



Биол. журн. Армении, 1-2 (72), 2020

ВИДОВАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ ЗАКВАСОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЛЕЧЕБНО-ДИЕТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА “НАРИНЕ”

Г.Г. ОГАНЕСЯН¹, А.А. БАРСЕГЯН¹, Л.В. ДАНИЕЛЯН¹, М.М. ПАШАЯН²

¹НПЦ “АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ” НАН РА

²Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци
hhov@sci.am

На основании всеобъемлющего анализа морфологических, культурных, физиологических, биохимических и молекулярно-генетических данных исходная культура кисломолочного напитка Нарине *Lactobacillus acidophilus* Ep 317/402 была повторно идентифицирована как *Lactobacillus helveticus* Ep 317/402.

Lactobacillus acidophilus – *Lactobacillus helveticus* – закваска “Нарине” – пробиотик – идентификация

Ձևաբանական, կուլտուրալ, ֆիզիոլոգիական, կենսաքիմիական և մոլեկուլային գենետիկական տվյալների համաապարկված վերլուծության հիման վրա Նարինե կաթնաթթվային ըմպելիքի խմորիչ կուլտուրան վերանույնականացվել է որպես *Lactobacillus helveticus* Ep 317/402:

Lactobacillus acidophilus – *Lactobacillus helveticus* – «Նարինե»-ի խմորիչ – պրոբիոտիկ – նույնականացում

Based on a detailed analysis of morphological, cultural, physiological, biochemical, and molecular genetic data, the starter culture of the sour milk beverage Narine based on a comprehensive analysis of morphological, cultural, physiological, biochemical and molecular genetic data, the starter of the sour milk beverage Narine *Lactobacillus acidophilus* Ep 317/402 was re-identified as *Lactobacillus helveticus* Ep 317/402.

Lactobacillus acidophilus – *Lactobacillus helveticus* – starter of “Narine” – probiotic – identification

Молочнокислые бактерии (МКБ) представляют группу бактерий, функционально связанных по способности производить молочную кислоту в результате гомо- или гетероферментативного метаболизма. Промышленное применение основано на шести ключевых видах МКБ; *Lactococcus* (молоко), *Lactobacillus* (молоко, мясо, овощи, зерновые), *Leuconostoc* (овощи, молоко), *Pediococcus* (овощи, мясо), *Oenococcus oeni* (вино) и *Streptococcus thermophilus* (молоко). Другие члены LAB, особенно лактобациллы, занимают важные ниши в желудочно-кишечном тракте людей и животных и обладают рядом пробиотических преимуществ, полезных для здоровья и самочувствия. Эти преимущества включают в себя положительное влияние на нормальную микрофлору, конкурентное исключение патогенов и стимуляцию / модуляцию иммунитета [17].

Концепция пробиотических или функциональных молочных пищевых продуктов была развита около 100 лет назад нобелевским лауреатом Ильей Мечниковым, приписавшим долголетие болгарских горцев к их регулярному потреблению кисломолочных продуктов, таких как йогурт. Он обосновал возможную ценность сквашенного молока как диетического продукта и рекомендовал к употреблению молоко, ферментированное *L. bulgaricus*, которое по настоящее время широко используется во многих странах [15]. В 1900 году Эрнст Моро, немецкий исследователь, обнаружил грамположительную палочку, которая, как считалось, является преобладающим видом в кишечном тракте новорожденных детей [16]. В течение следующих нескольких лет его работа была подтверждена и описанная им бактерия получила название *Lactobacillus acidophilus*. В 1911 году Ротч и Кендалл, а в 1915 году Реттгер с коллегами предложили идею и представили доказательства того, что этот организм может быть успешно использован вместо *L. bulgaricus* [18, 20]. Начиная с тридцатых годов, в США *L. acidophilus* используется в производстве ферментированного и сладкого ацидофильного молока. В связи с тем, что *L. acidophilus* из-за отсутствия в его геноме генов внеклеточных протеиназ не способен расти в цельном молоке, для получения ферментированного ацидофильного молока оно предварительно подвергается ультрапастеризации при 131°C для высвобождения аминокислот из молочных белков [12]. После суточной ферментации ультрапастеризованное молоко образует гелеобразную текстуру с длительным сроком хранения. Сладкое ацидофильное молоко готовится простым внесением биомассы *L. acidophilus* (около 10^6 КОЕ/мл) в пастеризованное молоко, которое можно хранить одну неделю, даже при комнатной температуре, без особых изменений характерных свойств [12]. Ацидофильное молоко категорически запрещалось давать детям грудного возраста. В середине прошлого века в Японии и в Финляндии было налажено производство тягучих кисломолочных напитков (КМН) под торговыми названиями Calpis (Calpis Food Industry Co. Ltd., Токио, Япония) и Evolus (Valio Ltd., Valio, Финляндия), сквашенные молочнокислой бактерией вида *L. helveticus* [21]. В Армении профессором Левонем Ерзинкяном в 1964 году был запатентован аналогичный продукт под названием Нарине, предназначенный для лечения разного рода кишечных расстройств и искусственного кормления или прикармливания детей грудного возраста [1]. Заквасочная культура, штамм Ер 317/402 Нарине, автором был отнесен к виду *L. acidophilus*, несмотря на отличие по более чем 13-ти морфологическим, биохимическим и культуральным свойствам от типовых штаммов *L. acidophilus* [3, 5, 19] и эффективному сквашиванию молока за менее чем 5 часов, [1]. Более того, ученым из Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии не удалось серологически дифференцировать Ер-1 и Ер-2 штаммы от *Lactobacillus helveticus* [1, 2].

Цель данной работы на основании анализа новых морфологических, культурных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических данных идентифицировать видовую принадлежность заквасочной культуры КМН Нарине.

Материалы и методы. Штамм *L. Acidophilus* MDC-9602 (Ер 317/402) и *L. acidophilus* MDC 9626 получили из РЦДМ, НППЦ “Армбиотехнология” НАН РА. В качестве питательных сред использовали обезжиренное молоко, гидролизованное молоко, MRS и LAPTg [10]. При необходимости среды уплотняли добавлением 1.5% агара. Для определения карболитической активности культур использовали агаризованные среды LAPT без глюкозы, содержащие соответствующие углеводы в качестве основного источника углерода, на поверхность которой спот тестом наносили суточные бульонные культуры МКБ, разбавленные в 10^5 раз. Для определения протеолитической активности МКБ суточные культуры осаждали центрифугированием, надосадок переливали в стерильную пробирку, бумажные диски погружали в надосадочную жидкость и помещали на агаризованную среду с молоком.

Чувствительность лактобактерий к желчи определяли добавлением 0,3 %, и 0,6 % (масс/объем) к суточным бульонным культурам МКБ, разбавленным в 10^5 раз, инкубировали при 37°C и периодически определяли оптическую плотность. Морфологию клеток изучали в световом микроскопе МБИ-11 с фазовым контрастом, при увеличении в 1200 раз. Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных штаммов была проведена в лаборатории биологически активных наноструктур НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва.

Все эксперименты проводили в 3-5 повторях. Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием компьютерного теста Стьюдента, принимая критерий $p < 0.05$ достаточным для оценки достоверной разницы в результатах.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены результаты исследования по ПЦР амплификации и секвениации фрагментов генов 16S РНК (с 1 по 1359 пн) и *rpoA* α -субъединицы РНК полимеразы (1-780 пн) штамма Ер.317/402 в сравнении с имеющимися в базе BLAST данными последовательностей аналогичных генов эталонных штаммов *L. helveticus* ATCC 15009 и *L. acidophilus* ATCC 700396(NCFM).

Как видно из табл. 1, по нуклеотидным последовательностям изученных генов ЗК Нарине имеет почти 100 %-ное сходство с *L. helveticus*. Последовательности фрагментов генов 16S рРНК и *rpoA* депонированы в NCBI GenBank под номерами HQ379170 и HQ379179, под авторством М.М. Pashayan и Н.Г. Hovhannisyanyan (2010).

Таблица 1. Сходство заквасочной культуры Нарине с типовыми *L. acidophilus* NCFM и *L. helveticus* ATCC 15009 по результатам секвениации фрагментов генов 16S рРНК и *rpoA*

Типовые штаммы	Ген 16S рРНК 1-1359 пн	Сходство, %	<i>rpoA</i> Аген 1-780 пн	Сходство, %
<i>L. helveticus</i>	1 замена	99,99	Нетзамен	100
<i>L. acidophilus</i>	23 замены	98,3	37 замен	95

пн – пар нуклеотидов

Выделенные Ерзинкяном штаммы Ер-1 (Ер 317/402) и Ер-2 также были посланы в Институт микробиологии Миланского католического университета (Италия) с целью таксономической идентификации генов 16S РНК. Проведенные исследования фрагментов (с 41 по 1083 пн) гена 16S рРНК подтвердили 100 %-ную идентичность обоих штаммов с типовым штаммом *L. helveticus* ATCC 15009 [4]. В работе Ботиной с соавторами также приведены данные, подтверждающие принадлежность ЗК Нарине к виду *L. helveticus* [6].

В табл. 2 представлены основные общие и отличительные черты заквасочной культуры Нарине с известными штаммами *L. acidophilus* и *L. helveticus*.

Несмотря на то что основной нишей обитания *L. acidophilus* является ЖКТ человека и животных, а для *L. helveticus* – молоко, анализ полных нуклеотидных последовательностей геномов выявил их тесную филогенетическую близость [7], что нередко являлась причиной ошибочной идентификации *L. helveticus* как *L. acidophilus* [23, 25]. Это говорит о том, что разница между молочными и кишечными МКБ штаммами детерминруется относительно небольшим, но высокоспецифичным набором генов [7]. Кроме того, сравнительная геномика ЖКТ-ассоциированных видов *L. acidophilus*, *L. gasseri* и *L. johnsonii* с молочными видами *L. bulgaricus* и *L. helveticus* позволила выявить ключевые наборы генов, детерминирующих адаптацию к определенной нише [7, 14, 17]. Так, имеющийся у *L. acidophilus* ген гидролазы желчной соли (*bsh*), необходимый для выживания в желудочно-кишечном тракте, у *L. helveticus*, не функционирует из-за мутации по сдвигу рамки считывания. Но с другой стороны, ЗК Нарине более устойчив к кислотному стрессу по сравнению с *L. Acidophilus* и *L. helveticus* ATCC 15009.

Таблица 2. Морфологическая, физиолого-биохимическая и культуральная характеристика заквасочной культуры Нарине, *L.acidophilus* и *L. helveticus*

Признаки	ЗК Нарине	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.helveticus</i> ATCC 15009
Основная ниша обитания	молоко	ЖКТ	молоко
Ферментация молока	+++	±	++
Ферментация гексоз и МК	Гф, D-,L-	Гф, D-,L-	Гф, D-,L-
Вязкость сгустка	+++	±	+
Предельная кислотность, °Т	350	65	250
Экзопротеазная активность	++++	-	++
Размер клеток	10-12 мк	4-6 мк	10-12 мк
Морфология колоний	нс, нт, 1-2мм	нс, нт, 1-2мм	нс, нт, 1-2мм
Ауксотрофность	14 ак	14 ак	14 ак
АКФ-ингибиторы	+++	-	±
Адгезия на растворителях	-	+++	-
Гидролиз желчных солей	-	++	-
Устойчивость к NaCl, %	2 - 4	4 - 6	2 - 4
Продукция H ₂ O ₂	-	++	-

(+) – активность или усвоение, ак – аминокислота, нс – не слизистая, нт – не тягучая, ЖКТ – желудочно-кишечный тракт, Гф – гомоферментативный, D-,L – изомеры МК – молочной кислоты, АКФ – Ангиотензин-конвертирующий фермент

Ферментация молока является основной отличительной чертой между *L. acidophilus* и *L.helveticus*. Как видно из табл. 2, ЗК Нарине по этому признаку превосходит не только *L. acidophilus*, но и другие штаммы *L.helveticus*. В молоке уровень свободных аминокислот и пептидов крайне низка, поэтому для роста МКБ должны обладать высокой протеолитической активностью, чтобы высвободить достаточное количество пептидов и аминокислот. Структурные компоненты протеолитической системы, в зависимости от их функции, можно разделить на 3 основные группы: 1 – протеиназы, которые расщепляют казеины до пептидов, 2 – транспортные системы, которые переносят пептиды через цитоплазматическую мембрану и 3 – пептидазы, которые разлагают пептиды [13].

Среди МКБ *L. helveticus* отличается быстрым ростом в молоке, благодаря высокой протеолитической активности и устойчивости к кислотному стрессу [27]. Предельная кислотность “Нарине” может достигать до 350 единиц по Тернеру, тогда как кислотность ферментированного *L. acidophilus* в ультрапастеризованном молоке достигает всего 65°Т (табл. 1). Большинство МКБ обладают только одним типом внеклеточной протеиназы (ВКП), тогда как у *L. helveticus*, в зависимости от штамма, идентифицированы до четырех генов: *prtH1*, *prtH2*, *prtH3* и *prtH4* [13]. *L. helveticus*, благодаря высокоэффективной протеолитической системе, состоящей из уникального набора пептидаз и протеиназ, способен гидролизовать молочные белки на дискретные биоактивные пептиды, а именно трипептиды Ile-Pro-Pro (IPP) и Val-Pro-Pro (VPP), подавляющие действие фермента АПФ, активатора ангиотензина, ответственного за повышение артериального давления. Полезность для здоровья (функциональность) ферментированных *L. helveticus* КМН Calpis и Evolus обусловлена наличием в них IPP и VPP [8]. Однако не все штаммы *L. helveticus* способны продуцировать АКФ ингибирующие олигопептиды при ферментации молока [9, 22] Важно отметить, что штаммы, продуцирующие АКФ ингибирующие олигопептиды, при ферментации молока образуют тягучий сгусток, схожий с Нарине.

Бактерии подвергаются множеству стрессов в кишечном тракте, в том числе вызванных наличием желчи. В связи с этим, устойчивость к желчной соли считается важным аспектом выживания для бактерий, населяющих кишечный тракт. *L. acidophilus*, в отличие от изученных штаммов *L. helveticus*, обладает устойчивостью к желчной соли, благодаря функциональному гену гидролазы желчной соли (*bsh*), необходимого для выживания в кишечнике [11]. У *L. helveticus* тоже присутствует ген *bsh*, но из-за мутации сдвига рамки считывания он нефункционален. В связи с этим, а также из-за низкой адгезивной способности на эпителиальных клетках *L. helveticus* не может выжить и колонизировать кишечный тракт. В табл.3 представлены данные по метаболизму углеводов, характерных для МКБ.

Таблица 3. Усвоения углеводов ЗК Нарине, *L.acidophilus* и *L. helveticus*

Углеводы	ЗК Нарине	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.helveticus</i>
Лактоза	+	+	+
Мальтоза	-	+	-
Сахароза	-	+	-
Целобиоза	-	+	-
Салицин	-	+	-

Известно, что метаболизм сахаров является основным критерием видовой принадлежности МКБ [5]. Сравнительное изучение метаболизма сахаров выявило резкое отличие *L. acidophilus* от *L. helveticus* ATCC 15009 и Ер 317/402. Мальтоза является наименее распространенным дисахаридом в окружающей среде и обычно присутствует только в кишечнике, где есть продукты распада крахмала. Адаптация к кишечной нише сильно зависит от числа активных генов гликозидазы, ответственной за утилизацию мальтозы. Анализ всех секвенированных геномов МКБ показал, что гены Мальтоза-6-фосфатгликозидазы присутствуют преимущественно у комменсальных кишечных микроорганизмов у видов *L. acidophilus*, *L. jhonsoni*, *L. casei*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* и *Streptococcus suis*[17].

По совокупности представленных данных (табл. 1,2 и 3) ЗК Нарине принадлежит к виду *L. helveticus*. Но в тоже время, по данным ДНК-ДНК-гибридизации, биохимическим особенностям и примерно 98 %-ным совпадением последовательностей нуклеотидов генов 16S рРНК, имеет самое тесное сходство с *L. acidophilus* [5, 21]. Хотя *L. helveticus* не является кишечным микробом, имеются множество литературных данных, указывающих на его положительное влияние на физиологию хозяина и предотвращение или лечение патологических явлений ЖКТ [24]. Показано, что *L. helveticus* обладает пробиотическими свойствами, не отличающимися от таковых известных пробиотических микроорганизмов как *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и др., а по таким свойствам, как производство ингибирующих АПФ пептидов или деградация аллергенов являются уникальными среди МКБ [24]. В проявлении пробиотического эффекта *L. helveticus* участвуют не только бактерии, но и биологические метаболиты, образующиеся во время брожения молока [26]. При длительном приеме во внутрь *L. helveticus*, благодаря высокой протеолитической активности, может стимулировать рост комменсальных бифидо- и лактобактерий. Именно благодаря глубокому гидролизу молочных белков КМН, Нарине легко усваивается детьми грудного возраста. *L. helveticus* лучше адаптирован к условиям промышленной ферментации, чем большинство кишечных пробиотических лактобацилл и бифидобактерий. Благодаря своей способности выживать при различных стрессах, таких как высокие температуры, низкий pH, осмотическое давление и кислород, его легко включить в различные пробиотические и симбиотические лекарственные формулы [21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерзинкян Л.А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Изд. АН Арм. ССР. Ереван. с. 88-89, 1971.
2. Квасникова Е.И., Нестеренко О.А., Подгоеский В.С., Мельниченко Л.А. Серологическая идентификация молочнокислых бактерий. Микробиология. 36, 673-702. 1967.
3. Красильников Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов. М., Изд-во АН СССР. 838, с. 1949.
4. Afrikian E. Studies of lactic-acid bacteria in Armenia with emphasis on radioprotective properties. The Environmentalist., 32, Iss. 2, 256-268, 2012.
5. Bergey's manual of systematic bacteriology. The Ludwig W., Schleifer K., Whitman W.B. Baltimore, Md. Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York, 3. 464-513. 2009.
6. Botina, S.G., Klimina, K.M., Koroban, N.V., Amerkhanov A.M., Zinchenko V.V., Danilenko V.N. Reclassification of Russian probiotic bacterial cultures of the genus *Lactobacillus*, Russ. J. Genet., 46, 11, 1485-1492. 2010.
7. Callanan M., Kaleta P., O'Callaghan J., O'Sullivan O., Jordan K., McAuliffe O., Sangrador-Vegas A., Slattery L., Fitzgerald G.F., Beresford T., Ross R.P. Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. J. Bacteriol., 190, 2, 727-735, 2008.
8. Fitzgerald R.J., Murray B.A. Bioactive peptides and lactic fermentations. Int. J. Dairy Technol., 59, Issue 2, 118-125. 2006.
9. Giraffa, G., M. Gatti, L. Rossetti, L. Senini, and E. Neviani. Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* revealed by genotypic characterization. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4, 1259-1265, 2000.
10. Hovhannisyan H.G., Barseghyan A.A., Grigoryan N.G., Topchyan A.V. Genetic improvement of technological characteristics of starters for fermented milk products. Applied Biochemistry and Microbiology, 46, 4, 395-399, 2010.
11. Klaenhammer T.R., Kleeman E.G. Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 41, 6, 1461-1467, 1981.
12. Kongo J.M., Malcata F.X. *Acidophilus* Milk. In: The Encyclopedia of Food and Health, 1, 6-14, 2016.
13. Kunji E.R., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 70, 2-4. 187-221, 2004.
14. Makarova K.S., Koonin E.V. Evolutionary genomics of Lactic Acid Bacteria. J. Bacteriol. 189, 4. 1199-1208, 2007.
15. Metchnikoff E. The prolongation of life. Optimistic studies. 1st ed. Putmans Sons, New York, NY, p. 176. 1908.
16. Moro E. Ueber den *B. acidophilus* in N. Sp., Jahrb. f. Kinderh., 52, 38-55, 1900.
17. O'Sullivan O., O'Callaghan J., Sangrador-Vegas A., McAuliffe O., Slattery L., Kaleta P., Callanan M., Fitzgerald G., Ross P., Beresford T. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. BMC Microbiol., 9, 50. 1-9, 2009.
18. Rettger L.F., Cheplin H.A. Therapeutic application of *Bacillus acidophilus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 19, 72-76, 1921.
19. Roques M., Sharpe M.E. An approach to the classification of the Lactobacilli. J. Appl. Bact. 22, 329-340, 1959.
20. Rotch T.M., Kendall, A.J. A Preparatory study of the *Bacillus acidophilus* in regard to its possible therapeutic use. Am. J. Dis. Child., 2, 30-38, 1911.
21. Slattery L., O'Callaghan J., Fitzgerald G.F., Beresford T., Ross R.P. *Lactobacillus helveticus*—A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. J. Dairy Sci., 93, 10, 4435-4454, 2010.
22. Seppo L., Jauhainen T., Poussa T., Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. Am. J. Clin. Nutr., 77, Issue 2. 326-330, 2003.

23. Strahinic I., Lozo J., Terzic-Vidojevic A., Fira D., Kojic M., Golic N., Begovic J., Topisirovic L. Technological and probiotic potential of BGRA43 a natural isolate of *Lactobacillus helveticus*. Front. Microbiol., 4, Article 2, 1-5, 2013.
24. Taverniti V., Guglielmetti S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. Frontiers in Microbiology, 3, 392. 1-13, 2012.
25. Tompkins T.A., Barreau G., Broadbent J.R. Complete genome sequence of *Lactobacillus helveticus* R0052, a commercial probiotic strain. J. Bacteriol., 194, 22, 6349, 2012.
26. Vinderola G., Binetti A., Burns P., Reinheimer J. Cell Viability and Functionality of Probiotic Bacteria in Dairy Products. Front. Microbiol., 2, Article 70, 1-6, 2011.
27. Yamamoto N., Akino A., Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Dairy Sci., 77, 4, 917-922, 1994.

Поступила 06.02.2020