მიხედვით.

## 2.7.3. ჰიდროფობულობა

შტამის უჯრედულ კედელზე ნახშირწყალბადების ადჰეზია შეფასებულ იქნა როგორც ბაქტერიის ჰიდროფობულობა (%(H)) n-ჰექსადეკანის (n-hexadecane) მეთოდის გამოყენებით (Vinderola and Reinheimer 2003). MRS თხევად საკვებ არეში, 18სთ-იანი ზრდის 2მლ ბაქტერიული კულტურა გადაიტანება 15მლ სტერილურ სინჯარაში. ცენტრიფუგირდება 9500გ-ზე 5წთ, 5°C-ზე. სუპერნატანტის მოშორების შემდეგ, ბაქტერიული მასა რესუსპენდირდება 60mM კალიუმის ორთოფოსფატის ხსნარში. სუსპენზიის ადსორბცია იზომება 560ნმ და წარმოადგენს A<sub>0</sub>-ს. სუსპენზიის 3მლ გადაიტანება სტერილურ სინჯარაში და ემატება 600მკლ n-ჰექსადეკანი, შენჯღრევის შემდეგ ინკუბირდება 1სთ განმავლობაში 37°C-ზე. ინკუბაციის შემდეგ სინჯის ადსორბცია იზომება 560ნმ-ზე და აღინიშნება როგორც A<sub>f</sub>. ჰიდროფობულობა გამოითვლება შემდეგი ფორმულის მიხედვით:  $\% (H) = ((A_0 - A_f) / A_0) \times 100$ . ექსპერიმენტი მიმდინარეობს დუბლიკატებით. საკონტროლო შტამის სახით გამოყენებულ იქნა *Lb. Plantarum* 790.

#### 2.7.4. საფუვრის უჯრედზე აგლუტინაცია

შტამების მანოზა-სპეციფიკური ადჰეზიის უნარის შეფასება *Sacharomyces cerevisiae*-ს უჯრედების აგლუტინაციის მეთოდის გამოყენებით განხორციელდა (Zago et al. 2011).

საცდელი კულტურების მომზადება: 10მკლ შტამის გადატანა ხდება 100მლ MRS თხევად საკვებ არეში, ინკუბაცია-18სთ-ის განმავლობაში. 20 მკლ *Sacharomyces cerevisiae* გადაიტანება 200მლ YPD-ში (Sigma-Aldrich), ინკუბაცია 28°C ზე, 1-3 სთ, სანჯღრეველა თერმოსტატში. 9მლ ბაქტერიული და საფუვრის კულტურები ცენტრიფუგირდება 7000g-ზე 10 წუთის განმავლობაში. საფუარი ირეცხება 1მლ ფოსფატის ბუფერში (PBS) და ზავდება 1%-იანი კონცენტრაციით PBS-ში. ბაქტერიული შტამი ზავდება 2მლ PBS-ში. 100მკლ საფუარს ემატება 50მკლ ბაქტერიული სუსპენზია და 50მკლ PBS-ი ან 50მკლ მეთილ- $\alpha$ -D-მანიპეპრანოზიდი (methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, Sigma), საბოლოო შემცველობით ხსნარში 100mM. 100მკლ საფუარს დამატებული 100მკლ PBS გამოიყენება უარყოფით კონტროლად. სინჯები გადაიტანება მიკროფინჯნებში. მიკროფინჯნები თავსდება 30 წთ-ის განმავლობაში სანჯღრეველა-თერმოსტატზე 28°C-ზე. აგლუტინაციის შედეგების ვიზუალიზაცია ხდება ნათელი-ფაზის სინათლის მიკროსკოპის საშუალებით X40 გადიდებაზე. CRA-FLC-ის მიერ მოწოდებული *Lb. plantarum* 790 და *Lb. helveticus* 37 კულტურები გამოყენებულ იქნა შესაბამისად ადჰეზიის მქონე და არმქონე კონტროლ შტამებად.

#### 2.8. მაწვნის დედოს კონსტრუირება

მიღებული მონაცემების შეჯამების შემდეგ, საცდელი მაწვნის დედოს კომბინაციების კონსტრუირებისთვის შერჩეულ იქნა 14 შტამი, მათ შორის *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus* -ის წარმომადგენელი სამ-სამი შტამი და *Lb. rhamnosus*-ის ხუთი შტამი.

##### 2.8.1. ანტაგონისტური აქტივობის დადგენა

შერჩეულ შტამებს შორის ურთიერთ-ანტაგონიზმის გამოსარიცხად გამოყენებულ იქნა ბაქტერიულ ნაზარდზე დაწვეთების მეთოდი (Jacobsen et al. 1999). ადრეული სტაციონალური ფაზის კულტურების 200მკლ შეგვაქვს 4მლ, თბილ SSM ნახევრად თხევად აგარში (აგარის შემცველობა 0.7%). შენჯღრევის შემდეგ მოცემული სუსპენზია

გადაგვაქვს წინასწარ გამზადებულ SSM აგარის პეტრის ფინჯნებზე, მეორე ფენად. სტაციონალური ფაზის ბაქტერიული კულტურის 10მკლ-ს ვაწვეთებთ აგარის ზედაპირზე. პეტრის ფინჯნების ინკუბაცია ხდება ანაერობულად 48სთ-ის განმავლობაში 42°C-ზე. ექსპერიმენტი ტარდება დუბლიკატებით, სტერილური MRS და M17 თხევადი არეები გამოიყენება კონტროლად. ბაქტერიული გაზონის ან დაწვეთებული შტამის ზრდის ინჰიბიცია განისაზღვრება როგორც ანტაგონისტური აქტივობა.

### **2.8.2. კომბინაციების აციდოფიკაციის სიჩქარის განსაზღვრა**

SSM-ში ნაზარდი ადრეული სტაციონალური ფაზის კულტურების კომბინაციები გადაიტანება 42°C-ზე შემთბარ, 80 მლ გამოხდილ სტერილურ რძეში, თითოეული შტამის 1%-იანი ინოკულუმით. რძის საწყისი pH-ი განისაზღვრება როგორც ათვლის ნულოვანი წერტილი. pH-ის ცვლილება, ფიქსირდება ინოკულაციიდან 1, 3 და 6 საათის შემდეგ, pH-მეტრის გამოყენებით.

### **2.8.3. კულტურების კომბინაციების ნადედის ორგანოლეპტიკური პროფილის შეფასება**

მაწვნის სინჯები დამზადებულ იქნა შემდეგნაირად: SSM-ში ნაზარდი ბაქტერიული კულტურების გადატანა ხდება 200მლ, 3%-იანი ცხიმინობის მქონე პასტერიზირებულ რძეში, დედოს საერთო ინოკულუმის 2%-იანი შემცველობით. პროდუქტი 3 საათის თავსდება 44°C-ზე. კოლტის წამოქმნის შემდეგ, სინჯები გადაგვაქვს 4°C-ზე 18-საათით. მიღებული მაწვნის სენსორული პროფილი შეფასებული იქნა 10 მოხალისის მიერ, ისეთი ორგანოლეპტიკურ მახასიათებლების მიხედვით როგორცაა: ტკბილი, მჟავე, მწარე, რძის, იოგურტის თუ ყველის მსგავსი სურნელი და გემო, კოლტის კონსისტენცია, სიმყარე, ერთგვაროვნება და სტრუქტურა.

## **2.9. საპილოტო-საწარმო ექსპერიმენტი**

შერჩეული დედო კულტურა გამოყენებული იქნა საპილოტო-საწარმო ექსპერიმენტისთვის. მაწვნის კომერციულ საწარმოში მოხდა ჩვენს მიერ კონსტრუირებული დედო კულტურის გამოცდა, 200ლ რძის შესადედებლად. ექსპერიმენტი განმეორდა სამჯერ.

-80°C-ზე დეპონირებული კოლექციიდან შერჩეული კულტურების გაღვივებისთვის, 10მკლ ბაქტერიული კულტურის გადატანა ხდება 30მლ MRS ან M17



თხევად საკვებ არეში. შტამები ინკუბირდება 42°C-ზე 12 სთ განმავლობაში, შემდეგ გადაიტანება 1ლ წინასწარ შემთბარ, 1.5% პასტერიზირებულ რძეში და ყოვნდება 3 სთ განმავლობაში 44°C-ზე. კოლტის წარმოქმნის შემდეგ, ნადედი ინახება 4°C-ზე, არაუმეტეს 6 საათისა. ნადედის სერიული განზავებების სელექტიურ არეებზე გათესვის მეშვეობით, ხდება რძემჟავა ბაქტერიების შესაბამისი ტიტრის განსაზღვრა და კონტამინაციის გამორიცხვა.

დედოს ტრანსპორტირება საწარმოში შესაბამისი ტემპერატურული პირობების დაცვით ხდება. ძროხის 200ლ პასტერიზებული რძე შედედებულ იქნა 2%-იანი ცოცხალი დედოს ინოკულუმით. ფერმენტაცია მიმდინარეობდა მწარმოებლის სტანდარტული პროცედურული განაწესის მიხედვით (MilkoFood<sup>LTD</sup>), მაწვნის დამზადებისთვის სავალდებულო პირობების დაცვით. პროდუქტის °T, pH-ს და ცოცხალი რძემჟავა ბაქტერიების კონცენტრაციის და კონტამინაციის მონიტორინგი მიმდინარეობდა ინოკულაციიდან 5სთ, 18 სთ და შემდგომი 14 დღის განმავლობაში. ამისთვის, თითოეული საწარმოო ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული ჩამოსხმული მაწვნების სიმრავლიდან, ხდებოდა დასაკვირვებელი სინჯების შემთხვევითი შერჩევა.

### **2.9.1. ტიტრირებადი მჟავიანობის დადგენა (°T)**

100მლ ჰომოგენიზირებულ სინჯს ემატება სამი წვეთი ფენოლფთალენის 1%-იანი სპირტხსნარი. მიღებული ხსნარი იტიტრება 0.1N NaOH-ით ხსნარის სუსტ ვარდისფერ შეფერილობამდე, რომელიც არ ქრება 1წთ-ის განმავლობაში. გამოყენებული 0.1N NaOH-ის რაოდენობა მლ-ში ექვივალენტურია °T-ს.

### **2.9.2. პროდუქტში ცოცხალი რძემჟავა კულტურების ტიტრის დადგენა და კონტამინაციის მონიტორინგი**

მაწვნის სინჯის 1მლ-ი გადაგვაქვს 9მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში და მზადდება სუსპენზიის ათჯერადი სერიული განზავებები. თითოეული განზავებიდან 500მკლ გადაიტანება სელექციურ საკვებ არეებზე და თანაბრად ნაწილდება პეტრის ფინჯნების ზედაპირზე. SSM, MRS და M17 აგარი გამოიყენება რძემჟავა კულტურების ტიტრის განსაზღვრისთვის, ხოლო BEA, Endo, Macconkey, Salmonella-Shigella (SS) სელექტიური და Sabouraud (Merck) აგარების მეშვეობით ხდება პროდუქტში კონტამინაციის მონიტორინგი. შესაბამის ზრდის პირობებში ინკუბაციის შემდეგ

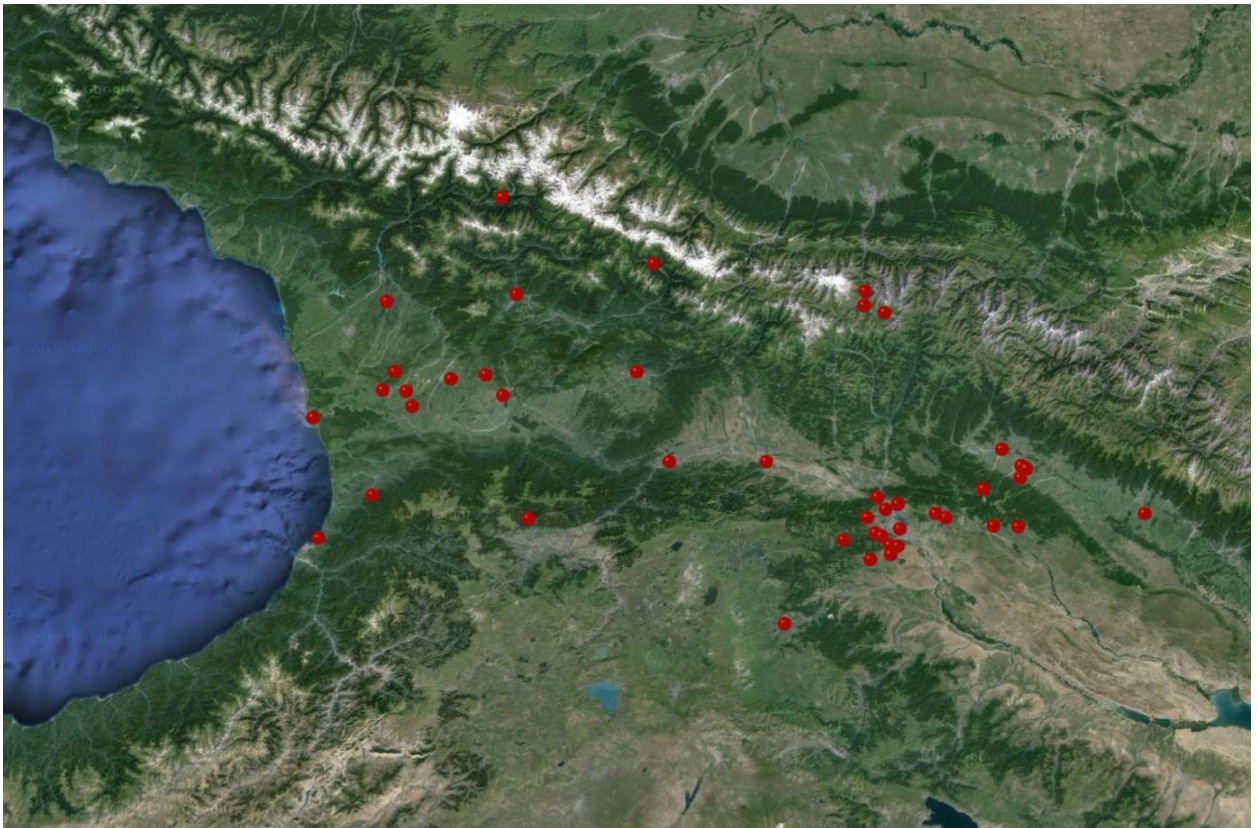
ხდება მონაცემების აღრიცხვა. სელექტიურ არეებზე გამოვლენილი ბაქტერიული კულტურების ტიტრი დგინდება შემდეგი ფორმულის მიხედვით:

$$\text{კწე/მლ} = \frac{\text{კოლონიების რაოდენობა}}{\text{განზავება X ინაკულუმის მოცულობა (მლ)}}$$

## თავი III. მიღებული შედეგები

### 3.1. მაწვნის სინჯების შეგროვება

2013-2015 წლების განმავლობაში, საქართველოს 10 რეგიონში, 46 სხვადასხვა წერტილში (სურათი 8.), შეგროვებულ იქნა ტრადიციული წესით დამზადებული 72 და 7 კომერციული მაწვნის სინჯი. სინჯების სრული სია მოცემულია ცხრილ 6.-ში.



სურათი 8. საქართველოს ლანდშაფტური რუკა. წითელი ნიშნულებით ნაჩვენებია მაწვნის მოპოვების გეოგრაფიული არეალები.

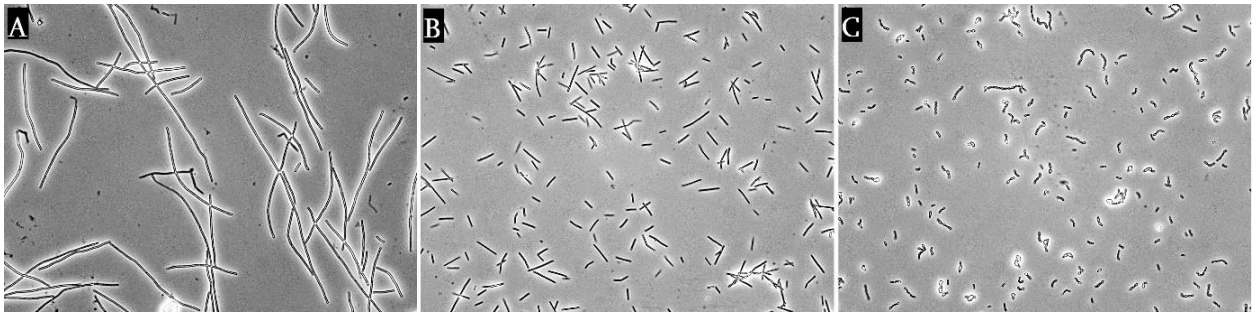
ნიმუში	მაწვნის ტიპი	წარმოშობის ადგილი	მიპოვების თარიღი
Abast1	ტრადიციული, ძროხის რძე	აბასთუმანი	2015
Aba1	ტრადიციული, ძროხის რძე	აბაშა	2013
Ala1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ალავერდი	2013
Asu1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ასურეთი	2014
Axa1; Axa2; Axa3; Axa4	ტრადიციული, ძროხის რძე	ახალსოფელი	2014
Gld2; Gld3; Gld4	ტრადიციული, ძროხის რძე	გლდანი (თბილისი)	2013; 2014
Gld1	ტრადიციული, ძროხის რძე	გლდანულა (თბილისი)	2014
Gom1	ტრადიციული, ძროხის რძე	გომბორი	2013
Gor1	ტრადიციული, ძროხის რძე	გორი	2014
Shal1; Shal2	ტრადიციული, ძროხის რძე	გულგულა	2014; 2015
SopD1	ტრადიციული, ძროხის რძე	დიდი დილომი (თბილისი)	2014
Dig1	ტრადიციული, ძროხის რძე	დილომი (თბილისი)	2014

Dma1; Dma2	ტრადიციული, ძროხის რძე	დმანისი	2013
Eki1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ეკი	2014
Tbi1; Tbi2; Tbi3; Tbi4	ტრადიციული, ძროხის რძე	ვაკე-საბურთალო (თბილისი)	2013; 2014
Var2	ტრადიციული, ძროხის რძე	ვარდისუბანი	2013
Tel1; Tel2; Tel3; Tel4; Tel5	ტრადიციული, კამეჩის რძე	თელავი	2014; 2015
Tele1	ტრადიციული, ძროხის რძე	თელეთი	2013
Khum1	ტრადიციული, ძროხის რძე	კუმისი	2014
Khu1	ტრადიციული, ძროხის რძე	კურდღელაური	2013
Kis1; Lis1; Lis2	ტრადიციული, ძროხის რძე	ლისი (თბილისი)	2014
Man1	ტრადიციული, ძროხის რძე	მანავი	2014
Martyol	ტრადიციული, ძროხის რძე	მარტყოფი	2014
Maxi1; Maxi2	ტრადიციული, ძროხის რძე	მახინჯაური	2015
Sva1; Sva2	ტრადიციული, ძროხის რძე	მესტია	2014; 2015
Mts1	ტრადიციული, ძროხის რძე	მცხეთა	2014
Nab1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ნაბადა	2013
Rach1; Rach2; Rach3; Rach4	ტრადიციული, ძროხის რძე	ონი	2015
Orb1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ორბეთი	2014
Sag1	ტრადიციული, ძროხის რძე	საგარეჯო	2014
Sach1	ტრადიციული, ძროხის რძე	საჩხერე	2013
Sen1; Sen2; Sen3; Sen4; Sen5	ტრადიციული, ძროხის რძე	სენაკი	2013; 2015
Sno1	ტრადიციული, ძროხის რძე	სნო	2015
St1; St2	ტრადიციული, ძროხის რძე	სტეფანწმინდა	2015
Tab1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ტაბახმელა (თბილისი)	2014
Pot1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ფოთი	2013
Kut2	ტრადიციული, ძროხის რძე	ქუთაისი	2014
San1; San2	კომერციული, ძროხის რძე	შ.პ.ს სანტე (თბილისი)	2014
MeM1	კომერციული, ძროხის რძე	შ.პ.ს. მე მარგო (თბილისი)	2014
Mil1; Mil2; Mil3	კომერციული, ძროხის რძე	შ.პ.ს. მილკო (თბილისი)	2014
Sop1	კომერციული, ძროხის რძე	შ.პ.ს. სოფლის ნობათი (თბილისი)	2014
F4	ტრადიციული, ძროხის რძე	ცხემი	2013
Tsalenj1	ტრადიციული, ძროხის რძე	წალენჯიხა	2014
Tsa1	ტრადიციული, ძროხის რძე	წალვერი	2013
Tso1	ტრადიციული, ძროხის რძე	წოდორეთი	2014
Tskh1	ტრადიციული, ძროხის რძე	წყალტუმნო	2014
Tskh2	ტრადიციული, ძროხის რძე	წყნეთი (თბილისი)	2014
Kha1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ხაშური	2013
Xon1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ხონი	2014
Ju1	ტრადიციული, ძროხის რძე	ჯუთა	2015

ცხრილი 6. შეგროვებული მაწვნის ნიმუშების აბრევიატურა, ტიპი, გეოგრაფიული ადგილ-  
წამომშობა და მოპოვების თარიღი.

### 3.2. მაწვნის დედო კულტურები

შერჩეული მიდგომის შედეგად, ჯამში გამოყოფილ იქნა 292 გრამ-დადებითი, კატალაზა-ნეგატიური, გასუფთავებული ბაქტერიული მონოკულტურა. მათ შორის 166 ჩხირისებრი, ხოლო 126 კოკოვანი ფორმა.



სურათი 9. წარმოდგენილია ნიმუში St1-დან (სტეფანწმინდა, 2015, ძროხის რძის მაწონი) გამოყოფილი სამი ბაქტერიული კულტურა. (A)-MRS თხევად არეში 18სთ-იანი ზრდის გრძელი ჩხირები; (B)-MRS თხევად არეში 18სთ-იანი ზრდის მოკლე ჩხირები; (C)-M17 თხევად არეში 18სთ-იანი ზრდის, საშუალო ზომის სტრეპტოკოკები. ვიზუალიზაცია: X40 გადიდების სინათლის-ფაზის მიკროსკოპია (Axioskop 40 HBO 50/AC, ZEISS).

### 3.3. კულტურათა იდენტიფიკაცია და გენოტიპირება

დნმ ექსტრაქცია Chelex-ის მეთოდის გამოყენებით 292 კულტურიდან განხორციელდა. მიღებულ დნმ-ზე დაფუძნებული, RAPD პჯრ-ის და შესაბამისი UPGMA დენდროგრამის აგების შედეგად გამოიკვეთა 10 უნიკალური RAPD პჯრ-ის ანაბეჭდის მქონე შტამი და 28 გენოტიპურად განსხვავებული UPGMA კლასტერი.

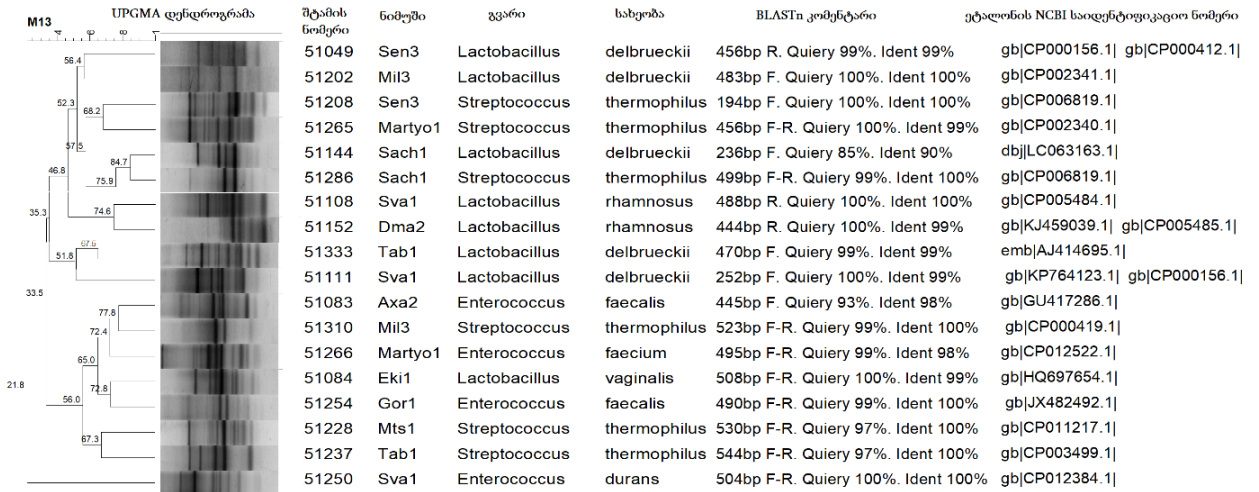
შტამები რომელთა RAPD ანაბეჭდები ერთმანეთის იდენტურია არანაკლებ >99%-ისა და ამავდროულად გამოყოფილია ერთი და იგივე ნიმუშიდან, მიიჩნევა დუბლირებულ იზოლატებად. ამგვარ იზოლატად 78 კულტურა განისაზღვრა. დუბლირებული კულტურების გამოცხრილვის შემდეგ, შემდგომი იდენტიფიკაცია 214 შტამისთვის განხორციელდა.

წინასწარი იდენტიფიკაციისთვის RAPD პჯრ-ის ანაბეჭდები შედარდა გენოტიპური პროფილების შიდა ელექტრონულ ბიბლიოთეკას (CRA-FLC-ის BioNumerics-ის „RAPD PCR M13 FINGERPRINTING“ მონაცემთა ბაზა), რომელიც მოიცავს ევროპის ტერიტორიაზე წარმოებული იოგურტების და ყველების დედო კულტურების დნმ ანაბეჭდებს. ბიბლიოთეკაში არსებული შტამების და მაწვნის კულტურების ანაბეჭდებს შორის სარწმუნო მსგავსება არ გამოვლინდა, რაც მიუთითებს მაწვნიდან გამოყოფილი კულტურების უნიკალურ გენოტიპურ პროფილებზე.

შემდგომი 16S რ-რნმ იდენტიფიკაციისთვის შეირჩა 18 ბაქტერიული კულტურა, რომლებიც მოიცავდა უნიკალური RAPD პროფილის და მსხვილი UPGMA კლასტერების წარმომადგენელ შტამებს. შედეგად 5 შტამი იდენტიფიცირებულ იქნა



როგორც *Lb.delbrueckii*-ის წარმომადგენელი, ხოლო 6 შტამი - *St. thermophilus*, 2 შტამი - *Lb.rhamnosus*, 1 - *Lb.vaginalis*, 1 - *E.durance*, 1 - *E.faecium* და 2 - *E.faecalis*-ი აღმოჩნდა. დაწვრილებითი ინფორმაცია 16S რ-რნმ იდენტიფიცირებული კულტურების შესახებ მოცემულია სურათი 10.-ში.



სურათი 10. 16S რ-რნმ იდენტიფიცირებული მაწვნის კულტურები. ნაჩვენებია მათი მსგავსების გამომსახველი დენდროგრამა, NCBI-ს ბაზაში რეფერირებული შტამის 16S რ-რნმ ნუკლეოტიდური თანაწყობის რაოდენობა, ბაზაში მიმდევრობების შესაბამისობის პროცენტული გადაფარვა, პროცენტული იდენტურობა და რეფერირებული შტამების საიდენტიფიკაციო ნომერები.

შემდგომ საფეხურზე, სახეობა სპეციფიური პჯრ-ის მემკვიდრით, კოლექციის 43 შტამის იდენტიფიკაცია განხორციელდა. სახეობა სპეციფიური პჯრ-ისთვის შერჩეული კულტურები მოიცავდნენ უნიკლალური RAPD პროფილის და მცირე UPGMA კლასტერების წარმომადგენელ შტამებს. მათგან 23 შტამი იდენტიფიცირებულ იქნა როგორც *Lb. delbrueckii*-ის წარმომადგენელი, ხოლო 10 შტამი - *St. thermophilus*, 1 შტამი - *Lb. rhamnosus*, 2 - *E. durance*, 4 - *E. faecium* და 3 - *E. faecalis*-ის სახეობათა წარმომადგენლებად განისაზღვრენ. იდენტიფიცირებული შტამების სრული სია ნაჩვენებია ცხრილ 7.-ში.

შტამის ნომერი	ნიმუში	გვარი	სახეობა	იდენტიფიკაცია	ეტალონი
51153	Tsa1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51064	Axa1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51086	Axa3	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51121	Lis1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315

51131	Sag1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51077	Tso1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51051	Sen3	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51054	Sen5	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51330	Tbi1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51082	Axa2	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51317	Sen1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
93	Maxi2	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51199	Mil1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51100	Tel2	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51047	Dma2	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51097	Shal1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51127	Martyo1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51150	Tbi4	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51299	Kut2	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51191	Kut2	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51060	Asu1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51205	Sop1	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
84-2	St2	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	SS PCR (For.DB1, Rev.SS1)	ATCC12315
51222	Axa2	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	SS PCR (For.DuHiF, Rev.DuR)	ATCC19432
51297	F4	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	SS PCR (For.DuHiF, Rev.DuR)	ATCC19432
51245	Tel3	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	SS PCR (For.EF-E1, Rev.EF-E2)	ATCC19433
51285	Nab1	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	SS PCR (For.EF-E1, Rev.EF-E2)	ATCC19433
51212	Axa1	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	SS PCR (For.EF-E1, Rev.EF-E2)	ATCC19433
51229	Axa3	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	SS PCR (For.FM-F1, Rev.FM-F2)	ATCC19434
51197	MeM1	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	SS PCR (For.FM-F1, Rev.FM-F2)	ATCC19434
51291	Gld4	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	SS PCR (For.FM-F1, Rev.FM-F2)	ATCC19434
51298	Kut2	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	SS PCR (For.FM-F1, Rev.FM-F2)	ATCC19434
51325	Sen2	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	SS PCR (For.SS1, Rev.CA1)	ATCC7469
85-4	Ju1	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
51263	Lis2	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
102-3	Abast1	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
51313	Sop1	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
51311	San1	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
L-1	Rach2	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
H-1	Rach3	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
U-1	Rach4	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
103-3	Sva2	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258
83-4	St1	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SS PCR (For.LacZ-for, Rev.LacZ-rev)	ATCC19258

ცხრილი 7. სახეობა სპეციფიური პჯრ-ის მეშვეობით იდენტიფიცირებული შტამების ჩამონათვალი, გამოყენებული პრაიმერების და კონტროლ შტამების მითითებით.

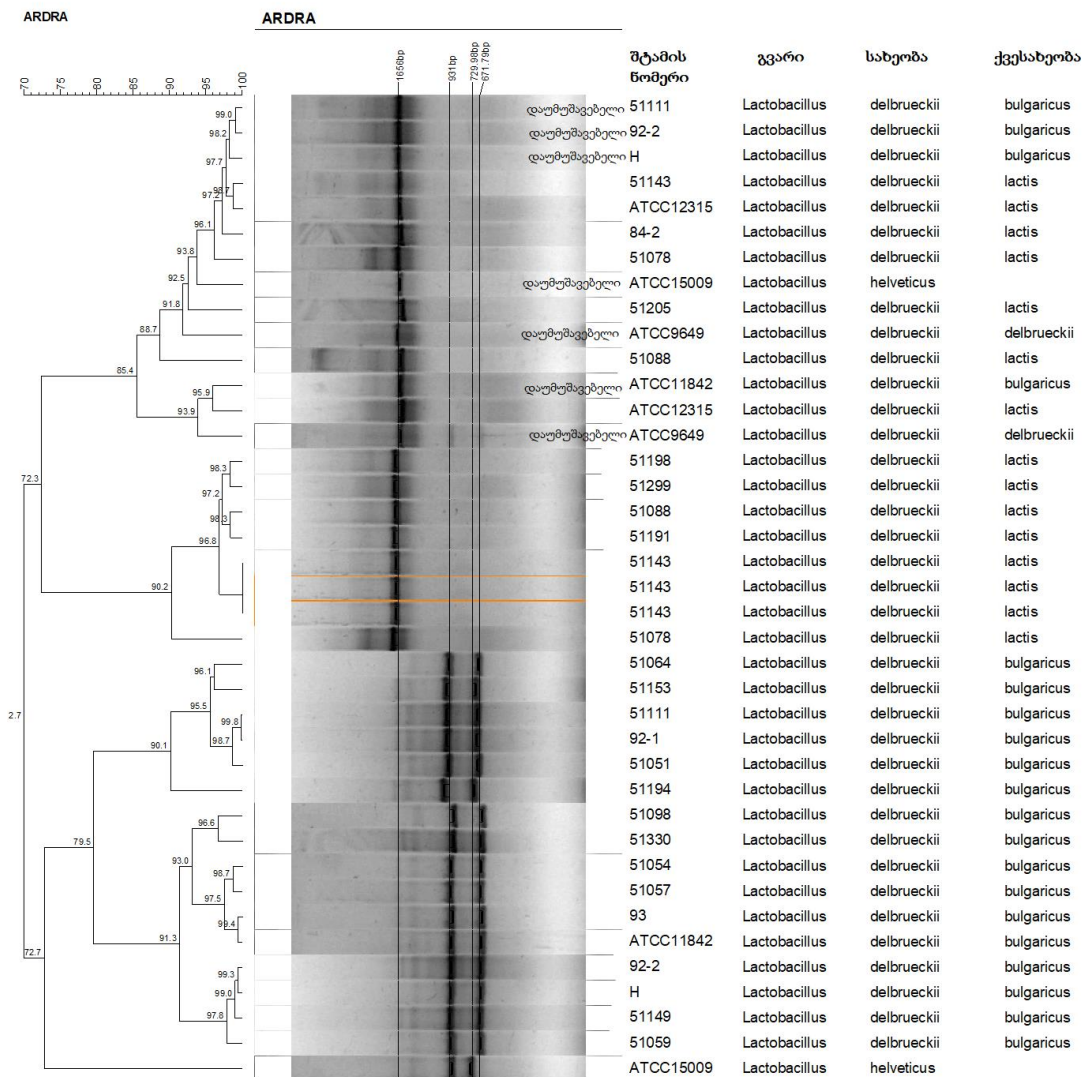
RAPD-პჯრ-ის და შესაბამისი UPGMA დენდროგრამის აგების, კლასტერების წამომადგენლობითი შტამების 500აწ 16S რ-რნმ და სახეობა სპეციფიური პჯრ იდენტიფიკაციის შემდეგ, მოხდა მიღებული შედეგების კლასტერული

ექსტრაპოლაცია. შედეგად შესაძლებელი გახდა კოლექციის სრული სახეობრივი იდენტიფიკაცია.

89 შტამი მიჩნეულ იქნა - *Lb. delbrueckii*-ის წარმომადგენლად, 45 შტამი- *E. faecium*-ის, 25 - *E. durans*, 28 - *E. faecalis*, 16 - *St. thermophilus*, 6 - *Lb. rhamnosus* და 5 შტამი კი *Lb. vaginalis*-ს სახეობას მიეკუთვნა.

ცნობილია რომ, *Lb. delbrueckii* სახეობა მოიცავს სამ ქვესახეობას: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. მათგან *lactis* და *bulgaricus* ხშირად გვხვდება რძის პროდუქტების მიკრობიოტებში (Delley and Germond 2002). ამიტომ შემდგომ საფეხურზე განხორციელდა *Lb. delbrueckii* წარმომადგენელი შტამების ქვესახეობრივი იდენტიფიკაცია *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* და *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის გამოსავლენად. ARDRA-ს მეთოდი გამოყენებულ იქნა *Lb. delbrueckii* -ს 16-ი კლასტერის წარმომადგენლობით კულტურებზე. შედეგად 69 შტამი იდენტიფიცირებულ იქნა როგორც *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ხოლო 20 შტამი *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*-ის ქვესახეობას განეკუთვნა. სურათ 11.-ზე მოცემულია ARDRA-ით მიღებული შედეგების დაწვრილებითი აღწერა.



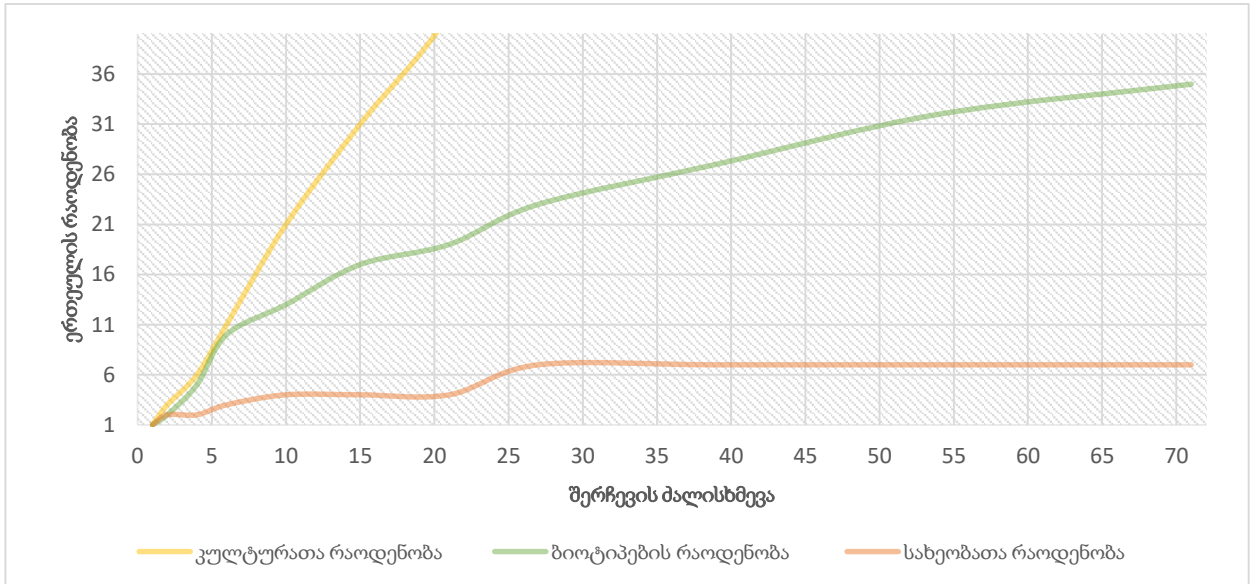


სურათი 11. ენდონუკლეაზა Eco R1-ის გამოყენებით დაჭრილი 1500აწ 16s რ-რნმ მონაკვეთების საიდენტიფიკაციო მსგავსების დენდროგრამა. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის წამომადგენელი და კონტროლ შტამი *Lb. helveticus* ATCC15009 გვამლევნ ბენდს 931აწ და 671აწ მონაკვეთებისთვის. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*- გვამლევს ბენდს მხოლოდ 1656აწ მონაკვეთზე, ისევე როგორც დაუმუშავებელი *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და დაუმუშავებელი საკონტროლო შტამი *Lb. helveticus*-ი.

იზოლატების დეტალური მოლეკულური იდენტიფიკაციის შემდეგ UPGMA დენდროგრამამ გვიჩვენა, რომ თითოეული სახეობა წარმოდგენილია გენოტიპურად განსხვავებული ბიოტიპებით. დადგინდა, რომ *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* წარმოდგენილია 5 ბიოტიპით, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* წარმოდგენილია 11 ბიოტიპით, *E. faecium* – 3, *E. durans* - 2, *E. faecalis* - 4, *St. thermophilus* – 10, *Lb. rhamnosus* - 2 და *Lb. vaginalis* კი ერთი ბიოტიპით.

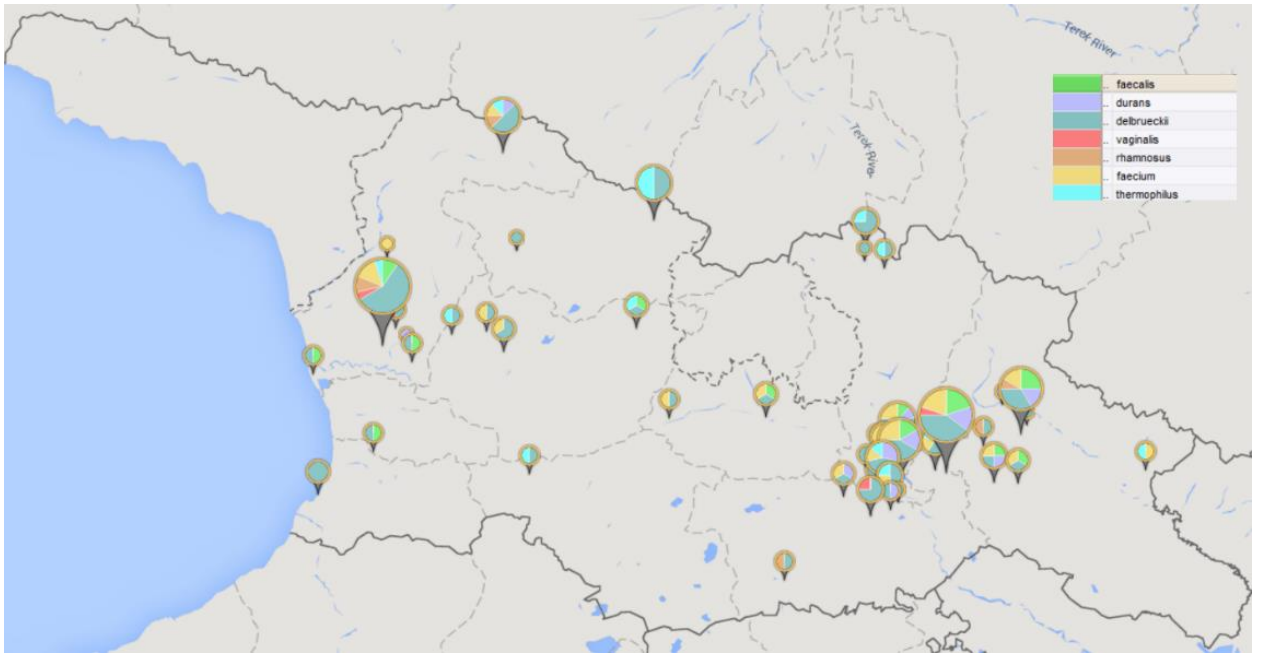
### 3.4. ბიომრავალფეროვნება

სინჯების შერჩევის ძალისხმევის მრუდის აგებისას, თვალსაჩინო გახდა, რომ სარწმუნო შედეგი, ანუ სინჯიდან გამოყოფილი სახეობების მრავალფეროვნების გაჯერება და მრუდის ასიმპტოტი, 27-ზე მეტი ნიმუშის შეგროვების შემთხვევაში სრულდება (დიაგრამა 2).



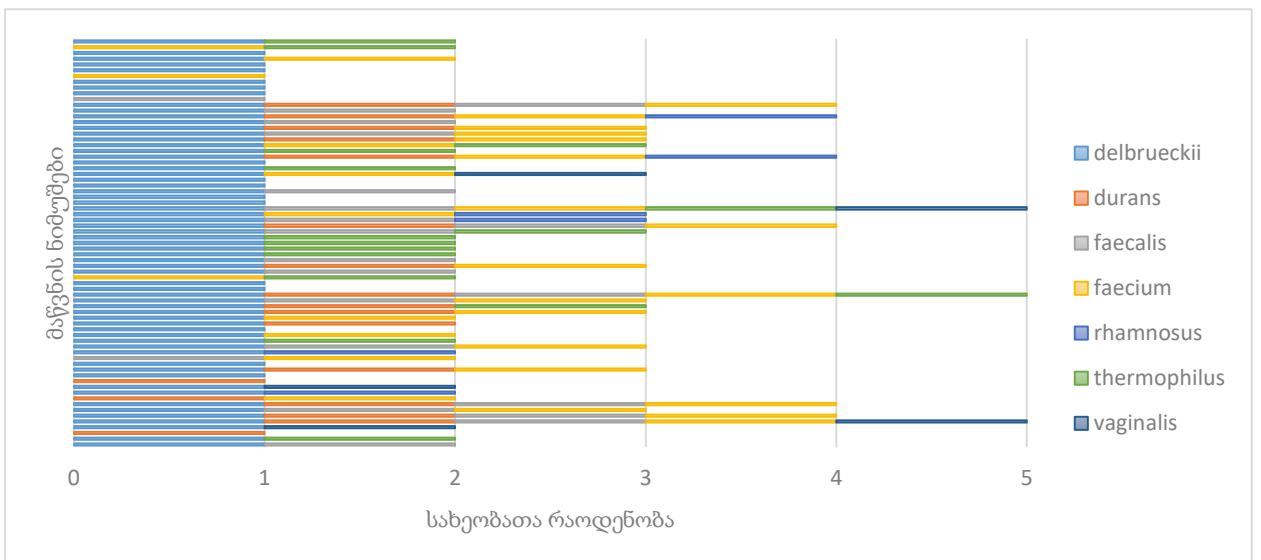
დიაგრამა 2. ნიმუშების შეგროვების ძალისხმევის ამსახველი მრუდი, რომელიც მიგვითითებს თუ რა რაოდენობის სინჯების მოპოვება იყო აუცილებელი სარწმუნო შერჩევის მისაღებად. მოცემულ შემთხვევაში შეგროვდა 72 ნიმუში, ხოლო მრუდი ასიმპტოტს 27-ე სინჯზე აღწევს. შესაბამისად, სახეობრივი მრავალფეროვნების შესაფასებლად, შეგროვებული ნიმუშების რაოდენობა დამაკმაყოფილებელია.

ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნიდან გამოყოფილი *Lb. delbrueckii*-ის, *E. faecium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *St. thermophilus*, *Lb. rhamnosus* და *Lb. vaginalis*-ის გეოგრაფიული განაწილება ნაჩვენებია სურათ 12-ზე. რუკიდან ჩანს რომ სახეობათა განაწილება არ ექვემდებარება რაიმე სახის გეოგრაფიულ თუ რეგიონალურ დაყოფას.



სურათი 12. საქართველოს რეგიონალური რუკა. მაწვნის ნიმუშებიდან გამოყოფილი ბაქტერიული კულტურების გეოგრაფიული განაწილება სახეობების მიხედვით.

მაწვნის დედო კულტურების განაწილებასა და მათ გეოგრაფიულ ადგილ წამოშობას შორის კორელაცია არ დაფიქსირდა. დედო კულტურების სახეობრივი განაწილება შემთხვევითია. მონაცემებიდან ნათლად ჩანს, რომ მაწვნის მიკრობიომი სტოქასტურია და სახეობრივი განაწილება ვარიირებს მაწვის ნიმუშების მიხედვით (იხილეთ დიაგრამა 3).



დიაგრამა 3. მაწვნის ნიმუშებში დაფიქსირებული ბაქტერიული სახეობები. სინჯებიდან იზოლირებული სახეობების რაოდენობა და განაწილება არათანაბარია. დიაგრამის y-ღერძზე

არსებული თითოეული წერტილი შეესაბამება მაწვნის ნიმუშს. ინდივიდუალური სინჯიდან იზოლირებული სახეობების მაქსიმალური რაოდენობა 5-ის ტოლია, ხოლო მინიმალური 1-ის.

ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნიდან მიღებული რძემჟავა ბაქტერიების სახეობათა განაწილება, რომელიც ეყრდნობა რიცხოვნობა სიმქიდროვის (სიმქიდროვის), დისპერსიის ხარისხს (პროცენტულ სიხშირეს) და გავრცელებას, მიუთითებს *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* -ის დომინანტურ პოზიციაზე. ხოლო შიდასახეობრივი მრავალფეროვნების მიხედვით, რომელიც მიუთითებს ბიოტიპების ფარდობით სიხშირეზე თითოეული სახეობისთვის, უმაღლეს ნიშნულს *St. thermopilus*-ი, *Lb. rhamnosus* და *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* სახეობები გვიჩვენებენ.

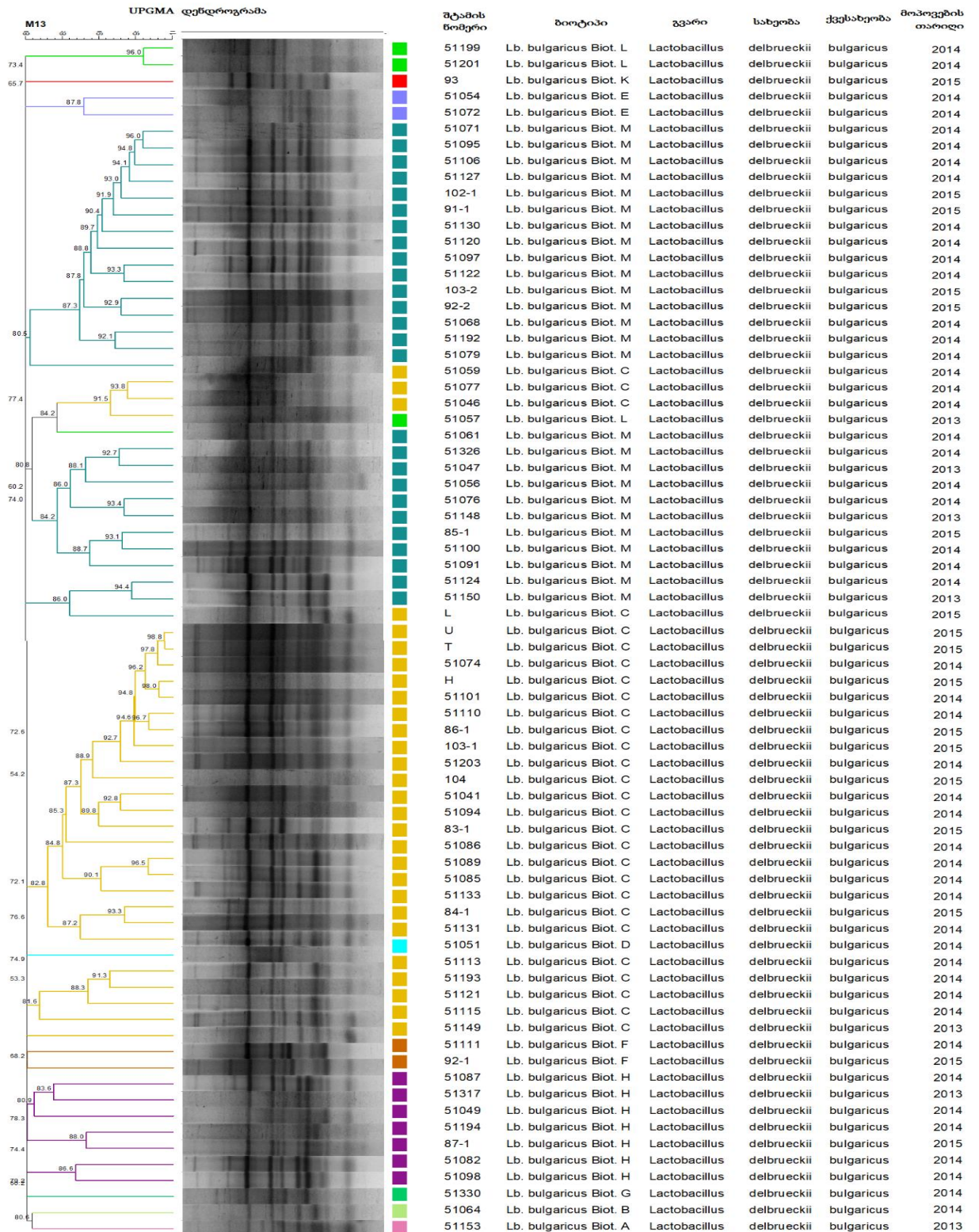
მაწვნიდან გამოყოფილი რძემჟავა კულტურის სახეობა	რიცხოვრივი სიმრავლე (სიმქიდროვი)	დისპერსიის ხარისხი (სიხშირე (%))	რაოდენობა ერთეულში (გავრცელება)	შიდასახეობრივი მრავალფეროვნება (ბიოტიპები (%))
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,97	76,06	1,28	15,94
<i>E. faecium</i>	0,42	40,85	1,03	6,67
<i>E. faecalis</i>	0,30	29,58	1,00	14,29
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	0,28	28,17	1,00	25,00
<i>E. durance</i>	0,25	25,35	1,00	8,00
<i>St. thermopilus</i>	0,23	22,54	1,00	43,75
<i>Lb. rhamnosus</i>	0,08	8,45	1,00	33,33
<i>Lb. vaginalis</i>	0,07	7,04	1,00	14,3

ცხრილი 8. სინჯებში რძემჟავა ბაქტერიების სახეობათა განაწილება სიმქიდროვის, სიხშირის, გავრცელების და შიდასახეობრივი მრავალფეროვნების მაჩვენებლები.

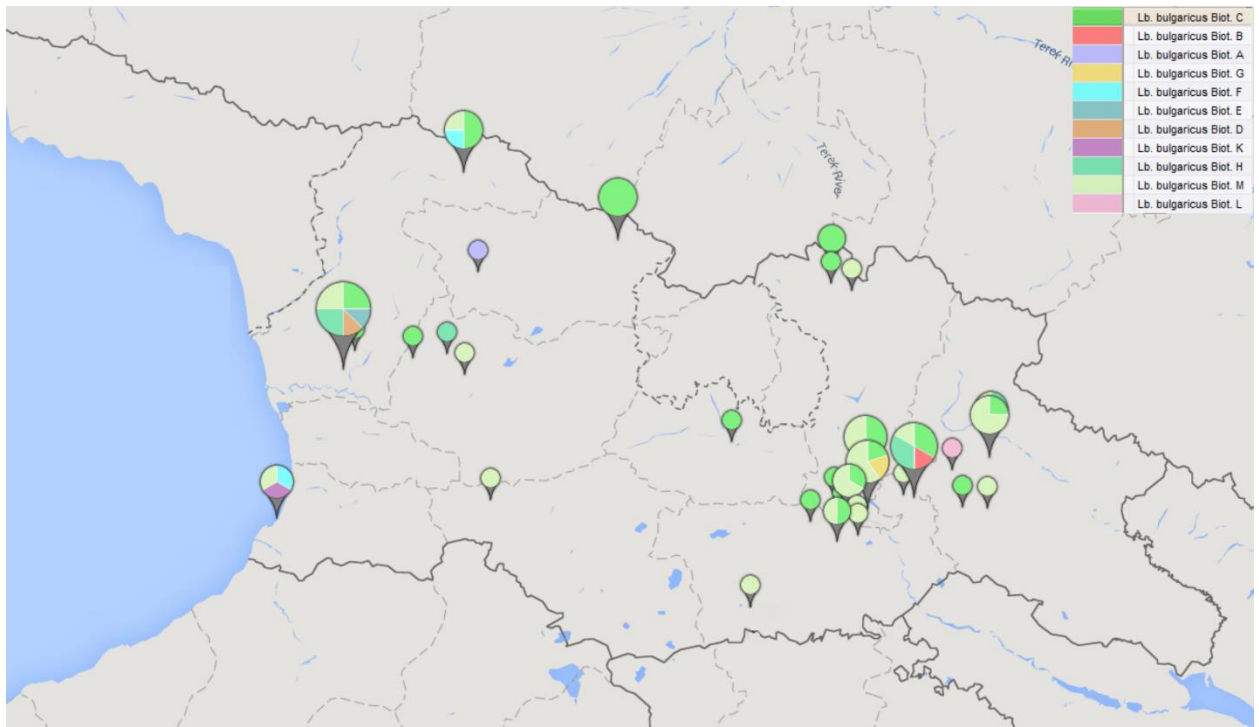


### 3.4.1. ბიოტიპები

დადგინდა, რომ *Lactobacillus delbrueckii* მაწვნის დომინანტურ მიკრობიომში ორი ქვესახეობით არის წარმოდგენილი. მათ შორის *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ი 11 ბიოტიპით გვხვდება, საიდანაც 5 კულტურა უნიკალური RAPD პროფილით ხასიათდება (*Lb.93*, *Lb.51051*, *Lb.51330*, *Lb.51064*, *Lb.51153*).

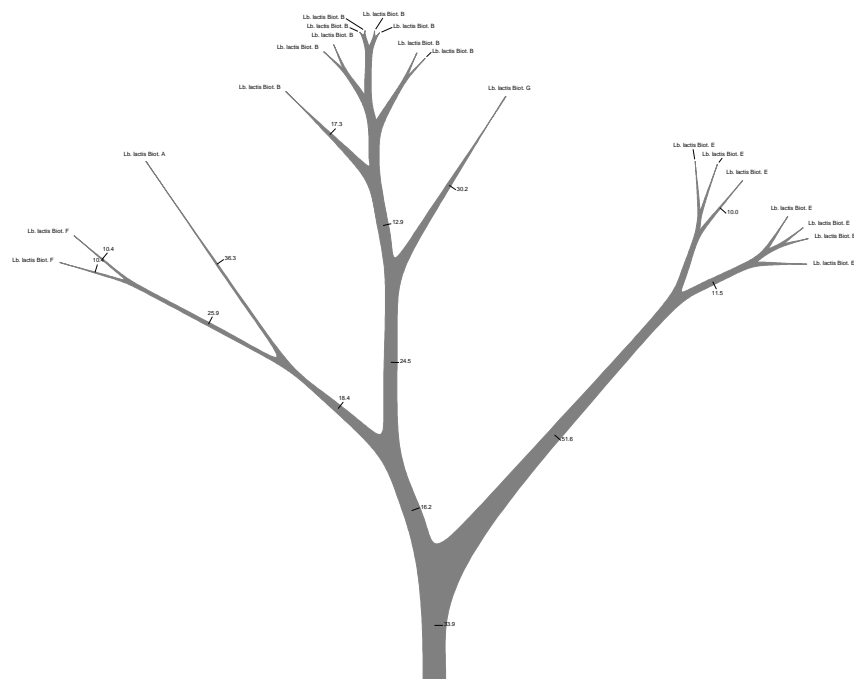


სურათი 13. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის UPGMA დენდროგრამა, რომელიც ასახავს ქვესახეობის გენოტიპურ მსგავსებას.

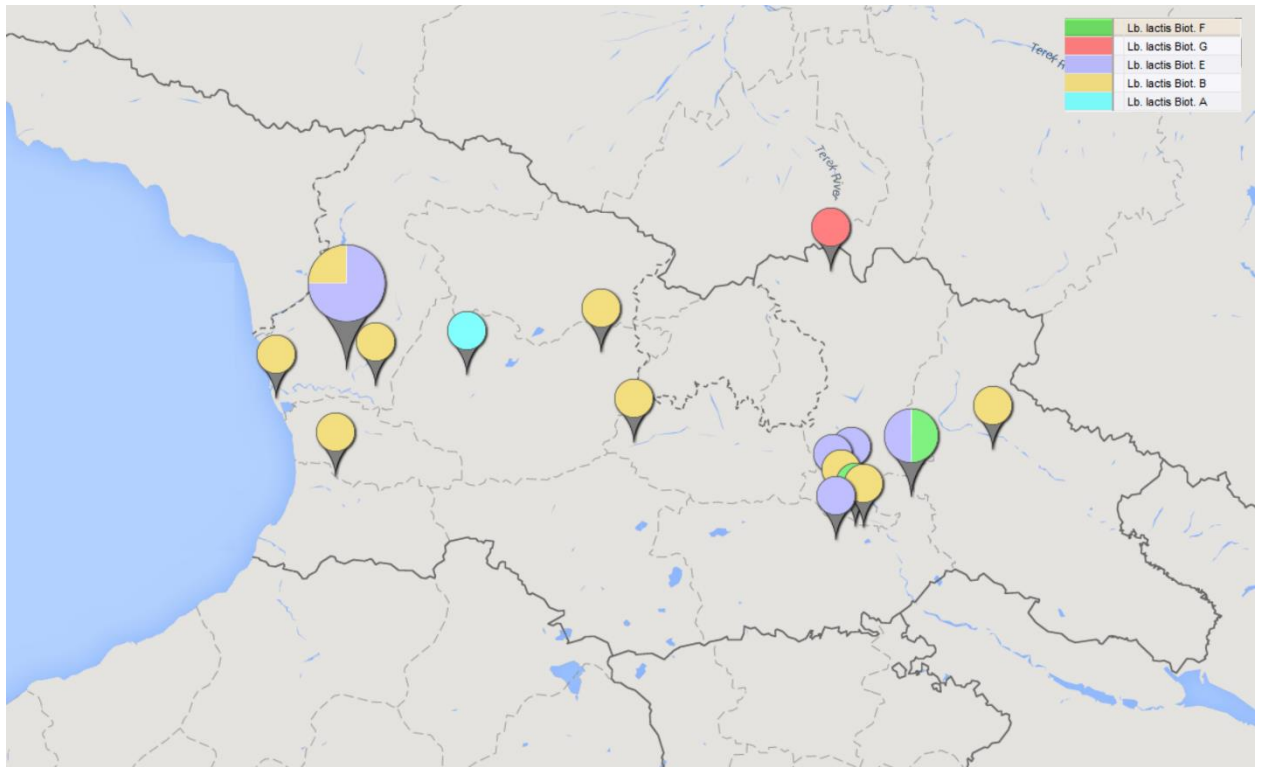


სურათი 14. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის ბიოტიპების გეოგრაფიული განაწილება

*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*-ი 5 ბიოტიპით არის წარმოდგენილი, საიდანაც მხოლოდ 1 კულტურა ხასიათდება უნიკალური RAPD პროფილით (*Lb.51191*)

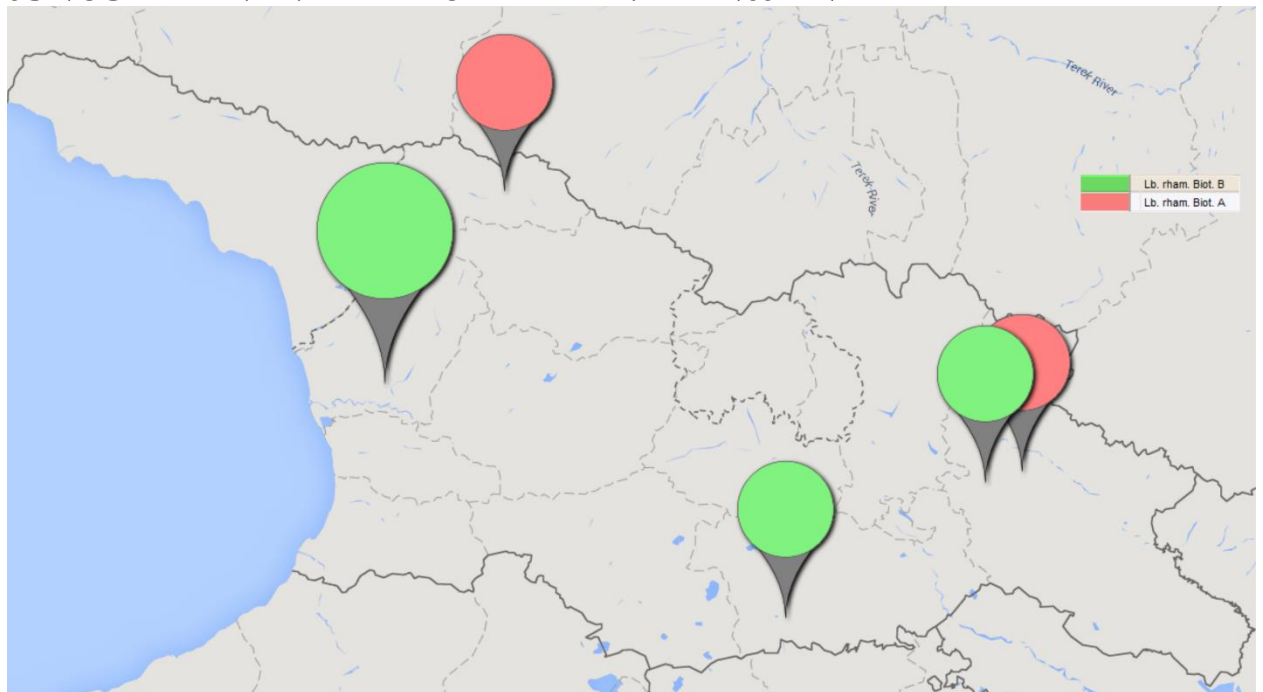


სურათი 15. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*-ის RAPD ანაბეჭდების UPGMA მსგავსების მატრიციდან აგებული ბიოტიპების ნათესაობის ხე.



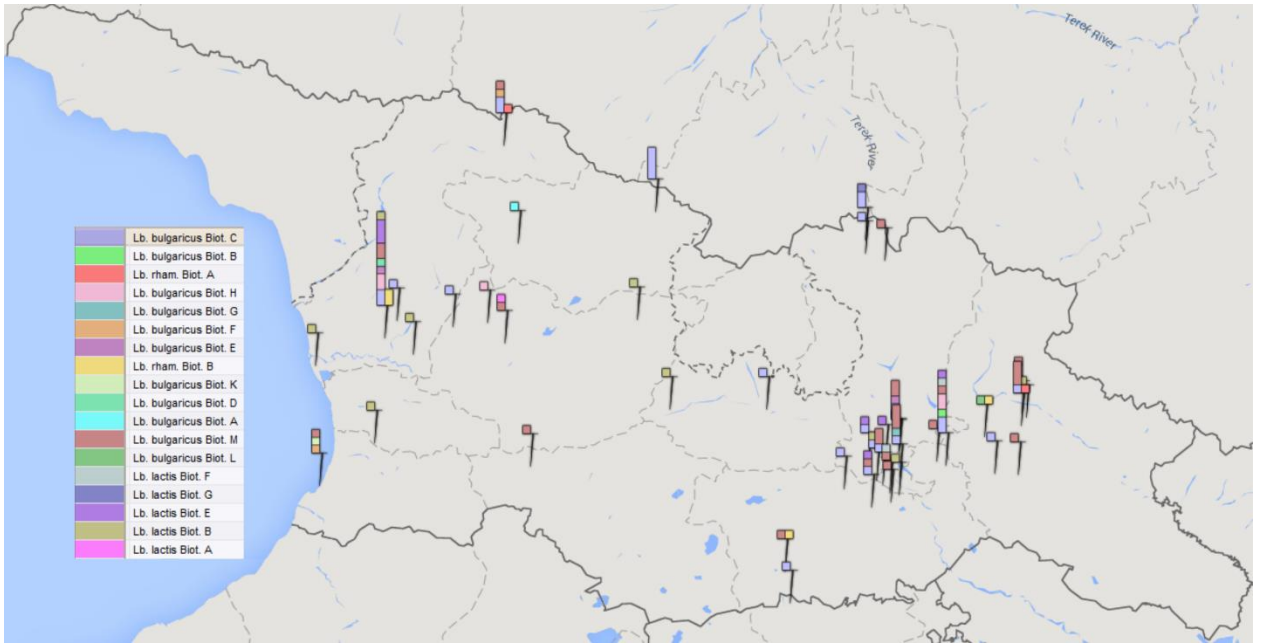
სურათი 16. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*-ის ბიოტიპების გეოგრაფიული განაწილება

ექვსი სხვადასხვა მაწვნის სინჯიდან გამოყოფილი *Lb. rhamnosus*-ის ექვსი კულტურა მხოლოდ ორი ბიოტიპით არის წარმოდგენილი



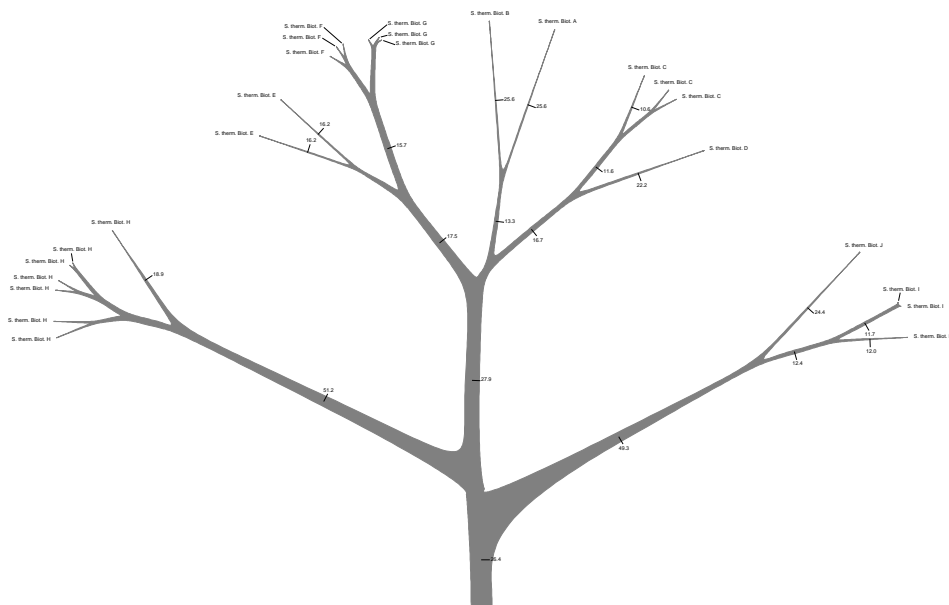
სურათი 17. *Lb. rhamnosus*-ის ბიოტიპების გეოგრაფიული განაწილება





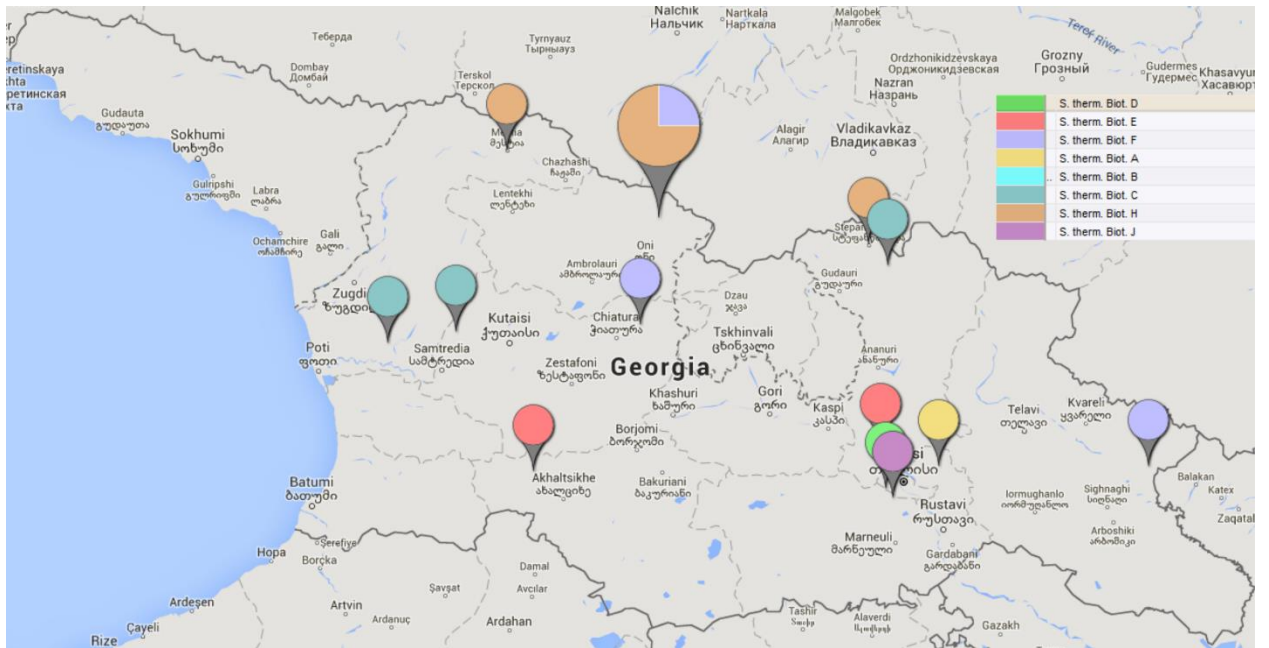
სურათი 18. ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის სინჯებიდან გამოყოფილი *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* და *Lb. rhamnosus*-ს ბიოტიპების გეოგრაფიული განაწილება.

*St. thermophilus*-ის კულტურები, რომლებიც მაღალი ფარდობითი შიდასახეობრივი მრავალფეროვნებით ხასიათდებიან, მოიცავენ 10 ბიოტიპს. მათ შორის 4 კულტურა ხასიათდება უნიკალური RAPD პროფილით (*St.51265*, *St.51263*, *St.51237*, *St.104-1*)



სურათი 19. *St. thermophilus*-ის RAPD ანაბეჭდების UPGMA მსგავსების მატრიციდან აგებული ბიოტიპების ნათესაობის ხე.

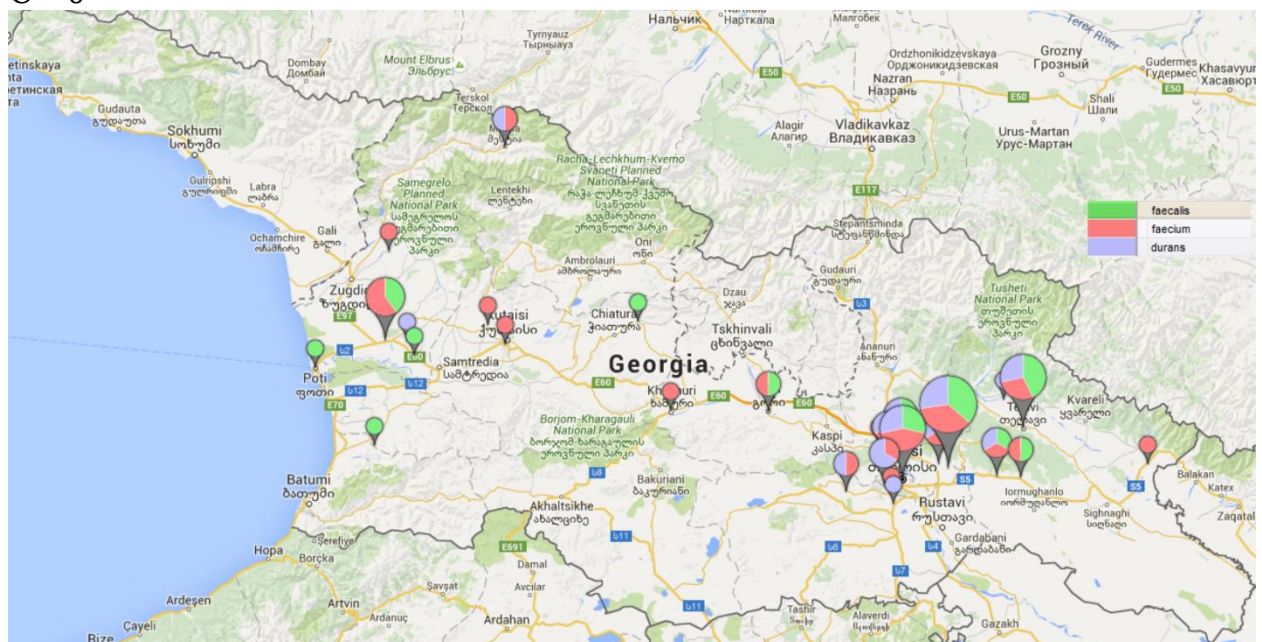




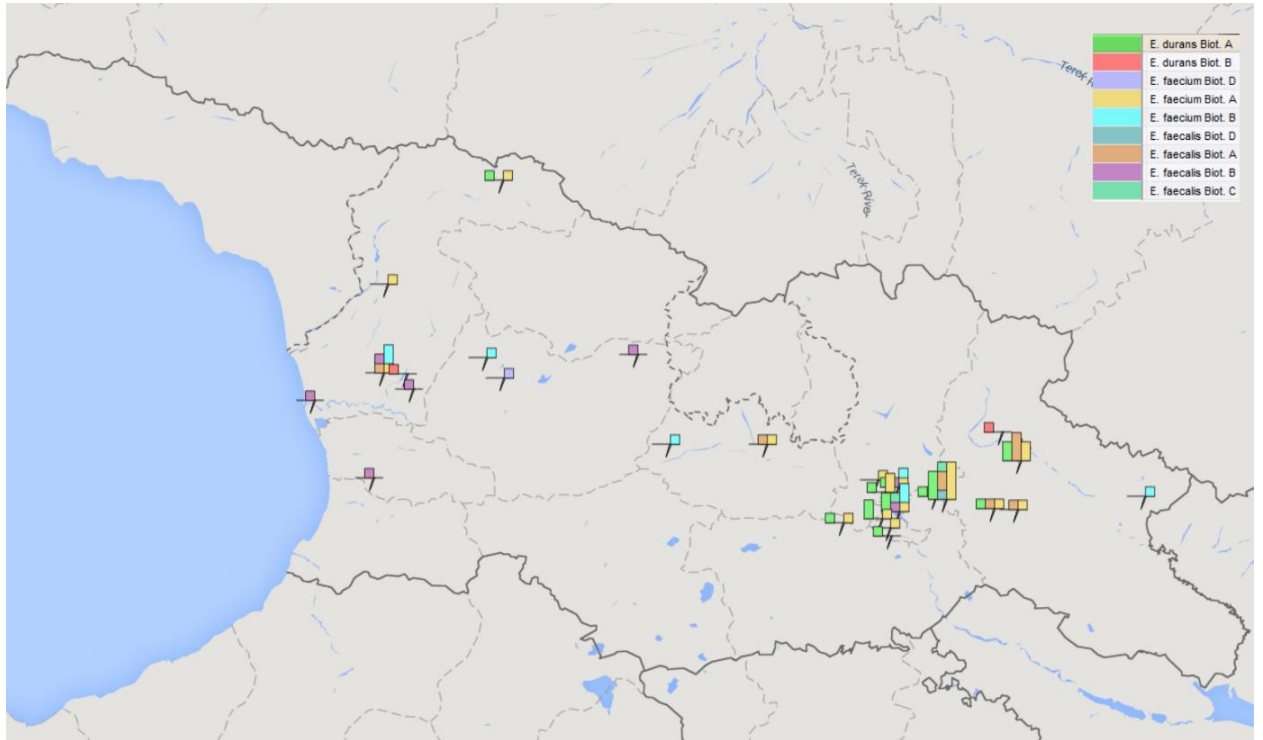
სურათი 20. *St. thermophilus*-ის ბიოტიპების გეოგრაფიული განაწილება

*Enterococcus spp.* რძის ფერმენტირებულ პროდუქტებში უმეტეს წილად კონტამინანტად განიხილება. *E. durans*, *E. faecium* და *E. faecalis*, ისევე როგორც *Lb.vaginalis* ფერმენტირებულ საკვებ პროდუქტებში ტოქსიური ბიოგენური ამინების, ჰისტამინის და თიროზინის ბიოსინთეზის უნარი გააჩნიათ (Diaz *et al.* 2020). შესაბამისად მოცემულ ეტაპზე, მათ კონტამინანტების სახით განვიხილავთ.

ბიოტიპების კუთხით *Lb.vaginalis*-ი ერთი ვარიანტით არის წარმოდგენილი, *E. durans* - 2, *E. faecium* - 3, ხოლო *E. faecalis* – 4 ბიოტიპით. *Enterococcus spp.* სახეობრივი და ბიოტიპების განაწილება, ტრადიციულ მწვნის სინჯებში შემთხვევით ხასიათს ატარებს.

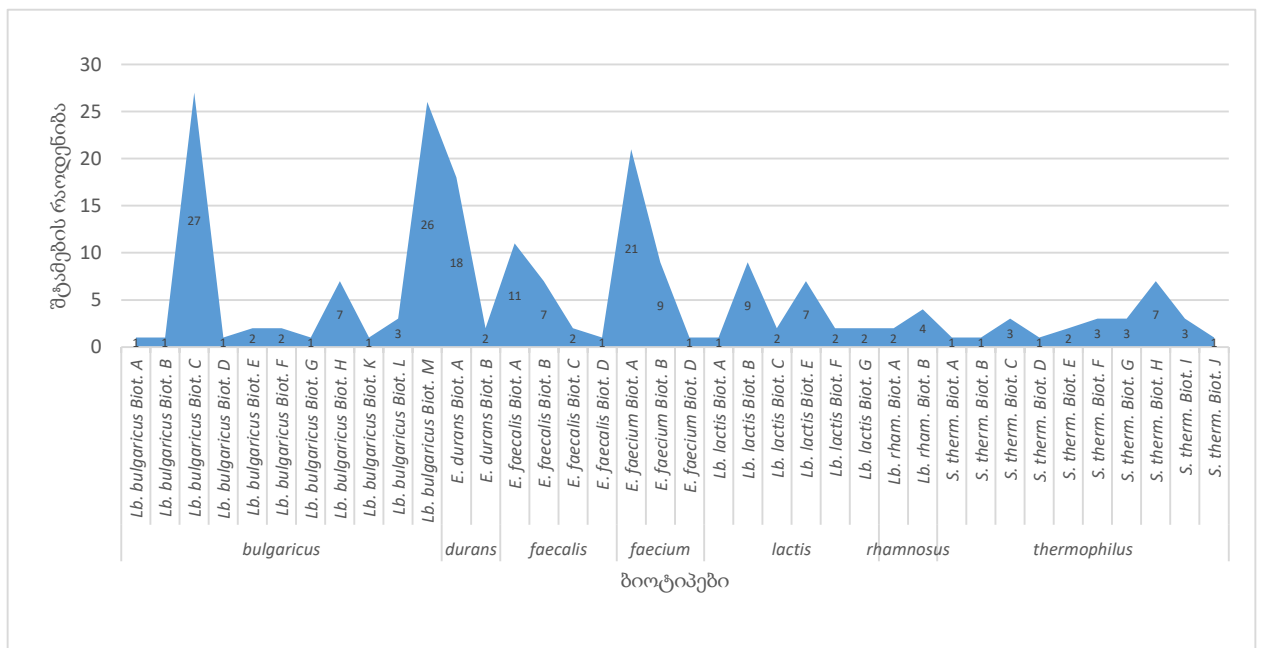


სურათი 21. ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის სინჯებიდან იზოლირებული *E. durans*-ის *E. faecium* და *E. faecalis* გეოგრაფიული განაწილება



სურათი 22. *E. durans*-ის *E. faecium* და *E. faecalis* ბიოტიპების გეოგრაფიული განაწილება

მაწვნიდან გამოყოფილი ყველა რძემჟავა ბაქტერიის სახეობა, *Lb. vaginalis*-ის გარდა წამოდგენილია ერთზე მეტი ბიოტიპით. ჯამში ექვს იდენტიფიცირებულ სახეობას შორის დაფიქსიდა 37 სხვადასხვა ბიოტიპი, რაც მაწვნის მიკრობიოტის მაღალ ბიომრავალფეროვნებაზე მიუთითებს.



დიაგრამა 4. ნაჩვენებია *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *St. thermophilus* და *Lb. rhamnosus*-ის ბიოტიპების სიხშირე. დიაგრამიდან ჩანს, რომ მოცემულ სიმრავლეში *Lb. bulgaricus* Biot. C, *Lb. Bulgaricus* Biot. M, *E. faecium* Biot. A, *E. durans* Biot. A, ყველაზე გავრცელებული ბიოტიპებია.

ტრადიციული წესით დამზადებული და კომერციული მაწვნებიდან იზოლირებული შტამების ბიოტიპების გამოვლენის საშუალებით, შესაძლებელი გახდა დედო კულტურების შედარება შტამების დნმ ანაბეჭდების დონეზე. დადგინდა, რომ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის ბიოტიპები: *Lb. bulgaricus* Biot.C და *Lb. bulgaricus* Biot.L, *St. thermophilus* ის ბიოტიპი *S. therm. Biot.H*, ასევე *E. durans*-ის ბიოტიპი *E. durans Biot.A* და *E. faecium*-ს ბიოტიპი - *E. faecium Biot.B*-ის წარმომადგენელი შტამები გვხვდება როგორც ტრადიციული წესით დამზადებულ, ასევე კომერციულ მაწვნებში.

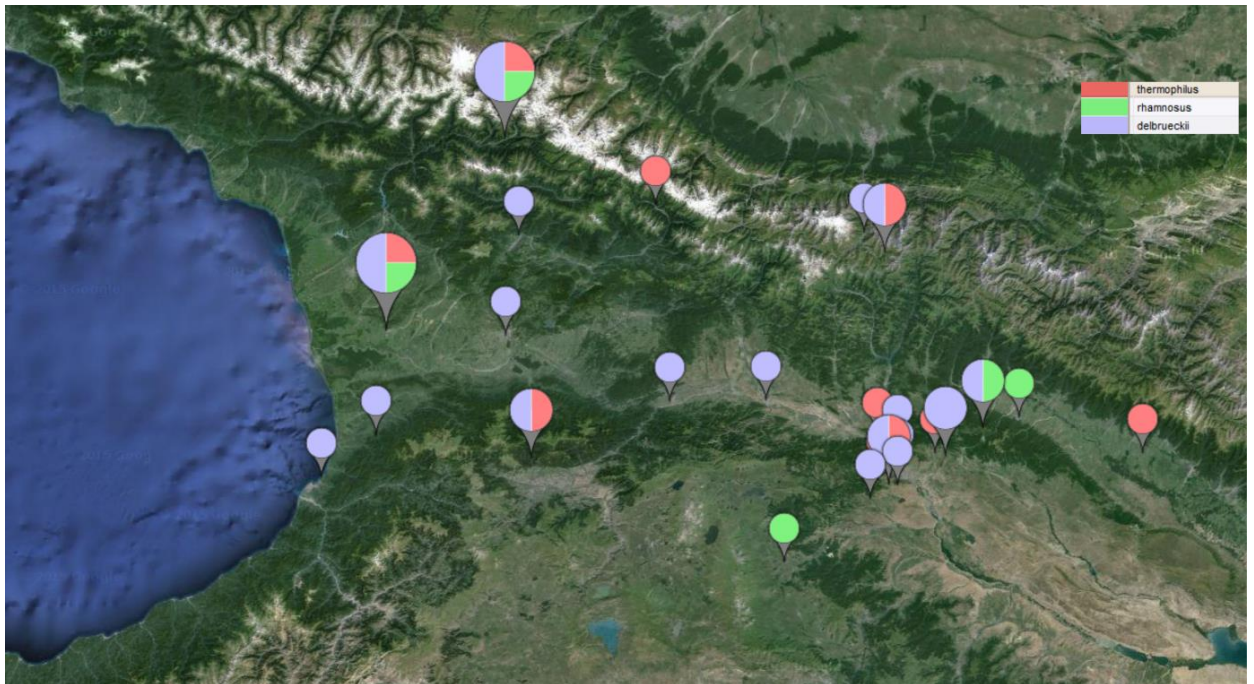
ბიოტიპები	რაოდენობა ტრადიციულ მაწონში	რაოდენობა კომერციულ მაწონში
<i>Lb. rham. Biot. B</i>	4	0
<i>Lb. lactis Biot. B</i>	9	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. M</i>	26	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. C</i>	27	1
<i>Lb. bulgaricus Biot. A</i>	1	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. H</i>	7	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. L</i>	1	2
<i>Lb. bulgaricus Biot. I</i>	7	0
<i>E. faecalis Biot. B</i>	3	0
<i>S. therm. Biot. F</i>	8	1
<i>E. faecium Biot. B</i>	2	0
<i>E. durans Biot. B</i>	21	0
<i>E. faecium Biot. A</i>	7	0
<i>Lb. lactis Biot. E</i>	1	0
<i>Lb. lactis Biot. A</i>	0	2
<i>Lb. lactis Biot. C</i>	0	3
<i>S. therm. Biot. I</i>	1	1
<i>Lb. lactis Biot. G</i>	16	2
<i>E. durans Biot. A</i>	5	0
<i>Lb. vaginalis</i>	1	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. G</i>	1	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. D</i>	2	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. E</i>	1	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. B</i>	1	0
<i>E. faecalis Biot. D</i>	2	0
<i>Lb. lactis Biot. F</i>	2	0
<i>Lb. rham. Biot. A</i>	2	0
<i>Lb. bulgaricus Biot. F</i>	11	0
<i>E. faecalis Biot. A</i>	3	0
<i>S. therm. Biot. C</i>	2	0
<i>E. faecalis Biot. C</i>	2	0
<i>S. therm. Biot. E</i>	1	0
<i>S. therm. Biot. J</i>	1	0
<i>S. therm. Biot. D</i>	1	0
<i>S. therm. Biot. A</i>	1	0
<i>E. faecium Biot. D</i>	1	0
<i>S. therm. Biot. G</i>	0	3
<i>S. therm. Biot. H</i>	5	2
<i>Lb. bulgaricus Biot. K</i>	1	0
<i>S. therm. Biot. B</i>	1	0

დიაგრამა 5. წარმოდგენილია ტრადიციული წესით დამზადებული და კომერციული მაწვნების დედო კულტურების ბიოტიპების განაწილება. პირველ ჰორიზონტალურ რიგში ნაჩვენებია ტრადიციულ მაწვნებში ნაპოვნი ბიოტიპების წარმომადგენელი შტამების რაოდენობა. ხოლო მეორე რიგში კი კომერციულ მაწვნებში არსებული ბიოტიპების წარმომადგენელი შტამების რაოდენობა. ტრადიციულ და კომერციულ მაწვნებში ბიოტიპების გადაფარვა მიუთითებს მათ შორის მიკრობიომის მიმოცვლაზე. მოცემულ შემთხვევაში 5 ბიოტიპის გადაფარვა დაფიქსირდა. ესენია: *Lb. bulgaricus* Biot.C, *Lb. bulgaricus* Biot.L, *S. therm. Biot.H*, *E. durans* Biot.A, *E. faecium* Biot.B.



### 3.5. ბიოტექნოლოგიური მახასიათებლები

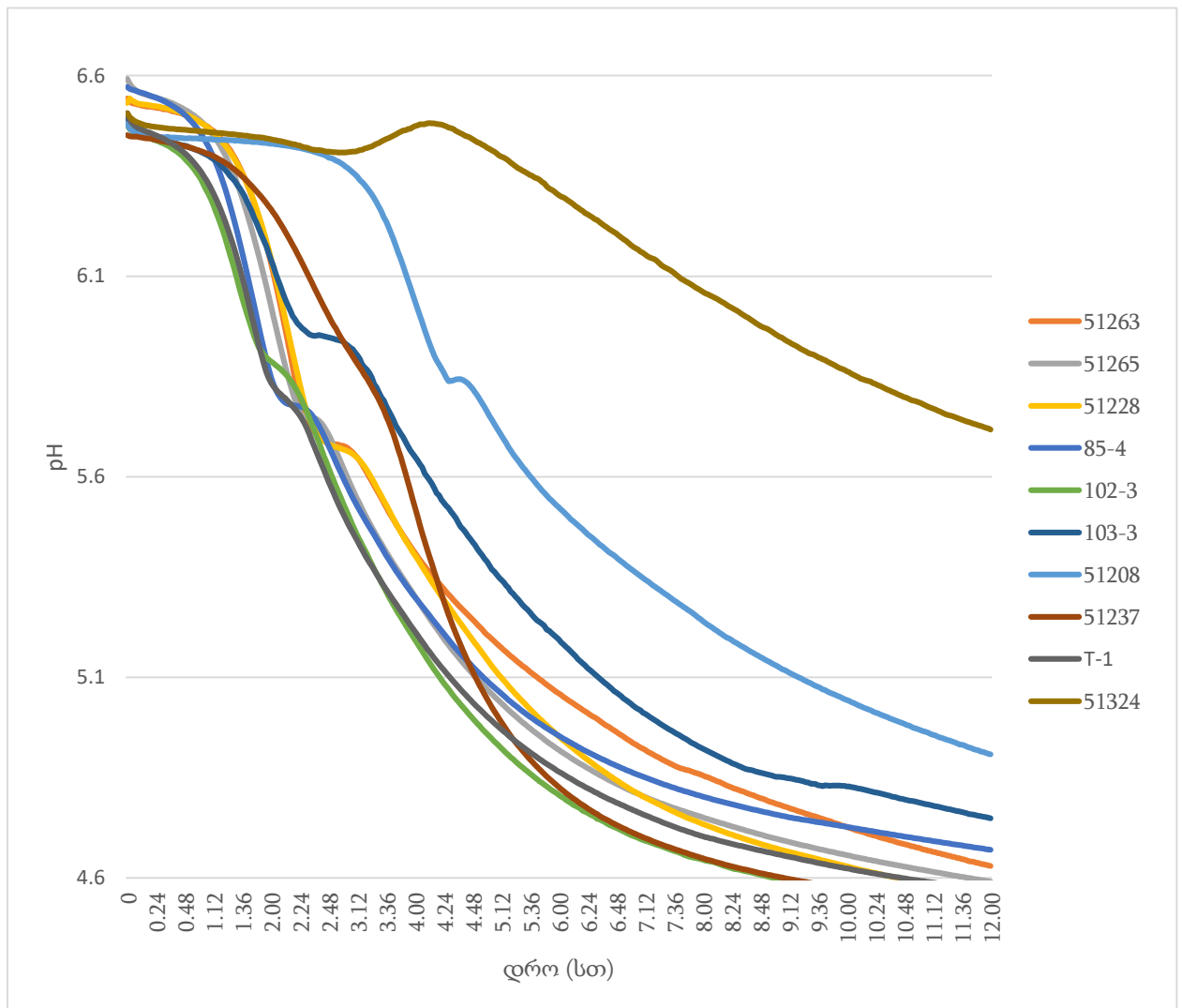
ბიოტექნოლოგიური მახასიათებლების შესწავლა შტამების შემცირებულ რაოდენობაზე განხორციელდა. მაწვნიდან გამოყოფილი რძემჟავა ბაქტერიების გენეტიკური დახასიათების საფუძველზე იდენტიფიცირებული, GRAS, QPS და პოტენციურად პრობიოტიკული სახეობების ბიოტიპების და მათი გეოგრაფიული ადგილ-წარმოშობის განაწილების საფუძველზე, შერჩეულ იქნა 36 შტამი. მათ შორის *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის 13 შტამი: 102-1 (Biot. M), 51064 (Biot. B), 51072 (Biot. E), 51057 (Biot. L), 51113 (Biot. C), 85-1, 93 (Biot. M), 51051 (Biot. D), 51049 (Biot. H), 51110 (Biot. C), 51111 (Biot. F), 51330 (Biot.G), 51153 (Biot. A). *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*-ის 8 შტამი: 51060 (Biot. E), 51066 (Biot. E), 51147 (Biot. B), 51191 (Biot. A), 51143 (Biot. B), 84-2 (Biot. G), 51333 (Biot. F), 51157 (Biot. B). ასევე *St. thermophilus*-ის 10 შტამი: 102-3 (Biot. E), 85-4 (Biot. C), 51263 (Biot. D), 51265 (Biot. A), 51228 (Biot. E), T-1 (Biot. F), 51208 (Biot. C), 103-3 (Biot. H), 51237 (Biot. J), 51324 (Biot. F) და *Lb. rhamnosus*-ის 5 შტამი: 51152 (Biot. B), 51154 (Biot. B), 51136 (Biot. B), 51108 (Biot. A), 51105 (Biot. A).



სურათი 23. საქართველოს ლანდშაფტური რუკა. ნაჩვენებია ბიოტექნოლოგიური მახასიათებლების შესასწავლად შერჩეული სახეობების ადგილ-წარმოშობის გეოგრაფიული განაწილება. ბიომრავალფეროვნების სრული სპექტრის მოსაცავად, შერჩეულ იქნა ყველა ბიოტიპის წარმომადგენლობითი შტამი.

### 3.5.1. აციდოფიკაციის სიჩქარე

შტამების მიერ ლაქტოზას ფერმენტაციის სიჩქარის შეფასება რძის მჟავიანობის განსაზღვრის მეთოდით განხორციელდა. რძის აციდოფიკაციის პროცესში, *St. thermophilus*-ი განიხილება როგორც წამყვანი მიკროორგანიზმი, თუმცა სიმბიოტური *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* -ი ასევე მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ პროცესის წარმართვაში. ამიტომ აციდოფიკაციის სიჩქარე სამივე სახეობის წარმომადგენელი შტამებისთვის განისაზღვრა.

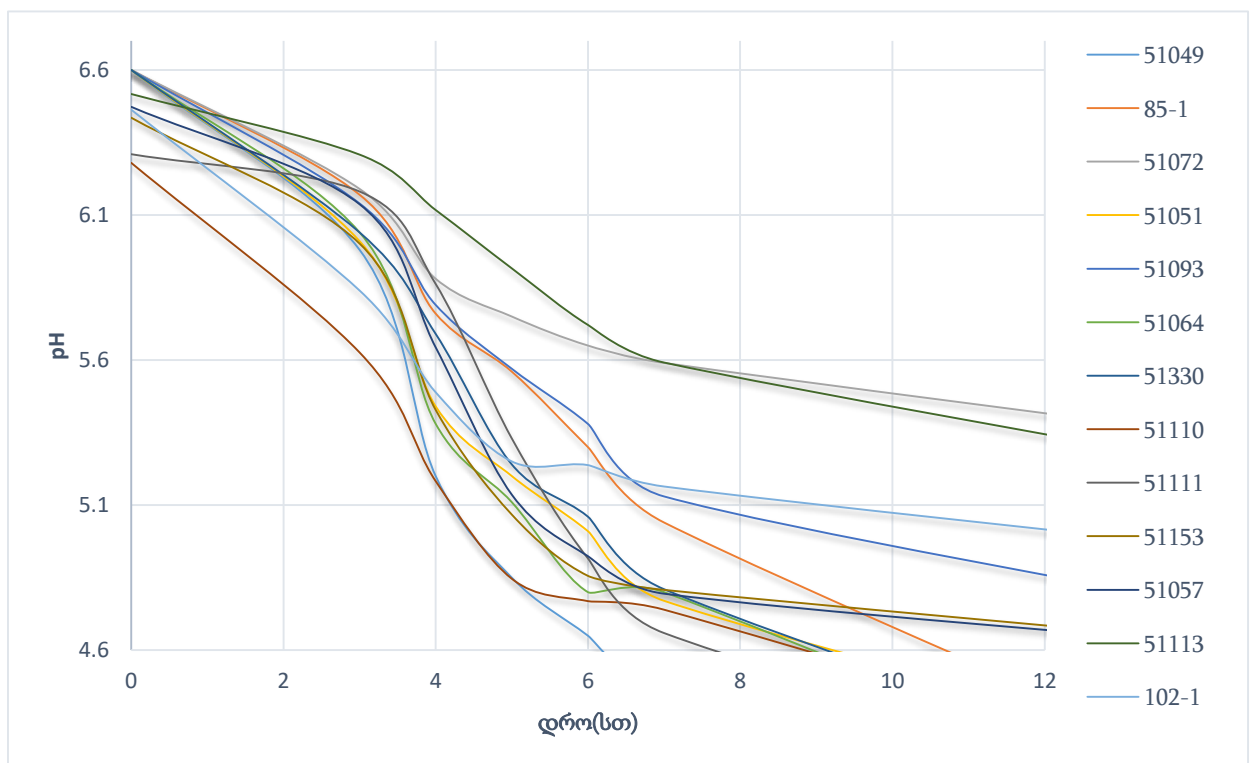


დიაგრამა 6. *St. thermophilus*-ის 10 შტამის აციდოფიკაციის სიჩქარის ასმახველი მრუდი. როგორც დიაგრამიდან ჩანს, *St. thermophilus* 102-3 -მა pH 4.6 ფერმენტაციის მეცხრე საათზე გადალახა, *St. thermophilus* 51237-მა 9.10 სთ-ის შემდეგ, *St. thermophilus* 51228-10.44 სთ, *St. thermophilus* T-1 ზღავრი 10.48სთ-ზე გადალახა, ხოლო *St. thermophilus* 51265 კი 11.44სთ-ზე.

დარჩენილმა ხუთმა შტამმა (51208, 51263, 103-3, 85-4, 51324), pH 4.6 მიღწევა 12-სთ-ზე ხანგრძლივი ინკუბაციის შემდეგ შეძლეს, რაც მათ სუსტ აციდოფიკაციის უნარზე მიუთითებს.

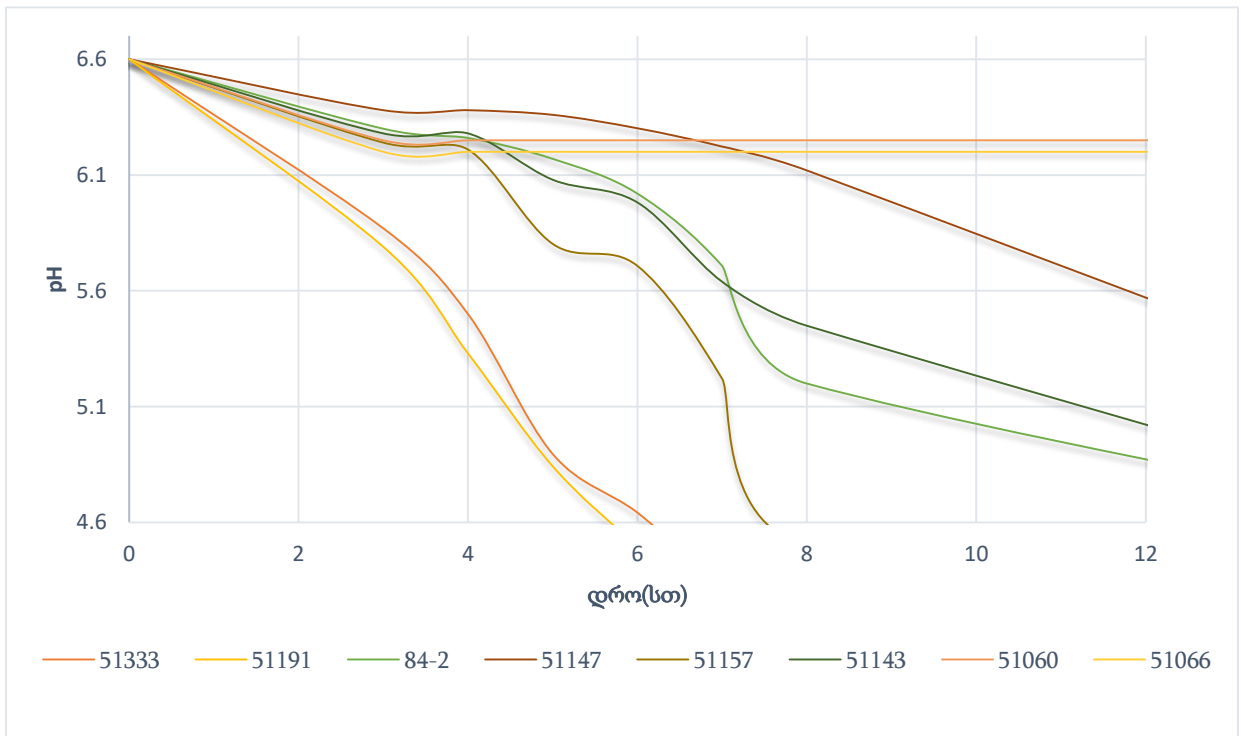
შტამი	$V_{max}$
<i>St.themophilus</i> 51263	2,00
<i>St.themophilus</i> 85-4	1,71
<i>St.themophilus</i> 51228	1,69
<i>St.themophilus</i> T-1	1,61
<i>St.themophilus</i> 51265	1,61
<i>St.themophilus</i> 51237	1,42
<i>St.themophilus</i> 102-3	1,41
<i>St.themophilus</i> 103-3	1,18
<i>St.themophilus</i> 51208	1,16
<i>St.themophilus</i> 51324	0,48

ცხრილი 9. *St.themophilus*-ის აციდოფიკაციის  $V_{max}$  მაჩვენებლები. სწრაფი აციდოფიკაციის უნარის მქონე შტამების 102-3 და 51237  $V_{max}$  -ი ნაკლებია ნელი ფერმენტაციის შტამების 51263 და 85-4 მაჩვენებლებზე და არ კორელირებს აციდოფიკაციის სიჩქარესთან.

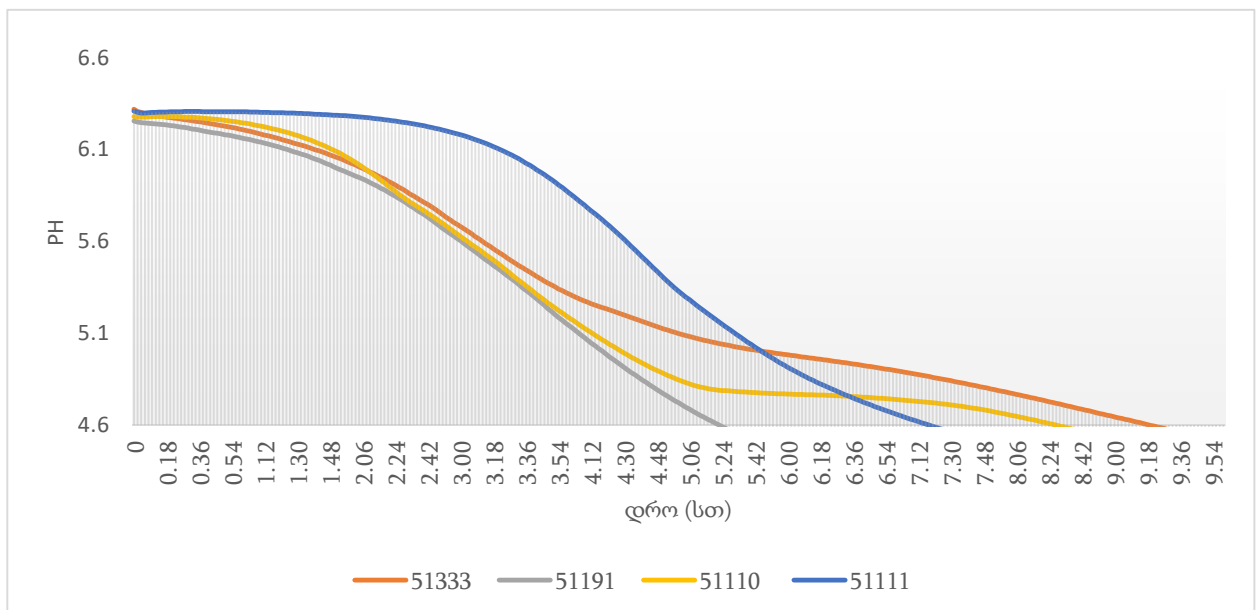


დიაგრამა 7. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის შერჩეული 13 შტამის აციდოფიკაციის სიჩქარის ამსახველი მრუდი. როგორც დიაგრამიდან ჩანს, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 51049-მა pH 4.6 ფერმენტაციის მეექვსე საათზე გადალახა, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 51111-მა 7.18 სთ-ის შემდეგ, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 51110 - 8.28 სთ, ხოლო 51064, 51051, 51330, 51330 კი მათე საათის მიღწევამდე. *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 85-1 pH 4.6 მეთერთმეტე საათზე

მიაღწია, ხოლო დარჩენილმა ექსვმა კულტურამ, pH 4.6 მიღწევა 12-სთ-ზე ხანგრძლივი ინკუბაციის შემდეგ შეძლეს, რაც მათ სუსტ აციდოფიკაციის უნარზე მიუთითებს.



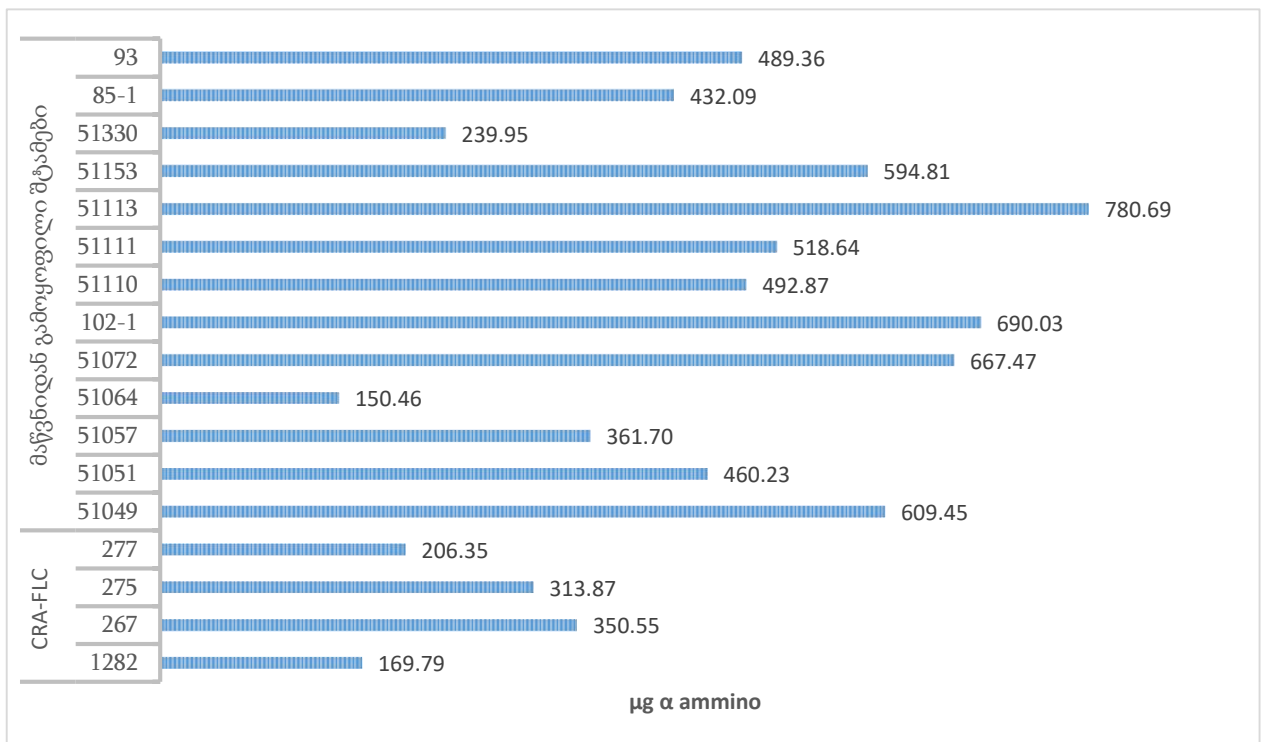
დიაგრამა 8. *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis*-ის 10 შტამის აციდოფიკაციის სიჩქარის ასმახველი მრუდი. როგორც დიაგრამიდან ჩანს, *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* 51191-მა pH 4.6 ფერმენტაციის 5.24 სთ-ზე გადალახა, *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* 51333-მა 9.20 სთ-ის შემდეგ, ხოლო *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* 51157 ზღვარი მეშვიდე საათზე გადალახა. დარჩენილმა სამმა შტამმა, pH 4.6 მიღწევა 12-სთ-ზე ხანგრძლივი ინკუბაციის შემდეგ შეძლეს, რაც მათ სუსტ აციდოფიკაციის უნარზე მიუთითებს. *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* 51060 და 51066 აციდოფიკაციის უნარი არ გამოავლინეს.



დიაგრამა 9. სწრაფი აციდოფიკაციის უნარის მქონე შტამები, რომელთაც მეტაბოლური აქტივობის შედეგად რძეში კაზეინის იზოლექტრული წერტილი (pH 4.6) 10-სთ-ზე ნაკლებ დროში მიიღწევა. აღსანიშნავია რომ ყველაზე სწრაფი აციდოფიკაციის სიჩქარე არა სტრუპტოკოკებმა, არამედ *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* 51191 გამოავლინა, რაც მაწვნიდან გამოყოფილი *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis*-ის შტამის უნიკალური მახასიათებელია.

### 3.5.2. პროტეოლიზი

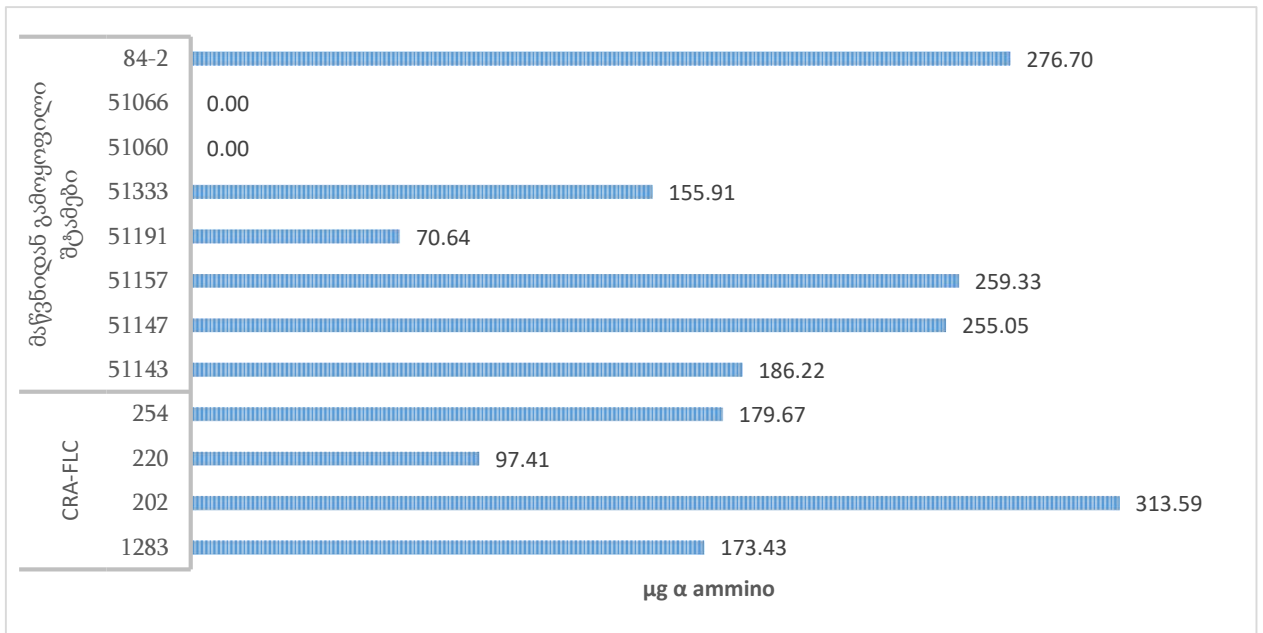
ბაქტერიული შტამების პროტეოლიზური აქტივობა განისაზღვრა O-ფთალდიალდეჰიდის მეთოდით. CRA-FLC-ის კოლექციაში არსებული რძემჟავა ბაქტერიები, გამოყენებულ იქნა პროტეოლიზის უნარის რეფერირებისთვის. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის წარმომადგენელმა შტამებმა აჩვენეს კაზეინის დაშლის მაღალი უნარიანობა. მათ შორის *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 51113 გამოავლინა ყველაზე მაღალი აქტივობა (780.7 მკგ/მლ).



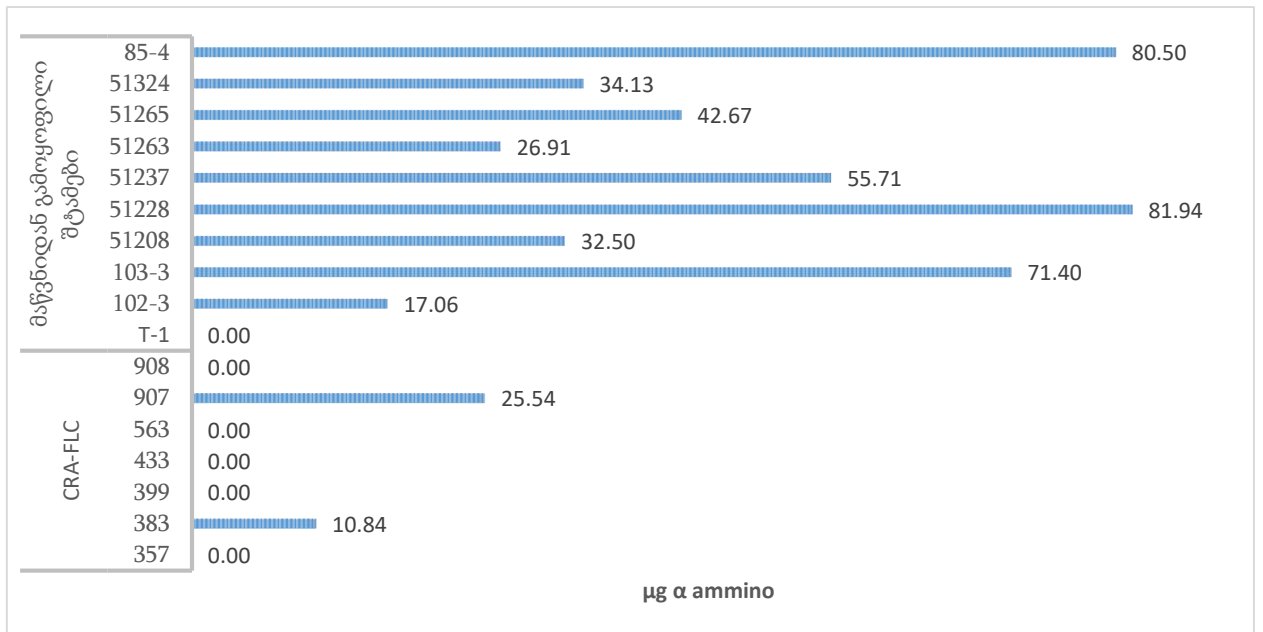
დიაგრამა 10. მაწვნიდან იზოლირებული და CRA-FLC-ს კოლექციაში არსებული *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის შტამების კაზეინის პროტეოლიზის უნარის მაჩვენებელი დიაგრამა.



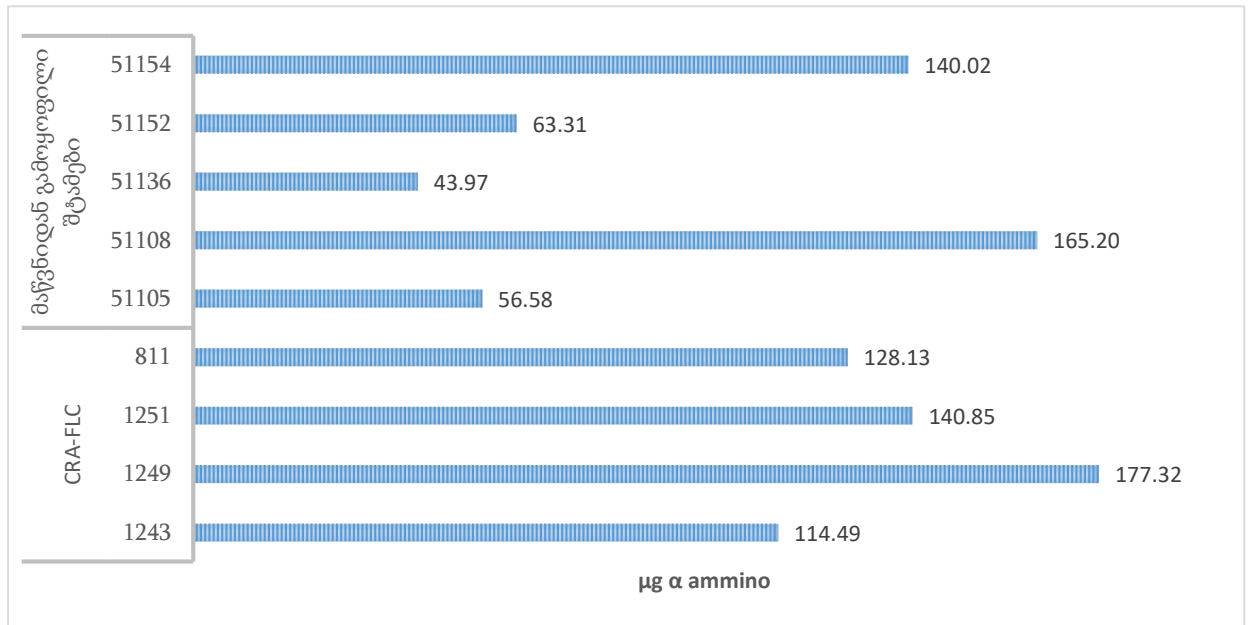
კაზეინის დაშლის უნარი გამოსახულია როგორც თავისუფალი  $\alpha$ -ამინო ჯგუფების რაოდენობა მკგ/მლ-ში.



დიაგრამა 11. მაწვნიდან იზოლირებული და CRA-FLC-ს კოლექციაში არებული *Lb. delbrueckii subsp. lactis*-ის შტამების კაზეინის პროტეოლიზის უნარის მაჩვენებელი დიაგრამა. კაზეინის დაშლის უნარი გამოსახულია როგორც თავისუფალი  $\alpha$ -ამინო ჯგუფების რაოდენობა მკგ/მლ-ში.



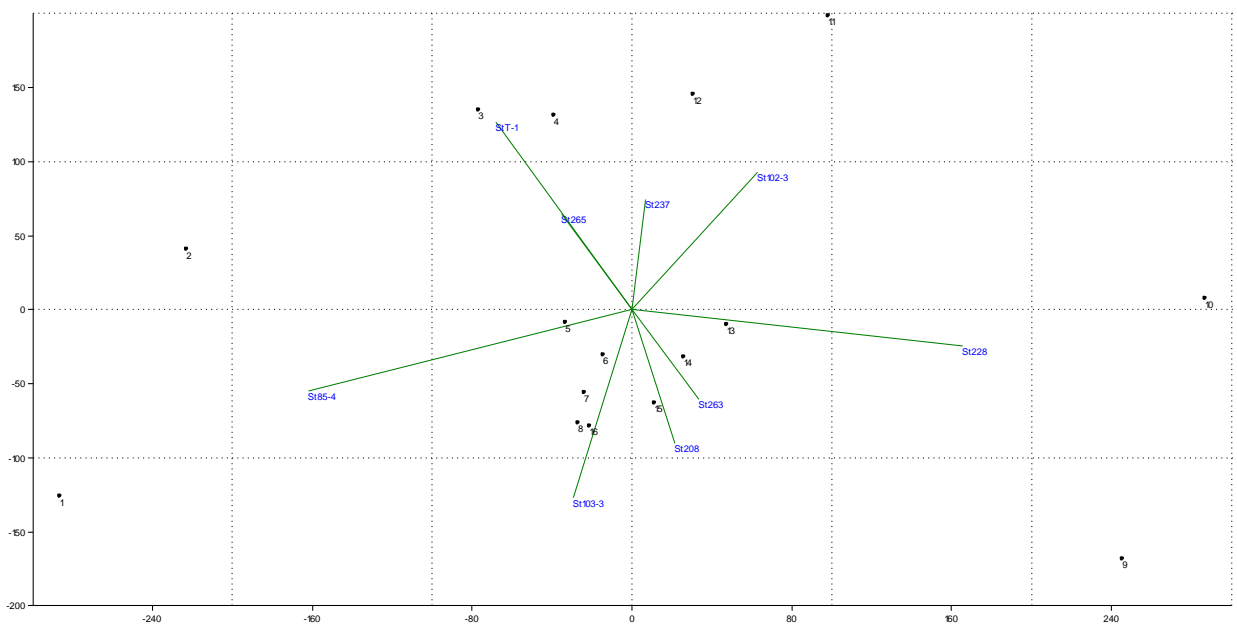
დიაგრამა 12. მაწვნიდან იზოლირებული და CRA-FLC-ს კოლექციაში არებული *St. thermophilus*-ის შტამების კაზეინის პროტეოლიზის უნარის მაჩვენებელი დიაგრამა. კაზეინის დაშლის უნარი გამოსახულია როგორც თავისუფალი  $\alpha$ -ამინო ჯგუფების რაოდენობა მკგ/მლ-ში.



დიაგრამა 13. მაწვნიდან იზოლირებული და CRA-FLC-ს კოლექციაში არებული *Lb. rhamnosus*-ის შტამების კაზეინის პროტოლიზის უნარის მაჩვენებელი დიაგრამა. კაზეინის დაშლის უნარი გამოსახულია როგორც თავისუფალი α-ამინო ჯგუფების რაოდენობა მკგ/მლ-ში.

### 3.5.3. ვისკოზურობა

*St. thermophilus* მეტაბოლური აქტივობის შედეგად მიღებული, რძის კოლტის კონსისტენცია შეფასდა მისი ვისკოზურობის მაჩვენებლის მიხედვით.



დიაგრამა 14. გაზომილი რძის ვისკოზურობის მაჩვენებელი ვარირებს 400 და 500 mPa/s შორის, რაც ზომიერი ვისკოზურობის მაჩვენებელია. შტამი *St. thermophilus* 51228 საშუალებით შედედებულმა რძემ ყველაზე მაღალი ვისკოზურობის მაჩვენებელი გამოავლინა.

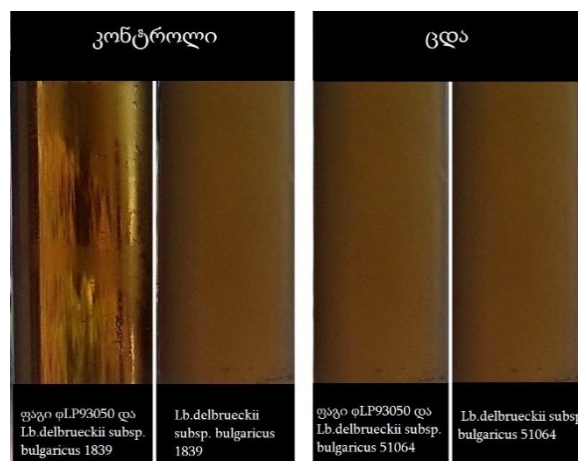
### 3.6. ფაგი-ბაქტერიის ურთიერთქმედება

პროფაგის ინდუქციის ტესტი ჩატარდა ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის შეფასებისთვის შერჩეულ 36 შტამზე, ხოლო ფაგორეზისტენტობა დადგინდა აციდოფიკაციის პროცესის წამყვანი სახეობებისთვის: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და *St. thermophilus*.

*Enterococcus spp.* განიხილება როგორც კონტამინანტური და პოტენციურად სახიფათო მიკროორგანიზმები. ამიტომ დადგინდა მაწვნიდან გამოყოფილი *E. faecalis*, *E. faecium* და *E. durans*-ის კულტურების ფაგომგრძობელობა და რეზისტენტული შტამების მიმართ გამოყოფილ იქნა *de novo* ბაქტერიოფაგები.

#### 3.6.1. დედო კულტურების ლიზოგენურობა და ფაგორეზისტენტობა

ექსპერიმენტისთვის გამოყენებულ იქნა CRA-FLC-ის მიერ მოწოდებული *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* და *St. thermophilus* სპეციფიური ლითიური ბაქტერიოფაგები. ოცდათერთმეტივე საცდელმა შტამმა შესაბამისი ლითიური ბაქტერიოფაგების მიმართ სრული რეზისტენტობა გამოავლინეს.

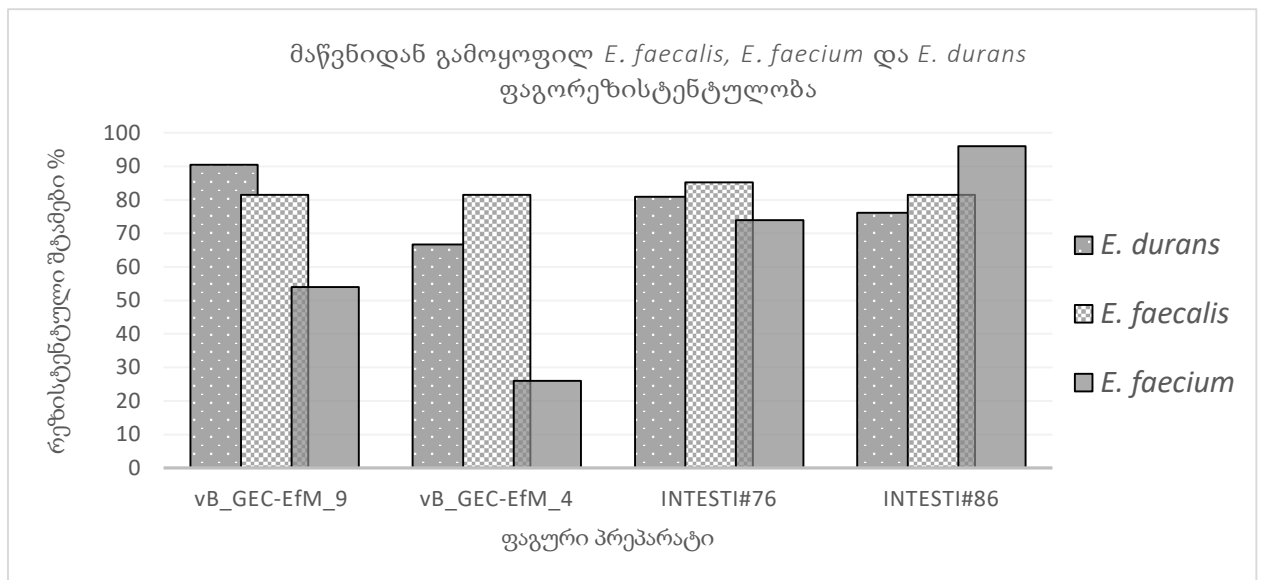


სურათი 24. ფაგორეზისტენტობის ტესტი. *კონტროლი*: მარცხენა სინჯარა - ფაგ-ინფიცირებული პატრონი შტამი, ნაჩვენებია 18სთ-ში მიღწეული სტაბილური ლიზისის სურათი. მარჯვენა სინჯარა - შტამის 18სთ-იანი ზრდა ფაგის დამატების გარეშე. *ცდა*: მარცხენა სინჯარა - ფაგ-ინფიცირებული ტესტ-შტამის 18სთ-იანი ინკუბაცია ლიზისის გარეშე. მარჯვენა სინჯარა - ტესტ-შტამის 18სთ -იანი ზრდა ფაგის დამატების გარეშე.

პროფაგის ინდუქციის ტესტი ჩატარდა ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის შესწავლისთვის შერჩეულ 36 შტამზე. (*Lb rhamnosus* 51136, 51105, 51152, 51154, 51108; *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 102-1, 51064, 51072, 51057, 51113, 85-1, 93, 51051, 51049, 51110, 51111, 51330, 51153; *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 51060, 51066, 51147, 51191, 51143, 84-2, 51333, 51157; *St. thermophilus* 102-3, 85-4, 51263, 51265, 51228, T-1, 51208, 103-3, 51237, 51324). ინდიკატორულ კულტურებად გამოყენებულ იქნა თავდ ტესტ-კულტურები. საცდელ შტამებში პროცედურის არცერთ ეტაპზე პროფაგის ინდუქცია არ გამოვლინდა.

### 3.6.2. მაწვნიდან გამოყოფილი *Enterococcus spp.* ფაგომგრძობელობა

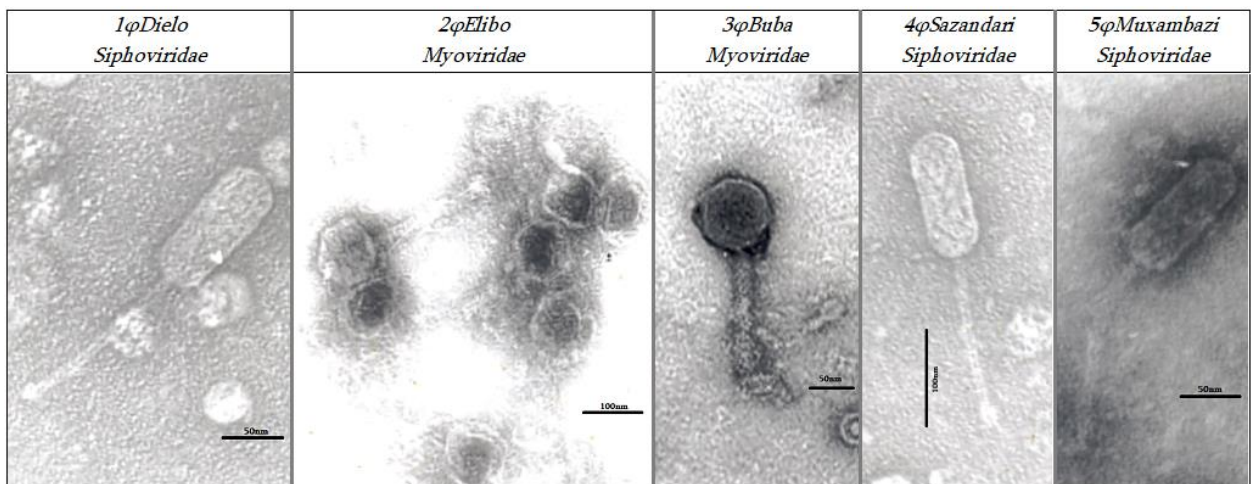
პირველ ეტაპზე მაწვნიდან გამოყოფილი *E. faecium*-ის 45 შტამის, *E. faecalis*-ის 28 და *E. durans*-ის 25 შტამის ფაგომგრძობელობა განსაზღვრული იქნა *vB\_GEC-EfM\_9*, *vB\_GEC-EfM\_4* მონოფაგების და INTESTI/R-022601#76(2017), INTESTI/R-022601#86(2018) ფაგური პრეპარატების მიმართ. შედეგად ოთხივე პრეპარატის მიმართ სრული რეზისტენტობა *E. faecalis*-ის შტამების 66.67%, *E. durans*-ის 52.38% და *E. faecium* - 26% გამოავლინა. დეტალური ინფორმაცია თითოეული პრეპარატის მიმართ მგრძობელობაზე მოცემულია დიაგრამა 15-ზე.



დიაგრამა 15. მაწვნიდან გამოყოფილი *E. faecium*, *E. faecalis* და *E. durans* კულტურების პროცენტული ფაგორეზისტენტობა *vB\_GEC-EfM\_9*, *vB\_GEC-EfM\_4*, INTESTI/R-022601#76 და INTESTI/R-022601#86(2018) მიმართ.

მეორე ეტაპისთვის *de novo* ბაქტერიოფაგის გამოსაყოფად შერჩეული იქნა თითოეული სახეობის წარმომადგენელი 5 რეზისტენტული შტამი (სულ 15 კულტურა). გამდიდრების მეთოდში გამოყენებამდე, მოცემული შტამების ლიზოგენურობის გამორიცხვა, Mitomycin C-ით ინდუქციის მეთოდის გამოყენებით განხორციელდა.

გამდიდრების მეთოდისთვის გამოყენებული იქნა 2017 წელს მოპოვებული სამი მდინარის წყლის სინჯი: მტკვარი (თბილისი), რიონი (ქუთაისი), იორდანე (ისრაელი), ასევე ტბის წყლის სინჯი (თბილისი), შავი ზღვის წყლის სინჯი (ბათუმი) და 9 თვის ჯანმრთელი ჩვილის განავალი. შედეგად გამოყოფილი, გასუფთავებული, კონცენტრირებული და ტრანსმისიური ელექტრონული მიკროსკოპით დახასიათებული იქნა შემდეგ ხუთი ბაქტერიოფაგი: *1φDielo* – *Siphoviridae*, წყარო: მდინარე რიონი, პატრონი შტამი: *E. faecalis* 170; *2φElibo* – *Myoviridae*, წყარო: განავალი, პატრონი უჯრედი: *E. faecium* 229; *3φBuba*-*Myoviridae* წყარო: მდინარე რიონი, პატრონი შტამი: *E. faecium* 291; *4φSazandari* და *5φMuxambazi* ოჯახი: *Siphoviridae*, წყარო: მდინარე რიონი, პატრონი შტამი: *E. faecium* 229. მიღებული ბაქტერიოფაგების მორფოლოგია ნაჩვენებია სურათ 25-ზე.

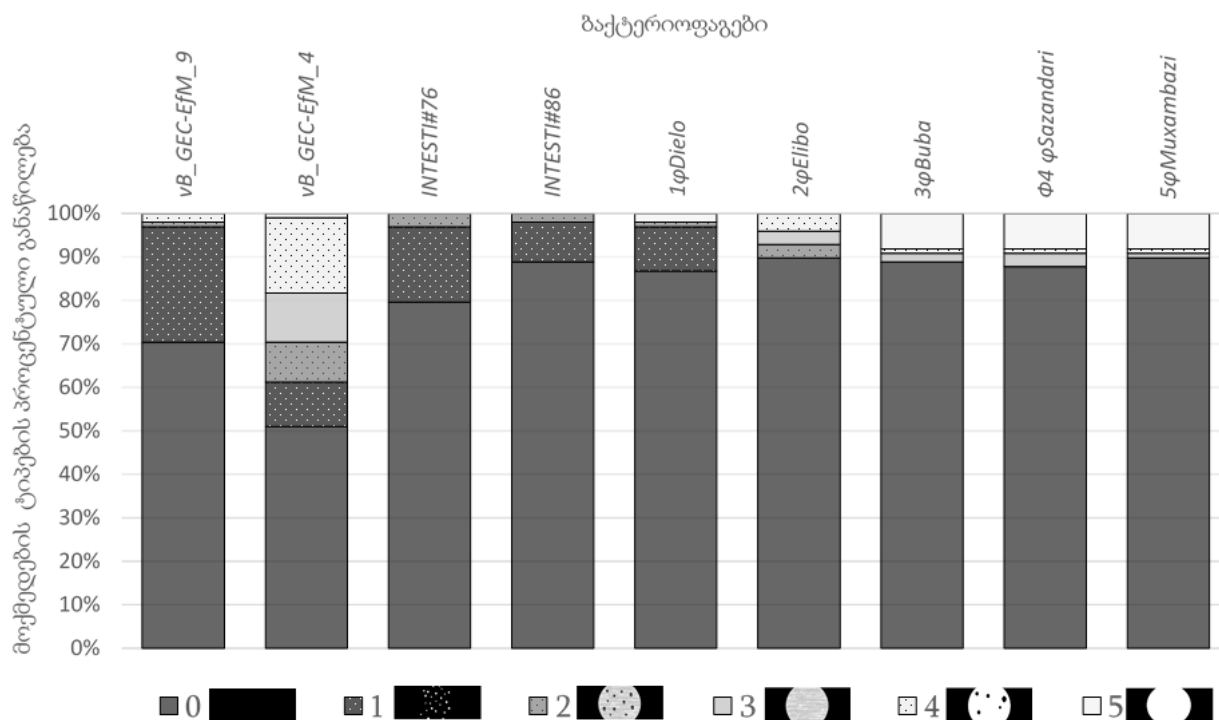


სურათი 25. კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი ახალი ბაქტერიოფაგების ტრანსმისიური ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით ვიზუალიზირებული ვირიონების მორფოლოგია.

მიღებული ფაგების მიერ პატრონი უჯრედის ლიზისის სტაბილურობის შეფასებამ აჩვენა, რომ ი.მ. 0.1 პირობებში *5φMuxambazi* 24სთ-ს განმავლობაში ინარჩუნებს თავისი პატრონი კულტურის *E. faecium* 229 სრულ (გამჭვირვალე არე) ლიზისს.

დანარჩენმა ოთხმა ტესტ ფაგმა სტაბილური ლიზისი ინკუბაციის არცერთ ეტაპზე არ აჩვენა.

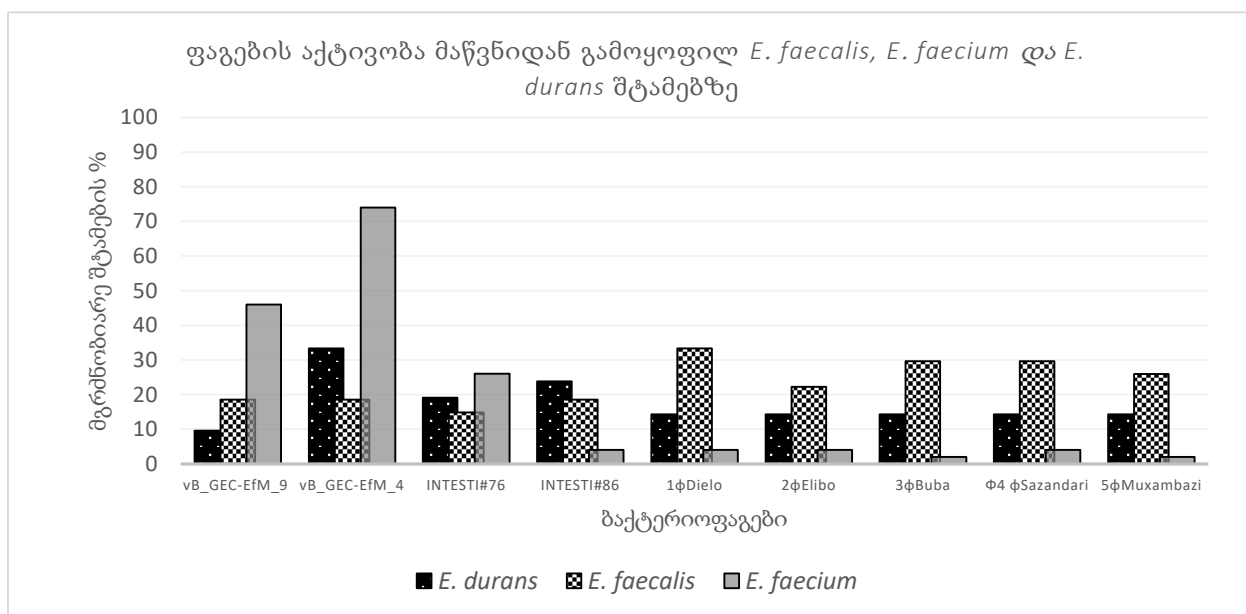
მოქმედების ტიპის მიხედვით *vB\_GEC-EfM\_9*, *vB\_GEC-EfM\_4*, *INTESTI#76*, *INTESTI#86*, *1φDielo*, *2φElibo*, *3φBuba*, *4φSazandari* და *5φMuxambazi* აქტივობა ნაჩვენებია დიაგრამა 16-ზე. დიაგრამიდან ჩანს რომ გამოყენებული ფაგების მიმართ შტამების უმრავლესობამ რეზისტენტობა გამოავლინა, სადაც რეზისტენტობის უმაღლესი მაჩვენებელი 89.8% *2φElibo* მიმართ დადგინდა. ყველაზე აქტიური მოქმედება *vB\_GEC-EfM\_4* აჩვენა, რომლის მიმართაც რეზისტენტობა შტამების მხოლოდ 51.02%-ში გამოვლინდა, არასრული ლიზისი 17.35%-ზე დაფიქსირდა, ხოლო სრული ლიზისი შტამების მხოლოდ 1.02%-ზე დაფიქსირდა. ამავდროულად აღსანიშნავია, რომ ახლად გამოყოფილმა ფაგებმა: *3φBuba*, *4φSazandari* და *5φMuxambazi* სრული ლიზისი მაწვნიდან გამოყოფილი ტესტ შტამების >8.16%-ზე აჩვენა.



დიაგრამა 16. ნაჩვენებია მაწვნიდან გამოყოფილი *Enterococcus spp.*-ს მიმართ გამოყენებული ფაგების მოქმედების ტიპების განაწილება. 0 - ფაგის მოქმედების ზონაზე აღინიშნება უწყვეტი ბაქტერიული ნაზარდი, მოქმედების უბანში არ ფიქსირდება ბაქტერიული ზრდის შეფერხების ნიშნები (რეზისტენტობა); 1 - გამოხატული ფაგური კოლონიები ბაქტერიული შტამის ნაზარდზე (მგრძნობიარე); 2 - მოქმედების უბანზე აღინიშნება მეორადი ბაქტერიული ზრდა

და ცალკეული ბაქტერიული კოლონიების ფორმირება (მგრძნობიარე); 3 - არასრული ლიზისი, მოქმედების ზონა დაბურულია, უბანზე გამოხატულია მეორადი ბაქტერიული ზრდა (მგრძნობიარე); 4- ნახევრადსრული ლიზისი, მოქმედების უბანზე აღინიშნება რეზისტენტული ბაქტერიული კოლონიების ზრდა (მგრძნობიარე); 5-სრული ლიზისი, ფაგის მოქმედების ზონა გამჭვირვალეა (მგრძნობიარე).

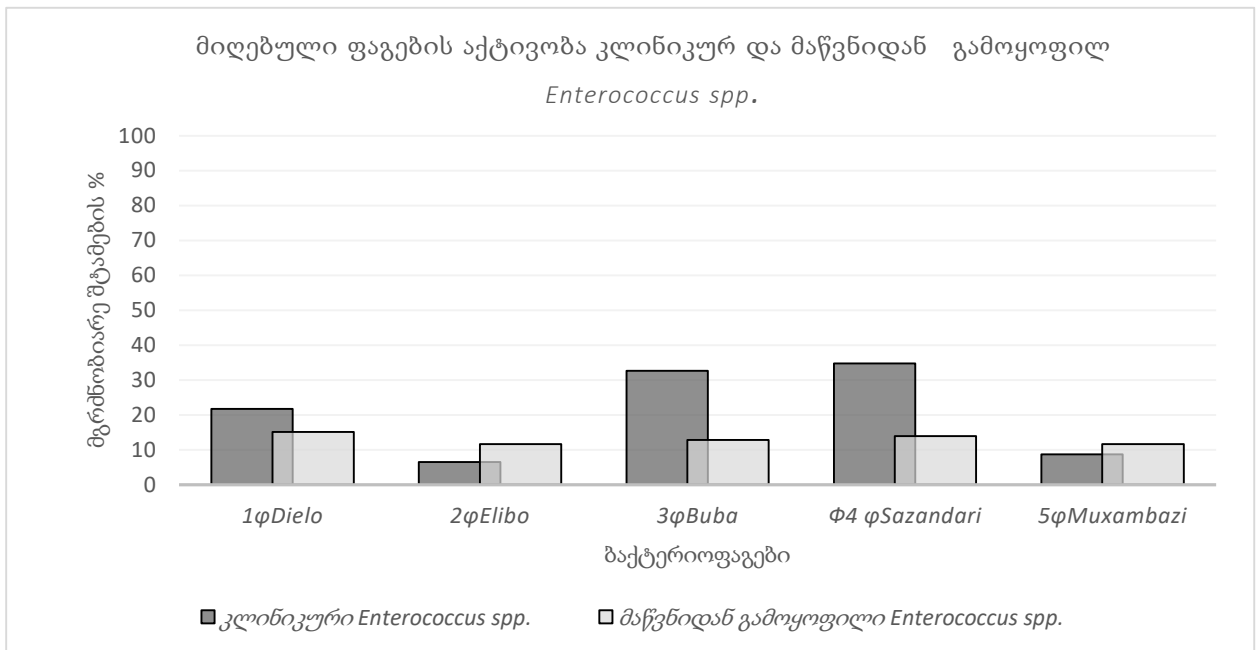
მაწვნიდან გამოყოფილი *E. faecium* და *E. durans* კულტურების მიმართ ყველაზე მაღალი აქტივობა შესაბამისად 74% და 33.4%, გ. ელიავას სახ. ინსტიტუტის კოლექციიდან მიღებულმა *vB\_GEC-EfM\_4* მონოფაგმა აჩვენა, ხოლო *E. faecalis*-ის მიმართ ყველაზე ეფექტური (33.3%) ახლად იზოლირებული *1φDielo* აღმოჩნდა. სამივე სახეობის წარმომადგენელი შტამების მგრძნობელობის პროცენტულობა თითოეული გამოყენებული ფაგის მიმართ ნაჩვენებია დიაგრამა 17-ზე.



დიაგრამა 17. გ. ელიავას სახ. ინსტიტუტის კოლექციიდან მიღებული ორი მონოფაგის, მრავალკომპონენტური ფაგური პრეპარატების და ახლად გამოყოფილი ფაგების აქტივობა მაწვნიდან გამოყოფილ *E. faecalis*, *E. faecium* და *E. durans* შტამებზე. ნაჩვენებია თითოეული სახეობის მგრძნობიარე შტამების პროცენტული რაოდენობა.

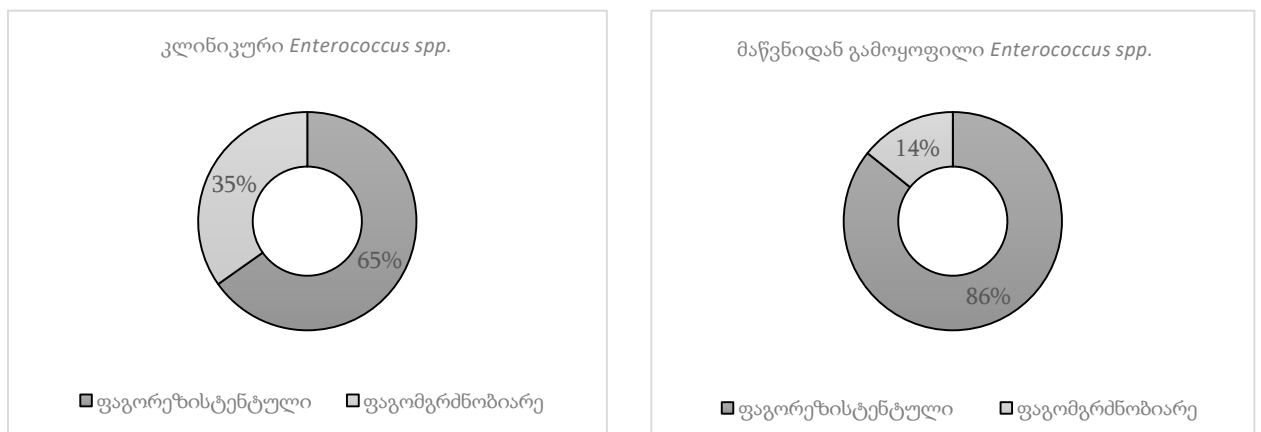
*De novo* მიღებული ბაქტერიოფაგების აქტივობა აგრეთვე შეფასებულ იქნა გ.ელიავას სახ. ინსტიტუტის კოლექციიდან მიღებულ *Enterococcus spp.* ორმოცდაექვს კლინიკურ იზოლატზე. *1φDielo*, *3φBuba*, და *4φSazandari*-მა მაწვნიდან გამოყოფილ კულტურებთან შედარებით მაღალი აქტივობა აჩვენეს კლინიკური იზოლატების მიმართ, შესაბამისად 21.73%, 32.6% და 34.78% კლინიკური და 15.11%, 12.79% და

13.95% აქტივობით მაწვნიდან გამოყოფილი კულტურების მიმართ. მონაცემები ნაჩვენებია დიაგრამა 18-ზე.



დიაგრამა 18. ახლად გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების აქტივობა მაწვნიდან გამოყოფილ და *Enterococcus spp.* კლინიკურ იზოლატებზე.

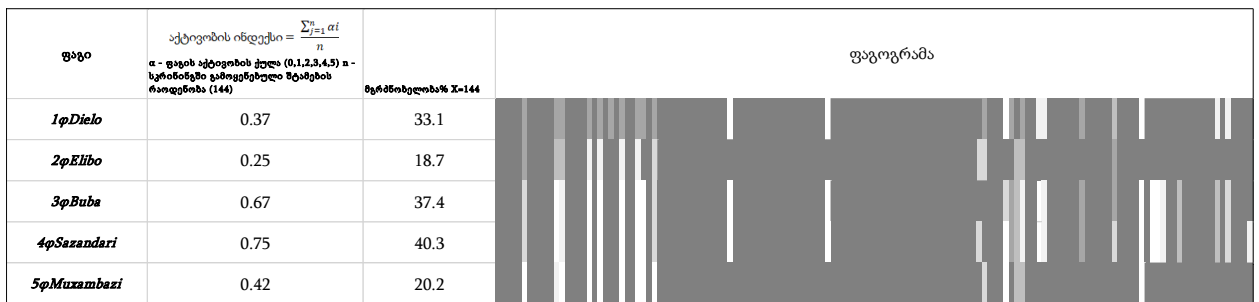
აღსანიშნავია, რომ *Enterococcus spp.* კლინიკურმა იზოლატებმა ფაგომგრძობელობის უფრო მაღალი პროცენტული მაჩვენებელი გამოავლინეს.



დიაგრამა 19. მარცხნივ - კლინიკური *Enterococcus spp.* იზოლატების ფაგომგრძობელობის მაჩვენებელი, მარჯვნივ - მაწვნიდან გამოყოფილი *Enterococcus spp.* ფაგომგრძობელობის პროცენტულობა.



დიაგრამა 20-ზე ნაჩვენებია ახლად გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების აქტივობის ინდექსი, რაც გულისხმობს მოქმედების სიმძლავრის მიხედვით მინიჭებული ქულის საფუძველზე, ფაგის ფარდობითი აქტივობის დადგენილ ინდექსს. მოცემული აქტივობის ინდექსი ეფუძნება 144 შტამის (46 კლინიკური + 98 მაწვნის იზოლატი) სკრინინგის შედეგად მიღებულ მონაცემებს. ასევე მოცემულია შტამების მგრძობელობის პროცენტული მაჩვენებელი და ფაგოგრამა. მოცემული ფაგოგრამა წარმოადგენს ფაგების ლიზისური აქტივობის ილუსტრაციას თითოეული ტესტ-შტამის მიმართ. საიდანაც ფაგების განსხვავებული აქტივობა ჩანს. რის საფუძველზეც შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ მორფოლოგიურად მსგავსი, საერთო პატრონი შტამის და გამოყოფის წყაროს მქონე ბაქტერიოფაგები *4φSazandari* და *5φMuxambazi* ნამდვილად განსხვავებული ფაგური კლონებია.



დიაგრამა 20. მიღებული ბაქტერიოფაგების აქტივობის ინდექსი, კლინიკური და მაწვნიდან გამოყოფილი შტამების ჯამური პროცენტული მგრძობელობა და ფაგოგრამა. ფაგოგრამაზე გამოყენებული ბაქტერიოფაგების აქტივობა ილუსტრირებულია შემდეგი ფერების სქემის მიხედვით:

მოქმედება	5	4	3	2	1	0
ფერი/აღნიშვნა	White	Light Gray	Medium Gray	Dark Gray	Very Dark Gray	Black

სადაც: 0 - ფაგის მოქმედების ზონაზე აღინიშნება უწყვეტი ბაქტერიული ნაზარდი, მოქმედების უბანში არ ფიქსირდება ბაქტერიული ზრდის შეფერხების ნიშნები (რეზისტენტობა); 1 - გამოხატული ფაგური კოლონიები ბაქტერიული შტამის ნაზარდზე (მგრძობიარე); 2 - მოქმედების უბანზე აღინიშნება მეორადი ბაქტერიული ზრდა და ცალკეული ბაქტერიული კოლონიების ფორმირება (მგრძობიარე); 3 - არასრული ლიზისი, მოქმედების ზონა დაბურულია, უბანზე გამოხატულია მეორადი ბაქტერიული ზრდა (მგრძობიარე); 4- ნახევრადსრული ლიზისი, მოქმედების უბანზე აღინიშნება რეზისტენტული ბაქტერიული კოლონიების ზრდა (მგრძობიარე); 5-სრული ლიზისი, ფაგის მოქმედების ზონა გამჭვირვალეა (მგრძობიარე).

### 3.7. პრობიოტიკური პოტენციალი

პრობიოტიკური პოტენციალის შესასწავლად შერჩეულ იქნა *Lb. rhamnosus*-ის სახეობის წამომადგენელი ხუთი შტამი: *Lb rhamnosus* 51136, 51105, 51152, 51154, 51108.

#### 3.7.1. ნაღვლის მარილების მიმართ მგრძნობელობა

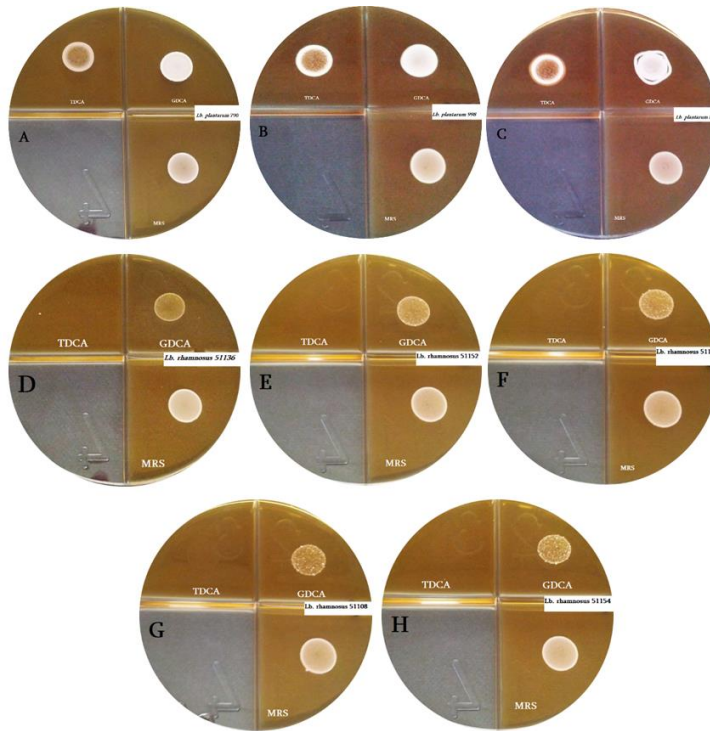
*Lb. rhamnosus*-ის შტამებმა ნაღვლის მარილის მიმართ საშუალო მგრძნობელობა გამოავლინეს. მონაცემები აღწერილია ცხრილ 10-ში. შტამი 51154 ყველაზე მგრძნობიარე აღმოჩნდა, 18.24%-იანი ზრდით 0.5% ნაღვლის შემცველ არეში. ყველაზე რეზისტენტული კი შტამი 51108 გამოდგა, რომელიც 1% ნაღვლის შემცველ არეში 38.36%-იანი ზრდას აჩვენებს. კონტროლთან შედარებით, (CRA-FLC-ის კოლექციის პრობიოტიკული შტამი *Lb. plantarum* 790) მაწვნიდან გამოყოფილმა *Lb. rhamnosus*-ის შტამებმა, გამოავლინეს ნაღვლის მიმართ მდგრადი გამძლეობა.

შტამები	% ზრდა A <sub>560</sub>		
	<i>Bile</i> - 0.3%	<i>Bile</i> - 0.5%	<i>Bile</i> - 1%
<i>Lb. rhamnosus</i> 51136	26,12	24,68	24,94
<i>Lb. rhamnosus</i> 51105	24,70	22,02	23,45
<i>Lb. rhamnosus</i> 51152	24,80	23,61	27,86
<i>Lb. rhamnosus</i> 51154	20,10	18,24	18,62
<i>Lb. rhamnosus</i> 51108	46,66	37,81	38,36
<i>Lb. plantarum</i> 790	16,69	11,88	9,43

ცხრილი 10. *Lb. rhamnosus*-ის შტამების ნაღვლის მიმართ გამძლეობის ამსახველი ცხრილი. ნაჩვენებია შტამების სიცოცხლისუნარიანობა ნაღვლის 0.3%, 0.5% და 1% შემცველ MRS თხევად საკვებ არეში. მონაცემები ასახავს შესაბამის კონტროლებთან მიმართებაში რეზისტენტულობის ზრდის პროცენტულ მაჩვენებელს.

#### 3.7.2. ნაღვლის მარილების დაშლა

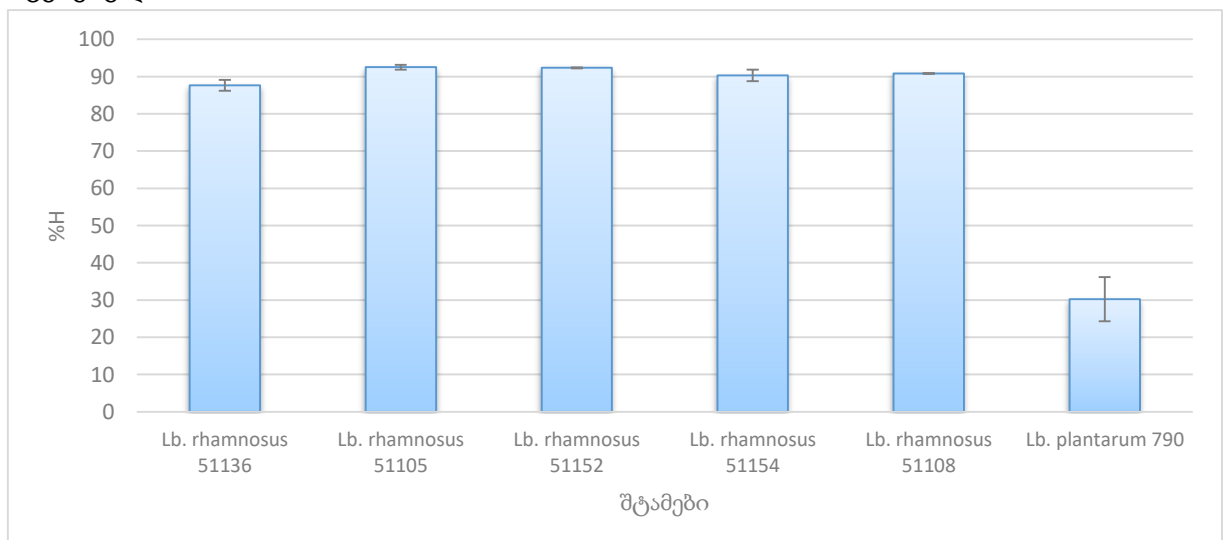
ნაღვლის მარილების: ტეუროდეოქსიქლორატის მჟავის და გლიკოდეოქსიქლორატის მჟავის დაშლის უნარი ტესტ შტამებმა არ გამოავლინეს. ხუთივე შტამის ზრდა დაითრგუნა ტეუროდეოქსიქლორატის მჟავის თანაობისას, ხოლო გლიკოდეოქსიქლორატის მჟავის შტამების ზრდაზე გავლენა არ მოუხდენია. (იხილეთ სურათი 26).



სურათი 26. ტეუროდეოქსიქლორატის მჟავის და გლიკოდეოქსიქლორატის მჟავის დაშლის უნარის განსაზღვრა. A, B და C - დადებითი კონტროლი, D,E,F და G - ტესტ შტამების ზრდის ამსახველი სურათი. ტეუროდეოქსიქლორატის მჟავა თრგუნავს ხუთივე შტამის ზრდას, ხოლო გლიკოდეოქსიქლორატის მჟავის შემცველ ნიადაგზე ტესტ შტამების ზრდა არ იზღუდება.

### 3.7.3. ჰიდროფობულობა

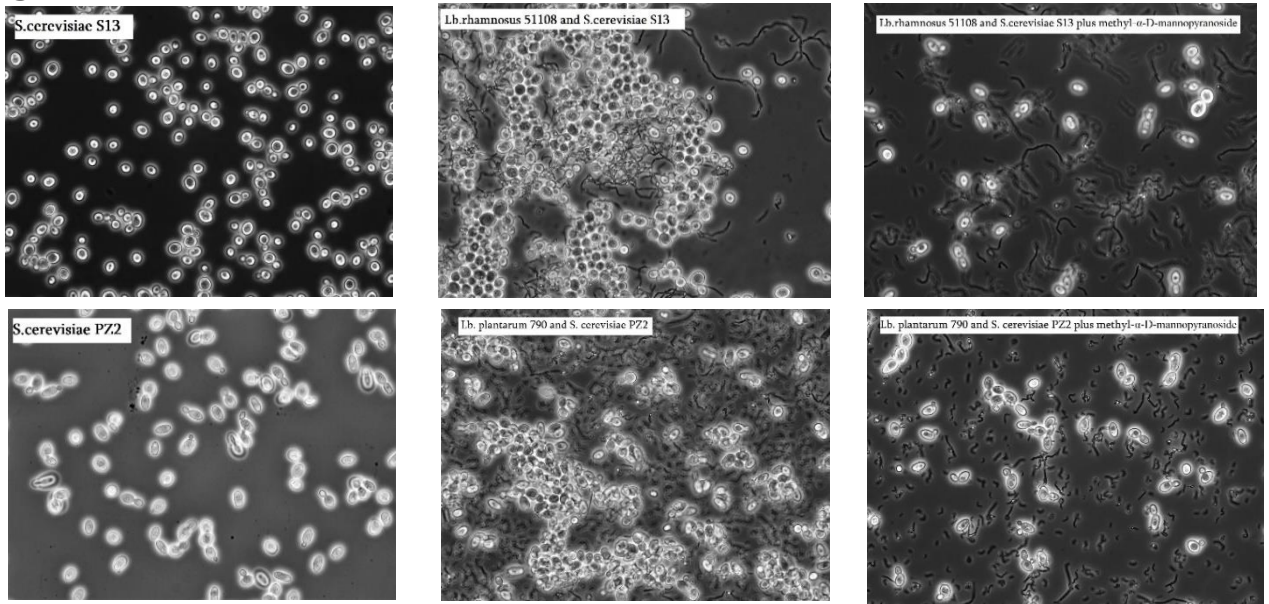
შტამის უჯრედულ კედელზე ნახშირწყალბადების ადჰეზია შეფასებულ იქნა როგორც შტამის ჰიდროფობულობა (%H). ხუთივე ტესტ შტამმა აჩვენა ჰიდროფობულობის მაღალი ხარისხი. მაჩვენებლები ვარირებენ 92.51% და 87.61% შორის, სადაც პრობიოტიკულმა კონტროლ შტამმა აჩვენა მხოლოდ 30.2% მაჩვენებელი.



დიაგრამა 21. ტესტ შტამების და კონტროლ შტამის ჰიდროფობულობის მაჩვენებლები.

### 3.7.4. საფუვრის უჯრედზე აგლუტინაცია

ბაქტერიული შტამების მანოზა-სპეციფიური ადჰეზიის უნარის შეფასება *Sacharomyces cerevisiae*-ს უჯრედების აგლუტინაციის მთოდის გამოყენებით განხორციელდა. ხუთივე ტესტ შტამმა გამოავლინა მანოზა-სპეციფიური ადჰეზიის უნარი.



სურათი 27. *Lb. rhamnosus* 51108 და პრობიოტიკული კონტროლ შტამის - *Lb. plantarum* 790 მანოზა-სპეციფიური საფუვრის აგლუტინაცია. სინათლის-ფაზის მიკროსკოპია, გადიდება X40 (Axioskop 40 HBO 50/AC, ZEISS).

### 3.8. მაწვნის დედოს კონსტრუირება

მიღებული მონაცემების შეჯამების შემდეგ, საცდელი მაწვნის დედოს კონსტრუირებისთვის შერჩეულ იქნა 14 კულტურა, მათ შორის *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის შემდეგი შტამები: 51110, 51113, 51111; *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* : 51333, 51157, 51191; *St. thermophilus* : 51265, 85-4, T-1 და *Lb. rhamnosus*-ის ხუთი შტამი: 51136, 51105, 51152, 51154, 51108.

შტამის ნომერი	51110	51113	102-1	51333	51191	51157	T-1	85-4	51265	51152	51154	51136	51108	51105
სახეობა	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>S.thermophilus</i>	<i>S.thermophilus</i>	<i>S.thermophilus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
ბიოტიპი	<i>Lb. bulgaricus</i> Biot. C	<i>Lb. bulgaricus</i> Biot. C	<i>Lb. bulgaricus</i> Biot. F	<i>Lb. lactis</i> Biot. F	<i>Lb. lactis</i> Biot. A	<i>Lb. lactis</i> Biot. B	<i>S. therm. Biot. F</i>	<i>S. therm. Biot. C</i>	<i>S. therm. Biot. A</i>	<i>Lb. rham. Biot. B</i>	<i>Lb. rham. Biot. B</i>	<i>Lb. rham. Biot. B</i>	<i>Lb. rham. Biot. A</i>	<i>Lb. rham. Biot. A</i>
წარმოების ადგილი	მესტია	გორი	აბასთუმანი	ტაბახმულა	ქუთაისი	თელავი	ონი	ჯუთა	მარტყოფი	დმანისი	გომორი	სენაკი	მესტია	თელავი
მოპოვების თარიღი	2014	2014	2105	2014	2014	2013	2015	2015	2014	2013	2013	2013	2014	2014
პროტეოლიზი (ფა ა სამსი)	492.87	780.69	690.02	155.91	70.64	259.33	0.00	80.50	42.67	63.31	140.02	43.97	165.20	56.58
ფაგო-რეზისტენტობა	ΦLP93042, ΦLP93050, ΦBYM	ΦLP93042, ΦLP93050, ΦBYM	ΦLP93042, ΦLP93050, ΦBYM	ΦPS9, ΦPS17, ΦAG14, ΦAG8, ΦA113, ΦA19	ΦPS9, ΦPS17, ΦAG14, ΦAG8, ΦA113, ΦA19	ΦPS9, ΦPS17, ΦAG14, ΦAG8, ΦA113, ΦA19	Φ33, Φ32, Φ592/2, Φ593/2, Φ46	Φ33, Φ32, Φ592/2, Φ593/2, Φ46	Φ33, Φ32, Φ592/2, Φ593/2, Φ46	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
აქტივობის ხარისხი	8.28სთ Vmax=1.0	>18სთ Vmax=4.0	>18სთ Vmax=0.9	5.24სთ Vmax=0.925	9.20სთ Vmax=1.146	8.0სთ Vmax=n/d	10.46სთ Vmax=1.6	14.58სთ Vmax=1.714	11.42სთ Vmax=1.609	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
მიკროსკოპია														

ცხრილი 11. მაწვნის დედოს კონსტრუირებისთვის შერჩეული შტამების მონაცემთა ცხრილი.

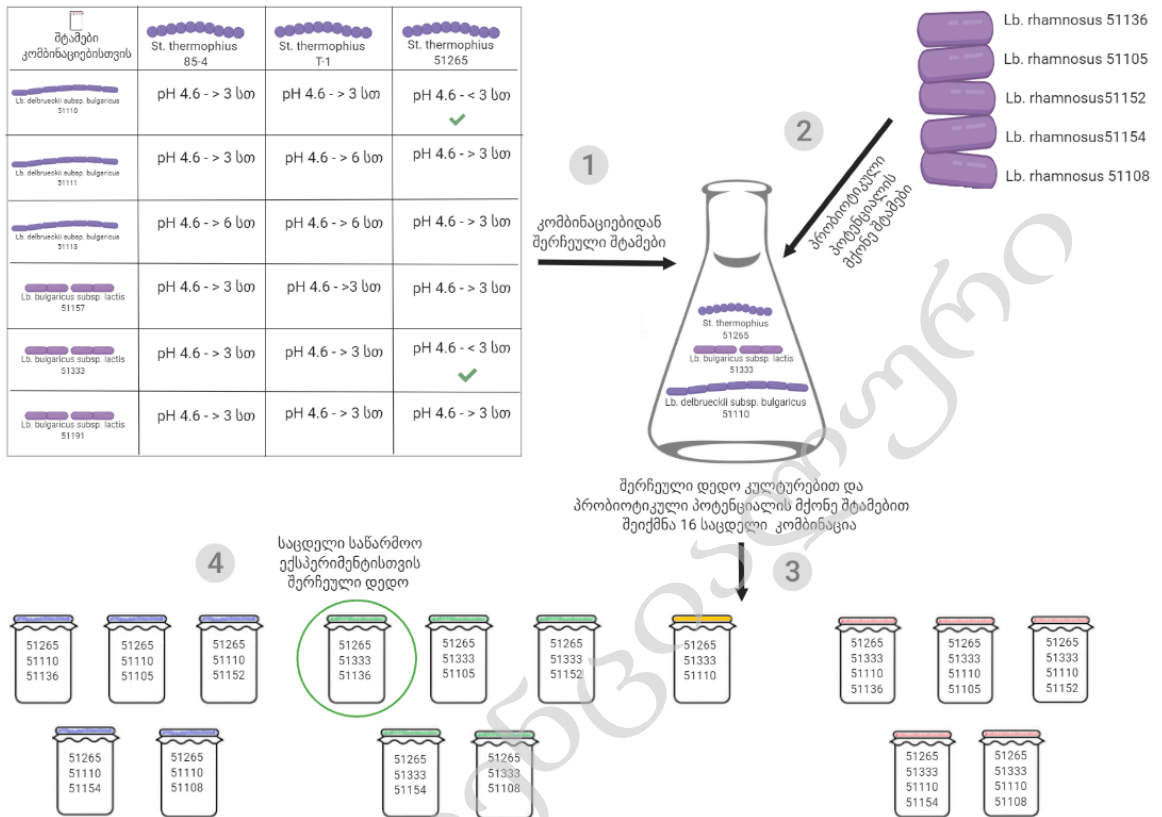
ბაქტერიულ ნაზარდზე დაწვეთების გზით ანტაგონისტური აქტივობა არცერთი შტამის მიერ არ გამოვლინდა.

კომბინაციების აციდოფიკაციის სიჩქარის დასადგენად, სწაყის ეტაპზე, განხორციელდა სტერპტოკოკული შტამების შეწყვილება *Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus*-ის და *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis*-ის შერჩეულ კულტურებთან. შესაბამისად შედგა 18 კომბინაცია. განისაზღვრა დაწყვილებული კულტურების აციდოფიკაციის სიჩქარე. კულტურათა წყვილები, რომელთაც pH 4.6 გადალახეს ფერმენტაციის მესამე საათზე, შერჩეულ იქნა შემდგომი მრავაკლომპონენტური კომბინაციების საცდელად. ამ პრინციპით შერჩეულ კომბინაციებს: *St. thermophilus* 51265/*Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus* 51110 და *St. thermophilus* 51265/*Lb. bulgaricus* subsp. *lactis* 51333 დაემატა *Lb. rhamnosus*-ის შტამები. შესაბამისად მიღებულ იქნა 11 სამ-კომპონენტური და 5 ოთხ-კომპონენტური დედო. სტარტერის შერჩევის სქემა ნაჩვენებია სურათ 28-ზე. აღსანიშნავია, რომ მიღებული 16 კომბინაციიდან, *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis* 51133-ის შემცველმა ყველა ვარიანტმა 44°C-ზე, 2-3 საათიანი ფერმენტაციის შემდეგ წარმოქმნა მყარი კოლტი.

ამავდროულად მიღებული 16 კომბინაცია შეფასდა ორგანოლეპტიკური და სენსორული ნიშან-თვისებების მიხედვით. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის შემცველმა კომბინაციებმა გამოავლინეს მეტწილად ტკბილი და რძის მსგავსი სურნელი და გემო, კოლტის კონსისტენცია საშუალოდ მყარი, სუსტი სინერეჯით. ხოლო *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*-ის შემცველმა კომბინაციებმა მეტწილად მაწვნის მსგავსი ორგანოლეპტიკური თვისებების გამოავლინეს. შესაბამისად, სწრაფი



აციდოფიკაციის უნარი მქონე და ორგანოლეპტიკურად შესაფერისი, სამი კომპონენის შემცველი სტარტერი: *St. thermophilus* 51265/*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 51333/*Lb. rhamnosus* 51136 შერჩეულ იქნა შემდგომი საცდელი საწარმოო გამოცდებისთვის.



სურათი 28. მრავალკომპონენტური მწვანის დედო კულტურის კონსტრუირების ამსახველი სქემა. პირველ ეტაპზე განხორციელდა სამი შერჩეული სტრუქტურული შტამის შეწყვილება *Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus*-ის და *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis*-ის შერჩეულ კულტურებთან. შედეგად შეირჩა სწრაფი აციდოფიკაციის უნარის მქონე ორი კომბინაცია. შემდგომ საფეხურზე შერჩეულ სტრუქტურულ კულტურებს დაემატათ სინერგეტიკული *Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus*-ის და *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis*-ის შტამები და პრობიოტიკური პოტენციალის მქონე *Lb. rhamnosus*-ის კომბინაციები. შედეგად მიღებული 16 კომბინაცია შეფასდა აციდოფიკაციის სიჩქარის და ორგანოლეპტიკური მახასიათებლების მიხედვით. შედეგად საპილოტო-საწარმოო ექსპერიმენტისთვის შერჩეულ იქნა სამი კომპონენტური სტარტერი (*St. thermophilus* 51265/*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 51333/*Lb. rhamnosus* 51136).

### 3.9. საპილოტო-საწარმოო ექსპერიმენტი

MilkoFood<sup>LTD</sup> საწარმოს მხარდაჭერით, შერჩეული სამკომპონენტური ავტოქტონური ცოცხალი დედოს გამოყენებით განხორციელდა 200ლ რძის შედეგად


და შესაბამისი რაოდენობის პროდუქტის ჩამოსხმა. ცდა განმეორდა სამჯერ. დამზადებული მაწონი, გემოვნებითი, ორგანოლეპტოკური თვისებებით და ხარისხით, ეთანხმება მწარმოებლის მოთხოვნებს და სახელმწიფოს მიერ დადგენილ სტანდარტს. შესაბამისად მიღებული პროდუქტი მიეწოდა მომხმარებელს.

საპილოტო ექსპერიმენტის მონიტორინგისთვის, ყოველ ცდაში, შემთხვევითათ შერჩეული იქნა დამზადებული პროდუქტის 12 სინჯი. მწარმოებლის მიერ დადგენილი ვარგისიანობის ვადა (14 დღე), განისაზღვრა დაკვირვების პერიოდად. მიღებულმა მონაცემებმა გვაჩვენა, რომ ტიტრირებადი მჟავიანობის მაჩვენებელი ვარირებდა 90-135°T, რაც საქპატენტის მიერ პროდუქტის რძეზე დამზადებული მაწონის დადგენილი ნორმის სტანდარტს (80-105°T) მცირედით ცდება. pH 4.6±2-4.1±2 უტოლდებოდა ანუ ნორმის ფარგლებში ვარირებდა.

მიღებულ პროდუქტში 14 დღის განმავლობაში ცოცხალი რძემჟავა ბაქტერიების საერთო რაოდენობა არანაკლებ 10<sup>7</sup>კწე/მლ წამოადგენდა. ეს მაჩვენებელი დამაკმაყოფილებელია ცოცხალი კულტურების შემცველი იოგურტის ტიპის რძის პროდუქტის სტანდარტისთვის. პროდუქტის დამზადების საწყის ეტაპზე (ფერმენტაციის დაწყებიდან 5სთ შემდეგ) და შენახვის პირობების დაცვისას, მომდევნო 14 დღის განმავლობაში, კოლიფორმები და სოკოვანი ზრდა სინჯებში ნორმატიულ ზღვრებს არ აღემატებოდა. თუმცა საყურადღებოდ სინჯებში დაბალი ტიტრით (10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup>კწე/მლ) გამოვლენილი ენტეროკოკული კონტამინაცია.

ნიმუში	pH ± 2	°T	SSM	MRS	M17	BEA	SDA	MAC	LB	Endo	SS
რძე (MilkFoodLTD)	6.6	20									
მაწონი I (5სთ, 44°C)	4.5	90	5.6x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>8</sup>							
მაწონი II (18სთ, 4°C)	4.23	120	7x10 <sup>8</sup>	3.32x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>8</sup>	6.2x10 <sup>4</sup>	1.44x10 <sup>6</sup>	1.68x10 <sup>3</sup>			
მაწონი III (7 დღე, 4°C)	4.18	135	3.4x10 <sup>8</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	6.4x10 <sup>4</sup>	1.12x10 <sup>3</sup>	0	0	0	0
მაწონი IV (14 დღე, 4°C)	4.17	135	5.8x10 <sup>8</sup>	4.4x10 <sup>8</sup>	4.8x10 <sup>8</sup>	8.6x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0

სელექტიური არე



სურათი 29. მესამე საპილოტო ცდის მონიტორინგის შედეგები. ნაჩვენებია შესწავილი მაწონის ნიმუშების შენახვის პირობები და დრო, მჟავიანობა (pH), ტიტრირებადი მჟავიანობა (°T) და მიკროორგანიზმების ზრდის მონაცემები სახვადასხვა სელექტიუ ტესტ-არეებზე. ბაქტერიული კულტურების ზრდის მაჩვენებელი მოცემულია კწე/მლ-ში. SSM-გამოხდილი რძის აგარი; MRS-რძემჟავა ჩხირების სელექტიური აგარი; M17-რძემჟავა კოკების სელექტიური აგარი; BEA-*Enterococcus* სპეციფიური სელექტიური არე; SDA-საბუროს დექსტროზის აგარი, გამოიყენება საფუვრების კულტივაციისთვის; MAC-მაკონკის აგარი, გამოიყენება გრამ-

უარყოფითი ენტერობაქტერიების კულტივაციისთვის; LB-ლურია ბერთანის არე, გამოიყენება სხვადასხვა ენტერობაქტერიების კულტივაციისთვის; Endo-ლაქტოზა-ფუქსინის-სულფიტის აგარი, გამოიყენება *E. coli* სელექტიური გამოვლენისთვის; SS-სალმონელა-შიგელას აგარი, გამოიყენება *Salmonella spp.* და *Shigella spp.* სელექტიური კულტივაციისთვის.



## თავი IV. შედეგების განხილვა

მოცემული კვლევის ფარგლებში, საქართველოს ათ რეგიონში, შემთხვევითად შერჩეული ორმოცდაექვსი წერტილიდან შეგროვებულ იქნა სამოცდათორმეტი ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის სინჯი. რძემჭავა კულტურების იზოლაციის და იდენტიფიკაციის შედეგად მიღებული იქნა ექვსი სახეობის და ორი ქვესახეობის წარმომადგენელი ორას სამი უნიკალური ბაქტერიული კულტურა. შერჩევის სიმძლავრის მრუდის აგების საშუალებით დადასტურდა, რომ შეგროვებული სინჯების რაოდენობა ნამდვილად საკმარისი არის სინჯებში არსებული ბაქტერიული სახეობების მრავალფეროვნების გამოსავლენად.

RAPD პჯრ-ის, 500აწ 16S რ-რნმ ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრის, სახეობა სპეციფიური პჯრ-ის და რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით დამუშავების მეთოდების გამოყენებით იდენტიფიცირებული იქნა *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus*, *Lb. rhamnosus*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, და *Lb. vaginalis*-ის სახეობები. მათ შორის *Lb. rhamnosus* და *Lb. vaginalis* მაწვნის მიკრობიოტიდან პირველად იქნა გამოყოფილი.

*Lb. rhamnosus* ბუნებრივი ჰაბიტატი ადამიანის კუჭ-ნაწლავის სისტემაა. ამ სახეობის წარმომადგენელი შტამები, თავისი დადებითი თვისებების გამო, ხშირად გამოიყენება პრობიოტიკების სახით (Reid 2016). იშვიათად გვხვდება ფერმენტირებული პროდუქტების ბუნებრივი მიკრობიოტების შემადგენლობაში, რაც მაწვნიდან გამოყოფილი *Lb. rhamnosus* კულტურების ღირებულებაზე მიუთითებს.

*Lb. vaginalis* ქალის ვაგინალური მიკრობიოტის ნაწილია, ასევე გვხვდება ფერმენტირებულ საკვებ პროდუქტებში, თუმცა რძის ნადეღში ჰისტამინის ბიოსინთეზის აქტიური უნარის გამო საკვებ პროდუქტებში არასასურველ მიკროორგანიზმად განიხილება (Diaz et al. 2020).

*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus* იოგურტის ტიპის ფერმენტირებულ პროდუქტებში დედო კულტურების სახით ხშირად გვხვდება და მათი მაწვნის ბიოტაში არსებობა ადრეული კვლევებშიც იქნა ნაჩვენები (Chanishvili et al. 2001; Uchida et al. 2007; Quero et al. 2014).

*E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis* თერმული დამუშავების მიმართ მაღალი გამძლეობის გამო რძის პროდუქტებში კონტამინანტების სახით ხშირად გვხვდება. როგორც ოპორტუნისტული პათოგენური ორგანიზმები, ისინი საკვებ პროდუქტებში არასასურველ მიკროორგანიზმებად განიხილება. ამასთან მაწვნიდან გამოყოფილი ბიოგენური ამინების წარმომქმნელი *E. durans* ადრეულ კვლევებშიც იქნა აღწერილი (Brusetti *et al.* 2008). შესაბამისად მაწვნის ავტოქტონური დედოს შესწავლის და დამზადების პროცესიდან *E. durans*, *E. faecium* და *E. faecalis* სახეობები გამოირიცხა.

*Enterococcus spp.* არტიზანული მაწვნის სინჯების 58% დაფიქსირდა, ხოლო შესწავლილი კომერციული მაწვნის 7 სინჯიდან *E. faecium* და *E. durans* სამ სინჯში ამოითესა. ასევე  $10^4$  კვ/მლ *Enterococcus spp.* დაფიქსირდა საპილოტო საწარმოო ექსპერიმენტის შედეგად მიღებულ მაწვნის სინჯებში. რაც არტიზანული მაწვნის და საწარმოო გარემოს კონტამინაციაზე მიუთითებს. ენტეროკოკული დაბინძურების ამგვარი მაღალი სიხშირე მათ ბიოკონტროლის აუცილებლობაზე მეტყველებს. მოცემულ კვლევაში შეფასებულ იქნა მაწვნის იზოლატების მიმართ *Enterococcus spp.* სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ლითიური პოტენციალი. ამ მიზნით მაწვნიდან გამოყოფილი *Enterococcus spp.* შტამების ფაგომგრძნობელობის პირველადი დახასიათება გელიავას ინსტიტუტის კოლექციაში არებული ორი ლითიური მონოფაგის და ორი ფაგური პრეპარატის გამოყენებით განხორციელდა. შედეგად ოთხივე სუსპენზიის მიმართ სრული რეზისტენტობა *E. faecalis*-ის შტამების 66.67%, *E. durans*-ის 52.38% და *E. faecium* - 26% გამოავლინა, რაც მოცემული შტამების ბუნებრივ ფაგორეზისტენტობაზე მიუთითებს. გამდიდრების მეთოდის გამოყენებით სხვადასხვა წყაროებიდან ფაგორეზისტენტულ შტამების მიმართ აქტიური, სამი *Siphoviridae* (*1φDielo*, *4φSazandari*, *5φMuxambazi*) და ორი *Myoviridae* (*2φElibo*, *3φBuba*) ტიპის ახალი ბაქტერიოფაგი იქნა გამოყოფილი და დახასიათებული. მიღებული ფაგების აქტივობა შეფასდა როგორც მაწვნიდან გამოყოფილ კულტურებზე ასევე *Enterococcus spp.* კლინიკურ იზოლატებზეც. ახლად მიღებულმა ფაგებმა მაწვნის კულტურებთან შედარებით მეტი ლითიური აქტივობა კლინიკურ იზოლატებზე გამოავლინეს, სადაც ყველაზე აქტიურმა ფაგმა *4φSazandari* კლინიკური იზოლატების 60.2% ხოლო მაწვნის კულტურების მხოლოდ 12.2% ლიზისი გამოიწვია. სახეობების მიხედვით *E. faecium* და *E. durans* კულტურების მიმართ ყველაზე მაღალი აქტივობა

შესაბამისად 74% და 33.4%-ით, გ. ელიავას სახ. ინსტიტუტის კოლექციიდან მიღებულმა *vB\_GEC-EfM\_4* ბაქტერიოფაგმა გამოავლინა, ხოლო *E. faecalis*-ის მიმართ ყველაზე ეფექტური (33.3%) ახლად იზოლირებული *1φDielo* აღმოჩნდა. ჯამურად მაწვნიდან გამოყოფილი შტამების მხოლოდ 37.8%-მა გამოავლინა სრული რეზისტენტობა ყველა ტესტ ფაგის მიმართ. მიღებული მონაცემები მიუთითებს ფაგების გამოყენების პოტენციალზე როგორც *Enterococcus spp.* ბიოკონტროლის საშუალებაზე. რა თქმა უნდა მოცემული საკითხი საჭიროებს დამატებით კვლევებს ფაგების ლიზისის სტაბილურობის, ადაპტაციების, კომბინაციების ეფექტურობის და წარმოების პროცესში *in situ* გამოცდების კუთხით.

მოცემული კვლევის ფარგლებში შტამების მრავალფეროვნება მათი გენოტიპების, კერძოდ კი UPGMA კლასტერიზაციის საფუძველზე მიღებული ე.წ. ბიოტიპების მიხედვით იქნა შესწავლილი. M13 პრაიმერის გამოყენებით გენერირებული პოლიმორფული დნმ ამპლიკონების პროფილების და მათი იერარქიული აგლომერაციული კლასტერიზაციით აგებული მონაცემთა ბაზის საფუძველზე შესაძლებელი გახდა მოცემული კოლექციის შტამების გენოტიპებზე დაფუძნებული ბიოტიპირება. აღწერილი მეთოდოლოგიის გამოყენებით საშუალება მოგვეცა კულტურების ბიომრავალფეროვნების ანალიზი სუბ-ქვესახეობების დონეზე. შედეგად შესაძლებელი გახდა შტამების ბიოგეოგრაფიული განაწილების შესწავლა, მათი მრავალფეროვნების დაწვრილებითი ანალიზი და სხვა კულტურებთან მათი ნათესაობის (კავშირების) დადგენა, რამაც მაწვნის მიკრობიოტაში მიმდინარე პროცესებზე სიღრმისეული დაკვირვების საშუალება მოგვცა.

ნაჩვენები იქნა, რომ მაწვნის მიკრობული კომპოზიცია და კულტურების რაოდენობა სინჯ-სპეციფიკური პარამეტრებია, რაც ადრეულ კვლევებთან თანხვედრაშია (Chanishvili *et al.* 2001). თუმცა მონაცემების დამუშავების შედეგად გამოჩნდა, რომ 2013-2015 წლებში მოპოვებულ მაწვნის სინჯებში *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ი (დისპერსიის ხარისხი 76.06%) *St. thermophilus*-ზე (22.54%) მეტად გავრცელებული დედო კულტურაა. ამასთან *St. thermophilus* ხასიათდება ყველაზე მაღალი შიდასახეობრივი მრავალფეროვნებით. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* სინჯების 75%-დან იქნა იზოლირებული, მათ შორის სინჯების 22% *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ის ერთზე მეტ ბიოტიპს შეიცავდა, ხოლო სინჯების 17%-დან *Lb.*

*delbrueckii*-ის ორივე ქვესახეობა იქნა გამოყოფილი. ყველაზე ხშირი ბიოტიპები *Lb.bulgaricus* Biot.C სინჯების 38% და *Lb.bulgaricus* Biot.M 36%-ში დაფიქსირდა. ამ ბიოტიპების ბიოგეოგრაფიული განაწილება, ისევე როგორც ყველა დაფიქსირებული სახეობების ბიოტიპები, შემთხვევით ხასიათს ატარებს. მაწვნის დედო კულტურების სახეობების, ქვესახეობების, ბიოტიპების განაწილებასა და მათ გეოგრაფიულ ადგილ წამოშობას შორის კორელაცია არ დაფიქსირდა. დედო კულტურების განაწილება შემთხვევითია და სინჯ-სპეციფიურ ხასიათს ატარებს.

ამავდროულად ბიოტიპების დაწვრილებითი შესწავლის შედეგად დადგინდა, რომ ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის მიკრობიოტებსა და კომერციულ პროდუქტებს შორის მიკროორგანიზმების მიმოცვლა ფიქსირდება. მოცემულ შემთხვევაში, კომერციული და არტიზანული მაწვნის სინჯებს შორის სულ 6 ბიოტიპის გადაფარვა დაფიქსირდა. ესენია: ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნების ყველაზე ხშირი ბიოტიპი *Lb.bulgaricus* Biot.C, ასევე *Lb.bulgaricus* Biot.L, *Lb.lactis* Biot.G, *S.therm.* Biot.H და *Enterococcus ssp.* ორი ბიოტიპი *E.durans* Biot.A და *E.faecium* Biot.B, რაც კომერციული და ტრადიციული მაწვნის დედო კულტურების და კონტამინანტების აქტიურ მიმოცვლაზე მიუთითებს. დედოს შენახვის ტრადიციული წეს-ჩვეულებების ცვლილებებთან ერთად, მაწვნის არტიზანულად დამზადებისას ხშირად კომერციული პროდუქტები გადადედება ხდება (პირადი კომუნიკაცია). რადგან მაწვნის ინდუსტრიული წარმოებისთვის ამჟამად იმპორტირებული მონოკულტურები გამოიყენება, კომერციული სტარტერების ტრადიციული წესით დამზადებულ პროდუქტში ინვაზიამ შესაძლებელია პროდუქტის მიკრობული მრავალფეროვნების თანმიმდევრული დეგრადაცია გამოიწვიოს.

მიღებული ბიოტიპების CRA-FLC-ის BioNumerics-ის „RAPD PCR M13 FINGERPRINTING“ მონაცემთა ბაზასთან შედარებისას მსგავსი ბიოტიპები არ გამოვლინდა. მოცემული ბაზის ლიმიტების გათვალისწინებით შეიძლება ითქვას, რომ მაწვნიდან გამოყოფილი შტამების ბიოტიპები განსხვავდება ევროპის ტერიტორიაზე გამოყენებადი იმავე სახეობის ყველის და იოგურტის სტარტერული კულტურების ბიოტიპებისგან, შესაბამისად ისინი ბიოტექნოლოგიურად ახალ და საინტერესო მასალას წარმოადგენენ.

ბიოუსაფრთხოების მოთხოვნებიდან გამომდინარე მაწვნის ავტოქტონური დედო კულტურების შესაქმნელად GRAS და QPS სტატუსის მქონე *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus* სახეობები იქნა შერჩეული. პრობიოტიკული პოტენციალი *Lb. rhamnosus* კულტურებისთვის იქნა დადგენილი.

იოგურტის ტიპის ნაღედის წარმოებისას დედო კულტურების ზრდის და მათ მიერ ლაქტოზის მეტაბოლიზმის სიჩქარე განსაზღვრავს პროდუქტის დამზადებისთვის საჭირო დროს. აციდოფიკაციის სიჩქარე განისაზღვრება როგორც მონოკულტურებისთვის, ასევე კულტურათა კომბინაციებში. მრავალკომპონენტური დედო კულტურებს შორის სინერგეტიკული ურთიერთქმედება პროდუქტის სწრაფ აციდოფიკაციაში გამოიხატება (<3სთ.) (Xanthopoulos *et al.* 2001). მონოკულტურების შეთხვევაში pH 4.6 ყველაზე სწრაფად *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 51191-მა ფერმენტაციის 5.24 სთ-ზე გადალახა, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 51049-მა pH 4.6 მიღწევას ექვსი საათზე მოანდომა, ხოლო *St. thermophilus* 102-3 -მა pH 4.6 ფერმენტაციის მეცხრე საათზე გადალახა. მიღებულ შედეგებში აღსანიშნავია რომ *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* სახეობის წარმომადგენელი შტამებმა *St. thermophilus*-ზე მეტად ეფექტური აციდოფიკაციის უნარი გამოავლინეს, რაც შესაძლოა მაწვნის კულტურებისთვის დამახასიათებელ თვისებად განვიხილოთ.

შერჩეული შტამების პროტეოლიზური აქტივობა *Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus*-თვის 150.46-780.69 მკგ/მლ ზღვრებში მერყეობდა, *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis* 0-276.7 მკგ/მლ, *St. thermophilus* 0-81.94 მკგ/მლ და *Lb. rhamnosus* 43.97-165.2 მკგ/მლ  $\alpha$  amino მაჩვენებლებს შორის მერყეობდა. მათ შორის თითოეული სახეობის ყველაზე აქტიური შტამები *Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus*-თვის 51110 – 492.87 მკგ/მლ, *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis* 51333 -115.91 მკგ/მლ, *St. thermophilus* 51265 – 42.67 მკგ/მლ და *Lb. rhamnosus* 51136 – 43.97 მკგ/მლ აღმოჩნდნენ. მიღებული მონაცემებიდან აღსანიშნავია *St. thermophilus*-ის შტამების მიერ გამოვლენილი პროტეოლიზის აქტიური უნარი, რაც ამ სახეობის წარმომადგენელი კულტურებისთვის ნაკლებად დამახასიათებელია თვისება (Rajagopal and Sandine 1990). მთლიანობაში კი რეფერენტულ შტამებთან შედარებით მაწვნიდან გამოყოფილმა შტამებმა საშუალოზე მაღალი პროტეოლიზური აქტივობა აჩვენეს.

*St. thermophilus*-ის შტამების დუდილის შედეგად მიღებული ნადედის ვისკოზურობა საშუალო მაჩვენებლების ფარგლებში მერყეობდა რაც მაწვნის ტიპის პროდუქტისთვის დამაკმაყოფილებელი მონაცემია.

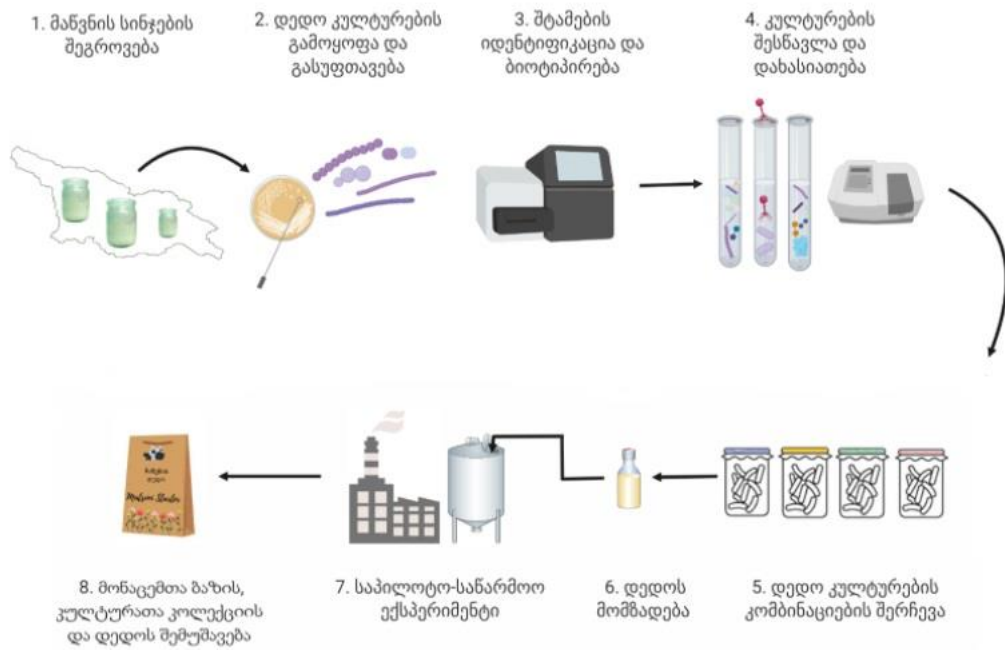
მიღებული მონაცემების შეჯამების შემდეგ, ფაგორეზისტენტული და არალიზოგენური *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus* კულტურებიდან შეირჩა მაღალი ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის მქონე სამ-სამი შტამი. მათი კომბინაციების აციდოფიკაციის სიჩქარის შეფასებამ *St. thermophilus* 51265/*Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus* 51110 და *St. thermophilus* 51265/*Lb. bulgaricus* subsp. *lactis* 51333 შორის სინერგეტიკული ურთიერთქმედება გამოავლინა. მათ კომბინაციებში pH 4.6 გადალახეს ფერმენტაციის მესამე საათზე, სადაც ინდივიდუალურად *St. thermophilus* 51265-ი მხოლოდ 11.44სთ-ზე, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 51110 - 8.28 სთ, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 51333-ი 9.20 სთ-ზე აღწევს pH 4.6.

რეფერენტულ პრობიოტიკულ *Lb. plantarum* შტამებთან მიმართებით *Lb. rhamnosus* ხუთივე ტესტ კულტურამ, ნაღვლის მიმართ გამძლეობის, ჰიდროფობულობის და აგლუტინაციის ეფექტური უნარი გამოავლინა. *Lb. rhamnosus* შტამებზე ჩატარებული ტესტების საფუძველზე დადგინდა, რომ ხუთივე შტამს აქვს პოტენციური უნარი შეინარჩუნოს სიცოცხლისუნარიანობა და ადჰეზიის უნარი ადამიანის კუჭ-ნაწლავის სისტემაში რაც წარმატებული კოლონიზაციის წინაპირობაა.

შედეგად მრავალკომპონენტური ავტოქტონური დედო კულტურის შესარჩევად *Lb. bulgaricus* subsp. *bulgaricus*, *St. thermophilus* და *Lb. bulgaricus* subsp. *lactis* შტამებს დაემატა *Lb. rhamnosus* კომბინაციები. მათ შორის ფერმენტაციის შედეგად მიღებული პროდუქტის ნადედის კოლტის სიმკვრივის და ორგანოლეპტიკური მახასიათებლების მიხედვით შეირჩეულ იქნა სამკომპონენტური დედო.

საპილოტო საწარმოო ექსპერიმენტის სამჯერ წარმატებით გამეორების შედეგად დადგინდა მიღებული მრავალკომპონენტური ავტოქტონური ცოცხალი დედო კულტურების ეფექტურობა და საწარმოო პროცესში გამოყენების ვალიდურობა. მიღებულმა პროდუქტმა დადგენილი ვარგისიანობის ვადის ფარგლებში, შესაბამისი შენახვის პირობებში, შეინარჩუნა პროდუქტისთვის დადგენილი ცოცხალი რემეჩავა ბაქტერიების ტიტრი და მჟავიანობის დონე.

მიღებული კვლევის საფუძველზე შეიქმნა საქართველოს სხვადასხვა კუთხეში დამზადებული მაწვნის მიკრობიოტის მონაცემთა ბაზა, შესწავლილ იქნა მიღებული შტამების ბიომრავალფეროვნება და ბიოგეოგრაფიული განაწილება, დადგინდა ავტოქტონური დედო კულტურების ბიოტექნოლოგიური და პრობიოტიკული პოტენციალი, რის საფუძველზეც შემუშავდა მრავალკომპონენტური მაწვნის ცოცხალი დედო.



სურათი 30. ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის სინჯებიდან დახასიათებული და შესწავლილი ავტოქტონური მრავალკომპონენტური დედო კულტურების შექმნის პროცესის საფეხურეობრივი გრაფიკული აღწერა.

## დასკვნები და რეკომენდაციები

- მონაცემების ანალიზის შედეგად დავასკვნით, რომ მაწვნის მიკრობიოტა მრავალკომპონენტური და დინამიური ეკოსისტემაა, დედო კულტურების კომპოზიცია კი სინჯ-სპეციფიურ ხასიათს ატარებს.
- მიღებული გენოტიპების ბიოგეოგრაფიული განაწილების შემთხვევითი ხასიათიდან გამომდინარე, მაწვნის დედო კულტურების სახეობების, ქვესახეობების, ბიოტიპების განაწილებასა და მათ გეოგრაფიულ ადგილ წამოშობას შორის კორელაცია არ დგინდება.
- არტიზანული და კომერციული მაწვნის ყველაზე გავრცელებული კონტამინანტი *Enterococcus spp.*-ია.
- მაწვნის მიკრობიოტა მაღალი ბიოტექნოლოგიური პოტენციალის მქონე კულტურებს შეიცავს.
- მაწვნიდან გამოყოფილი *Lb. rhamnosus* კულტურები პრობიოტიკული მახასიათებლების მატარებელია.
- ტრადიციული წესით დამზადებული მაწვნის სინჯებიდან მიღებული *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. rhamnosus* და *St. thermophilus* კულტურების გამოყენებით შესაძლებელია ინდუსტრიული წარმოებისთვის ვალიდური მრავალკომპონენტური დედოების შექმნა.

**პრაქტიკული რეკომენდაცია:** საქპატენტის მიერ წამოყენებული მოთხოვნილებების შესრულებისა და მინიტორინგისთვის აუცილებელია ცენტრალიზირებული კურირებადი მონაცემთა ბაზის მხარდაჭერა, რომლის საფუძველზეც მოხდება ადგილობრივი რძემწავა ბაქტერიების ვალიდაცია. ამისთვის აუცილებელია შესაბამისი ბაქტერიული კულტურების ფიზიკურ კოლექციასთან შეჭიდული უნიფიცირებულ მეთოდზე დაფუძნებული ტიპირების სისტემის დანერგვა. ამგვარი მონაცემთა ბაზის აგება შესაძლებელია დნმ-ამპლიფიკაციაზე დაფუძნებული ტიპირების მეთოდების: RFLP-პჯრ, პჯრ-რიბოტიპირება, RAPD-პჯრ, განმეორებადი ექსტრაგენული პალინდრომული (Rep)-პჯრ ან ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობის ანალიზზე დაფუძნებული მეთოდების: მიმდევრობების მულტილოკუსური ტიპირება (MLST), ერთი ნუკლეოტიდის პოლიმორფიზმის (SNP) ანალიზი, მიკროჩიპული



პლატფორმები (Microarrays) გამოყენებით. თუმცა ამგვარი მიდგომა ძვირადღირებულია და მრავალ შეზღუდვასთან არის დაკავაშირებული.

ალტერნატიულად შესაძლებელია საქპატენტის დადგენილება „ადგილობრივი რძემჟავა ბაქტერიების შტამებისაგან შემდგარი დედო“-ს შესახებ ჩანაცვლებულ იქნას რძემჟავა ბაქტერიების სახეობრივი კომპოზიტების მითითებით, რაც ბაზარზე არსებული პროდუქტის მონიტორინგს შესაძლებელს გახდის.

## გამოყენებული ლიტერატურა

- Ackermann, Hans-W. "Basic phage electron microscopy." In *Bacteriophages*, Humana press, (2009): 113-126.
- Ackermann, Hans-W. "Phage classification and characterization." In *Bacteriophages*, Humana press, (2009): 127-140.
- Adams, Mark Hancock. "Bacteriophages." *Bacteriophages*. (1959).
- Ainsworth, Stuart, Stephen Stockdale, Francesca Bottacini, Jennifer Mahony, and Douwe van Sinderen. "The Lactococcus lactis plasmidome: much learnt, yet still lots to discover." *FEMS microbiology reviews* 38, no. 5 (2014): 1066-1088.
- Appelmans, R. (1921) „Le dosage du bactériophage“. *Compt Rend Soc Biol*. (1921): 85:1098
- Archibald, Frederick S., and I. R. W. I. N. Fridovich. "Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria." *Journal of Bacteriology* 146, no. 3 (1981): 928-936.
- Baas-Becking, Lourens Gerhard Marinus. *Geobiologie; of inleiding tot de milieukunde*. WP Van Stockum & Zoon NV, (1934).
- Bartowsky, Eveline J. "Oenococcus oeni and malolactic fermentation—moving into the molecular arena." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, no. 2 (2005): 174-187.
- Begley, Máire, Colin Hill, and Cormac GM Gahan. "Bile salt hydrolase activity in probiotics." *Appl. Environ. Microbiol.* 72, no. 3 (2006): 1729-1738.
- Bokulich, Nicholas A., Lia Amiranashvili, Karine Chitchyan, Narine Ghazanchyan, Karen Darbinyan, Nino Gagelidze, Tinatin Sadunishvili et al. "Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni." *Food microbiology* 50 (2015): 12-19.
- Bolotin, Alexander, Benoît Quinquis, Pierre Renault, Alexei Sorokin, S. Dusko Ehrlich, Saulius Kulakauskas, Alla Lapidus et al. "Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus." *Nature biotechnology* 22, no. 12 (2004): 1554-1558.
- Brioukhanov, A. L., and A. I. Netrusov. "Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: a review." *Applied Biochemistry and Microbiology* 43, no. 6 (2007): 567-582.
- Brusetti, Lorenzo, Iana Malkhazova, Maher Gtari, Isabella Tamagnini, Sara Borin, Maya Merabishvili, Nina Chanishvili, Diego Mora, Francesca Cappitelli, and Daniele Daffonchio. "Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography." *BMC microbiology* 8, no. 1 (2008): 220.
- Brüssow, Harald, Carlos Canchaya, and Wolf-Dietrich Hardt. "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, no. 3 (2004): 560-602.

- Brussow, Harald, Marc Fremont, Anne Bruttin, Josette Sidoti, Anne Constable, and Vincent Fryder. "Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation." *Appl. Environ. Microbiol.* 60, no. 12 (1994): 4537-4543.
- Cai, Yimin, Jinsong Yang, Huili Pang, and Maki Kitahara. "Lactococcus fujiensis sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61, no. 7 (2011): 1590-1594.
- Canchaya, Carlos, Marcus J. Claesson, Gerald F. Fitzgerald, Douwe Van Sinderen, and Paul W. O'Toole. "Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species." *Microbiology* 152, no. 11 (2006): 3185-3196.
- Carr, Frank J., Don Chill, and Nino Maida. "The lactic acid bacteria: a literature survey." *Critical reviews in microbiology* 28, no. 4 (2002): 281-370.
- Castillo, Daniel, Kathryn Kauffman, Fatima Hussain, Panos Kalatzis, Nanna Rørbo, Martin F. Polz, and Mathias Middelboe. "Widespread distribution of prophage-encoded virulence factors in marine *Vibrio* communities." *Scientific reports* 8, no. 1 (2018): 1-9.
- Chaillou, Stéphane, Marie-Christine Champomier-Vergès, Monique Cornet, Anne-Marie Crutz-Le Coq, Anne-Marie Dudez, Véronique Martin, Sophie Beaufiles et al. "The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K." *Nature biotechnology* 23, no. 12 (2005): 1527-1533.
- Chanishvili, N., M. Merabishvili, K. Porchkhidze, and G. Natroshvili. "The Caucasian product Matsoni: its bacterial composition and properties." *Bull. Georgian Acad. Sci* 163 (2001).
- Chibani-Chennoufi, Sandra, Anne Bruttin, Marie-Lise Dillmann, and Harald Brüssow. "Phage-host interaction: an ecological perspective." *Journal of bacteriology* 186, no. 12 (2004): 3677-3686.
- Cho, Jae-Chang, and James M. Tiedje. "Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil." *Appl. Environ. Microbiol.* 66, no. 12 (2000): 5448-5456.
- Chopin, Marie-Christine, Alain Chopin, and Elena Bidnenko. "Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme." *Current opinion in microbiology* 8, no. 4 (2005): 473-479.
- Christensen, Jeffrey E., Edward G. Dudley, Jeffrey A. Pederson, and James L. Steele. "Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria." *Antonie van Leeuwenhoek* 76, no. 1-4 (1999): 217-246.
- Church, Frank C., Harold E. Swaisgood, David H. Porter, and George L. Catignani. "Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins1." *Journal of dairy science* 66, no. 6 (1983): 1219-1227.
- Damin, Maria Regina, Maria Regina Alcântara, A. P. Nunes, and Maricê Nogueira de Oliveira. "Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt." *LWT-Food Science and Technology* 42, no. 10 (2009): 1744-1750.

- Dandoy, Damien, Christophe Fremaux, Marie Henry de Frahan, Philippe Horvath, Patrick Boyaval, Pascal Hols, and Laetitia Fontaine. "The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS." In *Microbial cell factories*, vol. 10, no. S1, p. S21. BioMed Central, 2011.
- David, Lawrence A., Corinne F. Maurice, Rachel N. Carmody, David B. Gootenberg, Julie E. Button, Benjamin E. Wolfe, Alisha V. Ling et al. "Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome." *Nature* 505, no. 7484 (2014): 559-563.
- De Vuyst, Luc, and Frederic Leroy. "Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications." *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 13, no. 4 (2007): 194-199.
- De Vuyst, Luc. "Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains." *Biotechnology letters* 16, no. 3 (1994): 287-292.
- De Wit, Rutger, and Thierry Bouvier. "‘Everything is everywhere, but, the environment selects’; what did Baas Becking and Beijerinck really say?." *Environmental microbiology* 8, no. 4 (2006): 755-758.
- Delley, Michèle, and Jacques-Edouard Germond. "Differentiation of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, subsp. *lactis* and subsp. *delbrueckii* Using Physiological and Genetic Tools and Reclassification of some Strains from the ATCC Collection." *Systematic and applied microbiology* 25, no. 2 (2002): 228-231.
- Delorme, Christine. "Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*." *International journal of food microbiology* 126, no. 3 (2008): 274-277.
- Diaz, Maria, Beatriz Del Rio, Victor Ladero, Begoña Redruello, María Fernández, Maria Cruz Martin, and Miguel A. Alvarez. "Histamine production in *Lactobacillus vaginalis* improves cell survival at low pH by counteracting the acidification of the cytosol." *International Journal of Food Microbiology* 321 (2020): 108548.
- Diez, Ana M., Johanna Björkroth, Isabel Jaime, and Jordi Rovira. "Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de Burgos previously inoculated with *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*." *International Journal of food microbiology* 131, no. 2-3 (2009): 168-177.
- Dominguez-Bello, Maria Gloria. "Gestational shaping of the maternal vaginal microbiome." *Nature medicine* 25, no. 6 (2019): 882-883.
- Doyle, Michael P., Francisco Diez-Gonzalez, and Colin Hill, eds. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. John Wiley & Sons, (2019).
- Duar, Rebecca M., Xiaoxi B. Lin, Jinshui Zheng, Maria Elena Martino, Théodore Grenier, María Elisa Pérez-Muñoz, François Leulier, Michael Gänzle, and Jens Walter. "Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*." *FEMS microbiology reviews* 41, no. Supp\_1 (2017): S27-S48.

- Eaton, Tracy J., and Michael J. Gasson. "Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates." *Appl. Environ. Microbiol.* 67, no. 4 (2001): 1628-1635.
- Eichenbaum, Zehava, Eric Muller, Stephen A. Morse, and June R. Scott. "Acquisition of iron from host proteins by the group A streptococcus." *Infection and immunity* 64, no. 12 (1996): 5428-5429.
- Endo, Akihito, and Leon MT Dicks. "The genus Fructobacillus." *Lactic Acid Bacteria; Biodiversity and Taxonomy*. UK: Wiley Blackwell (2014): 381-90.
- Falush, Daniel, Thierry Wirth, Bodo Linz, Jonathan K. Pritchard, Matthew Stephens, Mark Kidd, Martin J. Blaser et al. "Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations." *science* 299, no. 5612 (2003): 1582-1585.
- Farley, John, and Gerald L. Geison. "Science, politics and spontaneous generation in nineteenth-century France: the Pasteur-Pouchet debate." *Bulletin of the History of Medicine* 48, no. 2 (1974): 161-198.
- Feiner, Ron, Tal Argov, Lev Rabinovich, Nadejda Sigal, Ilya Borovok, and Anat A. Herskovits. "A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 13, no. 10 (2015): 641-650.
- Fierer, Noah. "Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time." In *Accessing uncultivated microorganisms*, pp. 95-115. American Society of Microbiology, 2008.
- Fisher, Katie, and Carol Phillips. "The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus." *Microbiology* 155, no. 6 (2009): 1749-1757.
- Frank, Daniel N., Allison L. St Amand, Robert A. Feldman, Edgar C. Boedeker, Noam Harpaz, and Norman R. Pace. "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, no. 34 (2007): 13780-13785.
- Gallone, Brigida, Jan Steensels, Troels Prahl, Leah Soriaga, Veerle Saels, Beatriz Herrera-Malaver, Adriaan Merlevede et al. "Domestication and divergence of Saccharomyces cerevisiae beer yeasts." *Cell* 166, no. 6 (2016): 1397-1410.
- Gallone, Brigida, Stijn Mertens, Jonathan L. Gordon, Steven Maere, Kevin J. Verstrepen, and Jan Steensels. "Origins, evolution, domestication and diversity of Saccharomyces beer yeasts." *Current opinion in biotechnology* 49 (2018): 148-155.
- Gilbert, Jack A., Martin J. Blaser, J. Gregory Caporaso, Janet K. Jansson, Susan V. Lynch, and Rob Knight. "Current understanding of the human microbiome." *Nature medicine* 24, no. 4 (2018): 392.
- Giraffa, Giorgio, Miriam Zago, and Domenico Carminati. "Lactic acid bacteria bacteriophages in dairy products: problems and solutions." *Microbiology in Dairy Processing* (2018): 233-250.
- Golubic, Stjepko, and Lee Seong-Joo. "Early cyanobacterial fossil record: preservation, palaeoenvironments and identification." *European Journal of Phycology* 34, no. 4 (1999): 339-348.

- Graham, Ken, Helena Stack, and Rosemary Rea. "Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications—a review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2020): 1-26.
- Gratia, A. "Numerical relations between lysogenic bacteria and particles of bacteriophage." *Ann. Inst. Pasteur* 57, no. 652-676 (1936): 72.
- Groth, Amy C., and Michele P. Calos. "Phage integrases: biology and applications." *Journal of molecular biology* 335, no. 3 (2004): 667-678.
- Hagens, Steven, and Martin J. Loessner. "Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations." *Current pharmaceutical biotechnology* 11, no. 1 (2010): 58-68.
- Hamilton-Miller, J. M. T., Glenn Robinson Gibson, and W. Bruck. "Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'." *British Journal of Nutrition* 90, no. 4 (2003): 845-845.
- Hanchi, Hasna, Walid Mottawea, Khaled Sebei, and Riadh Hammami. "The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns—An update." *Frontiers in microbiology* 9 (2018): 1791.
- Hansen, J. Norman, and W. E. Sandine. "Nisin as a model food preservative." *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 34, no. 1 (1994): 69-93.
- Haukioja, A., V. Loimaranta, and J. Tenovuo. "Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro." *Oral microbiology and immunology* 23, no. 4 (2008): 336-343.
- Hedlund, Brian P., and James T. Staley. "Microbial endemism and biogeography." (2004): 225.
- Heineman, P. G. "Orla-Jensen's classification of lactic acid bacteria." *Journal of Dairy Science* 3, no. 2 (1920): 143-155.
- Hemme, Denis, and Catherine Foucaud-Scheunemann. "Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods." *International Dairy Journal* 14, no. 6 (2004): 467-494.
- Hickey, Malcolm W., Alan J. Hillier, and G. Richard Jago. "Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli." *Appl. Environ. Microbiol.* 51, no. 4 (1986): 825-831.
- Hotel, Amerian Córdoba Park, and A. Cordoba. "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria." *Prevention* 5, no. 1 (2001): 1-10.
- Hugas, Marta, and Josep Ma Monfort. "Bacterial starter cultures for meat fermentation." *Food chemistry* 59, no. 4 (1997): 547-554.
- Hughes, Jennifer B., Jessica J. Hellmann, Taylor H. Ricketts, and Brendan JM Bohannon. "Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity." *Appl. Environ. Microbiol.* 67, no. 10 (2001): 4399-4406.

- Iijima, Kazumaru, Koji Suzuki, Shizuka Asano, Hidetoshi Kuriyama, and Yasushi Kitagawa. "Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer-spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the horA and horC gene clusters." *Journal of the Institute of Brewing* 113, no. 1 (2007): 96-101.
- Iino, Takao, Akira Manome, Sanae Okada, Tai Uchimura, and Kazuo Komagata. "Effects of sodium acetate on the production of stereoisomers of lactic acid by *Lactobacillus sakei* and other lactic acid bacteria." *The Journal of general and applied microbiology* 47, no. 5 (2001): 223-239.
- Iyer, Ramya, S. K. Tomar, T. Uma Maheswari, and Rameshwar Singh. "Streptococcus thermophilus strains: Multifunctional lactic acid bacteria." *International Dairy Journal* 20, no. 3 (2010): 133-141.
- Jacobsen, C. Nexmann, V. Rosenfeldt Nielsen, A. E. Hayford, P. Lange Møller, K. F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandström, M. Tvede, and M. Jakobsen. "Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans." *Appl. Environ. Microbiol.* 65, no. 11 (1999): 4949-4956.
- Janik, Rafal, Lynsie AM Thomason, Andrew M. Stanisz, Paul Forsythe, John Bienenstock, and Greg J. Stanisz. "Magnetic resonance spectroscopy reveals oral *Lactobacillus* promotion of increases in brain GABA, N-acetyl aspartate and glutamate." *Neuroimage* 125 (2016): 988-995.
- Jiang, Haiyin, Zongxin Ling, Yonghua Zhang, Hongjin Mao, Zhanping Ma, Yan Yin, Weihong Wang et al. "Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder." *Brain, behavior, and immunity* 48 (2015): 186-194.
- Karczewski, Jurgen, Freddy J. Troost, Irene Konings, Jan Dekker, Michiel Kleerebezem, Robert-Jan M. Brummer, and Jerry M. Wells. "Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298, no. 6 (2010): G851-G859.
- Kebede, Ameha, B. C. Viljoen, T. H. Gadaga, J. A. Narvhus, and A. Lourens-Hattingh. "The effect of container type on the growth of yeast and lactic acid bacteria during production of Sethemi, South African spontaneously fermented milk." *Food Research International* 40, no. 1 (2007): 33-38.
- Kilara, A., and K. M. Shahani. "Lactase activity of cultured and acidified dairy products." *Journal of Dairy Science* 59, no. 12 (1976): 2031-2035.
- Kilpper-Bälz, Renate, Gabriele Fischer, and Karl Heinz Schleifer. "Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci." *Current microbiology* 7, no. 4 (1982): 245-250.
- Klein, Günter. "Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastrointestinal tract." *International journal of food microbiology* 88, no. 2-3 (2003): 123-131.
- Kneifel, W., Doris Jaros, and F. Erhard. "Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures." *International Journal of Food Microbiology* 18, no. 3 (1993): 179-189.
- Koenig, Jeremy E., Aymé Spor, Nicholas Scalfone, Ashwana D. Fricker, Jesse Stombaugh, Rob Knight, Largus T. Angenent, and Ruth E. Ley. "Succession of microbial consortia in the developing infant

- gut microbiome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. Supplement 1 (2011): 4578-4585.
- Kuipers, Oscar P., Girbe Buist, and Jan Kok. "Current strategies for improving food bacteria." *Research in Microbiology* 151, no. 10 (2000): 815-822.
- Kutter, Elizabeth, and Alexander Sulakvelidze. *Bacteriophages: biology and applications*. Crc press, (2004).
- Labrie, Simon J., Julie E. Samson, and Sylvain Moineau. "Bacteriophage resistance mechanisms." *Nature Reviews Microbiology* 8, no. 5 (2010): 317-327.
- Ladero, Victor, Carolina Gómez-Sordo, Esther Sánchez-Llana, Beatriz del Rio, Begoña Redruello, María Fernández, M. Cruz Martín, and Miguel A. Alvarez. "Q69 (an *E. faecalis*-infecting bacteriophage) as a biocontrol agent for reducing tyramine in dairy products." *Frontiers in microbiology* 7 (2016): 445.
- Lax, Simon, Daniel P. Smith, Jarrad Hampton-Marcell, Sarah M. Owens, Kim M. Handley, Nicole M. Scott, Sean M. Gibbons et al. "Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment." *Science* 345, no. 6200 (2014): 1048-1052.
- Lazaridis, Iosif, Dani Nadel, Gary Rollefson, Deborah C. Merrett, Nadin Rohland, Swapan Mallick, Daniel Fernandes et al. "Genomic insights into the origin of farming in the ancient Near East." *Nature* 536, no. 7617 (2016): 419-424.
- Lebeer, Sarah, Jos Vanderleyden, and Sigrid CJ De Keersmaecker. "Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens." *Nature Reviews Microbiology* 8, no. 3 (2010): 171-184.
- Leidy, Lynette E. "Guns, germs and steel: The fates of human societies." *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association* 11, no. 4 (1999): 565-566.
- Leroy, Frédéric, and Luc De Vuyst. "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." *Trends in Food Science & Technology* 15, no. 2 (2004): 67-78.
- Li, Wei, Mahinur Mutuvulla, Xiaohong Chen, Mei Jiang, and Mingsheng Dong. "Isolation and identification of high viscosity-producing lactic acid bacteria from a traditional fermented milk in Xinjiang and its role in fermentation process." *European Food Research and Technology* 235, no. 3 (2012): 497-505.
- Locey, Kenneth J., and Jay T. Lennon. "Scaling laws predict global microbial diversity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, no. 21 (2016): 5970-5975.
- Lopes, Maria de Fátima Silva, Tânia Ribeiro, Marta Abrantes, José Joaquim Figueiredo Marques, Rogério Tenreiro, and Maria Teresa Barreto Crespo. "Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci." *International journal of food microbiology* 103, no. 2 (2005): 191-198.
- Lorentzen, Marc PG, and Patrick M. Lucas. "Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats." *Applied microbiology and biotechnology* 103, no. 7 (2019): 2937-2945.



- Ludwig, Wolfgang, Elke Seewaldt, R. E. N. A. T. E. Kilpper-Bälz, Karl Heinz, Linda Magrum, Carl R. Woese, George E. Fox, And Erko Stackebrandt. "The phylogenetic position of Streptococcus and Enterococcus." *Microbiology* 131, no. 3 (1985): 543-551.
- Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan JJ Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau et al. "Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems." *Nature Reviews Microbiology* 9, no. 6 (2011): 467-477.
- Maki, M. A. A. R. I. T. "Lactic acid bacteria in vegetable fermentations." *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-* 139 (2004): 419-430.
- Marco, Maria L., Maaïke C. De Vries, Michiel Wels, Douwe Molenaar, Peter Mangell, Siv Ahrne, Willem M. De Vos, Elaine E. Vaughan, and Michiel Kleerebezem. "Convergence in probiotic Lactobacillus gut-adaptive responses in humans and mice." *The ISME journal* 4, no. 11 (2010): 1481-1484.
- Marcó, Mariángela Briggiler, Sylvain Moineau, and Andrea Quiberoni. "Bacteriophages and dairy fermentations." *Bacteriophage* 2, no. 3 (2012): 149-158.
- Martín, Rocío, Hans GHJ Heilig, Erwin G. Zoetendal, Esther Jiménez, Leónides Fernández, Hauke Smidt, and Juan M. Rodríguez. "Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women." *Research in microbiology* 158, no. 1 (2007): 31-37.
- Martín, Rocío, Susana Langa, Carlota Reviriego, Esther Jiménez, María L. Marín, Jordi Xaus, Leonides Fernández, and Juan M. Rodríguez. "Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut." *The Journal of pediatrics* 143, no. 6 (2003): 754-758.
- Martiny, Jennifer B. Hughes, Brendan JM Bohannon, James H. Brown, Robert K. Colwell, Jed A. Fuhrman, Jessica L. Green, M. Claire Horner-Devine et al. "Microbial biogeography: putting microorganisms on the map." *Nature Reviews Microbiology* 4, no. 2 (2006): 102-112.
- McGovern, Patrick, Mindia Jalabadze, Stephen Batiuk, Michael P. Callahan, Karen E. Smith, Gretchen R. Hall, Eliso Kvavadze et al. "Early neolithic wine of Georgia in the South Caucasus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, no. 48 (2017): E10309-E10318.
- Metchnikoff, Ilya Ilyich. *The prolongation of life: optimistic studies*. Springer Publishing Company, (2004).
- Michaylova, Michaela, Svetlana Minkova, Katsunori Kimura, Takashi Sasaki, and Kakuhei Isawa. "Isolation and characterization of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus from plants in Bulgaria." *FEMS microbiology letters* 269, no. 1 (2007): 160-169.
- Mills, S., A. Coffey, O. E. McAuliffe, W. C. Meijer, B. Hafkamp, and R. P. Ross. "Efficient method for generation of bacteriophage insensitive mutants of Streptococcus thermophilus yoghurt and mozzarella strains." *Journal of microbiological methods* 70, no. 1 (2007): 159-164.
- Mora, D., M. G. Fortina, C. Parini, G. Ricci, M. Gatti, G. Giraffa, and P. L. Manachini. "Genetic diversity and technological properties of Streptococcus thermophilus strains isolated from dairy products." *Journal of applied microbiology* 93, no. 2 (2002): 278-287.

- Morea, Maria. "Searching for functional beverages produced in Eastern European Countries." *Journal of Nutrition & Food Sciences* 37 (2008): 33-44.
- Moreno, MR Foulquié, P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst. "The role and application of enterococci in food and health." *International journal of food microbiology* 106, no. 1 (2006): 1-24.
- Mueller, Susanne, Katiana Saunier, Christiana Hanisch, Elisabeth Norin, Livia Alm, Tore Midtvedt, Alberto Cresci et al. "Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study." *Appl. Environ. Microbiol.* 72, no. 2 (2006): 1027-1033.
- Murphy, James, Jennifer Mahony, Gerald F. Fitzgerald, and Douwe van Sinderen. "Bacteriophages infecting lactic acid bacteria." In *Cheese*, pp. 249-272. Academic Press, (2017).
- Nami, Yousef, Reza Vaseghi Bakhshayesh, Hossein Mohammadzadeh Jalaly, Hajie Lotfi, Solat Eslami, and Mohammad Amin Hejazi. "Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products." *Frontiers in microbiology* 10 (2019): 300.
- Ni, Josephine, Ting-Chin David Shen, Eric Z. Chen, Kyle Bittinger, Aubrey Bailey, Manuela Roggiani, Alexandra Sirota-Madi et al. "A role for bacterial urease in gut dysbiosis and Crohn's disease." *Science translational medicine* 9, no. 416 (2017): eaah6888.
- O'Malley, Maureen A. "'Everything is everywhere: but the environment selects': ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography." *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 39, no. 3 (2008): 314-325.
- Ott, Andreas, Jacques-Edouard Germond, and Alain Chaintreau. "Vicinal diketone formation in yogurt: <sup>13</sup>C precursors and effect of branched-chain amino acids." *Journal of agricultural and food chemistry* 48, no. 3 (2000): 724-731.
- Parte, Aidan C. "LPSN-List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on." *Int J Syst Evol Microbiol* 68, no. 6 (2018): 1825-1829.
- Pessione, Alessandro, Cristina Lamberti, and Enrica Pessione. "Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria." *Molecular BioSystems* 6, no. 8 (2010): 1419-1430.
- Pot, Bruno, Wolfgang Ludwig, Karel Kersters, and Karl-Heinz Schleifer. "Taxonomy of lactic acid bacteria." In *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, pp. 13-90. Springer, Boston, MA, (1994).
- Pozo-Bayón, M. A., E. G-Alegría, M. C. Polo, C. Tenorio, P. J. Martín-Álvarez, M. T. Calvo De La Banda, F. Ruiz-Larrea, and M. V. Moreno-Arribas. "Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, no. 22 (2005): 8729-8735.
- Prückler, Michael, Cindy Lorenz, Akihito Endo, Manuel Kraler, Klaus Dürschmid, Karel Hendriks, Francisco Soares da Silva, Eric Auterith, Wolfgang Kneifel, and Herbert Michlmayr. "Comparison

- of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread." *Food microbiology* 49 (2015): 211-219.
- Pujato, S. A., A. Quiberoni, and D. J. Mercanti. "Bacteriophages on dairy foods." *Journal of applied microbiology* 126, no. 1 (2019): 14-30.
- Quadri, Luis EN. "Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria." In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Springer, Dordrecht, (2002): 133-145.
- Quero, Grazia Marina, Vincenzina Fusco, Pier Sandro Cocconcelli, Lubomila Owczarek, Mehlika Borcakli, Cecilia Fontana, Sylwia Skapska, Urszula T. Jasinska, Tarik Ozturk, and Maria Morea. "Microbiological, physico-chemical, nutritional and sensory characterization of traditional Matsoni: Selection and use of autochthonous multiple strain cultures to extend its shelf-life." *Food microbiology* 38 (2014): 179-191.
- Rajagopal, S. N., and W. E. Sandine. "Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk." *Journal of dairy science* 73, no. 4 (1990): 894-899.
- Rasmussen, Thomas Bovbjerg, Morten Danielsen, Ondrej Valina, Christel Garrigues, Eric Johansen, and Martin Bastian Pedersen. "Streptococcus thermophilus core genome: comparative genome hybridization study of 47 strains." *Appl. Environ. Microbiol.* 74, no. 15 (2008): 4703-4710.
- Ravel, Jacques, Pawel Gajer, Zaid Abdo, G. Maria Schneider, Sara SK Koenig, Stacey L. McCulle, Shara Karlebach et al. "Vaginal microbiome of reproductive-age women." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. Supplement 1 (2011): 4680-4687.
- Reid, Gregor. "Probiotics: definition, scope and mechanisms of action." *Best practice & research Clinical gastroenterology* 30, no. 1 (2016): 17-25.
- Reyes, Alejandro, Matthew Haynes, Nicole Hanson, Florent E. Angly, Andrew C. Heath, Forest Rohwer, and Jeffrey I. Gordon. "Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers." *Nature* 466, no. 7304 (2010): 334-338.
- Ringø, Einar, and François-Joël Gatesoupe. "Lactic acid bacteria in fish: a review." *Aquaculture* 160, no. 3-4 (1998): 177-203.
- Roberts, Richard J., Tamas Vincze, Janos Posfai, and Dana Macelis. "REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes." *Nucleic acids research* 38, no. suppl\_1 (2010): D234-D236.
- Rossetti, Lia, and Giorgio Giraffa. "Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases." *Journal of Microbiological Methods* 63, no. 2 (2005): 135-144.
- Rossi, Franca, Carmela Amadoro, and Giampaolo Colavita. "Members of the *Lactobacillus* genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: A review." *Microorganisms* 7, no. 5 (2019): 126.
- Ruas-Madiedo, P. "Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria." *J. Dairy Sci.* 88 (2005): 853-866.

- Saeedi, Baharak, Anita Hällgren, Jon Jonasson, Lennart E. Nilsson, Håkan Hanberger, and Barbro Isaksson. "Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci." *Apmis* 110, no. 12 (2002): 869-874.
- Sanders, Mary Ellen. "Probiotics and microbiota composition." *BMC medicine* 14, no. 1 (2016): 82.
- Satyanarayana, Tulasi, Bhavdish Narain Johri, and Anil Prakash, eds. *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology*. Springer Science & Business Media, (2012).
- Savijoki, Kirsi, Hanne Ingmer, and Pekka Varmanen. "Proteolytic systems of lactic acid bacteria." *Applied microbiology and biotechnology* 71, no. 4 (2006): 394-406.
- Schleifer, K. H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Bälz, M. D. Collins, and W. Fischer. "Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov." *Systematic and Applied Microbiology* 6, no. 2 (1985): 183-195.
- Schleifer, K. H., and W. Ludwig. "Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria." In *The genera of lactic acid bacteria*, pp. 7-18. Springer, Boston, MA, (1995).
- Schleifer, Karl H., and Renate Kilpper-Bälz. "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 34, no. 1 (1984): 31-34.
- Sender, Ron, Shai Fuchs, and Ron Milo. "Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body." *PLoS biology* 14, no. 8 (2016): e1002533.
- Silva, M., N. V. Jacobus, C. Deneke, and S. L. Gorbach. "Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31, no. 8 (1987): 1231-1233.
- Stanley, G. "Cheeses." In *Microbiology of fermented foods*, pp. 263-307. Springer, Boston, MA, (1998).
- Steensels, Jan, Brigida Gallone, Karin Voordeckers, and Kevin J. Verstrepen. "Domestication of industrial microbes." *Current biology* 29, no. 10 (2019): R381-R393.
- Sterken, Mark G., L. Basten Snoek, Jan E. Kammenga, and Erik C. Andersen. "The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*." *Trends in Genetics* 31, no. 5 (2015): 224-231.
- Stiles, Michael E., and Wilhelm H. Holzapfel. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." *International journal of food microbiology* 36, no. 1 (1997): 1-29.
- Sun, Z., H. M. Harris, A. McCann, C. Guo, S. Argimón, W. Zhang, X. Yang et al. "Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun* 6: 8322." (2015).
- Suvorov, Alexander. "Gut microbiota, probiotics, and human health." *Bioscience of microbiota, food and health* 32, no. 3 (2013): 81-91.
- Tacconelli, E., N. Magrini, G. Kahlmeter, and N. Singh. "Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics." *World Health Organization* 27 (2017).

- Turnbaugh, Peter J., Ruth E. Ley, Micah Hamady, Claire M. Fraser-Liggett, Rob Knight, and Jeffrey I. Gordon. "The human microbiome project." *Nature* 449, no. 7164 (2007): 804-810.
- Uchida, Kenji, Tadasu Urashima, Nino Chanishvili, Ikiti Arai, and Hidemasa Motoshima. "Major microbiota of lactic acid bacteria from Matsoni, a traditional Georgian fermented milk." *Animal science journal* 78, no. 1 (2007): 85-91.
- Van de Guchte, M., S. Penaud, C. Grimaldi, V. Barbe, K. Bryson, P. Nicolas, C. Robert et al. "The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 24 (2006): 9274-9279.
- Vandeputte, Doris, Gwen Falony, Sara Vieira-Silva, Raul Y. Tito, Marie Joossens, and Jeroen Raes. "Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates." *Gut* 65, no. 1 (2016): 57-62.
- Vinderola, Celso Gabriel, and Jorge Alberto Reinheimer. "Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance." *Food Research International* 36, no. 9-10 (2003): 895-904.
- Vinderola, Gabriel, Arthur Ouwehand, Seppo Salminen, and Atte von Wright, eds. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press, (2019).
- Vostrikov, A. S., V. I. Denisov, and Y. A. Kulikov. "Innovation activity of the Novosibirsk State Technical University." In *Proceedings KORUS 2000. The 4th Korea-Russia International Symposium On Science and Technology*, vol. 2, IEEE, (2000): 25-27.
- Walling, Emilie, Emmanuel Gindreau, and Aline Lonvaud-Funel. "A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider." *International journal of food microbiology* 98, no. 1 (2005): 53-62.
- Walter, Jens, Christian Hertel, Gerald W. Tannock, Claudia M. Lis, Karen Munro, and Walter P. Hammes. "Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis." *Appl. Environ. Microbiol.* 67, no. 6 (2001): 2578-2585.
- Wang, Xiaoxue, and Thomas K. Wood. "Cryptic prophages as targets for drug development." *Drug Resistance Updates* 27 (2016): 30-38.
- Wheelis, Mark. *Principles of modern microbiology*. Jones & Bartlett Publishers, (2011).
- Wilson, Geoffrey G., and Noreen E. Murray. "Restriction and modification systems." *Annual review of genetics* 25, no. 1 (1991): 585-627.
- Wittouck, Stijn, Sander Wuyts, Conor J. Meehan, Vera van Noort, and Sarah Lebeer. "A genome-based species taxonomy of the *Lactobacillus* Genus Complex." *mSystems* 4, no. 5 (2019): e00264-19.
- Woese, Carl R. "Bacterial evolution." *Microbiological reviews* 51, no. 2 (1987): 221.

- Xanthopoulos, V., D. Petridis, and N. Tzanetakis. "Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yogurts." *Journal of food science* 66, no. 5 (2001): 747-752.
- Yam, Baratali Zarei, Morteza Khomeiri, Alireza Sadeghi Mahounak, and Seid Mahdi Jafari. "Isolation and identification of yeasts and lactic acid bacteria from local traditional fermented camel milk, Chal." *Journal of Food Processing & Technology* 6, no. 7 (2015): 1.
- Yang, R., S. Argimon, Yihong Li, X. Zhou, and P. W. Caufield. "Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity." *Journal of microbiological methods* 82, no. 2 (2010): 163-169.
- Zago, Miriam, Luigi Orrù, Lia Rossetti, Antonella Lamontanara, Maria Emanuela Fornasari, Barbara Bonvini, Aurora Meucci, Domenico Carminati, Luigi Cattivelli, and Giorgio Giraffa. "Survey on the phage resistance mechanisms displayed by a dairy *Lactobacillus helveticus* strain." *Food microbiology* 66 (2017): 110-116.
- Zago, Miriam, Maria Emanuela Fornasari, Domenico Carminati, Patricia Burns, Viviana Suárez, Gabriel Vinderola, Jorge Reinheimer, and Giorgio Giraffa. "Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses." *Food Microbiology* 28, no. 5 (2011): 1033-1040.
- Zotta, T., E. Parente, and A. Ricciardi. "Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry." *Journal of applied microbiology* 122, no. 4 (2017): 857-869.
- Гогоберидзе Р. "изучение симбиотической закваски мацони". *Молочное дело* no.3 (1971): 16-20
- Демуришвили М. "Кислое молоко мацони". *Молочное хозяйство* М. (1930): 2-3
- Джандиери, Е., and М. Схиртладзе. "Микрофлора мацони, роль и взаимоотношение микроорганизмов." *Тр. Зак. КНИИЖ* 6 (1935): 333-365.
- Омсадзе Р.Н., Демуришвили Л.И., Манджавидзе Н.П., and Е.Г. Едиберидзе. "Приготовление симбиотической закваски мацони для приготовления этого продукта". *III конференция по микробиологии и вирусологии*. (1977): 980-81.
- დალაქიშვილი ი., დათოშვილი გ., ლელაშვილი ნ. მაწვნისმაგვარი რძე-მჟავა პროდუქტის მიღების ხერხი. *პატენტი* no. 253 (1996).

კვლევის ფარგლებში გამოქვეყნებული შრომების სია:

1. Elene Kakabadze, Miriam Zago, Lia Rossetti, Barbara Bonvini , Flavio Tidona, Domenico Carminati, Nina Chanishvili, Giorgio Giraffa „Characterisation of lactic acid bacteria isolated from the Georgian, yoghurt-like Matsoni“. *International Journal of Dairy Technology* 72, no. 3 (2019): 373-380.
2. **Elene Kakabadze**, Nata Bakuradze, Nino Grdzlishvili, Khatuna Makalatia, Gulnara Natroshvili, Nina Chanishvili „Microbiological investigation of artisanal caucasian yogurt-like product Matsoni“. *Мікробіологія і біотехнологія*, (3 (43)), 65-74.
3. Christine Rohde, Grégory Resch, Jean-Paul Pirnay , Bob G. Blasdel, Laurent Debarbieux, Daniel Gelman, Andrzej Górski, Ronen Hazan, Isabelle Huys, **Elene Kakabadze**, Małgorzata Łobocka, Alice Maestri, Gabriel Magno de Freitas Almeida, Khatuna Makalatia, Danish J. Malik, Ivana Mašla Šnová, Maia Merabishvili, Roman Pantucek, Thomas Rose, Dana Štveráková, Hilde Van Raemdonck , Gilbert Verbeken, Nina Chanishvili. „Expert opinion on three phage therapy related topics: bacterial phage resistance, phage training and prophages in bacterial production strains“ *Viruses*, 10(4), 178.
4. **Elene Kakabadze**, Nino Grdzlishvili, Nata Bakuradze, Khatuna Makalatia, Gulnara Natroshvili, Sophia Rigvava, Nina Chanishvili „De Novo Isolation of Bacteriophages specific to Enterococcus spp. Isolated from Dairy and Clinical Samples“; *Experimental and Clinical Medicine*, N4, 2018, 80-83, ISSN 1512-0392