

TECHNOLOGY OF PRODUCTION AND PROCESSING OF LIVESTOCK PRODUCTS

DOI <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-184-8-13>

ЕТАПИ РОЗРОБКИ ДУПЛЕКСНОЇ ПЛР ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

Бондаренко А. С.

*здобувач вищої освіти другого рівня
факультету технологій тваринництва
Державний біотехнологічний університет*

Юрко П. С.

*кандидат ветеринарних наук, старший дослідник,
доцент кафедри біотехнологій в тваринництві
Державний біотехнологічний університет
м. Харків, Україна*

Важливу роль в сучасному світі для організму людини та тварин відіграють препарати та продукти, що утримують живі культури корисних мікроорганізмів. До них відносяться пробіотики, пребіотики, симбіотики, а також кисломолочні продукти. Серед корисних мікроорганізмів слід зазначити *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* та *Streptococcus thermophilus* [1].

Вживання неякісних продуктів може завдати шкоди організму, тому дуже важливим є ефективний контроль якості пробіотиків та кисломолочних продуктів на наявність корисних мікроорганізмів [2]. Для контролю використовують як класичні мікробіологічні методи, так і сучасні молекулярно-генетичні методи. Порівняно з бактеріологічними дослідженнями, ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) дозволяє скоротити термін проведення контролю до 8 годин.

В попередніх дослідженнях нами було використано ПЛР для виявлення геному *Lactobacillus spp.* в кисломолочних продуктах, заквасках та пробіотиках [3].

Наступним етапом наших досліджень було поставлено за мету розробити дуплексну ПЛР для одночасного виявлення геномів *Bifidobacterium spp.* та *Lactobacillus spp.*

При проведенні ПЛР дуже важливо підібрати специфічні праймери, що будуть фланкувати ділянку гену цільового організму. Для підбору праймерів було обрано послідовність гену 16S рРНК *Bifidobacterium Bifidobacterium longum subsp. suillum strain Su 851* (№ в GenBank NR_145535.1).

Праймера для проведення ПЛР мають відповідати наступним вимогам:

1. Розмір праймерів повинен складати 16-25 пар нуклеотидів;
2. Вміст CG має становити 50-60% від загальної кількості;
3. Відмінність температур відпалу прямого та зворотнього праймеру не більш, ніж на 5 ° C;
4. Праймери не повинні бути само- та взаємно компліментарними.

В результаті досліджень було обрано праймери:

Bifidobacterium F (forward) 5`-CAGCTCGTGTTCGTGAGATGT-3`

Bifidobacterium R (reverse) 5`-CGTAAGGGGCATGATGATCT-3`

Далі на сайті NCBI за заданими параметрами було перевірено специфічність праймерів, визначена теоретично температура відпалу та відповідність вищезазначеним вимогам. Також правильність підбору праймерів перевірили за допомогою програмного забезпечення Primer3 (v. 0.4.0). Встановлено, що обрана праймерна система відповідає вимогам до праймерів та фланкує ділянку 16S рРНК *Bifidobacterium spp.* Дуплексна ПЛР буде складатися з двох пар праймерів специфічних для *Lactobacillus spp.* [4] та *Bifidobacterium spp.* Розмір цільових фрагментів складає 823 п.н. для *Lactobacillus spp.* та 151 п.н. для *Bifidobacterium spp.*, що дозволить легко розрізнити ділянки на електрофореграмі при використанні агарозного гелю. Визначення оптимальної температури відпалу для проведення ефективної дуплексної ПЛР потребує додаткової низки дослідів, тому що при проведенні ПЛР для виявлення *Lactobacillus spp.* оптимальна

температура відпалу складала 58°C [3], в той час, як розрахункова температура відпалу праймерів, специфічних для *Bifidobacterium* становить +58,5...+60,5°C.

Таким чином, в результаті проведених досліджень обрано праймерну систему для розробки дуплексної ПЛР на одночасне виявлення геномів *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium spp.* Подальші дослідження будуть спрямовані на визначення можливості використання даної тест-системи для контролю кисломолочних продуктів, пробіотиків та заквасок.

Література:

1. Kok C.R., Hutkins R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutr Rev.* 2018. № 76 (Suppl 1). P. 4–15. doi: 10.1093/nutrit/nuy056
2. Aldawsari F.S., Bin Helel B.S., Al shehry Y.M. et al. Probiotics and Their Quality-Related Concerns: Highlights From the Saudi Arabian Market. *Ther Innov Regul Sci.* 2020. № 54. P. 365–369. doi: 10.1007/s43441-019-00064-8
3. Юрко П.С., Бондаренко А.С. Дослідження ефективності використання ПЛР для ідентифікації *Lactobacillus spp.* у пробіотиках та кисломолочних продуктах. *Актуальні питання технологій тваринництва та ветеринарної медицини. Матеріали всеукр. онлайн-конференції.* Харків, 2020. С. 82–85.
4. Джобулаева А.К., Алимбетова А.В., Молжигитова А.Е., Джакибаева Г.Т. Использование молекулярных методов для видовой идентификации пробиотических лактобактерий. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2015. № 9 (часть 2). С. 312–316.