

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ԻՍՐԱՅԵԼՅԱՆ ԱՐԵՎԻԿ ԼԵՎՈՆԻ

**ԱՐՑԱԽԻ ՏԱՐԲԵՐ ԸՆՏԱՆԻ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ԿԱԹԻՑ
ԱՆՋԱՏՎԱԾ ԿԱԹՆԱԹՎԱՅԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ
ՄԵՏԱԲԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

**Գ.00.07- «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսությամբ**

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

ԵՐԵՎԱՆ-2018

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» ГНКО НАН РА

ИСРАЕЛЯН АРЕВИК ЛЕВОНОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ МЕТАБИОТИКОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА РАЗНЫХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ АРЦАХА**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 03.00.07 - «Микробиология. биотехнология»

ЕРЕВАН-2018

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝

կ.գ.թ. Ֆ.Ն. Տխրունի

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան

կ.գ.թ. Ի.Լ. Բազուկյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Հայաստանի ազգային ագրարային
համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2018թ.-ի նոյեմբերի 23-ին ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցեն՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց 14, հեռ. / ֆաքս՝ (37410) 654180:
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2018թ. հոկտեմբերի 19-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար

կենսաբանական գիտությունների թեկնածու

Գ.Ե.Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в НПЦ «Армбиотехнология». НАН РА.

Научный руководитель:

к.б.н. Ф. Н. Тхруни

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор Г. Г. Оганесян

к.б.н. И. Л. Базукян

Ведущая организация: Национальный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 23 ноября 2018 г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел / факс (37410) 654180.

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

Автореферат разослан 19 октября 2018 г.

Ученый секретарь специализированного совета

кандидат биологических наук

Г.Е. Аветисова

Արդիականությունը:

Վերջին տասնամյակում հակաբիոտիկների լայնածավալ օգտագործումը հանգեցրել է նոր ալերգիկ հիվանդությունների ի հայտ գալուն, ինչպես նաև հակաբիոտիկակայուն մանրէների տարածմանը [Goossens. 2003; Bodera. 2009]: Այսօր մի շարք գիտնականների ուշադրության կենտրոնում է՝ գտնել նոր կենսաբանական միացություններ. որոնք կարող են փոխարինել հակաբիոտիկներին: Այդ տեսանկյունից մեծ նշանակություն է տրվում կաթնաթթվային բակտերիաներին (ԿԹԲ), որոնք իրենց աճման ընթացքում սինթեզում են տարբեր հակամանրէային նյութեր, այդ թվում բակտերիոցիններ [Stern et al., 2008; Melik-Andreasyan et al., 2013]: Ելնելով դրանից, մեծ ուշադրություն է դարձվում տարբեր երկրներում ԿԹԲ-ների հատկությունների (հակամանրէային, հակաօքսիդանտային, ադիեզիվ և պրոբիոտիկ) ուսումնասիրմանը՝ նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերքի պատրաստման նպատակով: Զուգահեռ հետազոտվում են պրոբիոտիկ մանրէների նյութափոխանակության արգասիքները՝ մետաբիոտիկները, որոնք կարող են օգտագործվել որպես հավելում՝ անանաբուժության և սննդի կենսապահածոյացման մեջ [Шендеров. 2001]:

Գրականության մեջ սահմանափակ են ընտանի կենդանիների կաթից անջատված ԿԹԲ-ների հատկությունների ուսումնասիրության տվյալները: Հայտնի է, որ դեռ հնուց Արցախի Հանրապետության (ԱՀ) տարածաշրջանում տարբեր ընտանի կենդանիների կաթը օգտագործվել է բուժման նպատակով: Վերջին տարիների հետազոտությունները ցույց են տվել, որ Արցախի ԿԹԲ-ների կենսաբազմազանությունը էապես տարբերվում է Հայաստանի և Վրաստանի կաթնաթթվային մանրէների կենսաբազմազանությունից [Bokulich et al., 2015]:

2011-2017 թվականներին ԱՀ տարբեր շրջանների տնային տնտեսություններից հավաքվել են կովի կաթի մոտ 150 նմուշներ: Ցույց է տրվել, որ կովի կաթից անջատված մանրէները օժտված են պրոբիոտիկ հատկություններով և ներկայացված են մեծ մասամբ *Enterococcus* ցեղի տեսակներով [Առստամյան, 2016]:

Գիտական հետաքրքրություն է առաջացել հետազոտել նաև ընտանի կենդանիների(այժ, ոչխար, գոմեշ, ավանակ) կաթից անջատված պրոբիոտիկ ԿԹԲ-ները, որոնք կարող են հանդես գալ նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերքի արտադրության համար, իսկ դրանց մետաբիոտիկները կարող են կիրառվել անանաբուժության, բժշկության և կենսապահածոյացման մեջ:

Հետազոտության նպատակը և խնդիրները:

Սույն առենախոսության նպատակն է ուսումնասիրել ԱՀ տնային տնտեսությունների տարբեր ընտանի կենդանիների կաթից մեկուսացված էնդեմիկ կաթնաթթվային բակտերիաների պրոբիոտիկ հատկությունները և հակամանրէային մետաբիոտիկների ազդեցությունը պայմանական ախտածին, սնունդ փչացնող մանրէների աճման վրա: Այդ նպատակին հասնելու համար դրվել են հետևյալ խնդիրները՝

- Տարբեր շրջանների տնային տնտեսությունների կենդանիների (այժ, ոչխար, գոմեշ, ավանակ) կաթից կաթնաթթվային բակտերիաների անջատումը և ձևաբանական, ֆիզիոլոգիական հատկությունների ուսումնասիրումը,
- ԿԹԲ-ների աճի գնահատումը տարբեր սննդարար միջավայրերում (պաստերիզացված, մանրէազերծված, յուղալի (3,6 %) և յուղազրկված կաթ, MRS արգանակ),

- ԿԹԲ-ների պրոբիոտիկ հատկությունների ուսումնասիրումը (աճը ջերմաստիճանային տարբեր պայմաններում, կենսունակությունը pH-ի լայն տիրույթում, կայունությունը լեղու և պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների, հակաբիոտիկների նկատմամբ, հակաօքսիդանտային և հակամանրէային ակտիվությունները),
- ԿԹԲ-ների աճեցումից ստացված կուլտուրալ հեղուկների մաքրումը՝ հակամանրէային ակտիվությամբ նյութերի (մետաբիոտիկների) անջատման նպատակով,
- Ստացված մետաբիոտիկների ազդեցության ուսումնասիրումը՝ հիվանդներից անջատված պայմանական ախտածին, սնունդ փչացնող մանրէների աճի վրա,
- Ընտրված ԿԹԲ-ների նույնականացումը,
- Նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերքի արտադրության համար ընտրված ԿԹԲ-ների համակցությունների ստեղծումը և գիտաարտադրական փորձարկումները:

Գիտական նորույթ:

- Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները պրոբիոտիկ հատկություններով գերազանցում են տարբեր ընտանի կենդանիների կաթից անջատված ԿԹԲ-ներին,
- Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ տարբեր ընտանի կենդանիների կաթի ԿԹԲ-ների կուլտուրալ հեղուկից անջատված մետաբիոտիկները ավելի բարձր արդյունավետությամբ են ճնշում հիվանդներից անջատված հակաբիոտիկակայուն պայմանական ախտածին մանրէների աճը,
- Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ գոմեշի կաթից անջատված *LAB sp. KG1* մետաբիոտիկը բարձր արդյունավետությամբ ճնշում է սնունդը փչացնող հետազոտված մանրէների աճը,
- Առաջին անգամ ստեղծվել է համակցություն՝ գոմեշի կաթից անջատված *L.helveticus KG5* և կովի կաթից անջատված *Ent. durans P13* մանրէների հիման վրա՝ նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերքի արտադրության համար:

Կիրառական նշանակությունը:

Առաջին անգամ ԱՀ տարբեր շրջանների ընտանի կենդանիների (ոչխար, այծ, գոմեշ, ավանակ) կաթից անջատվել և ուսումնասիրվել են պրոբիոտիկ հատկություններով օժտված և արտադրական նշանակություն ունեցող ԿԹԲ-ների շտամներ: *LAB sp. KE1, LAB sp. KE2, LAB sp. KE3, LAB sp. KE4, Ent. faecium KE5, Ent.durans KE6, LAB sp. KE7, LAB sp. KE8, Ent. faecium KE9, Ent.durans KE10, L.helveticus KG5, Ent. faecium KV15-1, LAB sp. KV15-2, Ent. faecium KA3* և *Ent. faecium KAP1* մանրէները կարող են օգտագործվել նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերքների արտադրության համար. իսկ ԿԹԲ *LAB sp. KG1* շտամը և դրա մետաբիոտիկը կարող է կիրառվել որպես սննդի կենսապահածոյացման միջոց:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները:

1. Ընտանի կենդանիների կաթի նմուշներից մեկուսացված ԿԹԲ-ների ձևաբանական և ֆիզիոլոգիական հատկությունների ուսումնասիրումը,
2. Անջատված ԿԹԲ-ների պրոբիոտիկ հատկությունների ուսումնասիրումը՝
 - աճը տարբեր ջերմաստիճանային պայմաններում,
 - կայունությունը pH-ի՝ 2.0-9.0 տիրույթում,
 - կայունությունը լեղու 0.20-0.80 % խտությունների ազդեցությունից հետո,
 - կայունությունը պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցությունից հետո (տրիպսին, պեպսին),
 - կայունությունը տարբեր հակաբիոտիկների նկատմամբ,

- հակաօքսիդանտային ակտիվությունը,
 - ադիեզիա (սոսնձում) էպիթելային բջիջների վրա,
3. Պրոբիոտիկ հատկություններով օժտված ընտրված ԿԹԲ-ների աճեցումից ստացված կոկտուրալ հեղուկների մաքրումը և ստացված մասնաբաժինների համեմատական գնահատումը՝ կախված աճեցման պայմաններից,
 4. Ընտրված մետաբիոտիկների հակամանրէային ազդեցության ուսումնասիրումը՝ պայմանական ախտածին թեսթ-կոկտուրաների, հիվանդներից անջատված ախտածին մանրէների, սնունդը փչացնող հետազոտված մանրէների աճի վրա,
 5. Նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերքի արտադրության համար պրոբիոտիկ հատկություններով ԿԹԲ-ների հիման վրա տարբեր համակցությունների ստեղծումը:

Արենախոսական աշխարհանքի կապը գիտական թեմաների հետ:

Ատենախոսությունը իրականացվել է ՀՀ Գիտության Պետական Կոմիտեի կողմից ֆինանսավորվող 11AA-004 «Հետազոտել Արցախի տարբեր շրջանների կաթնաթթվային մանրէների բազմատեսակությունը՝ որպես հիմք նոր սերնդի կենսապատրաստուկների համար» (2011-2013թթ), 13AA-005 «ԼՂՀ կաթնամթերքներից ընտրված կաթնաթթվային բակտերիաների հակամանրէային հատկությունները՝ ընդդեմ մարդու և կենդանիների ախտածին մանրէների» (2013-2015թթ), 16AA-03 «ԼՂՀ-ի ԿԹԲ-ներից և խմորասնկերից ստացված հակամանրէային պատրաստուկների օգտագործման հետազոտությունը» (2016-2018թթ), Հայ օգնության ֆոնդի ԳԿԱՀ microbio 4583 «Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության մի շարք շրջանների կաթնամթերքից և տարբեր ընտանի կենդանիների կաթից մեկուսացված էնդեմիկ կաթնաթթվային բակտերիաների համեմատական ուսումնասիրությունը» (2016թ) դրամաշնորհների միջոցով. ինչպես նաև «Արցախի Գիտական Կենտրոն» ՊՈԱԿ-ի բազային ֆինանսավորման շրջանակներում (2011-2017թթ):

Արենախոսի անձնական ներդրումը:

Ատենախոսի անձնական ներդրումը ներառում է ձևակերպված խնդիրների իրականացում, թեմային առնչվող գիտական գրականության ուսումնասիրություն. հետազոտության արդյունքների վերլուծություն, քննարկում և ամփոփում, տպագրված գիտական հոդվածների և ատենախոսության ձևակերպում: Հիմնական խնդիրների դրվածքը և մեթոդների մշակումը իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի սննդի կենսաանվտանգության լաբորատորիայի առաջատար գիտաշխատող, կ.գ.թ. Ֆլորա Նուբարի Տիրունու ղեկավարությամբ:

Արենախոսության քննարկումը:

Ատենախոսության հիմնական դրույթները ներկայացվել են Միջազգային գիտաժողովներում՝ International Scientific Workshop “Trends in microbiology and microbial biotechnology”, 2014, October 5-8, Yerevan; 3rd International Scientific Conference on “Dialogues on Sciences”, 2015, June 23-26, Yerevan; International Young Scientists Conference “New Trends In Life Sciences”, 2016, September 27-29, Yerevan, Armenia; IV International Scientific Conference of Young Researchers “Biotechnology: Science and Practice” m 2017, September 28-30, Yerevan, Armenia; Երիտասարդ գիտնականների միջազգային գիտաժողով «Կենսաքիմիայի անցյալը, ներկան և ապագան», 2017, նոյեմբերի 2-3 Երևան; ՀՀ Գիտության Պետական Կոմիտեի կողմից ֆինանսավորվող 11AA-004, 13AA-005, 16AA-03, Հայ օգնության ֆոնդի ԳԿԱՀ microbio 4583 դրամաշնորհների ընթացիկ հաշվետվություններում. «Արցախի Գիտական Կենտրոն» ՊՈԱԿ-ի և ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդների նիստերում:

Աշխարհանքի իրականացման վայրը:

Աշխատանքը իրականացվել է ԱՀ «Արցախի Գիտական Կենտրոն» ՊՈԱԿ-ի մանրէաբանական և ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի սննդի կենսաանվտանգության

լաբորատորիաներում՝ 2011-2017 թվականների ընթացքում: Հիվանդներից անջատված պայմանական ախտածին մանրէների նկատմամբ մետաբիոտիկների ազդեցության ուսումնասիրությունները իրականացվել են ԱՀ ԱՆ «Համաճարակաբանության և հիգիենայի կենտրոն» ՊՈԱԿ-ում՝ բժիշկ-մանրէաբանների հետ համատեղ: Գիտաարտադրական աշխատանքները կատարվել են Ստեփանակերտի «Արցախ Կաթ» ընկերությունում:

Արենախոսության կառուցվածքը և ծավալը:

Արենախոսական աշխատանքը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, նյութերից և մեթոդներից, ստացված արդյունքներից և դրանց քննարկումներից՝ շարադրված վեց գլուխներում, ամփոփումից, եզրակացություններից, գիտագործնական առաջարկություններից, օգտագործված գրականության ցանկից, որը ներառում է 108 անուն հղումներ, և 4 հավելվածներից: Արենախոսության հիմնական ծավալը կազմում է 116 տպագրական էջ, ներառում է 28 աղյուսակ, 13 նկար:

Հրատարակված գիտական աշխատությունները:

Արենախոսության հիմնադրույթները և բովանդակությունը ներկայացված են հրատարակված 17 գիտական աշխատանքներում՝ 8 հոդված, որոնցից 2-ը առանց համահեղինակների և 9 թեզիս՝ տպագրված Միջազգային գիտաժողովների ժողովածուներում:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱՎՆԱՐԿ

Գլուխ 1-ում բերված են ընդհանուր տեղեկություններ պրոբիոտիկների և մետաբիոտիկների, դրանց ազդեցության տարբերությունների վերաբերյալ, ֆունկցիոնալ սննդամթերքի արդիականության, կիրառման հիմնավորումները:

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈՂՆԵՐ

2.1. Սննդամիջավայրեր: Աճեցման համար օգտագործվել է MRS արգանակ, ազար (ISO, Himedia, Հնդկաստան), լակտոազար, սննդարար ազար (Himedia, Հնդկաստան), «Արցախ Կաթ» ընկերության արտադրության կաթնաշոռի շիճուկ և յուղայի կաթ (3,6%), չոր յուղազրկված կաթ (1,5 %, Ուկրաինա): Օգտագործվել է նաև կաթնաշոռի շիճուկի հիման վրա պատրաստված սննդարար միջավայր [*ՀՀ Արտոնագիր*, 2015]:

2.2. Ուսումնասիրությունների առարկան: ԱՀ տարբեր շրջանների ընտանի կենդանիների (ավանակ, ոչխար, այծ, գոմեշ) կաթի տարբեր նմուշներից անջատվել են կաթնաթթվային բակտերիաներ:

2.3. ԿԹԲ-ների մարդու կուլտուրաների անջատում: 2011-2017 թվականների ընթացքում հավաքվել են ընդհանուր առմամբ կաթի 128 նմուշներ (ավանակ-10, այծ-40, ոչխար-68, գոմեշ-10): Նմուշները պահվել են ջերմապահարանում 24 ժամ, 37°C պայմաններում, որից հետո ցանքս է կատարվել MRS ազարի վրա: Առանձնացվել են ձևաբանական բնութագրով տարբեր գաղութներ, որոնցից յուրաքանչյուրը տեղափոխվել է կաթի և MRS արգանակի մեջ (5մլ) և աճեցվել ջերմապահարանում 24 ժամ, 37°C պայմաններում: Ըստ կաթի մերման արագության ընտվել են 98 ԿԹԲ-ներ:

2.4. Օգրագործված թեսթ կուլտուրաներ և պայմանական ախտածին մանրէներ: ԿԹԲ-ների հակամանրէային ակտիվությունը որոշելու նպատակով որպես թեստ կուլտուրա օգտագործվել են պայմանական ախտածին Գրամ-դրական *Bacillus subtilis* 17-89 և Գրամ-բացասական *Salmonella typhimurium* G-38 մանրէները, որոնք գտնվում են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ ՊՈԱԿ-ի «Սննդի կենսասանվտանգության» լաբորատորիայի կուլտուրաների հավաքածուում:

E. coli, *Citrobacter*, *L.casei*, *Ps. aeruginosa*, *Pr.vulgaris* ախտածին մանրէները անջատվել են հիվանդներից՝ ԱՀ ԱՆ «Համաճարակաբանության և հիգիենայի կենտրոն» ՊՈԱԿ-ի բժիշկ-մանրէաբանների կողմից:

2.5. ԿԹԲ-ների աճեցումը տարբեր միջավայրերում: ԿԹԲ-ների 16-20 ժամանոց ցանքսանյութը ավելացրվել է մանրէազերծված, պաստերիզացված, յուղալի և յուղազրկված կաթի, ինչպես նաև MRS արգանակի մեջ՝ միջավայրի 10%-ի չափով: Փորձանմուշները աճեցվել են ջերմապահարանում՝ 30°C, 37°C, 45°C պայմաններում, տևողությունը՝ ըստ դրված խնդրի:

2.6. ԿԹԲ-ների ձևաբանական հատկությունների նկարագրություն: Կատարվել է ըստ ընդունված մեթոդի [Акопян, 2007; Берги, 1980]:

2.7. Հակամանրէային ակտիվության որոշում և հաշվարկ: Կատարվել է ըստ ընդունված մեթոդի [Parente et al., 1995]:

2.8. ԿԹԲ-ների որոշ պրոբիոտիկ հատկությունների ուսումնասիրություն

2.8.1. ԿԹԲ-ների զգայունությունը լեղու նկատմամբ: Որոշվել է ըստ ընդունված մեթոդների [Wanda et al., 1991;Klaenhammer, 1993]:

2.8.2. ԿԹԲ-ների կենսունակությունը pH-ի տարբեր փրոբյոսներում: Որոշվել է ըստ ընդունված մեթոդների [Wanda et al., 1991; Klaenhammer, 1993]:

2.8.3. ԿԹԲ-ների կենսունակությունը պրոպրեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցությունից հետո: Որոշվել է ըստ ընդունված մեթոդների [Fernandes et al., 2008]:

2.8.4. ԿԹԲ-ների հակաօքսիդանտային ակտիվության գնահատում: Որոշվել է ըստ ադրենալինի ինքնօքսիդացման գնահատման [Сирота, 2013]:

2.8.5. ԿԹԲ-ների հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունության որոշում: Կատարվել են ըստ ընդունված մեթոդի [Биргер, 1990]:

2.8.6. ԿԹԲ-ների ադիզիվ հատկության որոշում: Կատարվել է ըստ ընդունված մեթոդի [Henricsson. et al., 1991]:

2.9. ԿԹԲ-ների աճեցումը և կուլտուրալ հեղուկի մաքրումը

2.9.1. Ցանքսանյութի ստացում: ԿԹԲ-ները աճեցվել են մանրէազերծված, պաստերիզացված, յուղալի և յուղազրկված կաթում, MRS արգանակում. ջերմապահարանում՝ 37°C պայմաններում, 16 ժամ տևողությամբ:

2.9.2. Կուլտուրալ հեղուկի ստացում: ԿԹԲ-ների 16 ժամանոց ցանքսանյութը 10%-ի չափով ավելցվել է MRS արգանակի կամ կաթնաշոռի շիճուկի հիման վրա սննդարար միջավայրի մեջ՝ 200մլ ծավալով սրվակների մեջ, որոնք պարունակում են 100մլ միջավայր: Աճեցումը կատարվել է ջերմապահարանում՝ 37°C պայմաններում, 24-48 ժամ տևողությամբ:

2.9.3. Վերնստվածքային հեղուկի խտանյութերի ստացում և մաքրում: Կենսազանգվածը կուլտուրալ հեղուկից անջատվել է կենտրոնախումամամբ (3000 պտույտ, 30 րոպե): Ստացված վերնստվածքային հեղուկը (ՎՆՀ) խտացվել է 5 անգամ՝ 50°C պայմաններում՝ մինչև չոր նյութերի (ՉՆ) պարունակությունը կազմի 18-20%: Մետաբիոտիկների անջատման նպատակով խտանյութը ենթարկվել է քրոմատոգրաֆիկ եղանակով մաքրման (ժել-ֆիլտրում, կրիչը՝ Sephadex G25 Superfine):

2.10. ԿԹԲ-ների նույնականացում: ԿԹԲ-ների ԴՆԹ-ն անջատվել է ըստ [Wright et al., 2017]: ԿԹԲ-ների նույնականացումն իրականացվել է 16S r-ԴՆԹ գեների սեքվենավորման մեթոդի կիրառմամբ:

2.11. ԿԹԲ-ների շտամների համակցությունների սրբոճում և օրգանոլեպտիկ հատկությունների գնահատում: Գնահատականը հաշվարկվել է համաձայն ԳՕՍՍ 4959 (<<):

2.12. Ստացված տվյալների վիճակագրական վերլուծություն: Օգտագործվել է համակարգչային Microsoft Word 10 և Microsoft Office Excel 2010 ծրագրերը, ստացված տվյալները համարվում են հավաստի p < 0.05-ի դեպքում:

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄՆԵՐ

ԳԼՈՒԽ 3. ՏԱՐՔԵՐ ԸՆՏԱՆԻ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ (ԱՅՑ, ՈՉԽԱՐ, ԳՈՄԵՇ, ԱՎԱՆԱԿ) ԿԱԹՈՑ ԿԹԲ-ՆԵՐԻ ԱՆՁԱՏՈՒՄ ԵՎ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ

3.1. ԿԹԲ-ների ձևաբանական բնութագիրը: ԱՀ տարբեր շրջանների տնային տնտեսություններից հավաքվել է տարբեր ընտանի կենդանիների կաթի 128 նմուշ (2.3 նյութեր և մեթոդներ): MRS ազարի և լակտոազարի վրա աճեցրած ԿԹԲ-ների գաղութները տարբերվում են զույնով, ձևով և չափով: ԿԹԲ-ների մանրադիտակային ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ դրանք ներկայացված են տարբեր չափերի գնդաձև և ցուպիկաձև բջիջներով: Անջատված ԿԹԲ-ների 91 %-ը գնդաձև են, իսկ 9%-ը ցուպիկաձև բջիջներ են: Գնդաձև և ցուպիկաձև բջիջների հարաբերությունը կազմել է մոտավորապես 9:1:

ԿԹԲ-ները աճեցվել են յուղալի (3,6%) և յուղազրկված (1,5%) կովի կաթի մեջ, որոշվել է մերման ժամանակը և թթվայնությունը: Ցույց է տրվել, որ մանրէները տարբեր արագությամբ են մերում կովի կաթը: Այծի և ավանակի կաթից անջատված մանրէները կովի կաթը մերում են 10-24 ժամում: Ոչխարի և գոմեշի կաթից անջատված մանրէները ավելի արագ են մերում կովի կաթը՝ 5-10 ժամում: Նշված կենդանիների կաթից անջատված մանրէները իրենց սկզբնական անջատման աղբյուր հանդիսացող կաթը մերում են ավելի կարճ ժամանակահատվածում:

3.2. Անջատված ԿԹԲ-ների որոշ պրոբիոտիկ հատկությունների ուսումնասիրություն:

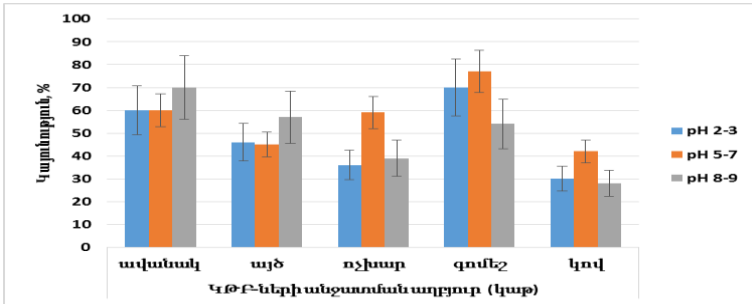
Որպեսզի ապացուցվի, որ ուսումնասիրվող ԿԹԲ-ները կարող են հանդես գալ որպես պրոբիոտիկներ, հետազոտվել է դրանց որոշ պրոբիոտիկ հատկությունները՝ կայունությունը լեղու ֆիզիոլոգիական խտությունների, մարսողական ֆերմենտների ազդեցության և pH տարբեր տիրույթների նկատմամբ, հակամանրէային և հակաօքսիդանտային ակտիվություններն, ադիեզիվ հատկությունը ըստ ընդունված մոտեցման (2,8 նյութեր և մեթոդներ):

3.2.1. ԿԹԲ-ների կայունությունը լեղու տարբեր խտանյութերի նկատմամբ: Լեղու նկատմամբ կայունությունը հանդիսանում է պրոբիոտիկների կարևորագույն հատկություններից մեկը [Wanda et al., 1991; Klaenhammer, 1993]: Ստուգվել է անջատված մանրէների կայունությունը լեղու 0.2-0.8% խտության նկատմամբ: Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ լեղու 0.5-0.8% խտության հանդեպ կայուն են ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները (40%): Գոմեշի, այծի և ոչխարի կաթից անջատված մանրէները կայուն են լեղու մինչև 0.2-0.5% խտության նկատմամբ: Նույն կենսունակությունը ցուցաբերել են կովի կաթից անջատված մանրէները:

3.2.2. ԿԹԲ-ների կայունությունը pH-ի տարբեր տիրույթներում: Քանի որ աղիների տարբեր հատվածները տարբերվում են pH-ի տիրույթներով, պրոբիոտիկ մանրէները և նրանց նյութափոխանակության արգասիքները, անցնելով աղեստամոքսային ուղու միջով, ենթարկվում են միջավայրի թթվայնության փոփոխության ազդեցությանը: Ստուգվել է անջատված ԿԹԲ-ների կայունությունը pH-ի տարբեր տիրույթներում [Fernandes et al., 2008]: Ցույց է տրվել, որ ԿԹԲ-ների կայունությունը կախված է միջավայրի pH-ից: Տվյալները ներկայացված են նկար 1-ում: Ինչպես երևում է նկար 1-ում բերված տվյալներից, ավանակի, այծի և գոմեշի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները պահպանում են կենսունակությունը pH-ի 2-9 լայն տիրույթում (60-80%): Ոչխարի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները կայուն են միջավայրի չեզոք pH-ի պայմաններում: Համեմատելով ստացված տվյալները, երևում է, որ կովի կաթից անջատված մանրէները ունեն ավելի ցածր դիմացկունություն pH-ի լայն տիրույթում (30-40%):

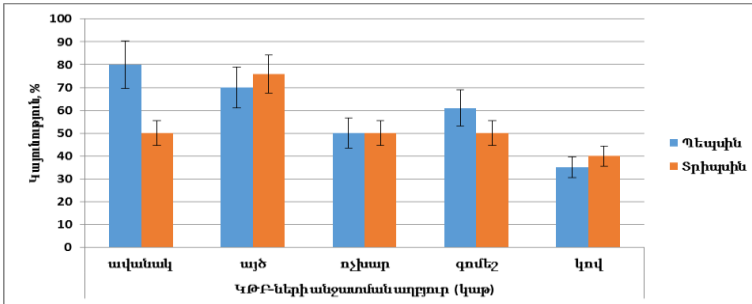
Այսպիսով, կարելի է ենթադրել, որ ավանակի, գոմեշի և այծի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները կարող են գոյատևել մարդու ուղիղ աղիներում, որտեղ pH-ի ցուցանիշը կազմում է

pH=8±1, իսկ գոմեշի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները՝ ստամոքսում, որտեղ pH-ի արժեքը համապատասխանաբար կազմում է pH=2±0.5:



Նկար 1. ԿԹԲ-ների կայունությունը pH-ի 2.0-9.0 տիրույթում

3.2.3. ԿԹԲ-ների կայունությունը տարբեր պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների նկատմամբ: Պրոբիոտիկները, ինչպես նաև նրանց նյութափոխանակության արգասիքները, անցնելով աղեստամոքսային ուղու տարբեր հատվածներով՝ ենթարկվում են մարսողական տարբեր ֆերմենտների ազդեցությանը [Murphy et al., 1999]: Այդ նպատակով հետազոտվել է անջատված ԿԹԲ-ների կայունությունը պեպսինի և տրիպսինի ազդեցության նկատմամբ (2.8.3. նյութեր և մեթոդներ): Ստացված տվյալները ներկայացված են նկար 2-ում:



Նկար 2. ԿԹԲ-ների կայունությունը ֆերմենտների ազդեցության նկատմամբ

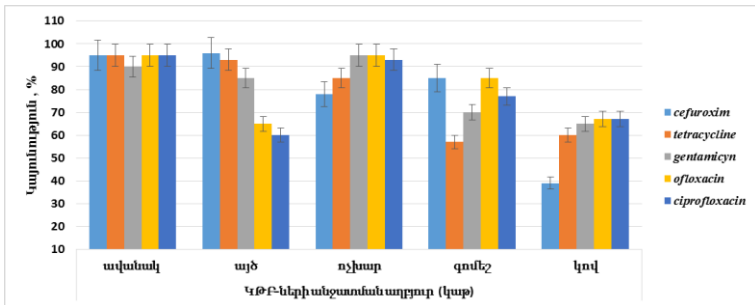
Ինչպես երևում է բերված տվյալներից, ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները 50%-ով պահպանում են կայունությունը տրիպսին ֆերմենտի ազդեցությունից հետո, իսկ պեպսին ֆերմենտի նկատմամբ կայուն են 80%-ով: Ոչխարի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները 50%-ով պահպանում են կայունությունը ինչպես տրիպսինի, այնպես էլ պեպսինի ազդեցությունից հետո: Համեմատելով տվյալները նշե՞նք, որ ամենացածր կայունությունը ուսումնասիրվող ֆերմենտների ազդեցության նկատմամբ դրսևորում են կովի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները (30-40%):

3.2.4. ԿԹԲ-ների հակաօքսիդանտային ակտիվությունը: Պրոբիոտիկ մանրէները պետք է օժտված լինեն նաև հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ: Այդ նպատակով հետազոտվել է

ընտրված ԿԹԲ-ների հակաօքսիդանտային ակտիվությունը [Сирота, 2013]: Ըստ ստացված տվյալների, հետազոտված ԿԹԲ-ից հակաօքսիդանտային բարձր ակտիվություն ցուցաբերում են այժի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները, իսկ ամենացածր ակտիվությունը՝ կովի կաթից անջատված մանրէները:

3.2.5. ԿԹԲ-ների հակամանրէային ակտիվությունը: Կարևոր պրոբիոտիկ հատկություններից է ԿԹԲ-ների հակամանրէային ակտիվության դրսևորումը: Հետազոտվել է ԿԹԲ-ների հակամանրէային ակտիվությունը պայմանական ախտածին մանրէների նկատմամբ (2.7. նյութեր և մեթոդներ): Արդյունքներից պարզվել է, որ ոչ բոլոր ԿԹԲ-ները ունեն հակամանրէային ակտիվություն Գրամ-բացասական *Salmonella typhimurium* G-38 և Գրամ-դրական *Bacillus subtilis* G17-89 (սպորավոր) պայմանական ախտածին թեսթ-կուլտուրաների նկատմամբ: ԿԹԲ-ները ճնշում են Գրամ-դրական և Գրամ-բացասական մանրէների աճը տարբեր արդյունավետությամբ: Ի տարբերություն այլ տարբեր ընտանի կենդանիների կաթից անջատված ԿԹԲ-ների, ավանակի կաթից անջատված մանրէները բարձր արդյունավետությամբ ճնշում են և՛ Գրամ-դրական, և՛ Գրամ-բացասական մանրէների աճը:

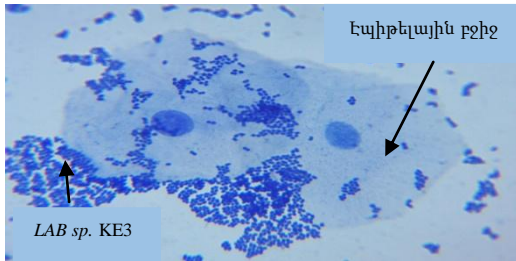
3.2.6. ԿԹԲ-ների կայունությունը հակաբիոտիկների նկատմամբ: Հետազոտվել է ԿԹԲ-ների կայունությունը բժշկության մեջ առավել հաճախ կիրառվող հակաբիոտիկների նկատմամբ (2.8.5. նյութեր և մեթոդներ): Տվյալները բերված են նկար 3-ում:



Նկար 3. ԿԹԲ-ների կայունությունը հակաբիոտիկների նկատմամբ

Բերված տվյալներից երևում է, որ ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները 90 % և ավել կայուն են բժշկության մեջ ամենից շատ օգտագործվող հակաբիոտիկների նկատմամբ: Կովի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները առավել կայուն են հետազոտված հակաբիոտիկների հանդեպ: Կայունությունը կախված է հակաբիոտիկի տեսակից: Ավանակի և ոչխարի կաթից անջատված ԿԹԲ-ների կայունությունը որոշ հակաբիոտիկների նկատմամբ կարելի է բացատրել նրանով, որ ԱՀ տարբեր շրջաններում նշված ընտանի կենդանիների կանխարգելիչ բուժման նպատակով շատ քիչ հակաբիոտիկներ են օգտագործվում և, ըստ այդմ, հետազոտվող ԿԹԲ-բերի հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունություն ենթադրվում է պայմանավորված է նրանց վայրի ձևերով:

3.2.7. ԿԹԲ-ների ադիեզիվ հատկությունը: Հայտնի է, որ ԿԹԲ-ները անցնելով աղետամոքսային ուղու տարբեր հատվածներով, կարող են ոչնչանալ, անցնել աղիների լուսանցքով, կամ էլ՝ օժտված լինելով ադիեզիվ հատկությամբ՝ ունակ լինեն սոսնձվել աղետամոքսային ուղու լորձաթաղանթի էպիթելային բջիջներին [Шендеров, 2001]: Այդ նպատակով ուսումնասիրվել է անջատված ԿԹԲ-ների ադիեզիվ հատկությունը: Նկար 4-ում բերված է մարդու բերանի խոռոչից վերցված էպիթելային բջիջների մակերեսին ԿԹԲ-ների ադիեզիայի պատկերը:



Նկար 4. Արհեզիայի պատկեր

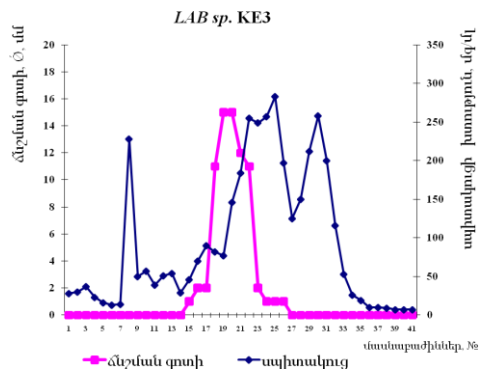
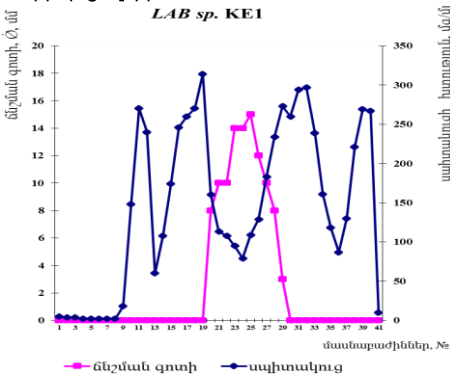
Ինչպես երևում է բերված նկարից, *LAB sp. KE3* շտամի բջիջները սունձվել են էպիթելային բջիջների վրա, որն կարելի է բացատրել ԿԹԲ-ների մոտ համապատասխան ռեցեպտորների առկայությամբ: Ոչ բոլոր հետազոտված ԿԹԲ-ները ցուցաբերել են արհեզիվ հատկություն:

Ամփոփելով հետազոտությունների ստացված տվյալները, տարբեր ընտանի կենդանիների կաթից անջատված 98 ԿԹԲ-ներից ընտրվել են 18 այն ԿԹԲ-ները, որոնք ցուցաբերել են մեկից ավել արդյունավետ պրոբիոտիկ հատկություններ: Ընտրված ԿԹԲ-ների ԴՆԹ-ների նմուշները ուղղարկվել են Հարավային Կորեայի «MACROGEN» ընկերության՝ նուկլեինաթթվային հաջորդականությունն որոշելու համար: Ստացված հաջորդականություններն համեմատվել են BLAST sequencing (ԱՄՆ) տվյալերի բազայում գրանցված էտալոնային շտամների հաջորդականությունների հետ: Նույնականացված 8 ԿԹԲ-ների շտամները ավանդադրվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում՝ համապատասխան համարների և ծածկագրերի տակ՝ *Enterococcus faecium* KA3 MDC 9667, *Enterococcus faecium* KAP1 MDC 9668, *Enterococcus faecium* KV15-1 MDC 9669, *Enterococcus faecium* KE5 MDC 9662, *Enterococcus faecium* KE9 MDC 9664, *Enterococcus durans* KE6 MDC 9665, *Enterococcus durans* KE10 MDC 9666, *Lactobacillus helveticus* KG5 MDC 9663:

ԳԼՈՒԽ 4. ԸՆՏՐՎԱԾ ԿԹԲ-ՆԵՐԻ ՎՆՀ ԽՏԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ ԵՎ ՄԵՏԱԲԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ

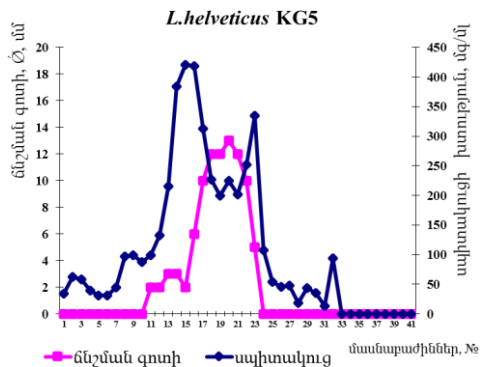
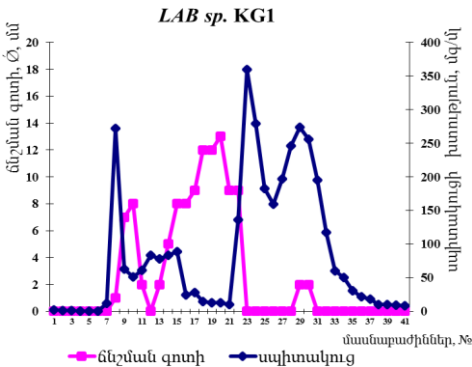
4.1. ԿԹԲ-ների ՎՆՀ խտանյութերի գնահատումը: Մետաբիոտիկների ստացման համար ուսումնասիրվող ԿԹԲ-ները աճեցվել են MRS արգանակում (միջ, 1) և շիճուկի հիման վրա մշակված սննդարար միջավայրում (միջ, 2): ԿԹԲ-ների կողմից սինթեզվող հակամանրէային նյութերի անջատման և մաքրման համար կիրառվել են օրգանական լուծիչով (էթանոլ 96,0 %) նստեցման և ժել-ֆիլտրման (Sephadex G25 superfine) եղանակների համադրումը (2.9.3. նյութեր և մեթոդներ): Ժել-ֆիլտրման եղանակով մաքրման ժամանակ յուրաքանչյուր շտամի համար հավաքվել են 40-45 մասնաբաժիններ, որոնցից յուրաքանչյուրը (5 ական մլ) գնահատվել են ըստ հակամանրէային ակտիվության և սպիտակուցային բնույթի նյութերի առկայության: Ստորև բերված են *LAB sp. KE3*, *LAB sp. KE1*, *L. helveticus* KG5, *LAB sp. KG1*, *Ent. faecium* KV15-1, *LAB sp. KV15-2*, *Ent. faecium* KA3 և *Ent. faecium* KAP1 ԿԹԲ-ների ՎՆՀ-ից մասնակի մաքրված հակամանրէային հատկություններով օժտված մասնաբաժինների ելքը (տվյալները բերված են նկար 5-ում): Նկար 5-ում (Ա, Բ) բերված տվյալները ցույց են տալիս, որ նույն պայմաններում աճեցված **ավանակի** կաթից անջատված *LAB sp. KE1* և *LAB sp. KE3* ՎՆՀ-ի մաքրումից ստացվել են 12 մասնաբաժիններ, որոնք օժտված են հակամանրէային ակտիվությամբ: Նկար 5 (Գ, Դ) ներկայացված են **գոմեջի** կաթից անջատված *L. helveticus* KG5 և *LAB sp. KG1* շտամների ՎՆՀ-երի մաքրման արդյունքները: ԿԹԲ *L. helveticus*

KG5 ունի 16 հակամանրէային մասնաբաժիններ, իսկ **LAB sp. KG1** ունի 13 հակամանրէային մասնաբաժիններ: Այս ՎՆՀ-ների կորերը տարբերվում են սպիտակուցի ելքով և հակամանրէային ընդհանուր տեսքով: Կարելի է ենթադրել, որ այդ շտամների մետաբոտիկները պատկանում են տարբեր ցեղերի:



Ա

Բ

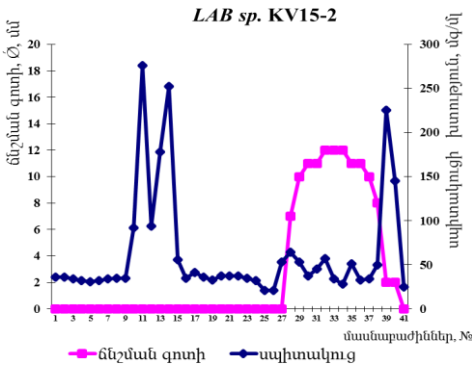


Գ

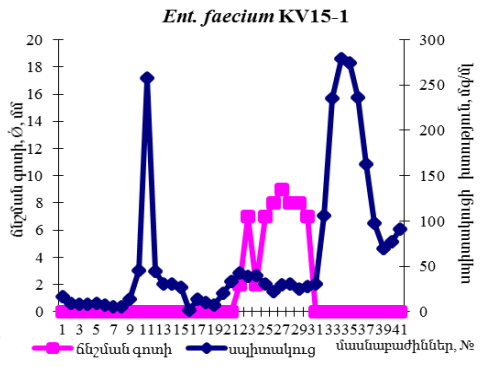
Դ

Նկար 5 (Ա. Բ. Գ. Դ). Տարբեր շտամների ՎՆՀ մասնակի մաքրման արդյունքները

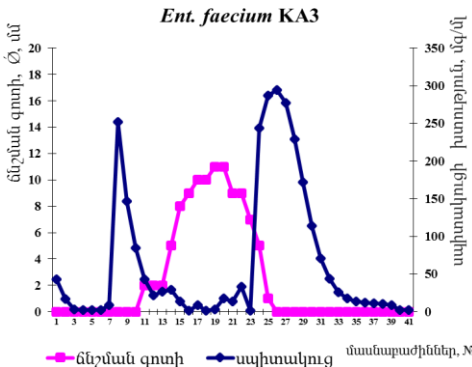
Ինչպես երևում է բերված տվյալներից **ոչխարի** կաթից անջատված ԿԹԲ (Նկար 5, Ե, Ձ) **Ent. faecium** KV15-1 ՎՆՀ-ի և **LAB sp. KV15-2** ՎՆՀ-ի կորերը չեն տարբերվում իրենց տեսքով, սակայն տարբերվում են հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված մասնաբաժինների ելքով: Այսպիսով կարելի է ենթադրել, որ այս երկու մանրէները տարբերվում են իրենց մետաբոտիկների սինթեզով:



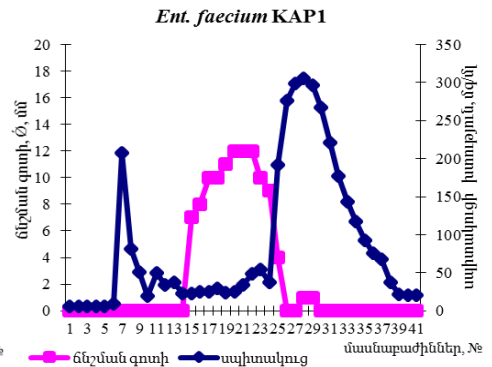
ա



բ



գ



դ

Նկար 5. (շարունակություն)

Հակամանրէային մասնաբաժինների ելքի տարբերությունը ՎՆՀ -ի մաքրումից հետո նկատվում է նաև **այժի** կաթից անջատված մանրէների 2 հետազոտված շտամերի մոտ: Այսպես *Ent. faecium* **KAP1** և *Ent. faecium* **KA3** ՎՆՀ -ի մաքրումը ցույց տվեց, որ այս մանրէները տարբերվում են իրենց մասնաբաժինների ակտիվությամբ: Կարելի է ենթադրել, որ այս մանրէները նույնատիպ են, սակայն տարբերվում են (Նկար 5 Ե, Ը):

Այսպիսով, ՎՆՀ-ի մաքրումը օգտագործվող մեթոդով ցույց է տալիս, որ անջատված մանրէները ունեն տարբեր մետաբոլիկների ելք՝ օժտված հակամանրէային ակտիվությամբ, որոնք տարբերվում են նաև սպիտակուցամանան նյութերի սինթեզով:

4.2. Աճման պայմանների ազդեցությունը մետաբոլիկների հակամանրէային ակտիվության դոսրման վրա: Հայտնի է, որ կախված աճման պայմաններից (ջերմաստիճան, սննդամիջավայր), հակամանրէային նյութերի սինթեզը տարբերվում է [Карапетян, 2010]: Հետազոտվել է մետաբոլիկների ելքը՝ կախված աճեցման պայմաններից: Օգտագործվել են MRS արգանակ և շիճուկի հիման վրա պատրաստված միջավայրերը: Ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները (թերմոֆիլներ) աճեցվել են 42°C, իսկ մնացածները՝ 37°C պայմաններում: Ստացված ՎՆՀ խտանյութերը մաքրվել են ժել-ֆիլտրման մեթոդով: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ միջավայր 1-ում **ավանակի** կաթից անջատված *LAB sp.* **KE5** շտամի մետաբոլիկի

հակամանրէային ակտիվութիւնը կազմել է 1400 ԱՄ/մլ, իսկ միջավայր 2-ում՝ 2800 ԱՄ/մլ, ինչը վկայում է, որ տվյալ շտամի մոտ մետաբիոտիկի սինթեզը և ակտիվութիւնը կախված է աճեցման միջավայրից: Միջավայր 1- և 2-ում *LAB sp. KE3* և *LAB sp. KE5* շտամների աճեցման դեպքում մետաբիոտիկների հակամանրէային ակտիվութիւնը նույն է և կազմել է 3600 ԱՄ/մլ, ինչը ցույց է տալիս, որ նշված շտամների մոտ մետաբիոտիկների հակամանրէային ակտիվութիւնը դրսևորումը կախված չէ աճեցման միջավայրից: **Ոչխարի** կաթից անջատված *Ent. faecium KV15-1* ԿԹԲ-ի մետաբիոտիկների հակամանրէային ակտիվութիւնը միջավայր 1-ում կազմել է 400 ԱՄ/մլ, իսկ միջավայր 2-ում՝ 900 ԱՄ/մլ: ԿԹԲ *LAB sp. KV15-2* ստացված մետաբիոտիկի հակամանրէային ակտիվութիւնը միջավայր 1- և 2-ում աճեցման դեպքում կազմել է 2500 ԱՄ/մլ և կախված չէ օգտագործվող միջավայրից:

Այսպիսով, չնայած որ *Ent. faecium KV15-1* և *LAB sp. KV15-2* անջատված են ոչխարի կաթից, դրանք տարբերվում են հակամանրէային մետաբիոտիկների սինթեզով: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ **այծի** կաթից անջատված ընտրված *Ent. faecium KA-3* ԿԹԲ-ի մետաբիոտիկների հակամանրէային ակտիվութիւնը դրսևորումը կախված չէ աճեցման միջավայրից: **Գոմեշի** կաթի նույն նմուշից անջատված ԿԹԲ-ներ *L.helveticus KG5* և *LAB sp. KG5-1* մետաբիոտիկների հակամանրէային ակտիվութիւնը դրսևորումը կախված է աճման միջավայրից:

Այսպիսով, ստացված տվյալները վկայում են, որ մետաբիոտիկների հակամանրէային ակտիվութիւնը դրսևորումը կախված է սննդարար միջավայրից, մանրէների մեկուսացման աղբյուրից և տեսակային պատկանելությունից:

4.3. ԿԹԲ-ների մետաբիոտիկների ջերմակայունությունը: Հայտնի է, որ ցածր մոլեկուլային կշռով սպիտակուցային բնույթի բակտերիոցինները ջերմակայուն են 121°C մինչև 20 րոպե ջերմային մշակման պայմաններում [Klaenhammer, et al., 1993]: Ուսումնասիրվել են *L. helveticus KG5*, *Ent. faecium KV15-1*, *Ent. faecium KA3*, *Ent. faecium KAP1*, *LAB sp. KG1*, *LAB sp. KV15-2*, *LAB sp. KE1* և *LAB sp. KE3* ԿԹԲ-ների ՎՆՀ-ներից ստացված մետաբիոտիկների ջերմակայունությունը՝ 50°C և 121°C, 20 րոպե ջերմային մշակման պայմաններում: Մետաբիոտիկների ակտիվութիւնը ջերմային մշակումից հետո ստուգվել է pH-ի երկու արժեքների դեպքում (pH=4.5 և 6.0): Պրոբիոտիկ հատկություններով օժտված *Ent. faecium KAP1*, *Ent. faecium KA3* և *L.helveticus KG5* շտամների մետաբիոտիկները 121°C, 20 րոպե ջերմամշակումից հետո չեն ճնշում *Salmonella typhimurium* G-38 և *B. subtilis* 17-89 աճը՝ մետաբիոտիկի pH=6.0 արժեքի դեպքում: ԿԹԲ *LAB sp. KV15-2*, *LAB sp. KE3*, *LAB sp. KE5*, *LAB sp. KG1* մետաբիոտիկները ջերմակայուն են 121°C մինչև 20 րոպե մշակումից հետո: Հակամանրէային ակտիվութիւնը ջերմամշակումից հետո դրսևորվում է նաև pH=6,0 արժեքի դեպքում, ինչը վկայում է, որ մետաբիոտիկները կարող են պարունակել բակտերիոցիններ [Klaenhammer et al., 1993]: Մինչդեռ մետաբիոտիկի pH=4.5 արժեքի դեպքում ջերմամշակումից հետո ակտիվութիւնը պահպանվում է: Դա կարելի է բացատրել նրանով, որ հակամանրէային ակտիվութիւնը նշված շտամների մոտ պայմանավորմամբ չէ միայն բակտերիոցիններով:

Այսպիսով, տարբեր կենդանիների կաթից անջատված ԿԹԲ-ների մետաբիոտիկները ցուցաբերում են տարբեր հակամանրէային ակտիվութիւն՝ կախված pH-ից և տարբեր ջերմակայունություն՝ կախված մշակման ջերմաստիճանից:

ԳԼՈՒԽ 5. ՍՏԱՑՎԱԾ ՄԵՏԱԲԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԱՃՐԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱԽՏԱԾԻՆ ՄԱՆԻԿՆԵՐԻ ԱՃԻ ՎՐԱ

5.1. Մետաբիոտիկների ազդեցությունը հիվանդներից անջատված հակաբիոտիկակայուն ախտածին մանրէների աճի վրա: Հայտնի է, որ այսօր մեծ խնդիր է հակաբիոտիկակայուն մանրէների տարածվածությունը: Այդ պատճառով հետազոտության նպատակներից մեկն է եղել ուսումնասիրել ստացված մետաբիոտիկների ազդեցությունը հիվանդներից անջատած (մեզից, կղանքից, վերքից, արյունից և այլն) պայմանական ախտածին մանրէների աճի վրա: Տվյալները բերված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1.

Մետաբիոտիկների (100 ԱՄ/մլ) ազդեցությունը պայմանական ախտածին մանրէների աճի վրա. %

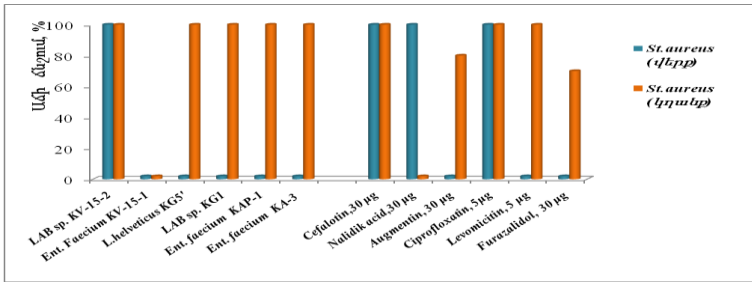
ԿԹԲ-ների անջատման աղբյուր, կաթ	Մետաբիոտիկ անջատման աղբյուր	Հիվանդներից անջատված ախտածին մանրէներ					
		<i>Staph. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pr. mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Pr.vulgaris</i>	<i>E.coli</i>
		n=15	n=15	n=18	n=5	n=10	n=20
ավանակ	<i>Ent. faecium</i> KE5	93±10	87±10	66±13	50±15	75±12	66±17
	<i>LAB sp.</i> KE3	93±10	93±10	66±14	40±19	25±12	33±18
այծ	<i>Ent. faecium</i> KAP1	50±15	93±9	50±16	93±9	33±17	95±7
	<i>Ent. faecium</i> KA3	50±16	80±12	94±8	90±10	66±13	95±8
գոմեշ	<i>L.helveticus</i> KG5	50±15	80±17	94±9	90±10	66±15	95±8
	<i>LAB sp.</i> KG1	50±16	93±9	89±11	90±10	66±18	66±15
ոչխար	<i>Ent. faecium</i> KV15-1	87±13	87±13	83±10	90±10	33±12	66±13
	<i>LAB sp.</i> KV15-2	0	50±12	50±17	90±10	66±17	33±15
կով	<i>Ent. durans</i> P13	25±15	58±18	29±13	0	0	15±17
	<i>Ent. faecium</i> M 14	0	50±16	50±16	0	0	50±10

"0"-աճի ճնշման բացակայություն

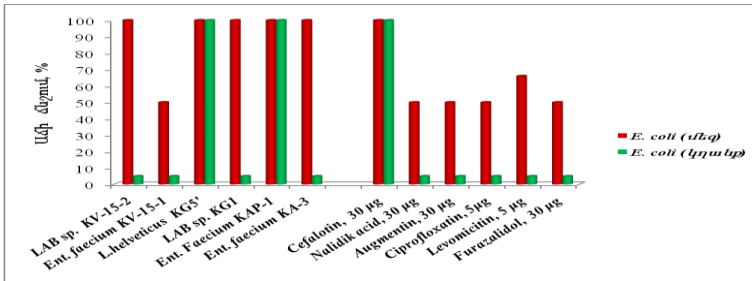
Ստացված տվյալներից երևում է, որ մետաբիոտիկները միևնույն ակտիվության դեպքում տարբեր արդյունավետությամբ են ազդում պայմանական ախտածին մանրէների աճի վրա՝ կախված ԿԹԲ շտամի տեսակից, ինչպես նաև ախտածին մանրէների տեսակային պատկանելությունից:

Կատարվել է հակաբիոտիկների և ստացված մետաբիոտիկների ազդեցության համեմատական ուսումնասիրություն՝ հիվանդներից անջատված պայմանական ախտածին մանրէների *E.coli* և *St.aureus* նկատմամբ: Տվյալները բերված է նկար 6-ում (Ա, Բ):

Ստացված տվյալներից երևում է, որ *LAB sp.* KV15-2 շտամի մետաբիոտիկը, բարձր արդյունավետությամբ ճնշում է *St. aureus*-ի աճը և կարող է փոխարինել Gentamicin, Cefalotin, Cefuroxime, Cefazolin, Ciprofloxatin, Azitromicin հակաբիոտիկներին: Մեզից և կղանքից անջատված *E.coli*-ի աճը ճնշելու համար Cefalotin, Nalidixic acid, Augmentin, Ciprofloxatin, Levomicitin հակաբիոտիկները կարող են փոխարինվել *Ent.faecium* KAP1 և *L.helveticus* KG5 ԿԹԲ-ներից ստացված մետաբիոտիկներով, որոնք Cefalotin հակաբիոտիկի նման բարձր արդյունավետություն ունեն և ավելի ուժեղ են քան Nalidixic acid, Augmentin, Ciprofloxatin, Levomicitin հակաբիոտիկները:



Ա



Բ

Նկար 6 (Ա, Բ). Մետաբիոտիկների և հակաբիոտիկների համեմատական ազդեցությունը տարբեր աղբյուրներից անջատված պայմանական ախտածին մանրէների վրա

Այսպիսով, երևում է, որ ընտրված ԿԹԲ-ներից ստացված մետաբիոտիկները տարբեր արդյունավետությամբ են ճնշում տարբեր տեսակի և ցեղի ախտածին մանրէների աճը: Մետաբիոտիկների արդյունավետությունը նաև կախված է *St.aureus*-ի և *E.coli*-ի անջատման աղբյուրից:

5.2. Մետաբիոտիկների ազդեցությունը սնունդը փչացնող մանրէների աճի վրա: Արցախում և Հայաստանում արտադրվող տարբեր սննդամթերքներից մեր կողմից անջատվել են սնունդը փչացնող մանրէներ և պայմանականորեն համարակալվել: Ուսումնասիրվել է մետաբիոտիկների ազդեցությունը սնունդը փչացնող նշված մանրէների աճի վրա: Ցույց է տրվել, որ տարբեր ընտանի կենդանիների կաթից մեկուսացված ԿԹԲ-ների մետաբիոտիկները ավելի բարձր արդյունավետությամբ են ճնշում սնունդը փչացնող մանրէներ աճը, քան մետաբիոտիկները, որոնք ստացվել են կովի կաթից անջատված ԿԹԲ-ների ՎՆՀ-ից: Աճի ճնշման առավել բարձր արդյունավետություն են ցուցաբերում գոմեշի կաթից անջատված *LAB sp. KG1* ՎՆՀ-ից ստացված մետաբիոտիկը. իսկ ամենացածր՝ կովի կաթից անջատված *Ent. durans* P13, *Ent. faecium* M14 շտամների մետաբիոտիկները: Ամփոփելով ստացված տվյալները, կարելի է ենթադրել, որ *LAB sp. KG-1*-ի մետաբիոտիկը կարող է ապագայում կիրառվել սննդամթերքների կենսապահածոյացման համար:

5.3. ՀՀ-ի և ԱՀ-ի ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ների համեմատական բնութագիրը: ԱՀ տարբեր շրջաններից ավանակի կաթից անջատված 10 ԿԹԲ-ները (*LAB sp. KE1*, *LAB sp. KE2*, *LAB sp. KE3*, *LAB sp. KE4*, *LAB sp. KE5*, *LAB sp. KE6*, *LAB sp. KE7*, *LAB sp. KE8*, *LAB sp. KE9*, *LAB sp. KE10*) համեմատվել են ՀՀ-ի տարբեր շրջանների ավանակի կաթից անջատված 3

ԿԹԲ-ների (*LAB sp. AE3, LAB sp. AE5, LAB sp. AE9*) հետ, որոնք վերցրվել է ՀՀ ԳԱԱ Հայկենսաստեխնոլոգիա ԳԱԿ մանրէների հավաքածուից: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ ՀՀ-ում ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները իրենց պրոբիոտիկ և հակամանրէային հատկություններով տարբերվում են ԱՀ-ում ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ներից:

ԳԼՈՒԽ 6. ԿԹԲ-ՆԵՐԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՄՆԵՂՎԱԹԵՐՔ ՍՏԱՆԱԼՈՒ ՀԱՄԱՐ

Նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերք ստանալու համար անհրաժեշտ է, որպեսզի մերանային շտամներն օժտված լինեն պրոբիոտիկ հատկություններով և տեխնոլոգիական ցուցանիշներով՝ կաթի մերման արագություն, թթվազոյացում, օրգանոլեպտիկ հատկություններ: Ներկայումս նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերք ստանալու համար ավելի արդիական է մեկից ավելի պրոբիոտիկ ԿԹԲ-ների համատեղ օգտագործումը: Հայտնի է, որ ԿԹԲ-ները համատեղ աճելու ընթացքում կարող են ցուցաբերել սիներգիզմի և/կամ անտոգոնիզմի փոխհարաբերություններ: Մեր կողմից առաջին անգամ փորձ է արվել կովի կաթի մեջ համատեղ աճեցնել տարբեր ցեղերին (*Enterococcus, Lactobacillus*) պատկանող նույնականացված մանրէներ: Ստացված նու սննդամթերքի թթվայնությունը 5 ժամ մերման դեպքում կազմել է 110-130 °T: Հետազոտված չորս տարբեր համակցություններում մանրէների մոտ նկատվել է սիներգիզմի երևույթը (յուրաքանչյուր մանրէի քանակը համակցությունում կազմել է 10⁸ ԳԱԱ/մ): Ստացված մերանի օրգանոլեպտիկ գնահատականը տրվել է համաձայն ԳՕՍՏ 4959-ի (ՀՀ) և կազմել է 29 միավոր: Ըստ ստացված տվյալների, ֆունկցիոնալ սնունդ ստանալու համար մեր կողմից ընտրվել և կիրառման համար առաջարկվել է բարձր պրոբիոտիկ հատկություններով *Ent. durans P13* և *L.helveticus KG5* մանրէների համակցությունը: Ստացված համակցության հիման վրա արտադրված սննդամթերքը ունի հաճելի համ ու հոտ:

"Արցախ Կաթ" ՓԲԸ ընկերությունում երկկողմանի համաձայնությամբ կատարվել են գիտաարտադրական փորձարկումներ՝ նոր սննդամթերք արտադրելու համար: Գործարանային պայմաններում անցկացվել է 5 տեխնոլոգիական գործընթաց՝ օգտագործելով *Ent.durans P13* և *L.helveticus KG5* համակցությունների հիման վրա մեր կողմից պատրաստված մերանը: Ցույց է տրվել, որ 1 տ արտադրանքի համար անհրաժեշտ է օգտագործել 3 լ մերան: Մերման ժամանակը արտադրական պայմաններում կազմել է 4-5 ժամ: Պրոբիոտիկ մանրէների հիման վրա ստացված կաթնամթերքը անվանվել է "**Արցախյակտ**", որը ունի NAST-A 01, A-0479-2017 համապատասխան վկայական և ԱՀ ՏՊ 90025478, 01 96-2017թ.:

Այսպիսով, առաջին անգամ մեր կողմից ստեղծվել է գոմեշի և կովի կաթից անջատված մանրէների հիման վրա համակցություն՝ նոր ֆունկցիոնալ սնունդ արտադրելու համար:

ԵՂՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ տարբեր ընտանի կենդանիների (այծ, ոչխար, գոմեշ, ավանակ) կաթից անջատված որոշ կաթնաթթվային բակտերիաները օժտված են պրոբիոտիկ հատկություններով և տարբերվում են կովի կաթից անջատված ԿԹԲ-ներից:
2. Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ավանակի կաթից անջատված ԿԹԲ-ները իրենց պրոբիոտիկ հատկություններով գերազանցում են այլ ընտանի կենդանիների կաթից անջատված ԿԹԲ-ներին:

3. Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ավանակի կաթից ԿԹԲ-ների ՎՆՀ-ի մասնակի մաքրումից հետո ստացված հակամանրէային մետաբիոտիկների մասնաբաժինների ելքը ավելի բարձր է, քան այլ ընտանի կենդանիների կաթից անջատված ԿԹԲ-ների ՎՆՀ-ի մոտ:
4. Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ տարբեր ընտանի կենդանիների կաթից մեկուսացված ԿԹԲ-ների ՎՆՀ անջատված մետաբիոտիկները տարբեր արդյունավետությամբ են ճնշում պայմանական ախտածին մանրէների աճը՝ կախված մետաբիոտիկների և ախտածին մանրէի տեսակից, անջատման աղբյուրից:

ԳԻՏԱԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԱՌԱՋԱՐԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Ավանակի և այծի կաթից անջատված *Enterococcus faecium* **KA3**, *Enterococcus faecium* **KE5**, *Enterococcus faecium* **KE6**, *Enterococcus durans* **KE10** շտամները, որոնք դրսևորում են պրոբիոտիկ հատկություններ, կարող են առաջարկվել որպես մերանային շտամներ՝ ֆունկցիոնալ սննդամթերքի արտադրման համար:
2. Այծի կաթից անջատված *Enterococcus faecium* **KA3** շտամը, որը ցուցաբերում է բարձր հակամանրէային և հակաօքսիդանտային ակտիվություն, կարող է կիրառվել սննդի կենսապահածոյացման համար:
3. Գոմեշի, ոչխարի և ավանակի կաթից անջատված *Lactobacillus helveticus* **KG5**, *Enterococcus faecium* **KE5**, *Enterococcus faecium* **KV151** շտամները, որոնք օժտված են ադիեզիվ հատկությամբ, կարող են կիրառվել աղեստամոքսային ուղու որոշ հիվանդությունների բուժման համար:
4. *Enterococcus durans* **P13** և *Lactobacillus helveticus* **KG5** պրոբիոտիկ շտամներով համակցությունը որպես մերան օգտագործվում է «**Արցախկաթ**» գործարանում նոր ֆունկցիոնալ սննդամթերքի արտադրության մեջ:

ԱՏԵՆԱԽՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԳԻՏԱԿԱՆ ԱՇԽԱՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

1. **Israyelyan A.**, Arustamyan L., Sargsyan Z. Influence of antimicrobial preparations on the growth of antibiotic resistant pathogenic bacteria // "Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology", International Scientific Workshop, October 5-8, Yerevan, Armenia, Book of Abstracts, 2014, p. 67.
2. Arstamyan L., **Israyelyan A.** Study of certain probiotic properties of endemic lactic acid bacteria from samples of matsun from the Republic of Nagorno Karabakh // "Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology", International Scientific Workshop, October 5-8, Yerevan, Armenia, Book of Abstracts, 2014, p. 43.
3. **Իսրայելյան Ա.**, Առստամյան Լ., Տխրունի Ֆ. Կենսաբանական արգասիքների ազդեցության ուսումնասիրությունը որոշակի ախտածին մանրէների աճի վրա // Արցախի պետական համալսարանի գիտական տեղեկագիր, Ստեփանակերտ, 1/2015, էջ 87-91:
4. Առստամյան Լ., **Իսրայելյան Ա.**, Տխրունի Ֆ. Մաճից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների որոշ պրոբիոտիկ հատկությունների գնահատումը // Материалы международной научной конференции, посвященной проблемам безопасности пищевых продуктов и продовольственной обеспеченности, ЕРЕВАН• НАҢА, 2015, с. 33– 37.

5. **Israyelyan A.**, Karapetyan K., Tkhruni F., Arstamyanyan L., Balabekyan Ts. Sensitivity of different pathogens to biological antimicrobial agents // European Journal of Biomedical and Life Sciences, Vienna, Austria, 2015, №3, p. 61- 66.
6. **Israyelyan A.**, Arstamyanyan L., Khachatryan T., Tkhruni F. Use of lactic acid bacteria with antimicrobial properties for co-cultivation // "Dialogues on Science", III International Scientific Conference of Young Researchers, June 23-26, Yerevan, Armenia, Book of Abstracts, 2015, p. 18.
7. Karapetyan K., Tkhruni F., **Israyelyan A.**, Arstamyanyan L., Balabekyan Ts. Comparative antimicrobial activity of probiotics against antibiotic-resistant human pathogens // "Dialogues on Science", III International Scientific Conference of Young Researchers, June 23-26, Yerevan, Armenia, Book of Abstracts, 2015, p. 34.
8. **Israyelyan A.**, Tkhruni F., Arstamyanyan L., Balabekyan Ts., Khachatryan T., Karapetyan K. Comparative characterization of endemic lactic acid bacteria isolated from several regions of Armenia and Nagorno-Karabakh Republic. *Biolog. Journal of Armenia*, Vol. LXVIII, Special Issue, 2016, p. 50-57.
9. Arstamyanyan L., **Israyelyan A.** The study of lactic acid bacteria isolated from milk of various domestic animals in Nagorno Karabakh Republic // "New Trends in Life Sciences", International Young Scientists Conference, September 26-28, Yerevan, Armenia, Abstracts, 2016, p. 34-35.
10. **Israyelyan A.**, Tkhruni F. Investigation of the properties of endemic LAB strains of genus *Enterococcus* isolated from samples of cow matsoon // *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 3, Issue 2, 2017, p.41- 45.
11. **Israyelyan A.** Comparative characterization of endemic lactic acid bacteria of *Enterococcus genus* from cow's milk // 1st European Conference on Biology and Medical Sciences, September 15, Vienna, Prague, 2017, p. 34-44.
12. Karapetyan K., Tkhruni F., **Israyelyan A.**, Yermolenko E., Verdyan A. Comparative characterization of endemic lactic acid bacteria of *Enterococcus genus* // *International Journal of Scientific & Technology Research*, Vol. 6, Issue 07, 2017, p. 357-361.
13. Arstamyanyan L., **Israyelyan A.**, Aleqsanyan L. Resistance to antibiotics of lactic acid bacteria isolated from matsoon // "Biotechnology Science and Practice", IV International Scientific Conference of Young Researchers, September 28-30, Yerevan, Armenia, Book of Abstracts, 2017, p. 29.
14. **Israyelyan A.**, Arstamyanyan L., Sargsyan Z., Aleqsanyan L. Inhibition of the growth of pathogenic bacteria // "Biotechnology Science and Practice", IV International Scientific Conference of Young Researchers, September 28-30, Yerevan, Armenia, Book of Abstracts, 2017, p. 30.
15. Karapetyan K., **Israyelyan A.**, Yermolenko E., Verdyan A., Balabekyan Ts. Creation of new complex probiotics on the basis of endemic lactic acid bacteria // 9th probiotics, prebiotics & new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & human and microbiota health, September 10-12, Rome, Italy, 2017, p.120.
16. **Israyelyan A.**, Arstamyanyan L., Aleqsanyan L. Antimicrobial properties of LAB isolated from milk of different animals // «Կենսաբանական և սննդամթերքի, ներկան և սպազան», Միջազգային երիտասարդական գիտաժողով, Նոյեմբեր 2-3, Երևան, Հայաստան, Գիտաժողովի թեզիսների և հոդվածների ժողովածու, 2017, էջ 17-18:
17. **Israyelyan A.** Comparative characterization of lactic acid bacteria isolated from donkey's milk // *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 5, Issue 3, 2018, p. 65-69.

ИСРАЕЛЯН АРЕВИК ЛЕВОНОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ МЕТАБИОТИКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА РАЗНЫХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ АРЦАХА

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, молоко, домашние животные, пробиотические свойства, метабитики.

Впервые были выделены 98 штаммов молочнокислых бактерий (МКБ) из молока разных домашних животных (коз, ослиц, буйволиц, овец) из натуральных хозяйств Арцаха. Бактерии были представлены в основном мезофильными (60%), термофильными (40%) видами. Соотношение кокковидных и палочковидных форм составляло 9:1, что может быть обусловлено климатическими условиями Арцаха.

Отобранные МКБ отличались по своим пробиотическим свойствам: устойчивости к разным концентрациям желчи, по выживаемости в широком диапазоне pH и в присутствии ферментов (пепсин, трипсин), наличии антиоксидантной и адгезивной активности, устойчивости к антибиотикам, способности подавлять рост патогенной антибиотикостойчивой микрофлоры, выделенной от больных пациентов и микрофлоры, вызывающей порчу пищевых продуктов. Исследования показали, что бактерии, выделенные из молока ослиц, по своим пробиотическим свойствам существенно отличаются от МКБ, выделенных из молока остальных домашних животных. Генотипирование отобранных штаммов методом секвенирования генов 16S РНК показало, что МКБ, выделенные из молока домашних животных (коз, ослиц, буйволиц, овец), представлены в основном штаммами рода *Enterococcus*.

Культуральные жидкости отобранных бактерий были очищены методом гель-фильтрации (Сефадекс G25) и получены фракции с антимикробными свойствами (метабитики). Показано, что их количественный выход зависит от видовой принадлежности штамма и от вида животного из молока которого выделены МКБ. Штамм МКБ *Ent. faecium KE5*, выделенный из молока ослицы, синтезирует больше метабитиков, чем все другие исследованные штаммы.

Показана зависимость синтеза метабитиков от состава питательной среды при выращивании штаммов *LAB sp.KE1*, *LAB sp.KE3*, *Ent.faecium KE5*, *LAB sp.KG5* (MRS, среда на основе сыворотки). Антимикробные активности метабитиков при культивировании на разных питательных средах при температуре 42 °C различаются.

Показана различная устойчивость метабитиков к термической обработке при температуре 121°C в течении 20 минут. Устойчивость к обработке при температуре 121°C, 20 минут и проявление антимикробной активности при pH=6,0 свидетельствует о наличии бактериоцинов в составе метабитика. Показана различная эффективность подавления роста патогенных штаммов (*St.aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, *Klebsiell sp.*, *Pr. vulgaris*, *E.coli*) метабитиками (100 AU/мл). Эффективность подавления роста зависит от источника выделения патогенных бактерий, природы метабитиков, полученных из концентратов КЖ бактерий, выделенных из молока разных животных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что антибиотики цефалотин, налидиксовая кислота, аугментин, ципрофлоксатин, левомицетин могут быть заменены

метабиотиками штаммов *Ent.faecium* KA1 и *L.helveticus* KG5 для подавления роста штаммов *E.coli*. Антибиотики гентамицин, цефалотин, цефутоксим, цефазолин, ципрофлоксацин, азитромицин можно заменить метабиотиком штамма **LAB sp. KV15-2** для подавления роста штаммов *St. aureus*.

Наличие пробиотических свойств: выживаемость штамма *Ent. faecium* KE5 при высоких значениях pH, адгезивность штамма, устойчивость к антибиотикам, высокая эффективность подавления роста патогенных антибиотикрезистентных штаммов и др., позволяет предположить о перспективности использования данного штамма в качестве пробиотика для лечения заболеваний ЖКТ.

Высокие значения протеолитической и антимикробной активности штаммов *Ent. faecium* KA3, *Ent. faecium* KE5, *Ent. faecium* KE6, *Ent. durans* KE10 при их совместном выращивании в молоке позволяют рекомендовать эти штаммы к использованию в качестве заквасок для получения продуктов функционального питания. Метабиотик штамма **LAB sp.KG-1**, подавляющий рост микрофлоры, инфицирующей пищевые продукты, может быть рекомендован к использованию в биоконсервации ряда пищевых продуктов, что открывает перспективы коммерциализации данного штамма.

Научно-производственные испытания показали возможность применения выбранной ассоциации штаммов *Ent.durans* P13 и *L.helveticus* KG5 в производстве нового кисломолочного продукта.

Таким образом, исследования МКБ. выделенных из молока разных домашних животных Арцаха и исследование свойств синтезируемых ими метабиотиков, показали их преимущество по сравнению с МКБ, выделенными из молока коров того же региона.

AREVIK LEVON ISRAYELYAN

INVESTIGATION OF LACTIC ACID BACTERIA AND THEIR METABIOTICS ISOLATED FROM MILK OF DIFFERENT DOMESTIC ANIMALS OF ARTSAKH

SUMMARY

Keywords: Lactic acid bacteria, milk, domestic animals, probiotic properties, metabiotics.

For the first time 98 strains of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from milk of different domestic animals (goats, donkeys, buffalo, sheep) of the rural households of the Republic of Artsakh. Bacteria were mainly represented by mesophilic (60%) and thermophilic (40%) species. The correlation of coccoid and rod-shaped forms was 9:1, which may be due to the climatic conditions of Artsakh.

Selected LAB strains differed in their probiotic properties: resistance to different concentrations of bile, survival in a wide range of pH and in the presence of enzymes (pepsin, trypsin) the presence of antioxidant and adhesive activity, resistance to antibiotics, the ability to inhibit the growth of pathogenic antibiotic resistant microflora isolated from patients and microflora, causing spoilage of food products. Investigations have shown that bacteria, isolated from donkey's milk significantly differ by their probiotic properties from the LAB, isolated from the milk of other domestic animals. Genotyping of the selected strains by sequencing 16S RNA genes showed

that LAB, isolated from milk of domestic animals (goats, sheep, buffalo, sheep) are mainly represented by strains of *Enterococcus* genus.

The culture liquids of the selected bacteria were purified by gel filtration method (Sephadex G25) and fractions with antimicrobial properties (metabiotics) were obtained. It is shown that their quantitative yield depends on the species belonging to the strain and on the animal type from the milk of which the LAB are isolated. *Ent. faecium* **KE5** LAB strain which isolated from donkey's milk, synthesizes more metabiotics than all other investigated strains.

The dependence of the synthesis of metabiotics from the composition of the nutrient medium is shown during the growth of strains *LAB sp.KE1*, *LAB sp.KE3*, *Ent.faecium KE5*, *LAB sp.KG5* (MRS and media on the basis of whey). Antimicrobial activities of metabiotics during cultivation on different nutrient media at temperature of 42 °C are differ.

The different resistance of metabiotics to heat treatment at a temperature 121°C during 20 minutes is shown. Stability to treatment at temperature of 121°C for 20 minutes and display of antimicrobial activity at pH =6.0 indicates about presence of bacteriocins in the composition of a metabiotic. The different efficiency of inhibition of the growth of pathogenic strains (*St.aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, *Klebsiella sp.*, *Pr. vulgaris*, *E. coli*) determined for metabiotics (100AU/ml). The effectiveness of growth inhibitor depends on pathogenic bacteria isolation source, from nature of metabiotics, obtained from concentrates of CL of bacteria, isolated from milk of different animals.

Obtained data shown, that the antibiotics Cefalotin, Nalidixic acid, Augmentin, Ciprofloxacin, and Levomycitin can be substituted with the metabiotic of *Ent. faecium* **KAP1** and *L.helveticus* **KG5** strains for inhibition of the growth of *E.coli* strains. Gentamicin, cefalotin, Cefuroxime, cefazolin, ciprofloxacin, azithromycin antibiotics can be substituted with a metabiotic of the strain *LAB sp. KV15-2* for the for the inhibition of the growth of *St.aureus* strains.

Presence of probiotic properties: survival of strain *Ent. faecium* **KE5** at high pH values. the adhesive activity of the strain. resistance to antibiotics. the high effectiveness of the growth inhibition of pathogenic antibiotic-resistant strains. etc.. suggests the prospect of using this strain as a probiotic for the treatment of gastrointestinal disease.

High values of proteolytic and antimicrobial activity of *Ent. faecium* **KA3**, *Ent.faecium* **KE5**, *Ent. faecium* **KE6**, *Ent. durans* **KE10** strains during their combined cultivation in the milk allow us to recommend these strains for using as starter cultures for the production of functional food. The metabiotic of *LAB sp. KG1* strain, which suppresses the growth of food contaminating microflora, can be recommended for using in bioconservation of a number of food products, which opens the perspective of commercialization.

Scientific and industrial tests have shown the possibility of application of the selected association of *Ent.durans* **P13** and *L.helveticus* **KG5** strains for the production of new dairy product.

Thus, the investigation of the LAB, isolated from the milk of different domestic animals of Artsakh and properties of metabiotics synthesized by them, showed their advantage in comparison with the LAB, isolated from milk of cows of the same region.