

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

Քերյան Անդրանիկ Գեղամի

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԲԱՐՁՐ ԼԵՌՆԱՅԻՆ ՇՐՋԱՆՆԵՐԻ ԱՎԱՆԴԱԿԱՆ
ԿԱԹՆԱՍԹԵՐՔՆԵՐԻՑ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ
ՆՈՒՅՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄԸ, ՀԱԿԱԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԵՎ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Գ.00.07 – «Միկրոբիոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2014

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

Керян Андраник Гегамович

ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ТРАДИЦИОННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
ВЫСОКОГОРНЫХ РЕГИОНОВ АРМЕНИИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 – «Микробиология»

ЕРЕВАН - 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,
կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ա. Հ. Թռչունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ. Գ. Հովհաննիսյան
կ.գ.թ. Ֆ. Ն. Տիրունի

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԱՆ «Ա. Բ. Ալեքսանյանի անվան
համաճարակաբանության, վիրուսաբանության
և բժշկական մակաբուժաբանության ԳՀԻ» ՊՈԱԿ

Պաշտպանությունը կայանալու է 2014 թ. հուլիսի 22-ին, ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 83:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2014 թ. հունիսի 20-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կ.գ.թ.

Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в биологическом факультете ЕГУ.

Научный руководитель:

член-корреспондент НАН РА,
д.б.н., профессор А. А. Трчунян

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор Г. Г. Оганесян
к.б.н Ф. Н. Тхруни

Ведущая организация:

«НИИ Эпидемиологии, вирусологии и медицинской
паразитологии имени А. Б. Александяна» ГНКО МЗ РА

Защита диссертации состоится 22 июля 2014 г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (374 10) 65 41 83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 20 июня 2014 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н

Г. Е. Аветисова

ՄԵԿԱՏՄԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Թեմայի արդիականությունը: Կաթնաթթվային բակտերիաները (ԿԹԲ) սովորաբար օժտված են բարձր կենսաբանական ակտիվությամբ, ինչը, դրանց բնական ծագման հետ միասին, ԿԹԲ դարձնում է մի շարք բնագավառներում կիրառության համար հարմար թեկնածուներ: Մասնավորապես, ԿԹԲ հակամանրէային ակտիվությունն ընկած է որպես պրոբիոտիկներ դրանց կիրառության հիմքում: Միննույն ժամանակ, ԿԹԲ կողմից սինթեզվող բակտերիացինները ներկայումս դիտարկվում են որպես հակաբիոտիկների այլընտրանք: ԿԹԲ, ինչպես նաև դրանց կողմից սինթեզվող բակտերիացինները լայն կիրառություն են գտել նաև սննդարդյունաբերությունում՝ որպես կենսապահպանիչներ (Cotter et al., 2005b):

ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը նույնպես կարևոր կիրառական նշանակություն ունի: Ինչպես հայտնի է, կաթի սպիտակուցները կարող են բազմաթիվ մարդկանց, հատկապես երեխաների մոտ առաջացնել ալերգիաներ, ինչը շատ դեպքերում կարող է հանգեցնել ծանր հետևանքների: Միննույն ժամանակ կաթը հանդիսանում է կարևոր ամինաթթուների և ածխաջրերի աղբյուր և սննդակարգից դրա բացառումը ցանկալի չէ: ԿԹԲ կիրառումը այդ խնդրի լուծման նպատակով կայանում է նրանում, որ պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ ճեղքում են կաթի սպիտակուցները, ինչը սովորաբար հանգեցնում է կաթի ալերգենության նվազման: Այդպիսի ԿԹԲ կարող են օգտագործվել հիպոալերգեն կաթնամթերքներ ստանալու նպատակով (El-Ghais et al., 2011a):

ԿԹԲ հակաբակտերիական և պրոտեոլիտիկ ակտիվությունների միջև կարող է գոյություն ունենալ յուրահատուկ կապ: Մասնավորապես, պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ-երը կաթի սպիտակուցների հիդրոլիզի արդյունքում կարող են առաջացնել հակաբակտերիական ազդեցությամբ օժտված պեպտիդներ (Hartman and Meisel, 2007): Սակայն այդ երկու հատկությունները միաժամանակ դրսևորող ԿԹԲ շտամները բնության մեջ հազվադեպ են հանդիպում (Topisirović et al., 2007):

Արտադրական տեսանկյունից չափազանց կարևոր է բարձր ակտիվությամբ օժտված նոր շտամների հայտնաբերումը և ներդրումն արտադրության մեջ: Տարբեր բնական միջավայրերը հանդիսանում են բարձր ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ նոր շտամների աղբյուր (Reid, 1999): Հայաստանն ունի լավ արտահայտված ուղղահայաց գոտիականություն, ինչը ստեղծում է էկոլոգիական խորշերի բազմազանություն՝ հատկապես բարձր լեռնային գոտիներում: Դա իր հերթին բերում է ավանդական կաթնամթերքներում մանրէների յուրահատուկ համակեցությունների ստեղծման (Movsesyan et al., 2010; Afrikian, 2012): Այդ պատճառով հետաքրքիր էր հայկական ավանդական կաթնամթերքներից հակաբակտերիական և պրոտեոլիտիկ ակտիվություն միաժամանակ ցուցաբերող շտամների անջատումը և դրանց հակամանրէային ու պրոտեոլիտիկ

ակտիվության ուսումնասիրումը՝ բարձր ակտիվությամբ օժտված շտամներ ստանալու նպատակով:

Ուսումնասիրության նպատակներն ու խնդիրները: Տվյալ աշխատանքի նպատակն էր Հայաստանի բարձր լեռնային շրջանների ավանդական կաթնամթերքներից մեկուսացնել միաժամանակ բարձր հակամանրէային և պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ շտամներ և ուսումնասիրել տարբեր ֆիզիկաքիմիական գործոնների, ինչպես նաև սննդամիջավայրերի կազմության ազդեցությունն այդ ակտիվությունների վրա:

Ուսումնասիրությունների համար սահմանվել են հետևյալ խնդիրները.

1. Հայկական ավանդական կաթնամթերքներից մեկուսացնել միաժամանակ բարձր պրոտեոլիտիկ և հակամանրէային ակտիվություններով օժտված ԿԹԲ շտամներ և նույնականացնել դրանք:

2. Բացահայտել տարբեր ֆիզիկաքիմիական գործոնների, ինչպես նաև աճեցման սննդամիջավայրերի տարբեր բաղադրիչների ազդեցությունը այդ շտամների աճի և հակաբակտերիական ակտիվության վրա:

3. Որոշել մեկուսացված շտամների աճման և հակաբակտերիական ակտիվության դրսևորման համար օպտիմալ պայմանները:

4. Հետազոտել այդ շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա տարբեր ֆիզիկաքիմիական գործոնների, ինչպես նաև մետաղների իոնների ազդեցությունը:

5. Որոշել հետազոտվող շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության դրսևորման օպտիմալ պայմանները:

Աշխատանքի գիտական նորայնն ու գիտագործնական նշանակությունը:

Տվյալ աշխատանքի ընթացքում անջատվել են ԿԹԲ շտամներ, որոնք միաժամանակ դրսևորում են բարձր պրոտեոլիտիկ և հակաբակտերիական ակտիվություն: Ընդհանուր առմամբ, այս երկու հատկությունները միաժամանակ դրսևորող շտամները, որոնք կարևոր կիրառական նշանակություն կարող են ունենալ, տարածված չեն:

Պարզվել է, որ միջավայրի pH-ի կարգավորվող պայմաններն առավել նպաստավոր էին հետազոտվող շտամների աճի, իսկ չկարգավորվող pH-ի պայմանները՝ հակաբակտերիական ակտիվության դրսևորման համար: Սա նշանակում է, որ միջավայրի pH-ի միջոցով կարելի է կարգավորել ուսումնասիրվող շտամների կենսաբանական ակտիվությունը:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ Ca^{2+} և Co^{2+} մետաղների իոնները խթանիչ ազդեցություն ունեն ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվության վրա: Ca (II) իոնների օպտիմալ կոնցենտրացիան 5 մմոլ էր: Նկատի ունենալով, որ մարդու աղիներում կալցիումի մնացորդային կոնցենտրացիան հենց 5 մմոլ է, կարելի է ենթադրել, որ այնտեղ հայտնվելիս ուսումնասիրվող ԿԹԲ շտամները կարող են դրսևորել բարձր հակաբակտերիական ակտիվություն: Այդ փաստի շնորհիվ ուսումնասիրվող երկու շտամները կարող են կիրառական կարևոր

նշանակություն ունենալ, մասնավորապես որպես պրոբիոտիկներ հնարավոր օգտագործման համար:

Պարզվել է, որ հետազոտվող շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը նույնպես խթանվում է Ca (II) և Co (II) իոններով: Կալցիումի իոնները զգալիորեն կրճատում էին սպիտակուցների հիդրոլիզի տևողությունը, ինչը չափազանց կարևոր է կիրառական տեսանկյունից: Թեև գրականությունում առկա են նշված իոնների կողմից ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվության խթանման վերաբերյալ մի շարք տվյալներ, բայց դրանց ազդեցությունը պրոտեոլիզի կինետիկայի վրա ուսումնասիրված չէր: ԿԹԲ բարձր պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը կարող է կիրառվել հիպոալերգեն կաթնամթերքներ ստանալու նպատակով:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները:

1. Կարգավորվող pH-ի պայմանները նպաստավոր են ԿԹԲ աճի, իսկ չկարգավորվող pH-ի պայմանները՝ հակաբակտերիական ակտիվության դրսևորման համար

2. Ca (II) և Co (II) իոնները խթանում են ԿԹԲ ինչպես հակաբակտերիական, այնպես էլ պրոտեոլիտիկ ակտիվությունները:

Աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ: Աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ Կրթության և գիտության նախարարության Գիտության պետական կոմիտեի քաղաքի ֆինանսավորման միջոցներով:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակի անձնական ներդրումը ներառում է նմուշների հավաքումը, ձևակերպված խնդիրների փորձնական իրականացումը, թեմայի վերաբերյալ գիտական գրականության ուսումնասիրությունը և վերլուծությունը, գիտական հոդվածների ևատենախոսության ձևակերպումը: Հիմնական խնդիրների ձևակերպումը և մեթոդների մշակումը, ինչպես նաև հետազոտությունների արդյունքները քննարկվել և մշակվել են գիտական ղեկավար, ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ., պրոֆ. Ա. Ն. Թռչունյանի, ինչպես նաև ասիստենտ, կ.գ.թ Ի. Լ. Բազուկյանի հետ համատեղ:

Աշխատանքի ապրոբացիան: Ատենախոսության արդյունքները զեկուցվել են ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետի Մանրէաբանության, բույսերի և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնի սեմինարների ընթացքում, ինչպես նաև «Биология – наука XXI века» 18-րդ միջազգային դպրոց-կոնֆերանսում (Պուշչինո, Ռուսաստան, 21-25 ապրիլ, 2014):

Հրատարակված աշխատություններ: Ատենախոսության արդյունքները ներկայացված են 4 հրատարակումներում, այդ թվում՝ 3 գիտական հոդվածներում և 1 գիտաժողովի թեզիսում:

Աշխատանքի կատարման վայրը: Աշխատանքը կատարվել է ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի մանրէաբանության, բույսերի և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում:

Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտությունների նյութերից և

մեթոդներից, հետազոտությունների արդյունքներից և դրանց քննարկումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է 146 էջի վրա, ներառում է 13 աղյուսակ, 40 նկար և 242 գրական հղում:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկը կազմված է 7 բաժիններից, որտեղ բնութագրված են ԿԹԲ-երը, նկարագրված է դրանց տարածվածությունը, դասակարգումը և նյութափոխանակության հիմնական ուղիները: Նկարագրված են նաև ԿԹԲ հակաբակտերիական և պրոտոէլիտիկ ակտիվությունները, մետաղների իոնների ազդեցությունը ԿԹԲ վրա, ինչպես նաև ԿԹԲ կիրառական նշանակությունը:

ԳԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱԳՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտության օբյեկտները: Հետազոտություններում օգտագործվել են Հայաստանի տարբեր մարզերի փոքր տնտեսություններից հավաքված մածուխի և պանրի նմուշներից անջատված ԿԹԲ շտամներ, ինչպես նաև նախկինում նույնպես ավանդական կաթնամթերքներից անջատված և ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետի Մանրէաբանության, բույսերի և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում պահվող ԿԹԲ շտամները:

Կաթնամթերքներից ԿԹԲ մեկուսացումը: Կաթնամթերքների նմուշներից պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ մեկուսացվել են կաթնային ազար սննդամիջավայրում, որտեղ դրանք առաջացնում են կազեինի հիդրոլիզի տեսանելի գոտիներ: Մեկուսացված ԿԹԲ մաքուր կուլտուրաները ստացվել են գծային ցանքի միջոցով:

Մեկուսացված ԿԹԲ նույնականացումը: Հետազոտվող ԿԹԲ շտամների ձևաբանական, կենսաքիմիական, ֆիզիոլոգիական հատկանիշները որոշվել են համընդհանուր մեթոդներով (Herpycov, 2005; Hammes and Hertel, 2006; Vos et al., 2009): ԿԹԲ նույնականացվել են 16S ռԴՆԹ-ի հաջորդականությունների վերլուծության հիման վրա:

ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվության ուսումնասիրությունը: ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունն ուսումնասիրվել է ազարում դիֆուզիայի մեթոդով (Papagianni et al., 2006)՝ որոշ ձևափոխություններով: ԿԹԲ աճման ընթացքում սինթեզվող կաթնաթթվի չեզոքացման նպատակով հակաբակտերիական ակտիվության ուսումնասիրությունից առաջ ԿԹԲ կախույթի pH-ը NaOH-ի խիտ լուծույթի ավելացման միջոցով հասցվել է 6.5-ի:

ԿԹԲ աճի և հակաբակտերիական ակտիվության կինետիկայի ուսումնասիրությունը: ԿԹԲ աճի և հակաբակտերիական ակտիվության կինետիկայի ուսումնասիրությունն իրականացվել է աճի ընթացքում ամեն 3 ժամը մեկ վերցված նմուշների համեմատմամբ: Աճը գնահատվել է ԿԹԲ կախույթի օպտիկական խտության (ՕԽ) չափման միջոցով, իսկ

հակաբակտերիական ակտիվությունը՝ ազարում դիֆուզիայի մեթոդով: Աճի կինետիկան ուսումնասիրելու համար ԿԹԲ կախության ՕԽ-ն չափվել է ամեն 3 ժամը մեկ: Հակաբակտերիական ակտիվության կինետիկայի ուսումնասիրման համար ամեն 3 ժամը մեկ ԿԹԲ կախությամբ մեկ փորձանոթ թերմոստատից տեղափոխվել է սառնարան՝ մինչև փորձի ավարտը, այնուհետև ուսումնասիրվել է հակաբակտերիական ակտիվությունը:

ԿԹԲ աճի և հակաբակտերիական ակտիվության ուսումնասիրությունը տարբեր pH-ի պայմաններում: Կարգավորվող և չկարգավորվող pH-ի պայմաններում ԿԹԲ աճի և հակաբակտերիական ակտիվության ուսումնասիրման համար օգտագործվել են 5, 6.5 և 8 նախնական pH արժեքներով սննդամիջավայրեր: Միջավայրի pH-ը կարգավորվել է համապատասխան արժեքներում՝ NaOH-ի ավելացման միջոցով:

ԿԹԲ աճի և հակաբակտերիական ակտիվության վրա մետաղների իոնների ազդեցության ուսումնասիրությունը: Այս նպատակով տարբեր մետաղների իոններ (Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} և Zn^{2+}) տարբեր կոնցենտրացիաներով (0.5, 1, 3, 5 և 10 մմոլ) նախապես ավելացվել են ՄՈՇ սննդամիջավայրին:

ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվության ուսումնասիրությունը: ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշվել է Բազուկյանի և մյուսների առաջարկած մեթոդով (Bazukyan et al., 2010): Պրոտեոլիտիկ ռեակցիան իրականացվել է՝ 100 մմոլ կալիում ֆոսֆատային բուֆերում (pH 6.5) լուծված բջիջների կախույթը 1/1 հարաբերությամբ խառնելով նույն բուֆերում լուծված սպիտակուցների հետ: Սպիտակուցների հիդրոլիզը գնահատելու համար կիրառվել է նատրիում դոդեցիլ սուլֆատ – պոլիակրիլամիդային ժել-էլեկտրաֆորեզ (ՆԴՄ-ՊԱԺԷ):

Պրոտեինազների գեների հայտնաբերումը: Կատարվել է ԿԹԲ շտամների քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի ՊՇՈ՞՞ օգտագործելով համապատասխան փրայմերներ: Առաջացած ամպլիկոնները ուսումնասիրվել են ազարոզային ժել-էլեկտրաֆորեզի միջոցով:

Պրոտեոլիտիկ ակտիվության՝ pH-ից կախվածության ուսումնասիրումը: Բջիջները լուծվել են pH-ի 5.5, 6, 6.5, 7.2 և 8 արժեքներ ունեցող 100 մմոլ կալիում-ֆոսֆատային բուֆերում: Սպիտակուցների հիդրոլիզն ուսումնասիրվել է ՆԴՄ-ՊԱԺԷ-ի միջոցով:

Փորձերի արդյունքների մշակումը: Բոլոր փորձերը կրկնվել են երեք անգամ: Աղյուսակներում և նկարներում ներկայացված են ստացված տվյալների միջին արժեքները՝ ստանդարտ շեղումներով, որոնք հաշվարկվել են GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, Inc.; ԱՄՆ) ծրագրի միջոցով:

Փորձերի արդյունքում ստացված տվյալները ենթարկվել են վիճակագրական մշակման: Մասնավորապես Սթյուդենտի Թ-թեստի միջոցով փորձերի արդյունքներում ստացված տվյալների հավաստիության գնահատման համար օգտագործվել է R Project for Statistical Computing version R 3.1.0 (The R foundation of statistical computing, Ավստրիա) ծրագիրը: Աշխատանքում բերված արդյունքերը հավաստի են ($p < 0.05$), եթե այլ արժեք հաջորդիվ բերված չէ:

**ԳԼՈՒԽ 3. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ
ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ**

**ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԵՎ ՀԱԿԱԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՄԲ ՕԺՏՎԱԾ ԿԹԲ
ՇՏԱՄՆԵՐԻ ՄԵԿՈՒՄԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՆՈՒՑՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄԸ**

ՀՀ բարձր լեռնային շրջանների ավանդական կաթնամթերքներից մեկուսացված ավելի քան 100 շտամներից նախ ընտրվել են բարձր պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված 7 շտամներ, որոնցից 5-ը նոր էին մեկուսացվել, իսկ 2-ը՝ նախկինում: Պարզվել է, որ բոլոր 7 շտամներն օժտված էին նաև հակաբակտերիական ակտիվությամբ գրամ-դրական և գրամ-բացասական թեստ-օրգանիզմների նկատմամբ: Դրանցից հետագա աշխատանքների համար ընտրվել են առավել ակտիվ 2-ը՝ 4.2 և 5.2 պայմանական անուններով:

Հետազոտվող շտամների ձևաբանական, կենսաքիմիական և ֆիզիոլոգիական հատկությունների ուսումնասիրությունների արդյունքում պարզվել է, որ դրանք պատկանում են *Lactobacillus* ցեղին:

ԿԹԲ հետագա նույնականացման համար ԿԹԲ բջիջներից անջատվել է դրանց քրոմոսոմային ԴՆԹ-ն, որն օգտագործվել է 16S ռԴՆԹ-ի ՊՇՌ-ի համար՝ օգտագործելով համապատասխան փրայմերներ: ՊՇՌ արդյունքում ստացված 16S ռԴՆԹ-ի ամպլիկոնների երկարությունը 4.2 շտամի համար 950 նգ էր, 5.2-ի դեպքում՝ 919 նգ: Այդ ամպլիկոնների սեկվենավորման արդյունքում ստացված նուկլեոտիդային հաջորդականությունները BLAST ալգորիթմի միջոցով համեմատվել են GenBank տվյալների շտեմարանում առկա հաջորդականությունների հետ: Արդյունքում 4.2 շտամը նույնականացվել է որպես *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (MDC 9632), իսկ 5.2 շտամը՝ որպես *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MDC 9633) (Աղ. 1):

Աղ. 1. 4.2 և 5.2 շտամների 16S ռԴՆԹ-ի հաջորդականությունների BLAST վերլուծության արդյունքները

Շտամներ	GenBank տվյալների բազայի առավել նման շտամներ	Նմանությունը
4.2	Չկուտիվացված բակտերիայի կլոն 13L-37	97%
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> FMAC9	98%
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> NBRC 3376	97%
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NWL32	97%
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> DE3	97%
5.2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i> NCC 725T	97%
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ND02	99%
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14	93%
	<i>Lactobacillus crispatus</i> ST1	92%
	<i>Lactobacillus helveticus</i> H10	92%

ԿԹԲ ՀԱԿԱԲԱԿՏԵՐԻՄԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Հակաբակտերիական ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ կարող են կիրառական մեծ նշանակություն ունենալ: Արտադրական նպատակներով այդ ԿԹԲ օգտագործման համար շատ կարևոր է բարձրացնել դրանց հակաբակտերիական ակտիվությունը: Այդ նպատակին կարելի է հասնել կամ գենետիկական ճարտարագիտության մեթոդներով, կամ միջավայրի տարբեր պայմանների ներգործության միջոցով: Հայտնի է, որ արտաքին ֆիզիկաքիմիական գործոնները (pH, ջերմաստիճան, օքսիդավերականգնման պոտենցիալ և այլն), ինչպես նաև սննդամիջավայրերի կազմը նշանակալի ազդեցություն ունեն ԿԹԲ աճի, ինչպես նաև կենսաբանական ակտիվության, այդ թվում՝ բակտերիացիաների սինթեզի վրա: Հարկ է նշել, որ բակտերիաների աճման և հակաբակտերիական ակտիվության դրսևորման օպտիմալ պայմանները ոչ միշտ են համընկնում (Juarez Tomás et al., 2002; Dortu et al., 2009; Soghomonyan et al., 2011): Այս գործոնների կիրառմամբ հնարավոր է կարգավորել բակտերիաների աճը և հակաբակտերիական ակտիվությունը՝ առավել համապատասխանեցնելով դրանք արտադրական չափանիշներին:

Կարևոր նշանակություն ունի ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվության կայունությունը pH-ի լայն տիրույթում: 4.2 և 5.2 շտամներն ունակ էին պահպանել իրենց հակաբակտերիական ակտիվությունը, երբ դրանց կախույթի pH-ը բարձրացվում էր մինչև 6.5: Ընդ որում, թեստ-օրգանիզմների աճի ճնշման գոտիների չափերը գրեթե նույնն էին, ինչ չկարգավորված pH-ով բջջային կախույթի դեպքում (Աղ. 2): Կաթնամթերքների արտադրության հիմնական հումքը հանդիսացող կովի կաթի pH-ը տատանվում է 6.4-6.8 սահմաններում, ինչից կարելի է ենթադրել, որ հետագոտվող շտամները կկարողանան ճնշել սննդամթերքների փչացում առաջացնող մանրէների աճը կաթնամթերքներում սննդային խմորումների վաղ փուլերի ընթացքում, մինչ օրգանական թթուների կուտակումը և դրան հաջորդող pH-ի անկումը:

Աղ. 2. ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվության կախվածությունը միջավայրի pH-ից

pH-ի արժեքը	Թեստ-օրգանիզմների աճի ճնշման գոտիները, մմ			
	4.2		5.2	
	<i>M. luteus</i> WT	<i>S. typhimurium</i> WDCM 1474	<i>M. luteus</i> WT	<i>S. typhimurium</i> WDCM 1474
Բնական պայմաններ	20.0±0.2	12.0±0.3	20.0±0.2	12.0±0.1
6.5	21.0±0.1	11.0±0.1	18.0±0.1	11.0±0.0
8	19.0±0.1	0	12.0±0.2	10.0±0.0

Որպես պրոբիոտիկներ ԿԹԲ կիրառման համար կարևոր է, որ դրանք պահպանեն իրենց ակտիվությունը աղիների հիմնային pH-ում: Պարզվել է, որ pH 8-ում 4.2 շտամը ցուցաբերում էր հակաբակտերիական ակտիվություն *M. luteus*-ի նկատմամբ: Սակայն 5.2 շտամի հակաբակտերիական ակտիվությունը մասնակիորեն ճնշվում էր (Աղ. 2):

Այս արդյունքները կարող են նշանակալի լինել կաթնամթերքների տեխնոլոգիայում հետազոտվող շտամների կիրառության համար: Այս շտամները կարող են հատկապես խոստումնալից լինել որպես ֆունկցիոնալ կաթնամթերք հնարավոր կիրառության համար, քանի որ դրանք ենթադրաբար կարող են ցուցաբերել իրենց հակաբակտերիական ակտիվությունը ոչ միայն կաթում, այլև աղեստամոքսային ուղիում:

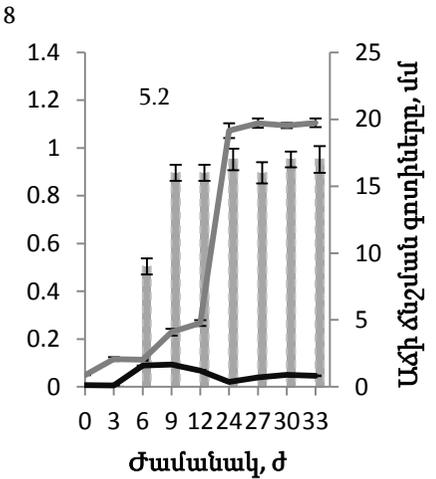
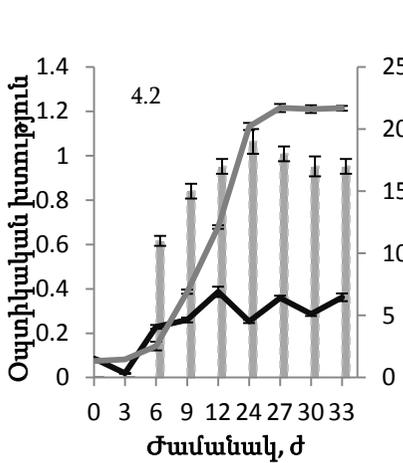
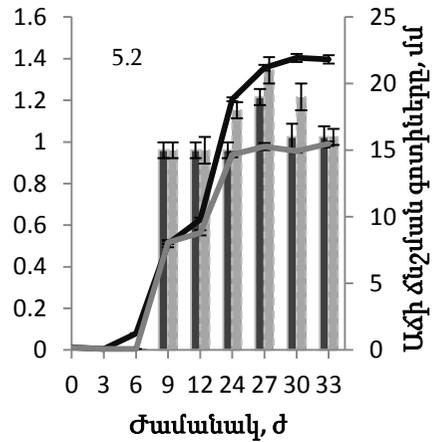
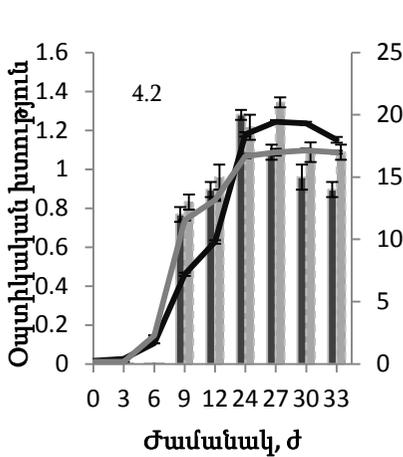
Կաթնամթերքների և այլ սննդամթերքների արտադրություններում հաճախ կիրառվում են բարձր ջերմաստիճաններ և կարևոր է, որ ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունը պահպանվի նման պայմաններում:

Պարզվել է, որ *M. luteus* WT-ի նկատմամբ 4.2 շտամի հակաբակտերիական ակտիվությունը պահպանվում է մինչև 55°C ջերմաստիճանում, իսկ 5.2 շտամի դեպքում՝ մինչև 60°C: Ջերմաստիճանի հետագա բարձրացումը բերում է հակաբակտերիական նյութի ակտիվության կորստի:

Միևնույն ժամանակ, երկու շտամներն էլ պահպանում էին իրենց հակաբակտերիական ակտիվությունը *S. typhimurium* WDCM 1474-ի նկատմամբ նույնիսկ 85°C ջերմաստիճանում (Աղ. 3): Սա թույլ է տալիս ենթադրել, որ նշված 2 թեստ-օրգանիզմներից յուրաքանչյուրի աճի ճնշման համար պատասխանատու են տարբեր հակաբակտերիական նյութեր:

Աղ. 3. ԿԹԲ հակաբակտերիական նյութերի դիմացկունությունը բարձր ջերմաստիճաններում

Ջերմաստիճան	Թեստ-օրգանիզմների աճի ճնշման գոտիները, մմ			
	4.2		5.2	
	<i>M. luteus</i> WT	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> WDCM 1474	<i>M. luteus</i> WT	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> WDCM 1474
40°C	15±1.3	16±1	15±1.3	18±0.6
45°C	15±1	15±1	15±1	17±0.6
50°C	13±0.6	15±1	14±1	16±0.6
55°C	13±0.6	15±1	14±1	16±0.6
60°C	0	13±1	11±1.3	16±1.3
65°C	0	13±0.6	0	13±1.3
70°C	0	12±0.6	0	12±0.6
75°C	0	12±1.3	0	12±0.6
80°C	0	12±0.6	0	12±1
85°C	0	12±1.3	0	12±0.6



Նկ. 1. 4.2 և 5.2 շտամների աճի (գծեր) և հակաբակտերիական ակտիվության (սյուներ) կինետիկան կարգավորվող (սև) և չկարգավորվող (մոխրագույն) pH-ի պայմաններում:

ԿԹԲ աճման և հակաբակտերիական ակտիվության դրևստրման օպտիմալ պայմանների ուսումնասիրության ընթացքում պարզվել է, որ հետազոտվող շտամներն առավել լավ էին աճում նախնական 8 pH-ով սննդամիջավայրում: Բացի այդ, այս սննդամիջավայրում աճեցվելիս հակաբակտերիական նյութերի սինթեզը սկսվում էր աճեցման արդեն 6-րդ ժամից, այն դեպքում, երբ այլ պայմաններում այն սկսվում էր միայն 9-րդ ժամից (Նկ. 1): Սակայն թեստ-օրգանիզմների աճի ճնշման գոտիները ավելի փոքր էին, քան նախնական 6.5 pH-

ի պայմաններում աճեցվող կուլտուրաների դեպքում: Համանման pH-կախվածություն է նկատվել *Lactobacillus amylovorus*-ի կողմից ամիլոլորինի արտադրման ժամանակ (Callewaert et al., 1999): Այսպիսով, 4.2 և 5.2 շտամների հակաբակտերիական նյութերի սինթեզի համար օպտիմալը 6.5 նախնական pH-ն է, սակայն երբ անհրաժեշտ է հակաբակտերիական ակտիվության արագ դրսևորում, կուլտիվացման միջավայրի նախնական pH-ը կարելի է դարձնել 8:

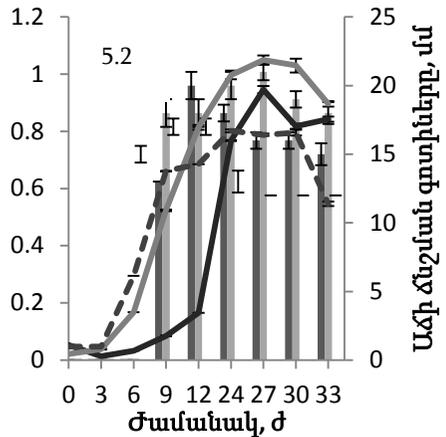
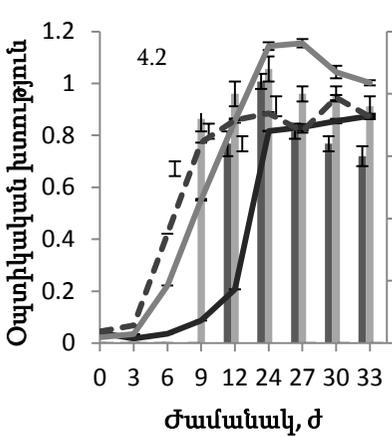
Հետազոտվող շտամների աճի համեմատությունը կարգավորվող և չկարգավորվող pH-ի պայմաններում ցույց է տվել, որ pH-ի կարգավորումն ավելի նպաստավոր է աճի համար: Մյուս կողմից, երկու շտամներն էլ ցուցաբերում էին ավելի բարձր հակաբակտերիական ակտիվություն, երբ աճեցվում էին չկարգավորվող pH-ի պայմաններում (Նկ. 1): Հարկ է նաև նշել, որ 2 շտամներն էլ չէին աճում հաստատուն պահվող 8 pH-ի պայմաններում (Նկ. 1): Նմանատիպ տվյալներ են ստացվել նաև *L. sakei*-ի կողմից սակացին G-ի արտադրության վերաբերյալ չկարգավորվող և կարգավորվող pH-ով կուլտուրաներում, երբ չկարգավորվող pH-ի նախնական 6 և 6.5 արժեքներն օպտիմալ էին հակալիստերիական ակտիվության համար (Dortu et al., 2009):

Այսպիսով, կարելի է ասել, որ լակտոբացիլների կենսաբանական ակտիվությունը հնարավոր է կարգավորել pH-ի միջոցով: Մասնավորապես, այն դեպքում, երբ հիմնական նպատակը կենսազանգվածի սինթեզն է, կարգավորվող pH-ը կարող է ավելի կիրառելի լինել: Մյուս կողմից, երբ հակաբակտերիական նյութերի սինթեզն ամենակարևոր չափանիշն է, չկարգավորվող pH պայմանները կարող են կենսական նշանակություն ունենալ:

Այս բացահայտումները կարող են օգտագործվել լակտոբացիլների նոր շտամների կիրառության համար որպես մայրական շտամներ կաթնամթերքների ստացման տեխնոլոգիաներում, որպես պրոբիոտիկներ և այլն:

Ջերմաստիճանը նույնպես կարևորագույն գործոն է, որն ազդում է բակտերիաների աճի և կենսաբանական ակտիվության վրա: Պարզվել է, որ երկու հետազոտվող շտամների և աճման, և հակաբակտերիական ակտիվության դրսևորման համար օպտիմալ է 37°C ջերմաստիճանը (Նկ. 2): ԿԹԲ մեծամասնության աճի և հակաբակտերիական ակտիվության դրսևորման համար այդ ջերմաստիճանն օպտիմալ է համարվում (Juarez Tomás et al., 2002): 45°C-ում ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունը դրսևորվում էր ավելի վաղ՝ աճեցման 6-րդ ժամից, սակայն գումարային ակտիվությունն ավելի փոքր էր, քան հետազոտված այլ ջերմաստիճանների դեպքում: Ավելին, 45°C-ում աճեցվելիս 4.2 շտամի հակաբակտերիական ակտիվությունը անհետանում էր աճեցման արդեն 27-րդ ժամից:

Մետաղների իոնները կարևոր նշանակություն ունեն ԿԹԲ կենսագործունեության համար: Դրանք մասնակցում են բջջում ընթացող նյութափոխանակության գործընթացներին, կարգավորում են տարբեր ֆերմենտների աշխատանքը և այլն: Սակայն մետաղների իոնների



■ ՀԱ 30°C ▨ ՀԱ 37°C
 ▨ ՀԱ 45°C — ԱՃ 30°C
 — ԱՃ 37°C - - - ԱՃ 45°C

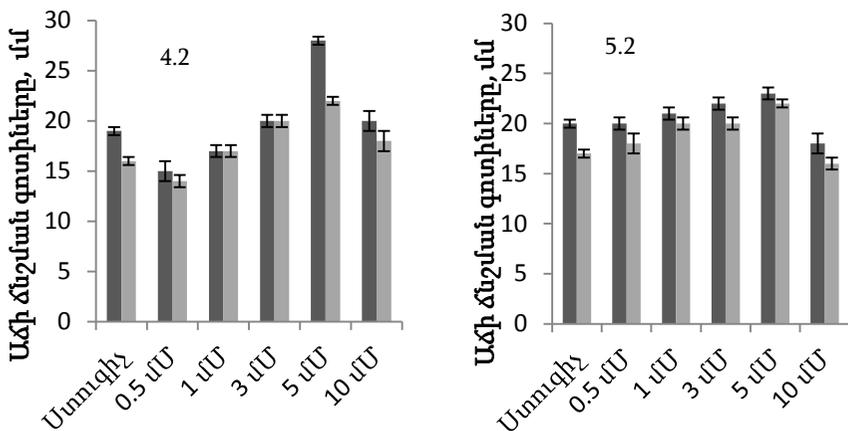
Նկ. 2. Ջերմաստիճանի գոտեցությունը ԿԹԲ աճի և սկաբակտերիական ակտիվության Ա) վրա

ազդեցությունը ԿԹԲ կողմից հակաբակտերիական նյութերի սինթեզի վրա գրեթե ուսումնասիրված չէ: Այդ թեմայով միակ աշխատանքում ցույց էր տրվել, որ Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} և Fe^{2+} իոնները ճնշում էին ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունը (Sharafi et al., 2013):

ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվության վրա տարբեր մետաղների իոնների ազդեցությունն ուսումնասիրելու համար դրանց աղերը 0.5-10 մմոլ կոնցենտրացիաներով ավելացվել են ԿԹԲ աճեցման սննդամիջավայրերին: Պարզվել է, որ Ca^{2+} -ը և Co^{2+} -ը խթանում էին երկու հետազոտվող շտամների հակաբակտերիական ակտիվությունը, իսկ Mg^{2+} -ը խթանիչ ազդեցություն էր ցուցաբերում միայն 5.2 շտամի դեպքում: Mn^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} և Zn^{2+} իոններն արգելակիչ ազդեցություն ունեին երկու շտամների հակաբակտերիական ակտիվության վրա, իսկ Ba^{2+} իոնները նկատելի ազդեցություն չէին թողնում:

Պարզվել է, որ Ca (II) իոններն առավելագույն կերպով խթանում էին 2 շտամների հակաբակտերիական ակտիվությունը 5 մՄ կոնցենտրացիայով (Նկ. 3): Պետք է նշել, որ աղիներում կալցիումի մնացորդային պարունակությունը մոտավորապես 5 մՄ է (Barrett et al., 2012), ուստի կարելի է ենթադրել, որ 4.2 և 5.2 շտամները, հայտնվելով աղիներում, կշարունակեն ցուցաբերել բարձր հակաբակտերիական ակտիվություն:

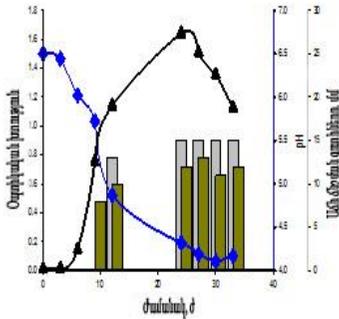
Չետազոտվող 2 շտամների աճման, թթվառաջացման և հակաբակտերիական ակտիվության կինետիկայի ուսումնասիրության արդյունքում պարզվել է, որ 5 մմոլ կալցիումի ավելացումն անդրադառնում էր 2 շտամների կողմից



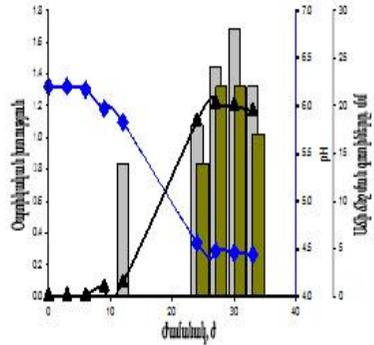
Նկ. 3. Ca (II) իոնների տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը 4.2 և 5.2 շտամների հակաբակտերիական ակտիվության վրա
 ■ *M. luteus* WT, ■ *S. typhimurium* WDCM 1474

կենսազանգվածի սինթեզի վրա (Նկ. 4): Կայցիում չպարունակող միջավայրում 2 շտամներն էլ ավելի լավ էին աճում: *M. luteus*-ի նկատմամբ հակաբակտերիական ակտիվության կինետիկան կայցիումի ավելացման պայմաններում չէր փոխվում, բայց ցուցաբերվող ակտիվությունը նկատելի կերպով խթանվում էր: 2 շտամներն էլ կայցիումի ներկայությամբ աճելիս *S. typhimurium*-ի նկատմամբ հակաբակտերիական ակտիվություն էին ցուցաբերում կուլտիվացման միայն 24-րդ ժամից սկսած, այն դեպքում, երբ կայցիում չպարունակող սննդամիջավայրում 4.2 և 5.2 շտամները սկսում էին ճնշել *S. typhimurium*-ի աճը համապատասխանաբար կուլտիվացման 12-րդ և 9-րդ ժամից սկսած: Սակայն դրսևորվող առավելագույն ակտիվությունը այս դեպքում նույնպես նկատելիորեն բարձր էր կայցիում պարունակող սննդամիջավայրում: Առանց կայցիումի աճելիս հակաբակտերիական ակտիվության ավելի վաղ դրսևորումը կարող է կապված լինել կենսազանգվածի բուռն աճի հետ, որն ուղեկցվում է կաթնաթթվի սինթեզով և միջավայրի pH-ի իջեցմամբ: Նշված երկու գործոններն էլ կարող են հանդիսանալ *S. typhimurium*-ի աճն արգելակող գործոն:

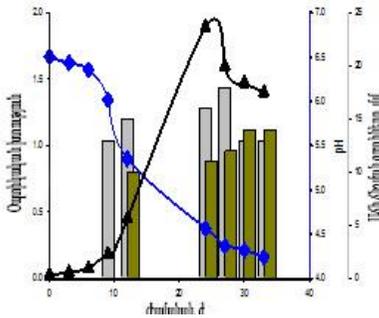
Co (II) իոնների ազդեցության ուսումնասիրման համար օգտագործվել են երկու տարբեր աղեր՝ CoSO_4 և CoCl_2 (Նկ. 5): Դրանք երկուսն էլ խթանում էին ուսումնասիրվող ԿԹԲ շտամների հակաբակտերիական ակտիվությունը: Սակայն պետք է նշել, որ չնայած CoCl_2 -ը ավելի ակտիվորեն էր խթանում 5.2 շտամի ակտիվությունն ընդդեմ *S. typhimurium*-ի, այնուամենայնիվ մնացած բոլոր դեպքերում CoSO_4 -ը ավելի արդյունավետ էր: Հետագա ուսումնասիրությունների ընթացքում պարզվել է, որ Co (II) իոնների օպտիմալ կոնցենտրացիան 1 մմոլ է



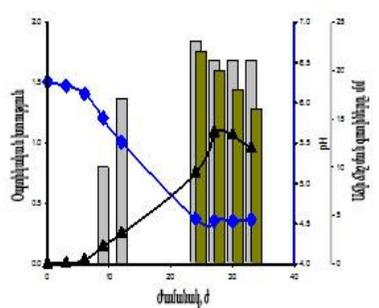
1



2



5.2

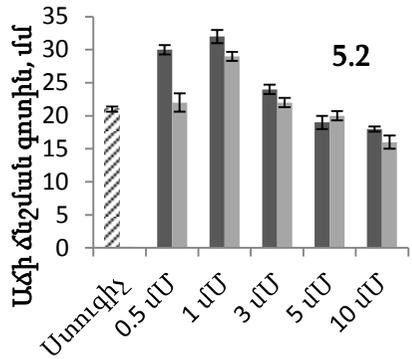
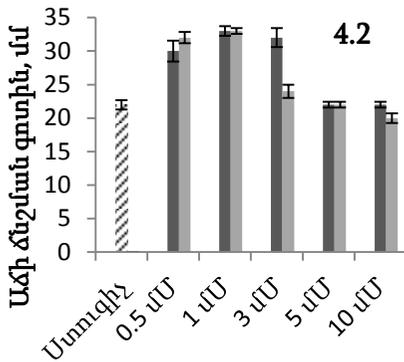


- ▲ Աճ
- ◆ pH-ի անկումը
- ՀԱ *M. luteus* նկատմամբ
- ՀԱ – *S. typhimurium* նկատմամբ

Նկ. 4. 4.2 և 5.2 շտամների աճը և հակաբակտերիական ակտիվությունը (ՀԱ) 5 մՄ Ca^{2+} առկայությամբ (2) և առանց Ca^{2+} (1):

ԿԹԲ ուսումնասիրվող շտամների ինչպես աճման, այնպես էլ հակաբակտերիական ակտիվության դրսևորման համար:

Ca (II) և Co (II) իոնների համատեղ ավելացումը ԿԹԲ աճեցման սննդամիջավայրում որևէ նկատելի ազդեցություն չէր թողնում դրանց հակաբակտերիական ակտիվության վրա: Ամենայն հավանականությամբ, երկու մետաղների իոնների առկայության պայմաններում տեղի է ունենում մրցակցություն դեպի բջիջ ներս տեղափոխվելու համար, կամ իոնների կրկնակի քանակության պայմաններում տեղի է ունենում մետաղների իոնների խելատացում, որը կարող է ազդել դրանց հասանելիության վրա:

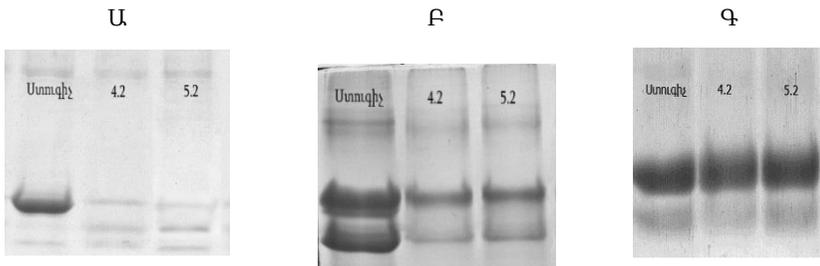


Նկ. 5. 4.2 և 5.2 շտամների աճը և հակաբակտերիական ակտիվությունը *M. luteus* WT նկատմամբ Co (II) տարբեր աղերի առկայությամբ: ■- CoSO₄, ■- CoCl₂

Այսպիսով, առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ Ca (II) և Co (II) իոնները կարող են խթանել ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունը: Այս արդյունքները կարող են կարևոր կիրառական նշանակություն ունենալ:

ԿԹԲ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Բարձր պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ կարող են կարևոր կիրառություն ունենալ հիպոալերգեն սննդամթերքների ստացման, ինչպես նաև սննդամթերքների համի և հոտի ձևավորման համար: ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը, ինչպես և հակաբակտերիական ակտիվությունը, կախված է արտաքին ֆիզիկաքիմիական գործոններից, ինչպես նաև սննդամիջավայրի կազմությունից: Պրոտեոլիտիկ ակտիվության խթանումը և պրոտեոլիզի

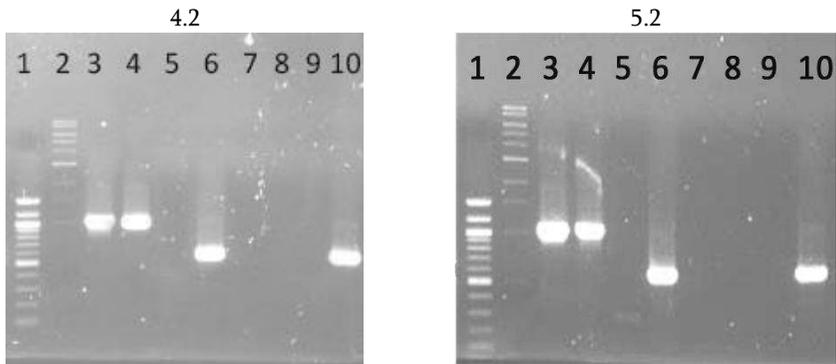


Նկ. 6. 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը Ա՝ β-կազեին, Բ՝ Na-կազեինատ; Գ՝ կաթի շիճուկային սպիտակուցներ; ռեակցիայի տևողությունը՝ 24 ժ:

ռեակցիայի տևողության կրճատումը շատ կարևոր են արտադրական նպատակներով ԿԹԲ օգտագործման համար:

4.2 և 5.2 շտամները դրսևորում էին բարձր պրոտեոլիտիկ ակտիվություն՝ ճեղքելով β-կազեինը և Na-կազեինատը (Նկ. 6): Այնուամենայնիվ, հետազոտվող 2 շտամներն ունակ չէին հիդրոլիզելու կաթի շիճուկային սպիտակուցները (Նկ. 6):

ԿԹԲ երկու շտամների մոտ պրոտեինազների գեների հայտնաբերման նպատակով օգտագործվել է ՊՇՌ՝ թաղանթային պրոտեինազների տարբեր տեսակների համար առանձնահատուկ վիրայմերներով: Հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ ուսումնասիրվող երկու շտամների մոտ առկա են PrtB տեսակի պրոտեինազներ (Նկ. 7):

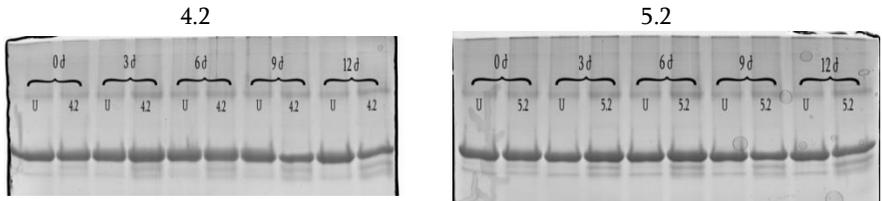


Նկ. 7. 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեինազների գեների հայտնաբերումը

1 – 1կբ նշիչ, 2 – 100 նգ նշիչ, 3 – Ստուգիչ PrtH, 4 – Ստուգիչ PrtR, 5 – Ստուգիչ PrtP, 6 – Ստուգիչ PrtB, 7 – PrtH, 8 – PrtR, 9 – PrtP, 10 – PrtB:

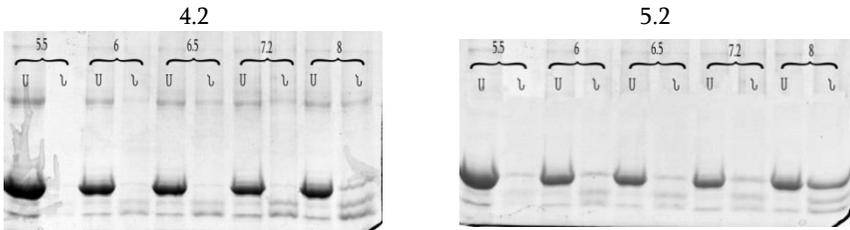
PrtB պրոտեինազներն առաջին անգամ հայտնաբերվել և ուսումնասիրվել են *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ի մոտ (Gilbert et al., 1996): Այդ գենը հայտնաբերվում է *L. delbrueckii* մյուս ենթատեսակների մոտ, սակայն դրա ակտիվությունը տարբեր կերպ է կարգավորվում: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ի մոտ այն միշտ գործում է, իսկ *L. delbrueckii* subsp. *lactis*-ի մոտ իսիստ ճնշվում է աճեցման սննդամիջավայրում պեպտիդների առկայության դեպքում (Gilbert et al., 1997; Germond et al., 2003):

Ուսումնասիրվել է ԿԹԲ 2 շտամների կողմից β-կազեինի հիդրոլիզի կինետիկան: Պարզվել է, որ 2 շտամների մոտ էլ սպիտակուցների հիդրոլիզը սկսվում է ինկուբացման 9-րդ ժամից (Նկ. 8): Ընդ որում, սպիտակուցներն ամբողջությամբ հիդրոլիզվում էին միայն 24 – ժամյա ինկուբացիայից հետո:



Նկ. 8. 4.2 և 5.2 շտամների կողմից β -կազեինի հիդրոլիզի կինետիկան; U-ստուգիչ

Պարզվել է, որ երկու հետազոտվող շտամներն ունակ էին հիդրոլիզել ինչպես β -կազեինը, այնպես էլ Na-ի կազեինատը pH-ի 5.5-8 արժեքներում: Ավելի ցածր pH արժեքներում պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը չի ուսումնասիրվել, քանի որ կազեինները գրեթե անլուծելի են 5.5-ից ցածր pH-ում (Strange et al., 1994): Երկու շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվությունն առավելագույնն էր pH-ի 5.5 արժեքի դեպքում (Նկ. 9): 4.2 շտամն ակտիվ էր անգամ pH 8-ում, սակայն համեմատաբար ավելի ցածր ակտիվությամբ, այն դեպքում, երբ 5.2 շտամի ակտիվությունը կրճատվում էր մոտ 50%-ով:



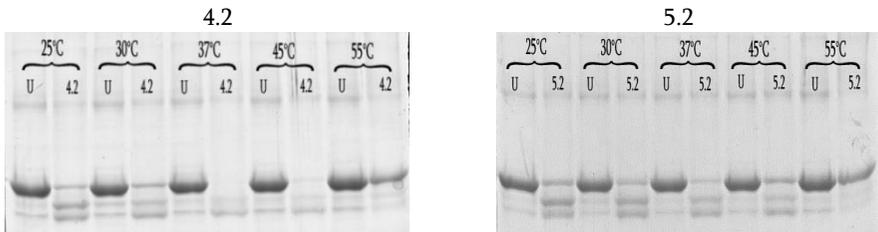
Նկ. 9. pH-ի ազդեցությունը 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա; U-ստուգիչ, Ն-նմուշ:

Լակտոբացիլների պրոտեոլիտիկ ակտիվության pH-կախվածության վերաբերյալ գրականությունում կան տարբեր տվյալներ: Այսպես օրինակ, ցույց է տրվել, որ *L. delbrueckii* subsp. *lactis*-ը և *Lactobacillus helveticus*-ը ցուցաբերում էին առավելագույն պրոտեոլիտիկ ակտիվություն pH 6-ում (Tsakalidou et al., 1999; Scolari et al., 2006): *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ի և *L. salivarius*-ի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունն առավելագույնն է 6.6 pH-ում (Bazukyan et al, 2010): *L. paracasei*-ի առավելագույն պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը դրսևորվել է 6.6-7 pH-ում (Hadji Sfaxi et al., 2012):

Այսպիսով, լակտոբացիլների առավելագույն պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը սովորաբար գրանցվում է համեմատաբար բարձր pH-ի արժեքներում, այն

դեպքում, երբ մեր շտամների մոտ ակտիվությունն առավելագույնն էր թույլ թթվային pH-ում: Նման լայն տիրույթի պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ շտամներ, որոնց առավելագույն ակտիվությունը դրսևորվում է նման ցածր pH-ի պայմաններում, նկարագրված չեն: Թթվային պայմաններում ակտիվության պահպանումը նշանակում է, որ կաթնամթերքների արտադրության ժամանակ միջավայրի pH-ի անկումը էլ ավելի կխթանի ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը: Այս տեսանկյունից, 4.2 և 5.2 շտամները նոր են և կարող են օգտագործվել կաթնամթերքների արտադրությունում:

pH-ի լայն տիրույթում ակտիվություն դրսևորելուց բացի, 4.2 և 5.2 շտամները պահպանում են իրենց պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը նաև ջերմաստիճանային լայն սահմաններում: Այնուամենայնիվ, երկու շտամների համար էլ օպտիմալ ջերմաստիճանը 37°C էր, իսկ 55°C ջերմաստիճանում դրանք մասամբ կորցնում էին իրենց ակտիվությունը (Նկ. 10):

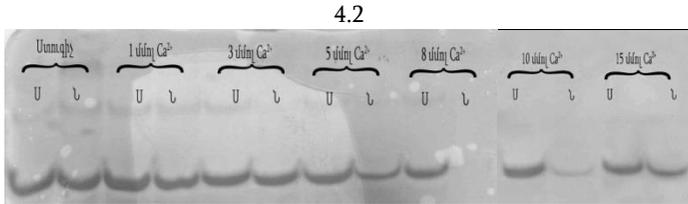


Նկ. 10. 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության կախվածությունը ջերմաստիճանից:

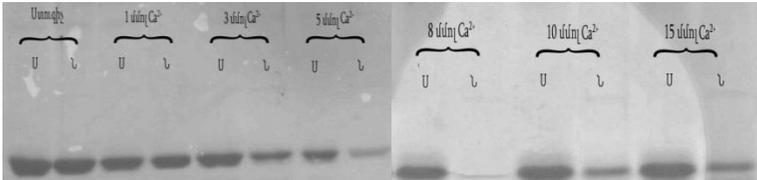
Մետաղների իոնները նույնպես կարևորագույն նշանակություն կարող են ունենալ ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվության համար: Մասնավորապես, կալցիումի և կոբալտի իոնները կարող են խթանել տարբեր ԿԹԲ-երի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը (Gobbetti et al., 1996; Rollán and Font de Valdez, 2001)՝ մեծացնելով սպիտակուցների հիդրոլիզի արդյունավետությունը և կրճատելով պրոտեոլիտիկ ռեակցիայի տևողությունը, ինչը կարող է կարևոր կիրառական նշանակություն ունենալ: Մյուս կողմից, հետաքրքիր էր ուսումնասիրել Ca (II) և Co (II) իոնների ազդեցությունը 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա, քանի որ արդեն ցույց էր տրվել դրանց հակաբակտերիական ակտիվության խթանումը նշված իոններով, և, ինչպես արդեն նշվել է, այս երկու հատկությունների միջև կարող է գոյություն ունենալ նյութափոխանակ կապ:

Չետագուտվել է կալցիումի և կոբալտի իոնների տարբեր (1-15 մոլ) կոնցենտրացիաների ազդեցությունը 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա: Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ երկու մետաղների իոններն էլ խթանում են հետագուտվող շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը:

Ընդ որում, Ca (II) իոնների համար օպտիմալ կոնցենտրացիան 8 մմոլ էր երկու շտամների համար (Նկ. 11):



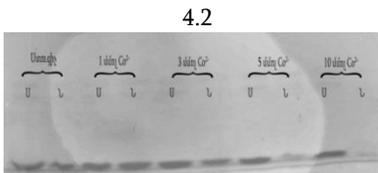
4.2



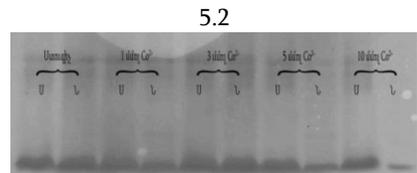
5.2

Նկ. 11. Ca (II) իոնների ազդեցությունը 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա; Ռեակցիայի տևողությունը՝ 9 ժամ; Ս – ստուգիչ, Ն – նմուշ

Կոբալտի իոններն առավելագույնս խթանում էին հետազոտվող շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը, երբ ավելացվում էին բուֆերին 10 մմոլ կոնցենտրացիայիով (Նկ. 12):



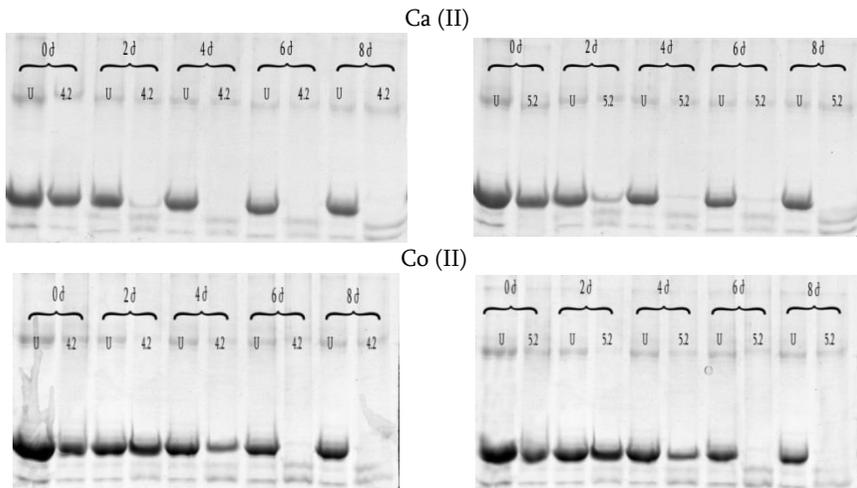
4.2



5.2

Նկ. 12. Co (II) իոնների ազդեցությունը 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա; Ռեակցիայի տևողությունը՝ 9 ժամ; Ս – ստուգիչ, Ն – նմուշ

Բացահայտվել է, որ կալցիումի և կոբալտի իոնների ավելացումը ռեակցիոն խառնուրդում փոխում էր 4.2 և 5.2 շտամների պրոտեոլիզի ռեակցիայի արագությունը: Եթե մետաղներ չչարունակող բուֆերում հետազոտվող երկու շտամները սկսում էին հիդրոլիզել սպիտակուցները ինկուբացիայի 9-րդ ժամից սկսած, ապա 10 մմոլ կոբալտի իոնների ավելացման դեպքում կազմինի հիդրոլիզը սկսվում էր կուլտիվացման արդեն 4-րդ ժամից: Միևնույն ժամանակ, 8 մմոլ կալցիումի իոնների ավելացման դեպքում կազմինը գրեթե ամբողջությամբ հիդրոլիզվում էր ընդամենը 2 ժամում (Նկ. 13):



Սկ. 13. Ca (II) և Co (II) իոնների օպտիմալ կոնցենտրացիաների ազդեցությունը 4.2 և 5.2 շտամների կողմից β-կազեինի հիդրոլիզի կինետիկայի վրա; U-ստուգիչ

Գրականությունում կան մի շարք տվյալներ ինչպես լակտոբացիլների, այնպես էլ այլ ԿԹԲ պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա Ca (II) և Co (II) իոնների խթանիչ ազդեցության վերաբերյալ: Մասնավորապես, Ռոլանը և Ֆոնտ դե Վալդեսը հաղորդում են, որ Ca (II) և Co (II) իոնները խթանիչ ազդեցություն ունեն *Lactobacillus reuteri* CRL 1098-ի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա (Rollan and Font de Valdez, 2001): *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 ակտիվությունն ուժեղացվել էր Ca (II), Mg (II) և հատկապես Co (II) իոններով (Gobbetti et al., 1996): Այնուամենայնիվ, առկա տվյալները գլխավորապես որակական են, իսկ պրոտեոլիտիկ ակտիվության կինետիկայի վրա նշված իոնների ազդեցության վերաբերյալ քանակական տվյալներ գրեթե չկան:

Իրենց օպտիմալ կոնցենտրացիաներով Ca (II) և Co (II) իոնների միաժամանակյա ավելացումը ռեակցիոն բուֆերում որևէ լրացուցիչ ազդեցություն չէր թողնում:

Այսպիսով, 4.2 և 5.2 շտամներն ունեն բարձր պրոտեոլիտիկ ակտիվություն, որը կայուն է ջերմաստիճանի և pH-ի լայն տիրույթում: Այդ ակտիվությունը կարելի է կտրուկ խթանել մետաղների իոնների, հատկապես՝ կալցիումի միջոցով, որի ավելացումը ռեակցիոն բուֆերում բերում է պրոտեոլիզի ռեակցիայի տևողության կտրուկ՝ մինչև 22 ժամով կրճատման: Նման բարձր ակտիվությունը և պրոտեոլիզի ռեակցիայի փոքր տևողությունը այս շտամները հեռանկարային են դարձնում հիպոլաերզեն սննդամթերքներ ստանալու նպատակով օգտագործման համար:

ԵԶՐԱԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Հայաստանի բարձր լեռնային շրջանների կաթնամթերքների նմուշներից մեկուսացվել են բարձր հակամանրէային և պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ երկու շտամներ, որոնք նույնականացվել են որպես *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* և *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*:

2. Հետազոտվող շտամների հակաբակտերիական ակտիվությունը կայուն է pH-ի լայն տիրույթում, ինչպես նաև բարձր ջերմաստիճաններում: Կարգավորվող pH-ի պայմանները նպաստում են ԿԹԲ աճին, իսկ չկարգավորվող pH-ի պայմանները՝ նրանց հակաբակտերիական ակտիվությանը:

3. Ca (II) և Co (II) իոնները խթանում են ուսումնասիրվող շտամների հակաբակտերիական ակտիվությունը: Ca (II) իոնների օպտիմալ կոնցենտրացիան 5 մմոլ է, Co (II) իոնների օպտիմալ կոնցենտրացիան՝ 1 մմոլ:

4. Ուսումնասիրվող շտամներն ունեն *PrtB* տիպի պրոտեինազներ և ցուցաբերում են բարձր պրոտեոլիտիկ ակտիվություն pH-ի և ջերմաստիճանի լայն տիրույթներում: Առավելագույն պրոտեոլիտիկ ակտիվություն երկու շտամները դրսևորում էին թթվային՝ 5.5 pH-ում:

5. Ca (II) և Co (II) իոնները խթանում են հետազոտվող շտամների կողմից β -կազեինի հիդրոլիզը՝ համապատասխանաբար 8 մմոլ և 10 մմոլ օպտիմալ կոնցենտրացիաներով: Կալցիումի իոնների ավելացման դեպքում սպիտակուցների հիդրոլիզի տևողությունը կտրուկ (մինչև 22 ժամ) կրճատվում է:

6. Ca (II) և Co (II) իոնների համատեղ ավելացման դեպքում դրանք որևէ ազդեցություն չեն թողնում ԿԹԲ ոչ հակաբակտերիական, ոչ պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա:

ԱՏԵՆԱՆՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՒՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

1. **Керян А. Г.**, Базукян И. Л., Попов Ю. Г., Трчунян А. А. (2014) Влияние Ca^{2+} и Co^{2+} на антибактериальную активность молочнокислых бактерий, Сборник тезисов “Биология наука XXI века” 18 международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, Россия, с. 23-24.
2. **Keryan A.** (2014) Distinguishing effects of different carbon and nitrogen sources on growth properties and antibacterial activity of two lactobacilli strains isolated from matsoun, *Agroscience*, Vol. 3-4, Yerevan, Armenia, pp. 188-192.
3. **Keryan A.**, Simonyan Y., Bazukyan I., Trchounian A. (2014) Inhibition of growth and antimicrobial activity of new lactobacilli strains isolated from Armenian dairy product matsoun with EDTA in low concentrations: comparative study with Gram-positive and Gram-negative bacteria, *NAS RA Reports*, Vol. 114, Issue 2, Yerevan, Armenia, pp. 149-155.

4. Keryan A., Bazukyan I., Popov Y., Trchounian A. (2014) Phenotypic characteristics of the new lactobacilli strain isolated from matsoun, the Armenian traditional sour-milk product, *Scientific medical journal*, Vol. 9, Issue 1, Yerevan, Armenia, pp. 18-23.

КЕРЯН АНДРАНИК ГЕГАМОВИЧ

Идентификация, изучение антибактериальной и протеолитической активности молочнокислых бактерий, изолированных из традиционных молочных продуктов высокогорных регионов Армении

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, идентификация, антибактериальная активность, протеолитическая активность, pH, ионы Ca (II), ионы Co (II)

Молочнокислые бактерии, обладающие антибактериальной активностью, могут использоваться для получения новых пробиотиков, а также в пищевой промышленности – как биоконсерванты. Молочнокислые бактерии с протеолитической активностью могут быть применены для получения гипоаллергенных молочных продуктов. Но молочнокислые бактерии, обладающие одновременно антибактериальной и протеолитической активностью, встречаются редко.

Целью данной работы было изолирование из традиционных молочных продуктов высокогорных регионов Армении штаммов молочнокислых бактерий, обладающих одновременно высокой антибактериальной и протеолитической активностью, и исследование влияния различных физикохимических факторов, а также состава среды культивирования на эти активности.

Из высокогорных регионов Армении были собраны образцы традиционных молочных продуктов, из которых были выделены штаммы, обладающие одновременно антибактериальной и протеолитической активностью. Из изолированных штаммов были выбраны два наиболее активных штамма, которые морфологическими, физиологическими, биохимическими, а также генетическими и филогенетическими методами были идентифицированы как *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Два исследуемых штамма обладали широкой антибактериальной активностью по отношению грам-положительных и грам-отрицательных бактерий. Их антибактериальная активность сохранялась в нейтральных (6.5) и слабо щелочных (8) значениях pH.

Было выявлено, что условия pH имеют важнейшее влияние на биологическую активность исследуемых штаммов. В частности, было показано, что контролируемый pH способствует росту этих штаммов, в то время, как

неконтролируемый pH более благоприятен для проявления антибактериальной активности.

Впервые было показано, что ионы Ca (II) и Co (II) стимулируют антибактериальную активность молочнокислых бактерий в оптимальных концентрациях 5 и 1 ммоль соответственно.

Исследуемые штаммы расщепляли β -казеин и Na-казеинат, но не гидролизировали сывороточные белки. Было выявлено, что оба штамма имеют протеиназы типа PrtV. Протеолитическая активность обеих штаммов устойчива в широких значениях pH и температуры. Оптимальный pH был 5.5. Молочнокислые бактерии, обладающие оптимальной протеолитической активностью в таких низких значениях pH не описаны.

Было показано, что ионы Ca (II) и Co (II) стимулируют протеолитическую активность исследуемых штаммов в оптимальных концентрациях 8 и 10 ммоль соответственно. Они резко снижали длительность протеолиза. В частности, если без добавки ионов металлов гидролиз белков начинался с 9-ого часа инкубации, а весь белок гидролизовался в течении 24 часов, то при добавлении Ca (II) весь белок гидролизовался уже через 2 часа инкубации.

Факт, что исследуемые штаммы одновременно обладают высокой антибактериальной и протеолитической активностью, широкий спектр их активности, а также их стимулирование с помощью pH и ионов металлов, могут иметь важное практическое значение. Эти штаммы перспективны и могут использоваться для получения новых пробиотиков, в пищевой промышленности – как биоконсерванты, а также с целью получения гипоаллергенных молочных продуктов.

KERYAN ANDRANIK G.

Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of mountainous regions of Armenia, and study of their antibacterial and proteolytic activity

SUMMARY

Key words: lactic acid bacteria, identification, antibacterial activity, proteolytic activity, pH, Ca (II) ions, Co (II) ions

Lactic acid bacteria expressing antibacterial activity may be used for development of new probiotics, as well as in food production – as biopreservatives. Lactic acid bacteria with proteolytic activity may be useful for development of hypoallergenic food. However, lactic acid bacteria combining these two activities are not common in nature.

The aim of this work was to isolate lactic acid bacteria strains that combine high antibacterial and proteolytic activities from traditional dairy products of

mountainous regions of Armenia, and to study the effect of external physicochemical factors, as well as medium composition on these activities.

From mountainous regions of Armenia samples of traditional dairy products were collected. These samples were screened for lactic acid bacteria strains possessing both antibacterial and proteolytic activities. From isolated strains two most active ones were chosen. They were identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using morphological, physiological, biochemical, as well as genetic and phylogenetic methods.

Two investigated strains had wide-range antibacterial activity against gram-positive and gram-negative test-strains. This activity was stable at neutral (6.5) and slightly alkaline (8) pH values.

It was demonstrated, that pH conditions have crucial effect on biological activity of tested strains. In particular, it was shown that controlled pH-conditions were optimal for the growth of two strains, while uncontrolled pH-conditions were better for expression of antibacterial activity.

It was shown first time, that Ca (II) and Co (II) ions stimulate the antibacterial activity of lactic acid bacteria with optimal concentrations of 5 and 1 mmol respectively.

Investigated strains were able to hydrolyze β -casein and sodium caseinate, but they were unable to hydrolyze whey proteins. Both strains have PrtB-type proteinases. The proteolytic activity of both strains was stable at wide spectrum of pH and temperature. Moreover, the optimal pH for proteolytic activity was 5.5 for both strains. Lactic acid bacteria strains with optimal proteolytic activity at such a low pH value are not characterized in literature.

Ca (II) and Co (II) ions had stimulatory effect on proteolytic activity of both strains at 8 and 10 mmol optimal concentrations respectively. They greatly reduced the duration of proteolysis. Particularly, if normally the hydrolysis of proteins by two strains started after 9th hour of incubation and the reaction was complete only after 24 hours, in case of addition of Ca (II) all protein was hydrolyzed after only 2 hours of incubation.

The fact that investigated strains possess high antibacterial and proteolytic activity at the same time, the wide spectrum of these activities, as well as their stimulation by pH and metal ions may have important practical application. These strains are promising and may be used for development of new probiotics, in food production – as biopreservatives, or for obtaining hypoallergenic dairy products.