

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Африкан Э.К. Тр. Ин-та микробиол., 3, 154-165, 1954.
2. Глаголсва О.Б., Умаров М.М., Злотников А.К. Микробиология, 63, 2, 221-227, 1994.
3. Красильников Н.О. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М., 1958.
4. Никогосян В.Г. Биолог. журн. Армении, 34, 3, 269-274, 1981.
5. Одум Ю. Основы экологии. М., 1975.
6. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.П. Практикум по микробиологии. М., 1972.
7. Умаров М.М., Шабаетов В.П., Смолин В.Ю., Мамедов Н.М. Почвоведение, 9, 70-75, 1993.
8. Alexander M. In: 5-th Int. Symp. Microb. Ecol., Kyoto, Aug. 27-Sept. 1, 1989, Abstr. 5, J. 16, 1990.
9. Gasikins M.H., Albracht S.L., Hubbel D.H. Ecosyst. and Environ. 12, 2, 98-116, 1985.
10. Krieg N.R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984.
11. Kundy B.C., Gaxur A.C. Plant and Soil, 57, 223-230, 1980.
12. Lethbridge G., Davidson M.S. Soil Biol. and Biochem., 15, 365-374, 1983.
13. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.C. Plant and Soil, 70, 249-255, 1983.
14. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.C. International J. Syst. Bacteriology, 34, 451-456, 1984.
15. Sneath P.H.A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1986.
16. Tilak K., Singh C., Roy N. Soil Biol. and Biochem., 14, 417-418, 1982.

Ստացվել է 10.III.1998

Биолог. журн. Армении, 3 (51), 1998

УДК 579.23+579.22

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
ШТАММА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРОДУКТА “НАРИНՅ՝

Լ.Տ.ՄԱՐԿՕՅԱՆ, Ա.Մ. ԲԱԼԱՅԱՆ, Մ.Ու. ՄԱԼԱՅԱՆ

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Исследовались состав и содержание ряда физиологически активных соединений (лактонокислот, жирных кислот, органических кислот и углеводов) в кисломолочном продукте “НаринՅ” и в клетках штамма *Lactobacillus acidophilus* ИИМНА-9602 (317/402), а также некоторые морфобиохимические особенности последних. Показано, что “НаринՅ” содержит заметные количества указанных соединений, играющих, вероятно, существенную роль в пищевых и лечебных качествах данного продукта.

Ուսումնասիրվել են մի շարք ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացությունների՝ ածխաթթուների, ճարպաթթուների, օրգանական թթուների և ածխաջրատների քանակությունն ու քանակը «ՆարինՅ» մթերքում և *L.acidophilus* ԻՆՄԻԱ-9602 (317/402)

շտամի բջիջներում, ինչպես նաև վերջիններիս որոշ մորֆոլոգիական և բջջաբանական առանձնահատկությունները: Ցույց է տրվել, որ «Նարինե» մթերքում առկա են նշված միացությունների զգալի քանակներ, որոնք, հավանաբար, կարևոր դեր են կատարում նրա սննդարար և բուժիչ հատկություններում:

The composition and content of physiologically active compounds (aminoacids, fatty acids, organic acids and carbohydrates) of the product "Narine" and the strain *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602 (317/402), as well as the several morphological and cytological features of the strain's cells have been studied. It has been shown that "Narine" contains perceptible amounts of mentioned compounds, which have probably essential role in nutritive and medicinal properties of that product.

*Lactobacillus acidophilus* - аминокислоты - жирные кислоты - углеводы - "Наринэ"

Различные кисломолочные продукты - простокваша, кефир, ряженка, йогурт, мацун, ацидофильное молоко и др. - различаются химическим составом, пищевыми и органолептическими качествами, а также специфической микрофлорой. В Институте микробиологии НАН Армении проф. Л.А. Ерзинкяном совместно с сотрудниками были выделены и изучены различные штаммы молочнокислых бактерий. Особый интерес представили культуры *Lactobacillus acidophilus*, в частности штамм ИНМИА-9602 (317/402), с помощью указанной культуры был получен кисломолочный продукт "Наринэ" [1,2]. Многолетние исследования показали, что "Наринэ" является лечебно-диетическим продуктом, обладает высокой эффективностью при лечении кишечных заболеваний, воспалительных процессов и других заболеваний. В настоящее время лечебно-диетический кисломолочный продукт "Наринэ" нашел широкое применение.

В этой работе мы задались целью охарактеризовать культуру *L. acidophilus* и продукт "Наринэ" по аминокислотному составу, содержанию жирных и органических кислот, а также изучить некоторые морфоцитологические свойства этой культуры.

**Материал и методика.** Культура *L. acidophilus* ИНМИА-9602 была получена из лаборатории бродильных микроорганизмов Института микробиологии НАН РА. Она поддерживалась на обезжиренном молоке (обрате). Для исследования морфологических и цитологических особенностей клеток культуру выращивали на следующих средах: обезжиренном молоке (обрате), ферментативном гидролизате молока (панкреатин), синтетической среде MRS и на подтворожной сыворотке. Для получения прозрачной сыворотки ее центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин и стерилизовали. Культуру выращивали при 37-38° в течение 24-48 ч.

Морфологию клеток изучали в живых препаратах методами фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Для флуоресцентно-микроскопических исследований клетки флуорохромировали акридинiovым оранжевым и тетрациклином (раствор в дистиллированной воде 1:10000). Использовали фазово-контрастное устройство КФ-4 и флуоресцентный микроскоп МЛ-2. Кисломолочный продукт "Наринэ" получен согласно разработанной технологии [3].

**Определение состава и количества углеводов** в "Наринэ" проводили после предварительного осаждения белков этанолом (1:5). Осадок удаляли центрифугированием при 10000 г/10 мин и после концентрирования надосадочной жидкости под вакуумом состав углеводов определяли:

- с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках "Силуфоль" в системе растворителей n-бутанол - уксусная кислота - вода (4:3:3). Хроматограммы проявляли анисин-фталатовым реактивом в n-бутаноле;

- на высокоразрешающем хроматографе марки "Optilab 5931" (Швеция). Колонка

Lichrosorb-NH<sub>2</sub> (4.6ммx25см). Скорость потока 1мл/мин, давление 40 атм.

*Определение состава и количества аминокислот* проводили в биомассе и продукте "Наринэ". Биомассу культур (100 мг), выращенную в жидкой среде MRS в течение 24 ч, гидролизовали в 6N HCl при 105°, 24 ч. После удаления HCl под вакуумом осадок растворяли в дозирующем буфере (12 мл), рН 2.2. Анализ аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе марки ААА339 (Чехословакия).

*Анализ аминокислот* продукта "Наринэ" проводили из лиофилизированного препарата аналогично вышеописанному способу. В анализатор вводили 100 мкл раствора.

*Определение состава и количества жирных кислот* проводили в лиофильно высушенных препаратах биомассы и "Наринэ". Жирные кислоты экстрагировали органическими растворителями. После метилирования идентификацию и определение их содержания проводили на хроматографе Chrom-5 (Чехия) с пламенноионизирующим детектором. Хроматографический анализ жирных кислот проводили в изотермическом режиме работы прибора при t=180°, длине колонки 1,2 м. Стационарная фаза - дисперсностью 100-120 меш; газ-носитель - гелий, скорость его - 30 мл/мин [4].

*Определение органических кислот* проводили также в лиофильно высушенном препарате "Наринэ". Органические кислоты экстрагировали из 100 мг препаратов с 10мл воды и далее определяли методом ферментативного анализа. Лактат определяли лактат-дегидрогеназой, яблочную и щавелевую кислоты - с помощью малат дегидрогеназы, пируват-лактатдегидрогеназы в присутствии НАД и НАДН [5].

**Результаты и обсуждение.** Исследования клеток культуры, выращенной на обезжиренном молоке, показали, что образующийся сгусток свернувшегося молока заполняет поле зрения и мешает микроскопированию. Возникла необходимость подбора прозрачной питательной среды. Были испытаны среды MRS, ферментативный (панкреатин) гидролизат молока и отцентрифугированная подтворожная сыворотка. Испытания показали, что на средах MRS культура растет плохо. Удовлетворительные результаты были получены при выращивании культуры на гидролизате молока и подтворожной сыворотке. На этих средах культура росла хорошо, а при исследовании под микроскопом поле зрения было достаточно чистым. Поэтому в работе были использованы последние две среды.

Изучение морфологии клеток двухсуточной культуры *L. acidophilus* ИИМИА-9602, выращенной на гидролизованном молоке или подтворожной сыворотке, методом фазового контраста показало следующее. Культура бактерий представлена палочковидными клетками различной длины - от 2 до 9 мкм и более и толщиной 0.6-0.9 мкм. Клетки одиночные, парные или соединены в короткие цепочки. Встречаются, однако, длинные, нитевидные формы. Палочки прямые, с закрученными концами. Неподвижные, жгутиков не имеют. В условиях фазового контраста темные, хорошо преломляют свет. Какие-либо включения в молодых клетках при наблюдении в фазово-контрастном микроскопе не выявляются. Размножаются путем образования поперечной перегородки и отделения в последующем дочерних клеток (рис. 1-5).

Изучен ядерный аппарат клеток двухсуточной культуры. ДНК выявляли путем прижизненного флуорохромирования раствором акридинового оранжевого (1: 10000) и наблюдали в люминисцентный микроскоп. ДНК образует комплекс с акридиновым оранжевым и люминисцирует ярко-зеленым цветом при освещении лучами синеволетового участка спектра. Установлено, что ДНК у клеток культуры распределена в цитоплазме диффузно. Отдельные

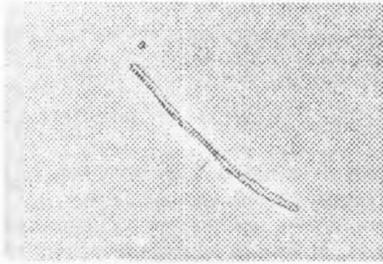


Рис. 1. 2-суточная культура *L. acidophilus* ИИМИА-9602, выращенная на гидролизате молока. Отчетливо видны клеточные перегородки. Фазовый контраст. Объектив 40х, гомаль 5х.

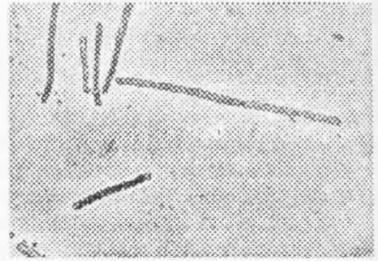


Рис. 2. 2-суточная культура *L. acidophilus* ИИМИА-9602, выращенная на подвароженной сыворотке. Фазовый контраст. Объектив 90х, гомаль 5х.

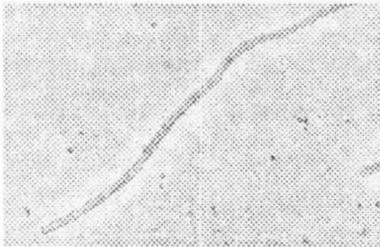


Рис. 3. *L. acidophilus* ИИМИА 9602 6-суточная культура, выращенная на гидролизате молока. Целочка удлиненных клеток. Фазовый контраст. Объектив 90х, гомаль 5х.



Рис. 4. 6-суточная культура *L. acidophilus* штамм ИИМИА-9602, выращенная на подвароженной сыворотке. Длинная, нитевидная форма без перегородок. Фазовый контраст. Объектив 90х, гомаль 5х.

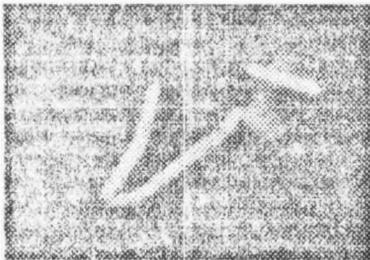


Рис. 5. 6-суточная культура *L. acidophilus* ИИМИА-9602, выращенная на гидролизате молока, флуорохромированная азридиновым оранжевым. Виден люминесцирующий ядерный компонент, равномерно распределенный в цитоплазме клеток. Люминесцентный микроскоп объектив 90х, гомаль 5х.

нуклеотиды не выявлялись. При флуорохромировании раствором тетрациклина и наблюдении в люминесцентном микроскопе в клетках были обнаружены светящиеся, желтые, очень мелкие зерна, расположенные под цитоплазматической мембраной, по-видимому, мезосомы. Вследствие небольших размеров они не выявляются на фотоснимках. При флуорохромировании тетрациклином выявляются также цитоплазматическая мембрана и клеточные перегородки.

Известно, что питательные и лечебные свойства кисломолочных продуктов определяются в основном их химическим составом, в частности, наличием физиологически активных соединений. Исследования показали, что в продукте "Наринэ" основным углеводом является лактоза - 5.5 %. Обнаружены также следы глюкозы.

Анализ состава и количества аминокислот показал, что в биомассе 24-часовой культуры преобладают следующие аминокислоты: аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аланин, глицин, лейцин, а в продукте "Наринэ" - пролин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин, аланин, валин,

лизин (табл. 1).

Таблица 1. Аминокислотный состав гидролизатов биомассы *L. acidophilus* шт. ИПМИА-9602 и продукта "Наринэ"

Аминокислоты	Количество аминокислот, мМ	
	в биомассе (на 100 мг)	в продукте "Наринэ" (на 1 мл)
Аспарагиновая к-та	110.7	610.0
Треонин	55.5	374.0
Серин	43.8	500.0
Глютаминовая к-та	101.1	1604.0
Пролин	29.8	1356
Цистин	не опред.	не опред.
Глицин	66.3	270
Аланин	169.5	424
Валин	57.0	520
Метионин	33.0	68
Изолейцин	39.0	330
Лейцин	63.0	620
Тирозин	36.0	41.0
Фенилаланин	3.6	8.7
Гистидин	22.5	256.0
Лизин	52.2	568.0
Аргинин	25.5	180.0

Результаты анализа жирных кислот показали, что как клетки *L. acidophilus*, так и продукт "Наринэ" достаточно богаты жирными кислотами с числом углеродных атомов 13-18, причем ряд компонентов с одинаковым

Таблица 2. Относительный процентный состав жирных кислот штамма *L. acidophilus* ИПМИА-9602 и продукта "Наринэ"

Номер пика	Жирные кислоты*	Биомасса <i>L. acidophilus</i>	Продукт "Наринэ"
1	C 13 : 0	1.5	следи
2	C 13 : 0	0.7	следи
3	C 13 : 0	0.1	0.1
4	C 14 : 0	3.5	0.2
5	C 14 : 0	0.1	13.5
6	C 14 : 1	следи	1.2
7	C 15 : 0	12.4	0.6
8	C 15 : 0	24.5	0.7
9	C 15 : 1	-	0.1
10	C 15 ; 0	1.3	1.6
11	C 16 ; 0	9.9	0.8
12	C 16 : 1	0.2	2.3
13	C 16 ; 0	22.7	36.2
14	C 17 : 0	5.7	0.8
15	C 17 : 0	7.3	1.2
16	C 17 : 0	1.4	1.2
17	C 18 ; 0	3.1	24.8
18	C 18 : 1	0.4	2.8
19	C 18 : 0	4.8	11.5

Примечание. \*Цифра до двоеточия - число углеродных атомов в молекуле, цифра после двоеточия - количество двойных связей в молекуле кислоты.

числом атомов углерода встречается в трех различных изо-, антезио- и неоформах, а также насыщенными и ненасыщенными связями. Обнаружено, что в биомассе преобладают жирные кислоты а-15:0, н-15:0 и н-16:0, сумма которых составляет 58% от общей суммы, а в продукте "Наринэ" преобладают н-14:0, н-16:0, и-18:0 и н-18:0, сумма которых составляет 83% от их общего количества (табл. 2).

Своеобразная картина наблюдается в составе и количестве органических кислот в продукте "Наринэ". Показано, что общая сумма оксикислот составляет 23 мМ. Концентрация молочной кислоты равна 15 мМ, а яблочной - 0,8 мМ. Пировиноградная, уксусная и щавелевая кислоты не были обнаружены.

Проведенные исследования позволяют пополнить наши представления о биохимической и морфо-цитологической характеристике кисломолочного продукта "Наринэ" и использованного для его изготовления штамма *L. acidophilus*. Наблюдается заметное количество в них ряда физиологически активных соединений, таких как аминокислоты, жирные кислоты и органические кислоты, возможно играющие существенную роль в лечебно-диетических свойствах "Наринэ".

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ерзинкян Л.А. Приготовление и применение лечебного ацидофильного молока "Наринэ". Ереван, 1965.
2. Ерзинкян Л.А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. 234 с., Ереван, 1971.
3. Ерзинкян Л.А., Акопян Л.Г., Чарян Л.М. Способ производства кисломолочного продукта. Патент РФ N2035871, 27.05.95, N15, патент РА, N64.
4. Кейтс М. Техника липодологии. М., 1975.
5. Bergmeyer H.U. Methods of enzyme analysis. 1963.

Поступила 5.III.98