

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

---

На правах рукописи

ЛИ ХАО (КНР)

**ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ  
ШТАММОВ *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII*  
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА ХЛЕБА**

Специальность 03.00.07 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2009

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук Рыжкова Евгения Петровна (03.00.07)

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук Ушакова Нина Александровна

кандидат биологических наук Бонарцева Гарина Александровна

**Ведущее учреждение: Московский государственный университет пищевых производств, кафедра «Биотехнология»**

Защита диссертации состоится **23 октября 2009 г.** в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, корп. 12, Биологический факультет, **аудитория 557.**

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан “ **10** ” сентября 2009 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Н.Ф. Пискункова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Выявление микроорганизмов-пробиотиков, изучение их пробиотически значимых свойств, исследование воздействия на физиологию макроорганизма (**животного и человека**), создание новых способов применения как биоконсервантов пищевых продуктов – всё это в целом современная обширная проблема, которую решают специалисты разных областей. Актуальность её определяется стремлением людей к экологическим (биологическим) подходам в поддержании здоровья: сокращению применения химических препаратов (химиотерапия) и любых ксенобиотиков, включая антибиотики. И это действительно возможно: лечение многих заболеваний достигается с помощью пробиотиков именно потому, что они настраивают (регулируют) иммунную систему человека (животных), способны нормализовать микробиоту желудочно-кишечного тракта благодаря избирательной антимикробной активности (без антибиотиков), вызывать апоптоз некоторых опухолей. Последнее относится и к пропионовокислым бактериям (ПКБ), действующим, например, против аденокарциномы прямой кишки [Jan et al., 2004]. Все эти наблюдения и достигнутые результаты исследователей в Мире по сути инициированы русским учёным, лауреатом Нобелевской премии 1908 г., И. И. Мечниковым, который в своё время «вылечил Балканы» от желудочно-кишечных заболеваний с помощью только одной полезной бактерии: *Lactobacillus delbrueckii*.

Понятие «пробиотик» в настоящее время расширяется по смыслу по сравнению с первоначальным [Rolfe, 2000; Шендеров, 2001; Nomoto, 2005; Суворов, 2007; Adams, Huang, 2008] и по определению ВОЗ (2002) подразумевает живой микроорганизм, поступивший в организм естественным путём, улучшающий его общее физиологическое состояние. Пробиотики в настоящее время условно подразделяют на три категории: антимикробные, иммуномодулирующие и метаболические [Суворов, 2007]. Возможно и комплексное воздействие пробиотических микроорганизмов. Пробиотики могут быть индигенными (резидентными, автохтонными) или транзиторными, которые проявляют неспецифическую слабую адгезию на эпителии и не колонизируют его.

Пробиотическое действие обусловлено видом микроорганизма, его метаболизмом. Биологической особенностью классических ПКБ (по сравнению, например, с МКБ) является способность продуцировать ряд метаболитов-нутрицевтиков, включая витамины группы В, в том числе фолиевую кислоту, витамин В<sub>12</sub> [Воробьёва, 1976; Hugenholtz, 2002] и бифидогенные факторы [Kaneko et al., 1994; Isawa et al., 2002; Warminska-Radiko et al., 2002], выделение пропионовой кислоты (пропионатов) и полипеп-

тидов, обладающих антимикробными [Holo et al., 2002] и антимуtagenными свойствами [Vorobjeva, 2000], наличие в клетках ферментов-антиоксидантов [Краева, Воробьёва, 1981] и другое. В последнее время выявляется штаммовая специфичность пробиотических эффектов микроорганизмов [Warminska-Radiko, 2002; Lan et al., 2007; Kekkonen et al., 2008]. Поэтому выявление новых пробиотиков, в том числе среди штаммов *P. freudenreichii*, актуально.

Микробиологическая защита пищевых продуктов от порчи всегда актуальна и является альтернативой применению вредных для человека химических препаратов и дорогостоящих физических факторов. Она во все века применялась человеком (эмпирически, без знания микробиологии), например, сыроделие, в котором ПКБ участвуют, зародилось как способ консервирования молочного белка, казеина, а не как производство деликатесов. Вместе с тем, разработки новых способов ведут к улучшению результатов в плане эффективности защиты пищевых продуктов и её безопасности, особенно если в основе способов лежит знание биологии микроорганизмов. Именно это актуально.

Классические или «молочные» пропионовокислые бактерии в настоящее время активно прокладывают себе путь в обоих этих направлениях.

Безопасность *P. freudenreichii* признаётся Европейским комитетом (European Food Safety Authority, EFSA), основанном в 2002 году: статус QPS (Qualified presumption of Safety, <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/en.html>). Комитет США (Food and Drug Administration) также недавно включил эту бактерию в список GRAS (Generally Recognized AS Safe) под номером: 21 CFR133.195 [Lan et al., 2007].

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы явилось обнаружение действия исследуемых штаммов классических пропионовокислых бактерий (р. *Propionibacterium*) в качестве пробиотиков, начальное изучение их пробиотически значимых свойств и разработка новых способов защиты пшеничного хлеба от гнилостного поражения.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) идентифицировать имеющиеся в лаборатории штаммы ПКБ с применением молекулярно-биологического метода (сиквенс фрагментов гена 16S рРНК) и филогенетического анализа;
- 2) исследовать жизнеспособность штаммов пропионовокислых бактерий в условиях модели желудочно-кишечного тракта;
- 3) испытать штаммы ПКБ на животных в отношении их действия как возможных про-

биотиков;

4) оценить пробиотически значимые свойства исследуемых штаммов пропионовокислых бактерий: их иммуностропную, антимикробную, антиоксидантную активности, а также способность к образованию некоторых специфических полезных экзометаболитов;

5) разработать основы накопительной заквасочной технологии производства пшеничного хлеба, устойчивого к бактериальной деструкции («картофельной болезни»)

### **Научная новизна работы**

Биология классических пропионовокислых бактерий достаточно полно изучена. Она позволяет прогнозировать их активность в качестве пробиотиков. *P. jensenii* 702 уже признана эубиотиком, способным к адгезии на слизистой и размножению в ЖКТ [Adams, Huang, 2008]. Вместе с тем адгезия и колонизация эпителия рассматривается как полезное, но необлигатное пробиотическое свойство. Более важным является выживаемость и функциональная активность полезного для человека (животного) транзитного микроорганизма в ЖКТ. Научные предпосылки указывают на штаммовую детерминированность тех или иных свойств бактерий-пробиотиков. Штаммы *P. freudenreichii* ещё не получили статуса истинного или автохтонного пробиотика (эубиотика), однако немногочисленные испытания, в том числе и проведённые в нашей работе, свидетельствуют о пробиотическом действии этой бактерии на организм животного. Важное значение работы состоит в оценке и обобщении имеющейся в литературе информации по биологии и пробиотически значимым свойствам классических ПКБ.

Новизна настоящей работы состоит, во-первых, в оригинальной оценке выживаемости бактерий - кандидатов в пробиотики в агрессивной среде ЖКТ при использовании разработанной нами модели, а также в обнаружении положительного воздействия *P. freudenreichii* на организм животного на примере птицы; во-вторых, в выявлении пробиотически значимых свойств (в жидких культурах, культуральных жидкостях и в суспензиях живых клеток) новых изолятов классических ПКБ, которые были филогенетически идентифицированы нами как штаммы *P. freudenreichii*. Так, показано, что *P. freudenreichii* подавляет развитие как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, причём в нейтральной среде, за счёт пропионатов и бактериоцин-подобных веществ. Проведена оценка внеклеточного содержания витамина В<sub>12</sub> и активности некоторых экзоферментов. Впервые выявлены антиоксидантные свойства жидких культур *P. freudenreichii*, что существенно для их пробиотического действия в ЖКТ, и пока-

зана иммуотропная активность клеток бактерии (результаты получены практически одновременно с финскими исследователями). Эти наблюдения свидетельствуют о возможности реализации биологии классических ПКБ в ЖКТ животных, определяющей пробиотические эффекты.

В-третьих, при разработке заквасочного способа применения бактерии для защиты пшеничного хлеба от гнилостного поражения обнаружили способность *P. freudenreichii* развиваться на мучной среде только вслед за МКБ. Установили, что трофическая цепь между *Lactobacillus delbrueckii* и *P. freudenreichii* на мучной среде действует. Предварительное культивирование термофильной молочнокислой бактерии обеспечивает развитие пропионовокислой культуры, предположительно, вследствие накопления лактатов и ферментативной модификации белков мучной среды с образованием стимуляторов её роста.

### **Практическая значимость работы**

Полученные научные результаты показывают целесообразность использования наших штаммов *P. freudenreichii* в пробиотических препаратах.

Исследованные штаммы *P. freudenreichii* готовы для испытаний в качестве пробиотических препаратов, которые могут быть применены как в животноводстве, так и в клиническом или профилактическом питании пациентов-добровольцев. Поскольку данные бактерии, скорее всего, транзиторные пробиотики, их потребление должно быть перманентным (периодическим) при высокой исходной концентрации клеток (не менее  $10^8$  -  $10^9$ ) и их экзосметаболитов.

Выявленные пробиотические эффекты и свойства исследуемых штаммов *P. freudenreichii* позволяют использовать их в пищевой промышленности в качестве био-консервантов не только с уверенностью в безопасности, но и достигая обогащения пищевых продуктов клетками-пробиотиками и их полезными экзосметаболитами.

Разработан способ приготовления пшеничного хлеба, устойчивого к «картофельной болезни», с использованием пропионовокислой закваски, которую можно накапливать в условиях хлебозаводов перед внесением в дрожжевое тесто на мучной среде в требуемом количестве. Этот удобный и экономичный способ включает трофическую цепь между *L. delbrueckii* и *P. freudenreichii*. Он даёт возможность накапливать пропионовокислую закваску в нестерильных условиях (без контаминаций), которая содержит натуральные пропионаты, в геометрической прогрессии путём её двукратного разбавления свежей мучной средой, предварительно ферментированной *L. delbrueckii*. Способ испытан в условиях, соответствующих производственным. Достигнуты практически важные результаты в хранении хлеба и улучшении его качества

(способ патентуется).

### **Апробация результатов**

Результаты диссертационной работы были доложены на Всероссийском симпозиуме «Автотрофные микроорганизмы». Москва. МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, декабрь 2005; на Международном Конгрессе «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания». Санкт-Петербург, май 2007 г.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Исследуемые штаммы безопасны для животных и человека на основании их принадлежности к *Propionibacterium freudenreichii*.
2. Выживаемость исследуемых штаммов *P. freudenreichii* в модельной пищеварительной системе даёт возможность их применения в качестве метаболизирующих пробиотиков.
3. Пробиотическое действие в отношении животного организма выявлено на примере двух исследуемых штаммов.
4. Пробиотически значимые свойства исследуемых штаммов *P. freudenreichii*: иммуностропная, антиоксидантная, избирательная антимикробная активности, а также образование полезных внеклеточных соединений (в том числе бактериоцин-подобных веществ, витамина В<sub>12</sub> и некоторых экзоферментов) служат объяснению их общего пробиотического действия.
5. Применение ПКБ для защиты пшеничного хлеба от поражения гнилостными бактериями на основе заквасочной технологии (в крупномасштабном производстве хлеба) может быть успешно реализована с использованием трофической цепи между *L. delbrueckii* и *P. freudenreichii*.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, получено положительное решение по заявке на Патент РФ.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация содержит: Введение, Обзор литературы, раздел Объекты, материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы (всего **141** наименование), Список публикаций соискателя. Работа изложена на **174** страницах, включает 16 таблиц, 28 рисунков и список сокращений.

**Работа выполнена в рамках Договора № 5 (2006-2009 гг)** о научном и учебно-методическом сотрудничестве между Биологическим факультетом МГУ имени М.В. Ломоносова и Институтом систематики и экологии животных СО РАН (куратор Сереб-

ров В.В.).

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### Объекты, материалы и методы

В работе использовали штаммы классических бактерий р. *Propionibacterium* (рабочее обозначение Pr 1- Pr 7), ранее изолированные из Швейцарского сыра, которые фенотипически существенно различаются между собой. Для их видовой идентификации применили молекулярно-биологический метод, основанный на ПЦР гена 16S рРНК и включающий анализ продуктов ПЦР при помощи электрофореза в геле агарозы, выделение, очистку и секвенирование фрагментов генов длиной более 1300 нуклеотидов. Филогенетический анализ штаммов ПКБ на основе установленной последовательности генов проведён с использованием базы данных GenBank по последовательностям генов 16S рРНК. Работу проводили на базе Центра «Биоинженерия» РАН.

Культивирование бактерий р. *Propionibacterium* Pr 1 - Pr 7 проводили при 30° С периодическим способом (в колбах Эрленмейера, 70% заполнение объёма) при свободном доступе воздуха (статичная культура, концентрация кислорода ~ 0,024 мМ или 0,7 мг/л) на жидких средах нескольких вариантов, а также на «твёрдой» среде.

ГКС = глюкозо-кукурузная среда («богатая»), на которой поддерживали, временно (до 3-х месяцев при + 6°С) хранили культуры ПКБ и использовали в опытах.

ГКС-тв = среда ГКС с добавлением агара и мела. Инкубирование засеянной ГКС-тв на чашках Петри проводили в течение 5 - 6 суток при 30°С в анаэроустате.

ЛКС = лактатно-кукурузная среда имела тот же состав, что и ГКС, но вместо глюкозы был взят лактат натрия.

мСС = минимальная синтетическая или глюкозо-минеральная среда содержала глюкозу, соли и витамины: пантотенат кальция, тиамин и биотин. Концентрация хлористого кобальта – 1,0 мг/л. Вода дист.; рН 6,8–7,0. Время культивирования варьировали от 48 до 96 часов.

пСС-А = полусинтетическая среда: глюкозо-минеральная среда (мСС), обогащённая триптоном или пептоном, содержит 1,0 мг/л хлористого кобальта.

пСС-Б = то же, соль кобальта – 0,1 мг/л.

Выживаемость штаммов *P. freudenreichii* в агрессивной среде ЖКТ оценивали используя в качестве реактора (модельный ЖКТ) резервуар, содержащий овсяные хлопья «Геркулес» в качестве пищи, желудочный сок (аптечный) или/и эмульсию желчи (аптечной) в разных сочетаниях. Время инкубирования варьировали. Температуру поддерживали равной 36,6°С. Перед контрольными высевами ПКБ рН среды доводили до нейтрального значения. Анализ микробиологической чистоты культур проводили с помощью светового микроскопа Laboval-4 (Zeiss, Germany) в фиксированных окрашенных препаратах. Количественную оценку роста осуществляли по A<sub>540</sub> (Specol 10, Germany),



а также по КОЕ/мл.

Пробиотические эффекты в отношении животного организма (на примере перепелов) оценивали по показателям развития, сохранности и продуктивности птицы при ежедневном введении в питьевую воду КЖ штаммов Pr 2 и Pr 4 из расчета 0,1 мл на голову в сутки в течение 10 суток. Выборка птицы по принципу аналогов составила 50 голов. Базой для испытаний служила перепелиная ферма: физиологический двор ГНУ СибНИПТИЖ СО Россельхозакадемии.

Иммунотропную активность исследуемых штаммов ПКБ выявляли и измеряли по концентрации цитокинов, образуемых в крови *ex vivo* [Рябичева и др., 2006] под влиянием введённых клеток ПКБ. Концентрацию цитокинов определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа производства ЗАО «Вектор-Бест» (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Положительным контролем являлся коммерческий препарат «Иммунал». Количественным параметром служило соотношение концентрации цитокина в пробе с препаратом к концентрации цитокина в пробе без препарата, т.е. отношение индуцированной продукции цитокинов к спонтанной продукции (индекс стимуляции, ИС).

Обнаружение внеклеточного витамина B<sub>12</sub> (суммарных корриноидов) у штаммов *P. freudenreichii* Pr 1 - Pr 7, выращенных на пСС, с увеличенной концентрацией хлористого кобальта (5,0 мг/л), было сделано спектрофотометрическим сканированием их КЖ, а также растворов белков, сконцентрированных после высаливания сульфатом аммония из КЖ. Критерием присутствия корриноидов служило появление абсорбции в области длины волны 360 нм в результате обработки препаратов раствором нитрита натрия [Канопкайте, 1978; Pratt, 1982; Канопкайте, Рачкус, 1991]. Измерение концентрации корриноидов (суммарных соединений группы витамина B<sub>12</sub>) в КЖ проводили микробиологическим методом с тест-культурой *E. coli* 113-3, ауксорофу по B<sub>12</sub> или метионину. Чувствительность метода – 0,025 нг.

Общую активность протеолитических ферментов свежеприготовленных культуральных жидкостей ПКБ (в нейтральных и кислых условиях) измеряли спектрофотометрическим методом с использованием искусственного субстрата: азоказеина, который в своём составе содержит азокраситель, высвобождаемый при гидролизе белка [Vinokurov et al., 2006]. Измерение активности выполнили в Отделе биохимии белков Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова.

Суммарную активность липолитических ферментов в КЖ штаммов ПКБ, выращенных на мСС, измеряли также по гидролизу хромогенного субстрата – *пара-*

нитрофенилбутирата. Метод основан на спектрофотометрическом измерении концентрации пара-нитрофенола, который выделяется при гидролизе синтетического субстрата под действием липазы. Анализ проводили в лаборатории проф. С.П. Синеокого (ВКПМ).

Антимикробную активность штаммов *P. freudenreichii* исследовали по отношению к некоторым микроорганизмам-мишеням, которые культивировали при 30°C на следующих средах:

МКБ-пСС или МРС - полусинтетическая среда для молочнокислых бактерий (г/л) глюкоза – 20; пептон – 10; дрожжевой экстракт – 5,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 5,0; КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,1; микроэлементы (мг/л) MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 5,0 или MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 4,0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,01; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,005; вода дист., pH 6,8.

Среда А для *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. (г/л) глюкоза – 20; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 5,0; КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,1; микроэлементы (мг/л); вода дистиллированная; pH 6,8-7,0.

Среда В для *E. coli* и *Pseudomonas* sp. (г/л): глюкоза – 20; пептон – 1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,0; КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,25; дрожжевой экстракт – 1,0; микроэлементы (мг/л) MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 5,0 или MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 4,0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,01; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,005; вода дистиллированная; pH 6,8-7,0.

Среда С для *S. cerevisiae* (г/л) глюкоза – 60, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 5,0, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1,5, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O – 0,5, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>· 4 H<sub>2</sub>O – 0,1, кукурузный экстракт – 1,0, микроэлементы (мг/л): MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 5,0 или MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 4,0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,01, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,005, вода дистиллированная; pH 6,8-7,0.

Плотные среды, используемые для газонов бактерий-мишеней при анализе АНМФ: *Bacillus subtilis* и *B. cereus* культивировали на среде А с добавлением 2% агара, поддерживали на скошенном картофельном агаре. Аэробный рост газонов бацилл – 24 ч при 30°C. На поверхность среды наносили по 1 капле жидких культур.

*B. coagulans* растили на среде: (%) NaCl – 1,0; пептон – 1,0 с добавлением бульона Хоттингера [Стоянова и др., 2006]. Аэробный рост – 24 ч при 55°C.

*Pseudomonas* sp. и *E. coli* растили также аэробно на плотной среде В при 30° менее суток.

Для молочнокислых бактерий на чашках использовали среду МРС с добавлением агара (2%) и мела (0,5%). *L. plantarum* и *L. fermentum* растили анаэробно (в анаэро-статах), остальные МКБ – в присутствии воздуха. Выращивали в течение двух суток.

Качественный и количественный анализ ЛЖК (пропионовая и уксусная кислоты) проводили методом газовой хроматографии с использованием аппаратно-программируемого комплекса на базе газового хроматографа «Кристалл 2000М», производитель СКБ «Хроматэк», г. Йошкар-Ола, Россия. Параметры колонки НР FFAP составляли 50 x 0,32 x 0,5 мм. Детектор – пламенно-ионизационный. Образцы готовили путем перевода солей ЛЖК в форму кислоты. Концентрацию молочной кислоты измеряли методом ВЭЖХ.

Выявление бактериоцин-подобных веществ (БПВ). Культуры выращивали на разных средах. В первом опыте – на ГКС в течение 4-х суток. В последующих опытах

по выявлению бактериоцинов – на мСС в течение 5 - 6 суток. КЖ штаммов ПКБ получали центрифугированием культур при 17000 об/мин (30000g), 20 мин с охлаждением. Центрифуга фирмы «Beckman» (США), модель J2-21. Диализ проводили в 0,02 М К-фосфатном буфере с использованием бензоилированных диализных мешков фирмы «Sigma» (США) с размером пор, пропускающих молекулы от 1200Да и менее. Осаждение полимеров из КЖ культур, выращенных на мСС, проводили постепенным добавлением (на магнитной мешалке) насыщенного раствора сульфата аммония до конечной концентрации насыщения 77% при комнатной температуре. Осадки собирали на мембранных фильтрах с диаметром пор 0,4 мкм, перерастворяли в 0,02 М К-фосфатном буфере рН 7,0, диализовали ночь при 6°С. Диализное соотношение 1:200. Измеряли концентрацию белка и обрабатывали протеиназой К фирмы «Amresco» (США)/«Helicon» (Россия). Для выявления БПВ использовали метод диффузии в агар: в лунки ( $\varnothing = 0,8$  см) на свежесезанных газонах вносили препараты штаммов Pr 1 - Pr 7 по 0,1 мл КЖ. Два часа выдерживали при комнатной температуре и затем инкубировали при 30°С 18-20 ч или 42-48 ч (МКБ). Контроль за микробиологической чистотой культур ПКБ и микроорганизмов-мишеней проводили путём световой микроскопии с помощью микроскопа LABOVAL-4 (Carl Zeiss, Yean). Рост жидких культур измеряли на спектрофотометре “Specol”, model 10, Germany, при 540 нм и прямым подсчётом клеток в поле микроскопа и по КОЕ/мл.

$A_{540}$  (по суспензии клеток Pr 4) в 1 см кювете = 0,301 мг/мл АСБ =  $3,3 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Для оценки антиоксидантной активности использовали жидкие культуры штаммов *P. freudenreichii* (Pr 2) и *P. freudenreichii* (Pr 4), выращенные на мСС в течение 72 ч при 30°С при свободном доступе воздуха с периодической нейтрализацией образуемых кислот. Концентрация живых клеток в конце культивирования составляла (3-4)  $\times 10^9$  КОЕ/мл. Для измерения антиоксидантной активности штаммов бактерии использовали электрохимический метод катодной вольтамперометрии. Методика эксперимента заключалась в получении вольтамперограмм катодного восстановления кислорода с помощью портативного программируемого анализатора «Антиоксидант» (фирма «Полиант», г. Томск). В основе метода лежит модельная реакция электровосстановления  $O_2$ , протекающая на индикаторном электроде по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в тканях и клетках организмов, способных к кислородному дыханию. В данном способе (рН в измерительной ячейке 6,8-7,0) рассматривается одноэлектронное восстановление кислорода с образованием активных кислородных радикалов  $O_2^{\cdot -}$ . Снижение их концентрации в растворе регистрируется по уменьшению катодного тока ЭВ  $O_2$  на ртутно-пленочном электроде в области потенциалов от 0 до – 0,7 В. Измере-

ния проводили на каф. биофизики Томского гос. университета.

В процессе разработки способа приготовления хлеба, устойчивого к «картофельной болезни, использовали следующие мучные среды:

Мучная среда 1 (оМПЗ) или «осахаренная» мучная пшеничная заварка. Для приготовления оМПЗ пшеничную 2 сорта заваривали водой с температурой 85-90°C (соотношение мука:вода=1:3). После охлаждения заварки до 55°C вносят ферментные препараты  $\alpha$ -амилазы (Bakezyme P500BG, пр-во фирмы DSM, Германия) и глюкоамилазы (Bakezyme AG800BG, производство фирмы DSM, Германия) в количестве 0,001% и 0,01% к массе муки в заварке соответственно. Продолжительность гидролиза при температуре 55° С 1,5 часа.

Мучная среда 2 (МС 2). Среду готовили путем заваривания муки кипящей дрожжевой водой в том же соотношении и после охлаждения обрабатывали амилазами, как описано выше, а также протеолитическими ферментами (DSM Bakery Ingredients; Bakezyme B 500 (нейтральная бактериальная протеаза). Дозировка: 0,5 - 3,0 г/100кг.

Водный экстракт осахаренной мучной среды (ЭМС). Для приготовления ЭМС оМПЗ центрифугировали: 45 мин при 9000 тыс. об/мин. В результате получали прозрачный водный раствор, сводный от нерастворимых компонентов оМПЗ.

Экстракт мучной среды оМПЗ, предварительно ферментированный с помощью *L. delbrueckii*, обозначен как ЭМС/LD.

*Lactobacillus delbrueckii* штамм 40 получен из коллекции ГосНИИ ХП. Штамм депонирован в ВКПМ под номером В-3887. Бактерию поддерживали на солодовом сусле (12%) с дробинкой, культивируя 24 - 48 ч при 50 - 52°C. Выращенную культуру хранили при 6 - 10°C. В опытах *L. delbrueckii* культивировали (18 - 20 ч при 50°C) на оМПЗ.

Моделирование процесса накопления закваски на основе ПКБ для внесения её в дрожжевое пшеничное тесто состояло в последовательном (поэтапном) двукратном разбавлении культуры *P. freudenreichii*, выращенной на ЭМС/Ld, с помощью этой же среды. Значение pH сразу после разбавления поддерживали нейтральным. Накопление закваски в условиях, соответствующих производственным, проводили на натуральной нестерильной оМПЗ (без центрифугирования). Подавление развития контаминирующих муку молочнокислых бактерий достигалось предварительной 2 ч экспозицией смеси (на каждом этапе) в присутствии молочной кислоты, образованной *L. delbrueckii*.

Световую микроскопию фиксированных окрашенных препаратов проводили с помощью микроскопа Laboval-4, Zeiss, Germany. Компьютерное изображение получено с помощью микроскопа Axioskop (Zeiss, Germany) системы автоматического анализа изображений KS 300, Zeiss (Germany). Увеличение при съемке x1000.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с применением разных подходов в зависимости от количества повторных измерений. Среднее

арифметическое значение со стандартным отклонением вычисляли в опытах с большим количеством вариантов (программа SigmaPlot 3.02). Медиану (Me), т.е. среднее по величине показание с максимальным отклонением (в %), использовали в экспериментах с тремя повторностями [Венчиков, Венчиков, 1974].

## Результаты исследования

### 1. Секвенирование фрагментов 16S рРНК и филогенетический анализ исследуемых штаммов ПКБ

На основании подробного сравнительного филогенетического анализа с использованием базы данных GenBank были получены результаты, позволившие найти положения новым штаммам на филогенетическом дереве [Van de Peer, De Wachter, 1994]. Уровень гомологии последовательностей анализируемых штаммов с типовым штаммом *P. freudenreichii* DSM 4902<sup>T</sup> (GenBank AC number Y10819) был высоким, более 99 % (для Pr 4 = 99,6%). Все исследуемые штаммы вошли в кластер, образованный имеющимися в базе данных штаммами вида *P. freudenreichii*, включая типовые штаммы двух подвидов этого вида: *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* и *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* (рис. 1). Штаммы Pr 1 - Pr 7 имели близкие последовательности генов 16S рРНК с высоким процентом сходства между собой (99,3 - 99,6%). При этом секвенированные фрагменты генов 16S рРНК изучаемых штаммов обнаружили высокий уровень гомологий с аналогичными последовательностями различных штаммов *P. freudenreichii* (99,1 - 99,9%). Ранее столь же высокий уровень сходства генов 16S рРНК (доступных из базы данных GenBank) был обнаружен между штаммами, принадлежащими к различным видам рода *Propionibacterium*: не только *P. freudenreichii*, но и других, например, *P. acidipropionici* (98,9-100%) и *P. acnes* (98,1 - 100%). Следовательно, обнаруженный нами уровень сходства генов 16S рРНК исследуемых штаммов с известными представителями вида *P. freudenreichii* соответствует наблюдаемым уровням внутривидового сходства у других видов рода *Propionibacterium*. Согласно существующим представлениям [Stackebrandt, Goebel, 1994], этот уровень соответствует внутривидовому. При этом уровень сходства последовательностей изучаемых штаммов с представителями других (помимо *P. freudenreichii*) видов рода *Propionibacterium* был заметно ниже (91,1 - 95,7%). На основании полученных данных можно идентифицировать изучаемые штаммы Pr 1 - Pr 7 как представителей вида *P. freudenreichii*.

Штамм Pr 4 был заявлен в GenBank и зарегистрирован как *P. freudenreichii* RVS-4-irf (International GenBank AC number EU418709). Штаммы Pr 2 (*P. freudenreichii* RVS-2-ims) и Pr 4 (*P. freudenreichii* RVS-4-irf) депонированы в ВКПМ.

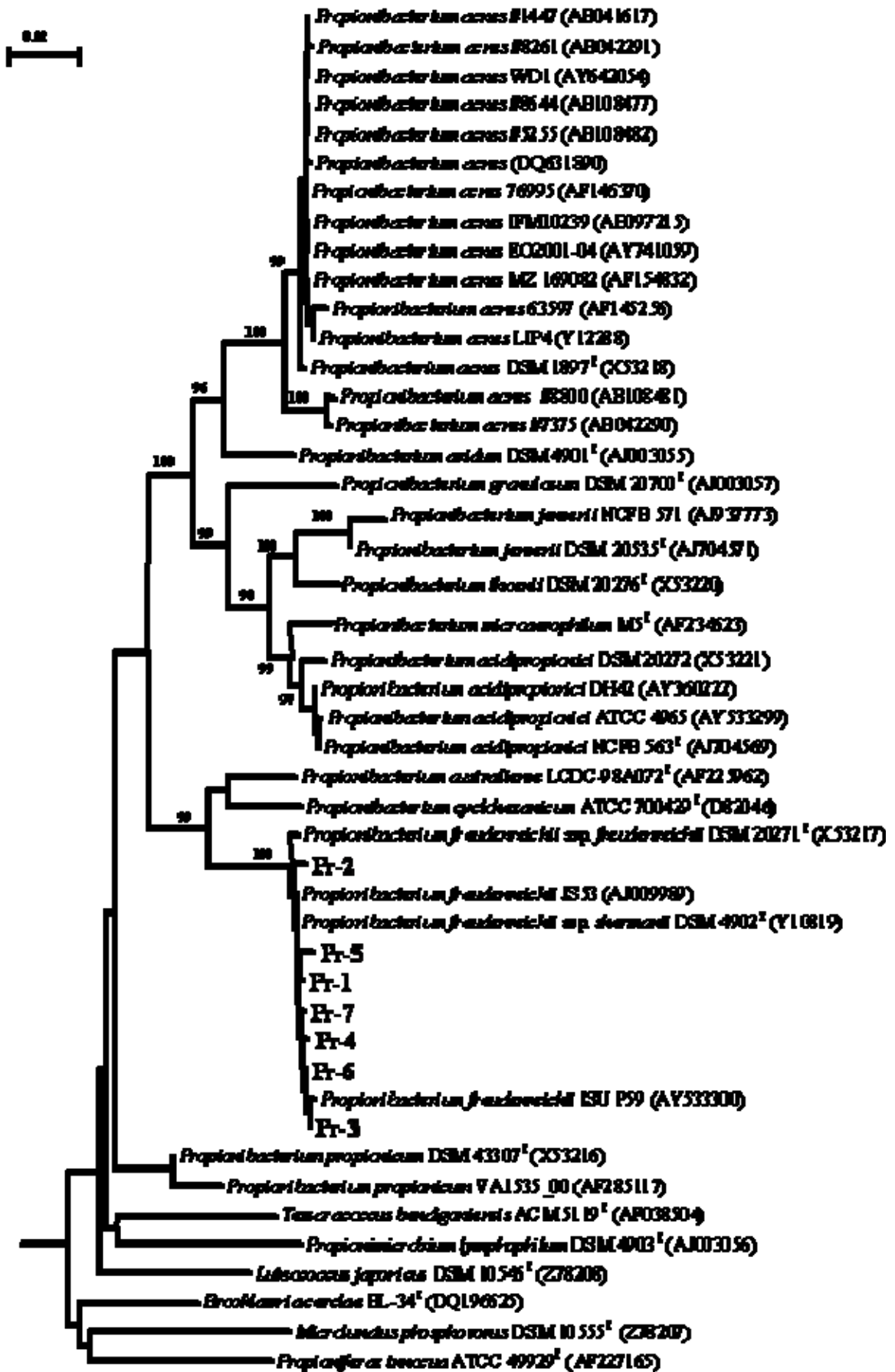


Рис. 1. Филогенетическое положение штаммов *P. freudenreichii* Pr 1 - Pr 7

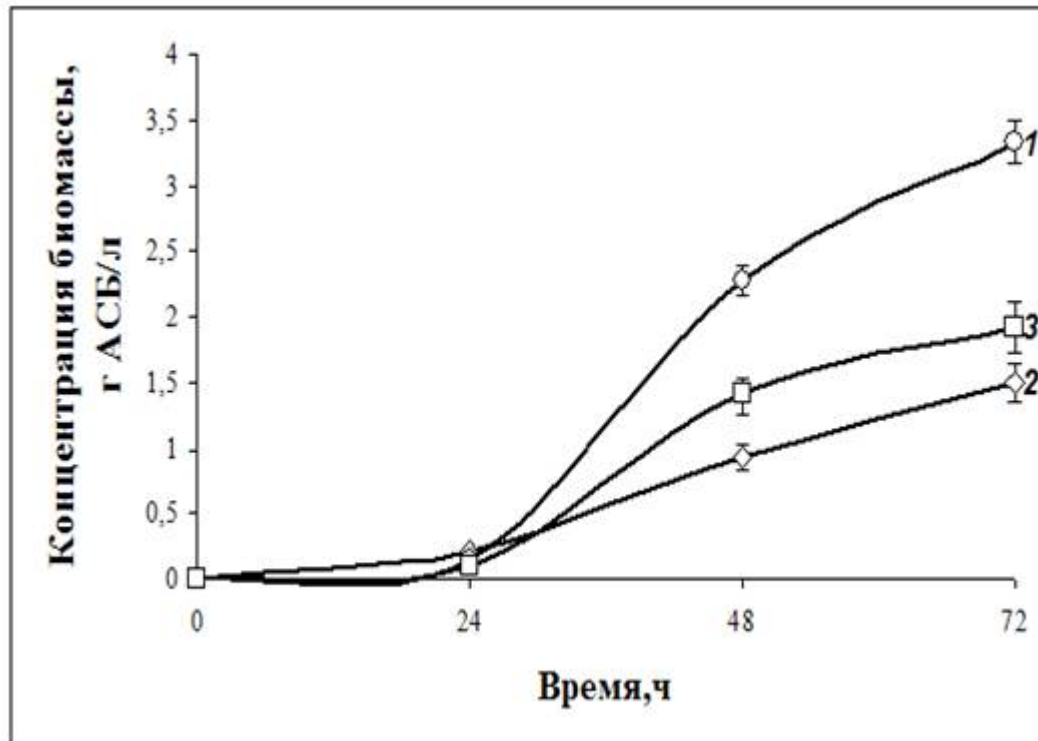
## 2. Пробиотически значимые свойства исследуемых штаммов *P. freudenreichii* и их действие на макроорганизм

### 2.1. Выживаемость штаммов *P. freudenreichii* в условиях модельного (неполного) ЖКТ

Наблюдали, что все семь штаммов исследуемых ПКБ росли на ГКС после их предварительного инкубирования (3 ч при температуре тела) в присутствии желудочного сока, который вводили в среду до конечного значения pH 2,5 - 3,0, или 0,5 - 1,0 % эмульсии желчи (конечный pH 8,0 - 8,4) после нейтрализации среды способны к росту.

Данные представленные на **рис. 2**, показывают, что после инкубирования клеток в условиях «желудка» или «тонкого кишечника», жизнеспособность культуры Pr 4 сохранялась. Снижение роста ПКБ на богатой среде по сравнению с контролем, очевидно, вызвано гибелью или инактивированием части клеток в агрессивных условиях.

Оценили уровень выживаемости ПКБ в неполном модельном ЖКТ (по концентрации живых клеток) в результате последовательного инкубирования в условиях «желудка» (3 ч, смесь А) и, после нейтрализации кислот, «тонкого кишечника» (5 ч, смесь Б). Перед вторым этапом инкубирования смеси хранили в течение ночи при 6°C и при нейтральном значении pH (**табл. 1**).



**Рис. 2.** Способность *P. freudenreichii* Pr 4 к росту на богатой среде (ГКС) после инкубирования в условиях искусственного желудка и (параллельно) тонкого кишечника:

1- контроль: рост на ГКС, в качестве посевного материала (10%) использовали 3-х су-



точную культуру, выращенную на ГКС; 2 - опыт: рост на ГКС после экспозиции культуры в реакторе с желудочным соком (модель “желудок”). 3 - опыт: рост на ГКС после экспозиции с желчью (модель «тонкий кишечник»).

**Таблица 1.**

Выживаемость *P. freudenreichii* Pr 4 в условиях модельного (неполного) ЖКТ

Повторные (независимые) эксперименты	До начала экспозиции (без инкубации), контроль 0-времени		После экспозиции (инкубация в смесях А→Б), опыт	
	КОЕ/мл	log % по log	КОЕ/мл	log % по log
1.	2,8 x 10 <sup>9</sup>	9 100	4,6 x 10 <sup>6</sup>	6 66,7
2.	3,7 x 10 <sup>9</sup>	9 100	1,0 x 10 <sup>6</sup>	6 66,7
3.	9,7 x 10 <sup>8</sup>	8 100	9,1 x 10 <sup>5</sup>	5 62,5
Среднее (Me)	3,7 x 10 <sup>9</sup>		1,0 x 10 <sup>6</sup>	

Таким образом, на примере *P. freudenreichii* штамм Pr 4 мы показали, что ПКБ более чем на 60% (по log КОЕ/мл) могут сохранять жизнеспособность в ЖКТ. Выживание в агрессивной среде ЖКТ клеток пропионовокислых бактерий – важное условие для проявления их пробиотического (метаболически обусловленного) действия в ЖКТ, а также основание для изучения их пробиотически значимых свойств.

## 2.2. Действие штаммов *P. freudenreichii* на макроорганизм

Мы провели испытания двух штаммов классических ПКБ (*P. freudenreichii*, Pr 2 и Pr 4) на развитие, сохранность и продуктивность птицы (перепелов). В результате проведённых исследований под влиянием введённой КЖ пропионовых бактерий наблюдали увеличение сохранности поголовья птицы, прирост живой массы и сокращение расхода кормов. Данные, полученные в экспериментах, представлены в таблице 2.

Таким образом, введение культуральной жидкости (экзометаболитов) штаммов *P. freudenreichii* в рацион животных обеспечивает повышение сохранности особей, стимулирует их развитие, снижает расходы корма на единицу продукции. По сути, в данном случае мы констатируем положительное действие экзометаболитов ПКБ, которые содержатся в культуральной жидкости, но не рассматриваем здесь вопрос о функции собственно живых клеток ПКБ в ЖКТ птиц.

Таблица 2.

Эффект культуральной жидкости *P. freudenreichii* двух штаммов на состояние птицы (перепела) в условиях фермы при введении в рацион

	Группа			
	Контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Сохранность, %	91	95	96	93
Живая масса в начале опыта, г	8,4±0,08	8,3±0,09	8,2±0,10	8,2±0,08
Живая масса в конце опыта, г	169,0±2,7	175,6±2,4	177,5±2,8	172,2±3,0
Прирост живой массы, г:				
Абсолютный	160,4±3,7	167,3±4,2	169,3±4,8	164,0±2,4
Среднесуточный	2,67±0,02	2,79±0,03	2,82±0,04	2,73±0,06
% к контролю	100	104,3	105,6	102,2
Потреблено кормов на 1 голову, кг	0,890	0,880	0,891	0,900
Затраты корма на 1 г прироста, г	5,55	5,26	5,26	5,49

Контроль — птицу содержали на стандартном рационе

I группа — птице дополнительно скармливали КЖ штамма Pr 2

II группа — птице дополнительно скармливали КЖ штамма Pr 4

III группа — птице (в качестве контроля) скармливали среду Блаурока.

Последнее требует специального изучения, однако полученные результаты позволяют прогнозировать положительный эффект цельных культур классических ПКБ на физиологию животных (и человека). Результаты данного эксперимента – показатель пробиотического потенциала классических пропионовокислых бактерий вида *P. freudenreichii*, а именно исследуемых штаммов.

### 2.3. Иммунотропные свойства исследуемых штаммов *P. freudenreichii*

Ранее было известно, что кожные (cutaneous) ПКБ, например, *P. acnes* и некоторые другие виды, способны проявлять иммунотропные свойства в отношении организма животного и человека [Воробьева, 1995]. Мы впервые наблюдали, что все семь исследуемых штаммов, которые принадлежат классической («молочной») ПКБ, *P. freudenreichii*, обладают иммунотропной активностью (в разной степени), и это являет-

ся проявлением одного из её пробиотических свойств. В исследовании применили модель *ex vivo*, в которой оценивали образование цитокинов в крови человека под действием клеток исследуемых штаммов классической ПКБ. Полученные результаты по образованию разных цитокинов (их абсолютные концентрации) под действием клеток семи штаммов представлены в рукописи диссертации. Результаты были получены в трёх независимых опытах при трёхкратном повторении измерений для каждого штамма. Стимуляция синтеза цитокинов (некоторых интерлейкинов ИЛ, интерферона ИНФ- $\gamma$ , фактора некроза опухолей, **ФНО- $\alpha$** ) клетками ПКБ как правило превышала таковую препаратом «Иммунал», особенно в отношении синтеза ФНО- $\alpha$ . В **табл. 3** представлены данные по ИС в отношении некоторых цитокинов.

**Таблица 3.**

Индекс стимуляции (ИС\*) образования некоторых цитокинов под действием клеток ПКБ (2 мкг/мл сырой биомассы) в системе *ex vivo*

Препарат ПКБ	Индекс стимуляции образования цитокинов			
	ИЛ 1-РА	ИЛ-8	ФНО- $\alpha$	ИНФ- $\gamma$
<b>Pr 1</b>	6,61	18,2	295,9	2,04
<b>Pr 2</b>	6,13	22,5	247,2	2,04
<b>Pr 3</b>	5,30	18,1	515,21	0,66
<b>Pr 4</b>	5,51	18,3	641,51	0,87
<b>Pr 5</b>	6,57	11,2	275,63	0,97
<b>Pr 6</b>	4,71	20,4	566,86	0,00
<b>Pr 7</b>	5,78	16,9	632,67	0,97
Иммунал (мкг/мл):				
300	0,33	8,65	2,80	0,51
30	0,00	4,46	2,95	0,77
3,0	0,00	1,60	2,51	0,41

\* ИС рассчитывали относительно показаний спонтанно образованных цитокинов в каждом отдельном эксперименте. Данные представляют собой медиану при отклонениях менее 10% для трёх вариант типичного из трёх независимых экспериментов.

Подтверждением полученным нами результатам служит работа, выполненная в Финляндии независимо и практически одновременно с нашей. На изолированных мононуклеарных клетках крови человека *in vitro* установлена способность клеток разных бактерий-пробиотиков (в том числе *P. freudenreichii* JS), взятых в соотношении 1:1 (клетки бактерий: моноциты), индуцировать синтез цитокинов. Эта способность сильно варьировала у разных штаммов бактерий [Kekkonen et al., 2008]. Для клеток другой классической пропионовокислой бактерии: *P. jensenii* 702, недавно показаны адью-

вантные эффекты (на крысах) в отношении вакцины на основе *Mycobacterium tuberculosis* [Adams, Huang, 2008].

#### 2.4. Внеклеточный витамин В<sub>12</sub> (корриноиды) и некоторые ферменты культуральной жидкости штаммов *P. freudenreichii*

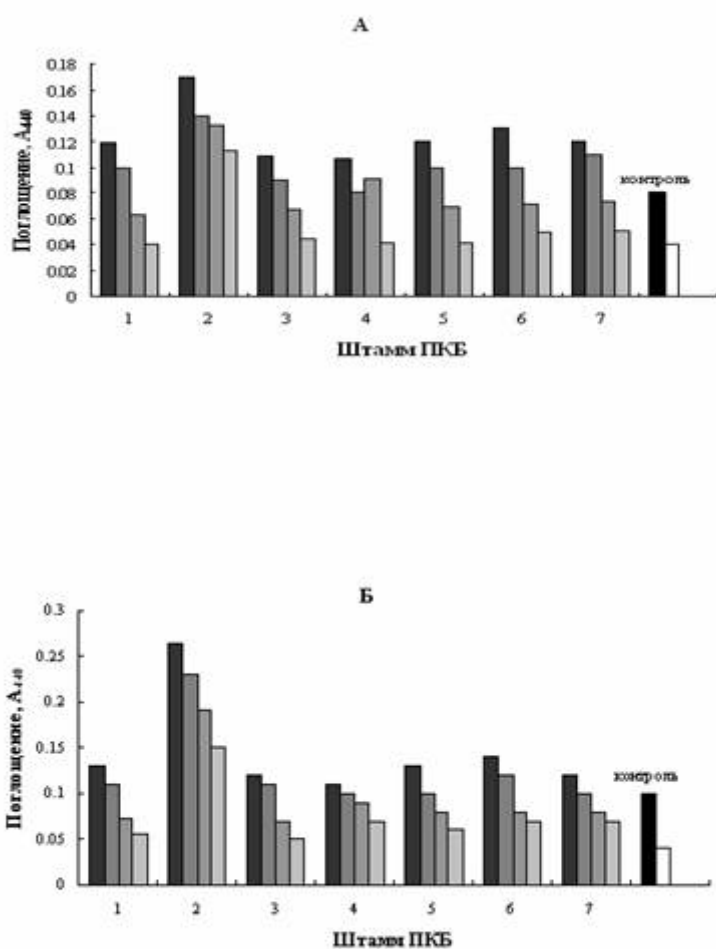
Экзометаболиты пробиотиков непосредственно влияют на метаболизм макроорганизма-хозяина в результате их всасывания в кровь, но и микроорганизмы, составляющие микробиоту ЖКТ, находятся под их влиянием. Среди экзометаболитов пробиотиков есть не только ингибиторы, так и стимуляторы (например, бифидогенные факторы) роста бактерий. ПКБ образуют широкий спектр метаболитов (см. таблицу 1 в рукописи диссертации), полезных для человека. Особое место среди них занимает витамин В<sub>12</sub>, который в животном организме участвует в двух метаболических процессах: биосинтезе метионина и катаболизме жирных кислот через пропионил-КоА. Он содержится внутри клеток ПКБ [Рыжкова (Иордан), 2003].

Мы попытались измерить его внеклеточное содержание в среде (мСС с повышенным содержанием соли кобальта) с тем, чтобы в предварительном плане оценить его доступность для клеток эпителия в ЖКТ. Наши исследования цельной КЖ и осаждённых из неё белков показали, что в среду выделяется очень малое количество соединений группы витамина В<sub>12</sub>. Оно на 3 - 4 порядка ниже, чем в клетках бактерии (по расчётам на единицу объёма культуры) и составляет 0,1 - 0,3 пг/мл. Поэтому ПКБ как источник внеклеточного витамина может иметь реальное значение, только если цельная культура будет поступать в ЖКТ в сконцентрированном виде.

Вместе с тем, КЖ штаммов *P. freudenreichii* проявили разную по величине протеолитическую активность (ПА), которая зависела от состава среды, времени культивирования и рН культуральной жидкости (**рис. 3**). При этом соотношение общих ПА (в 100 мкл КЖ) для штаммов в целом сохранялось. После вычитания контроля и с учетом концентрации белка в КЖ мы рассчитали удельные активности протеаз, которые выражали как А<sub>440</sub>/мг белка. Активность КЖ в нейтральных условиях была наибольшей у штамма Pr 2 (0,3); средней у штаммов Pr 1, 5 - 7 (0,13 - 0,16 - 0,2 - 0,16 соответственно) и наименьшей у штамма Pr 4 (0,1). В кислых условиях (рН 4,5) активность КЖ у всех штаммов была ниже, чем при значении рН, равном 7,0. Пробиотическое значение ПА штаммов *P. freudenreichii* может заключаться в протеолизе трудноперевариваемых белков, например, коллагена или гликопротеидов, если цельная культура будет поступать в ЖКТ животного в сконцентрированном виде.

Липолитическую активность, которая в принципе свойственна классическим ПКБ, развивающимся в сырах, выявить не удалось, возможно, из-за культивирования

бактерий в данных условиях опыта на минимальной среде без индукторов.



**Рис. 3.** Протеолитическая активность КЖ штаммов ПКБ. А. 48-ч культуры; Б. 96-ч культуры  
Обозначения: ■ - на ГКС, рН=7; ■ - на ГКС, рН<7; ■ - на МСС, рН=7; ■ - на МСС, рН<7; ■ - ГКС; □ - МСС

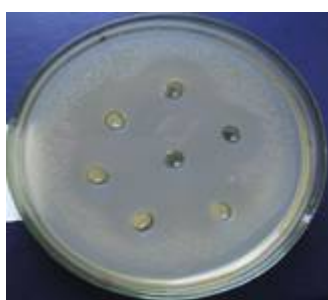
## 2.5. Избирательная антимикробная активность исследуемых штаммов *P. freudenreichii*

Поддержание (регуляция) баланса микробиоты в ЖКТ – сложный и малоизученный процесс. Однако именно он рассматривался как первейшая функция пробиотиков [Rolfe, 2000; Шендеров, 2001]. Здесь возникает двойственная проблема: пробиотики должны подавлять развитие нежелательных микроорганизмов в ЖКТ, но, по крайней мере, не влиять негативно на состояние автохтонных пробиотиков. Пробиотики условно подразделяют на иммуномодулирующие, метаболические и антимикробные [Суворов, 2007]. Классические ПКБ и, в частности *P. freudenreichii*, можно отнести ко

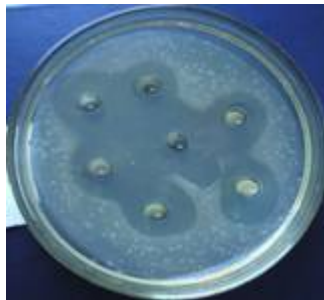
всем трём категориям. Антимикробная активность имеет большое значение для нормализации физиологического состояния животного и человека путём регулирования микробиоты ЖКТ.

Мы выявили подавляющее действие *P. freudenreichii* семи исследуемых штаммов (Pr 1- Pr 7), в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Некоторые из них (*E. coli*) могут вызывать дисбаланс микробиоты ЖКТ (колит). Другие имеют прямое отношение к порче пищевых продуктов (бациллы, псевдомонады). Отметим, что определённые штаммы *Bacillus subtilis* являются пробиотиками для животных, переваривающих клетчатку (работы группы д.б.н. Н.А Ушаковой), поэтому в случае подавления их развития ПКБ совместное их применение в комплексных препаратах нецелесообразно.

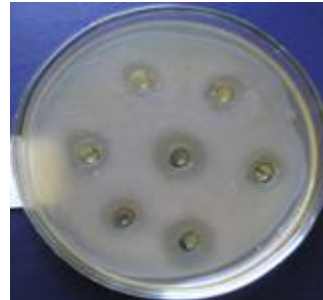
Испытывали цельные жидкие культуры штаммов ПКБ, выращенных на пСС среде при нейтральном значении pH. Наблюдали зоны подавления роста для следующих бактерий-мишеней: *Bacillus subtilis* 40, *B. cereus* 9, *Pseudomonas putida* 96, *Ps. aeruginosa* 50, *E. coli* 85, *E. coli* 109. Эффект подавления был наиболее выражен в отношении *B. subtilis*, *Ps. putida* и отсутствовал для *B. coagulans* (здесь не показано). На **рис. 4** выборочно представлены качественные данные по антибактериальной активности семи штаммов *P. freudenreichii*. Подавление роста патогенных энтеробактерий: *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* sp. и *Listeria monocytogenes*, разными штаммами классических ПКБ ранее установили исследователи из Польши [Warminska-Radiko et al., 2001; 2002; Laniewska-Troekenhem et al., 2004]. Антагонистическое действие ПКБ против некоторых мицелиальных грибов (плесеней) констатировано в Швеции [Lind et al., 2007]. Важным фактом оказалась толерантность *L. casei* к культуре *P. freudenreichii*, указывающая на возможную биосовместимость МКБ и ПКБ. При нейтральном значении pH антимикробными факторами (АНМФ) исследуемых штаммов *P. freudenreichii* явились пропионаты и впервые обнаруженные у изучаемых штаммов бактериоцин-подобные вещества.



*B. subtilis* 40



*Ps. putida* 9



*E. coli* 109

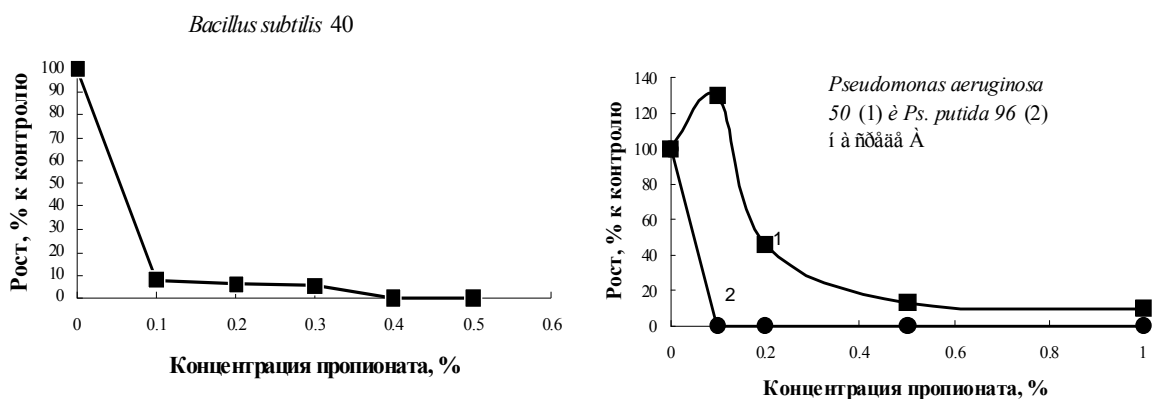


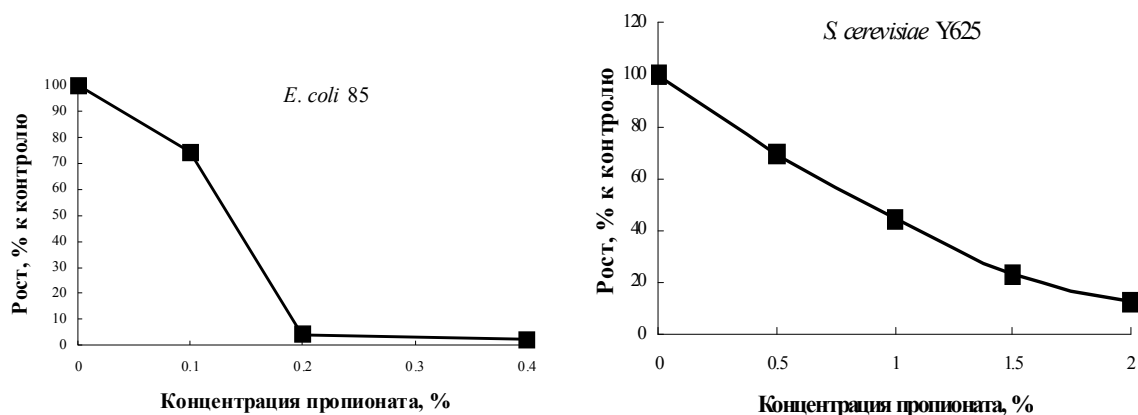
Рис. 4.

Влияние культур *P. freudenreichii* (Pr 1 - Pr 7) на рост некоторых бактерий-мишеней на плотных средах. Нижние фото: (слева) «вертикальный» штрих - *L. casei* C1; (справа) «вертикальный» штрих - *P. freudenreichii* Pr 4

Мы установили действующие концентрации пропионата натрия, вызывающие 90% подавление роста, на некоторые микроорганизмы-мишени, растущие на жидких средах. Данные выборочно представлены на рис. 5. Наибольшую чувствительность проявили штаммы р. *Bacillus* и *Pseudomonas*. Достаточно устойчивыми к П-На в высокой концентрации (0,5% и более) оказались дрожжи и молочнокислые бактерии (МКБ).

Выявленные разные действующие концентрации пропионата косвенным образом позволяют прогнозировать эффективность штаммов *P. freudenreichii* как антимикробных агентов в ЖКТ (в толстом кишечнике при рН, близком к нейтральному) против тех или иных микроорганизмов. Кроме того эти данные важны для применения ПКБ в качестве биоконсервантов.





**Рис. 5.** Выявление действующих концентраций пропионата натрия как АНМФ на рост микроорганизмов-мишеней

Испытание КЖ *P. freudenreichii* в аналогичных опытах с бациллами как мишенями показало её более сильное действие по сравнению с чистым пропионатом, взятом в тех же концентрациях, что и в КЖ. Это указывало на образование клетками данной пропионовой бактерии других АНМФ помимо пропионатов. Впервые у наших штаммов обнаружили антибактериальные экзометаболиты, отличные от ЛЖК и их солей, которые, предположительно, имеют полипептидную природу (молекулярная масса – более 1200 кДа) и действуют в нейтральной среде (**Таблица-схема 4**). Эти бактериоцин-подобные вещества (БПВ) проявили ингибирующее действие в отношении бактерий рр. *Bacillus* (штаммы Pr 1, Pr 4 - 7); *Escherichia (coli)* - штамм Pr 6; *Lactobacillus*: *L. casei* ( Pr 3), *L. acidophilus* (Pr 1, 3, 5); *L. plantarum* (Pr 1); *L. brevis* (Pr 1 - 6). Действия бактериоцин-подобных веществ различались, если препараты были получены при культивировании штаммов *P. freudenreichii* на разных средах (богатой или минимальной) и по-разному приготовлены. Оно также зависело от штамма бактерии-мишени.



**Таблица-схема 4.**

Выявление антибактериального действия белковых препаратов из КЖ штаммов ПКБ, выращенных на минимальной среде

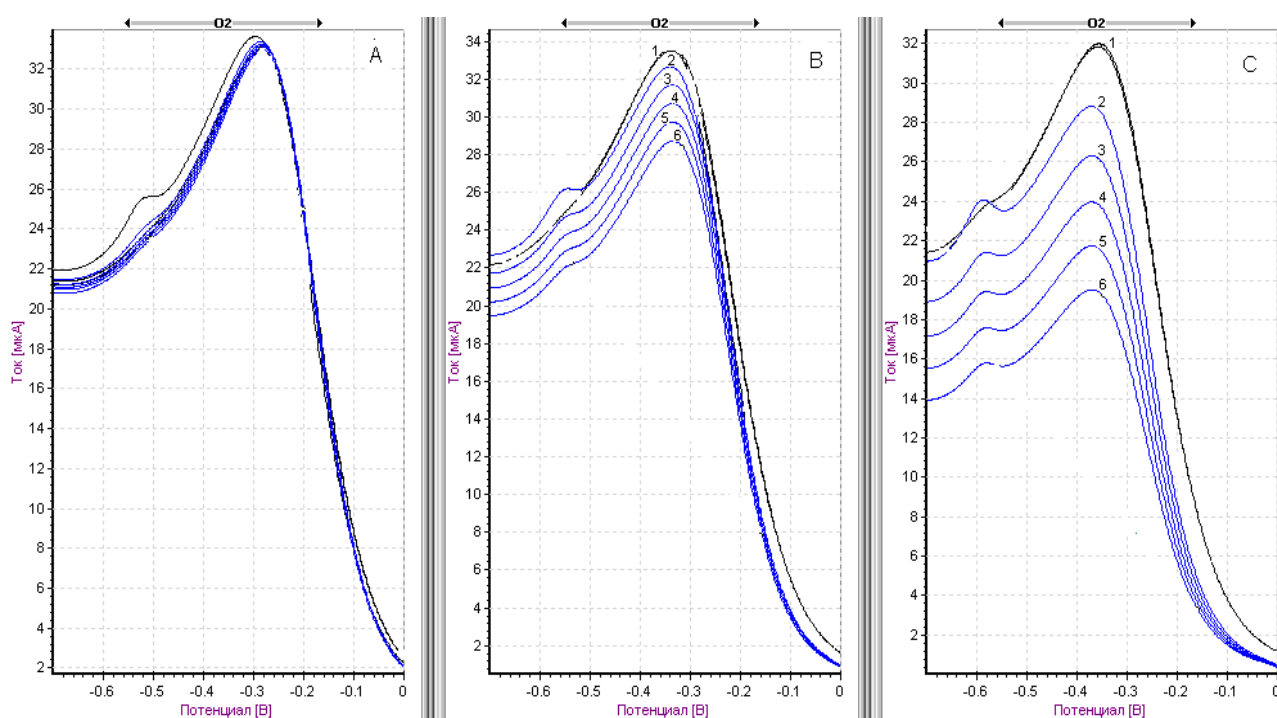
Бактерии-мишени	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>						
	Pr 1	Pr 2	Pr 3	Pr 4	Pr 5	Pr 6	Pr 7
<i>Bacillus subtilis</i> 40	☀			☀	☀	☀	☀
<i>B. cereus</i> 9	☀			☀	☀	☀	☀
<i>B. coagulans</i> 429							
<i>Pseudomonas putida</i> 96							
<i>Ps. aeruginosa</i> 50			?				
<i>E. coli</i> 85							
<i>E. coli</i> 109						☀	
<i>Lactobacillus. casei</i> C1		?	☀		?		
<i>L. acidophilus</i> 146	☀	?	☀		☀		
<i>L. brevis</i> 5	☀	☀	☀	☀	☀		
<i>L. brevis</i> 78	☀	☀	☀	☀	☀		
<i>L. plantarum</i> A63	☀						
<i>L. plantarum</i> 30							
<i>L. fermentum</i> 34							

☀ - выявлена активность БПВ. ☀ - Препараты обработаны протеиназой К (контроль на белок). Пропуск - активности нет.

## 2.6. Антиоксидантные свойства жидких культур штаммов *P. freudenreichii*

Снижение избыточной концентрации активных форм кислорода в организме животного (человека) благоприятно отражается на его жизнедеятельности. Клетки данной бактерии обладают ферментами антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазой, каталазой и пероксидазой. В пробиотическом отношении важно, чтобы не только клетки-пробиотики защищали себя, но культура в целом, в случае её потребления макроорганизмом, обладала антиокислительными возможностями. С использования высокочувствительного метода катодной вольтамперометрии на примере двух штаммов выявили выраженную антиоксидантную активность жидких культур *P. freudenreichii* (рис. 6 и табл. 5).

Таким образом, новые штаммы *P. freudenreichii* проявляют пробиотическое действие на макроорганизм и обладают свойствами, частично объясняющими это действие. Исследование не ограничивается полученными результатами и требует продолжения, однако представленные штаммы классической пропионовокислой бактерии на основании выявленных свойств можно отнести к пробиотикам всех трёх категорий.



**Рис. 6.** Вольтамперограммы электровосстановления кислорода в отсутствие (1) и в присутствии (2–6) образца культуры *P. freudenreichii* (штамм Pr 2) при разбавлении 1:100 (А), 1:20 (В) и 1:10 (С) и при времени опыта  $t=4$  мин (2),  $t=8$  мин (3),  $t=12$  мин (4),  $t=16$  мин (5)  $t=20$  мин (6)

**Таблица 5.**

Значения кинетического критерия антиоксидантной активности  $K$  образцов жидких культур ПКБ и питательной среды ( $n = 3, P = 0,95$ )

Наименование образца	Разбавление	$K_{sr}$ , мкМ/ мин	$S_r$
<b><i>P. freudenreichii</i></b>			
<b><i>RVS-2-ims:</i></b>			
образец Ia	1:100	0,41	0,084
	1:20	1,62	0,071
	1:10	4,12	0,031
образец Ib	1:100	0,53	0,047
	1:20	1,84	0,038
	1:10	1,84	0,014
<b><i>P. freudenreichii</i></b>			
<b><i>RVS-4-irf:</i></b>			
образец Ia	1:100	0,51	0,031
	1:20	1,53	0,016
	1:10	3,68	0,020
образец Ib	1:100	0,41	0,057
	1:20	1,56	0,049
	1:10	3,82	0,020
Питательная среда	1:100	0,12	0,021
	1:20	0,24	0,023
	1:10	0,38	0,022

$K_{sr}$  - кинетический критерий антиоксидантной активности; отражает количество прореагировавших с анализируемым образцом кислородных форм во времени

$S_r$  – относительное стандартное отклонение:

### **3. Разработка способов применения *P. freudenreichii* для защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни», вызываемой развитием бацилл**

*P. freudenreichii* как биоконсервант пищевых продуктов перспективна и уже давно применяется, если учесть древнее сыроделие как стихийный способ консервирования молочного белка-казеина. Эту бактерию относят к «пищевым» микроорганизмам, а с учётом её пробиотических свойств применение в защите продуктов от порчи становится особенно привлекательным. Отметим, что в отличие от молочной и уксусной ки-

слот пропионовая кислота (пропионаты) как антимикробный фактор активна и при нейтральном значении рН. Последнее важно для протекции пищевых продуктов без их подкисления. При этом в результате воздействия ПКБ на пищевой субстрат (продукт) происходит его обогащение веществами-нутрицевтиками.

Положительный эффект пропионовой кислоты (пропионата) и ПКБ в защите хлеба от гнилостного поражения известен давно. Проблема состоит в способе применения в крупномасштабном производстве. Мы предложили разные подходы: производство биомассы ПКБ на подходящих для пищевых продуктов средах с обеспечением высокого уровня образования пропионатов, получение водных растворов пропионовой кислоты/пропионата путём сбраживания сахаров суспензиями клеток ПКБ. Имобилизация клеток ПКБ, с их реактивацией, для получения пропионовой и уксусной кислот была разработана в нашей лаборатории ранее. Эти способы требуют отдельных производств.

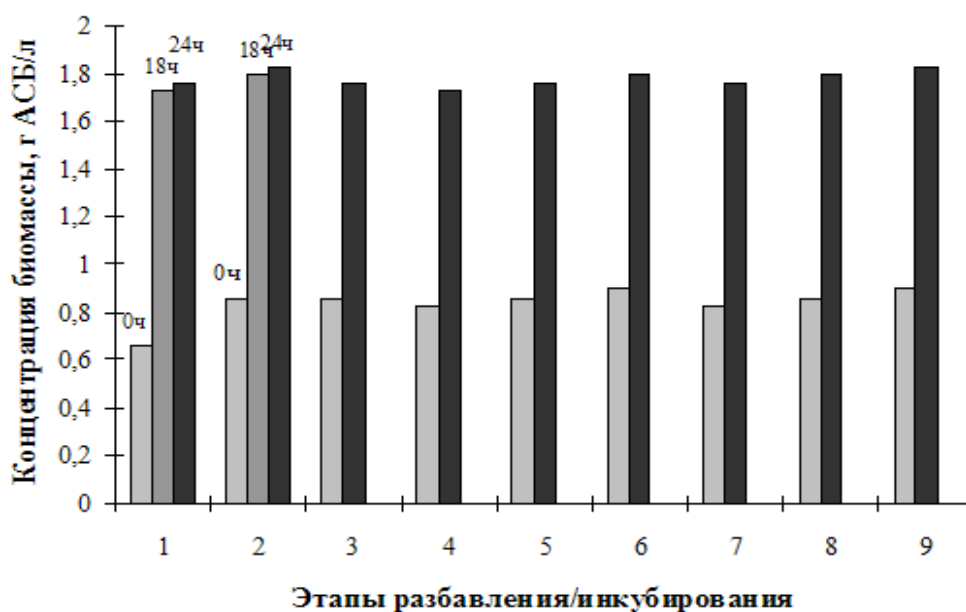
Способ защиты хлеба должен быть экономичным и удобным для хлебозаводов. В России давно применяют так называемую заквасочную технологию на основе молочнокислых бактерий, которая позволяет накапливать закваску (перед внесением её в дрожжевое тесто при замесе) в геометрической прогрессии путём двукратного поэтапного разбавления свежей мучной средой.

Мы установили, что ПКБ, в отличие от МКБ, слабо развиваются на обычной мучной среде и постепенно «вымываются» из неё при разбавлениях. В результате проведённой работы по её обогащению (с использованием в опытах водного экстракта мучной среды, ЭМС) удалось «заставить» ПКБ удваивать биомассу в течение требуемого периода времени для поэтапного разбавления, однако этот подход имел ограничения.

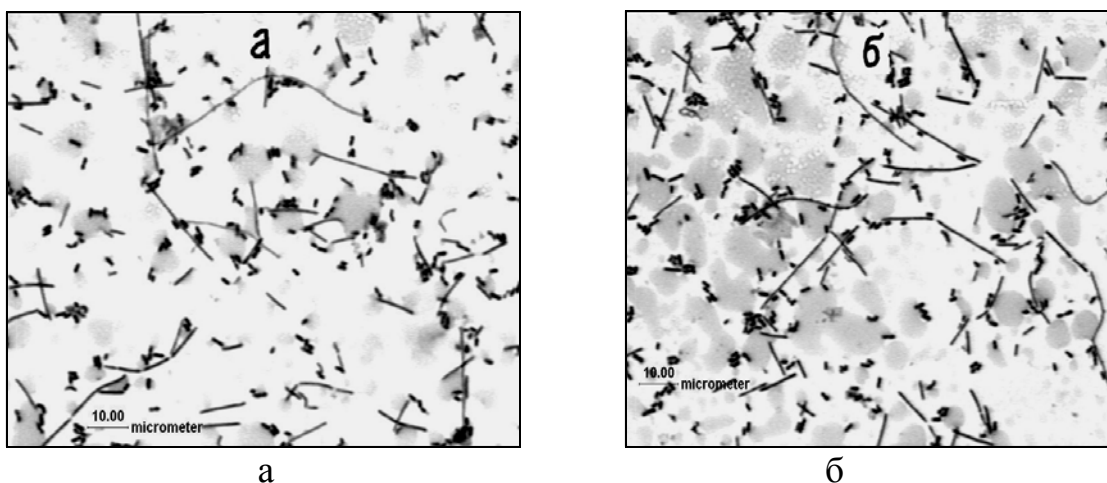
Успешным оказался способ с предварительным выращиванием на мучной среде *L. delbrueckii*: в этом случае лактат служит субстратом для ПКБ. По нашим наблюдениям (и в соответствии с литературными сведениями) в результате развития *L. delbrueckii* может происходить модификация белков муки с образованием пептидов-стимуляторов для роста ПКБ. Кроме того 2-ч экспозиция с молочной кислотой (на каждом этапе, перед нейтрализацией среды) препятствует развитию в нестерильной натуральной закваске контаминирующих МКБ, обычно вытесняющих ПКБ.

Модельные опыты проводили с применением ЭМС/Ld, т.е. ферментированного с помощью *L. delbrueckii* водного экстракта осахаренной мучной заварки, оМПЗ (рис. 7), а затем использовали натуральную нестерильную мучную среду для культивирования *P. freudenreichii* RVS-4-irf вслед за *L. delbrueckii* 40. В последнем случае условия были

близки производственным. Натуральная закваска на основе двух культур длительно сохраняла неизменными исходные параметры (концентрацию клеток ПКБ и пропионатов), а также и микробиологическую чистоту (рис. 7). Выпеченный пшеничный хлеб не только значительно дольше не портился: (в камере ускоренного старения): в 4,5 раза по сравнению с контролем, но и обладал улучшенными органолептическими (приятный ореховый аромат, сдобный вкус) и физическими свойствами (большой объём и пористость).



**Рис. 7.** Модель накопительной закваски на основе МКБ + ПКБ: поэтапное удвоение биомассы *P. freudenreichii* на среде ЭМС/Id после её двукратного разбавления той же средой и инкубирования.



**Рис. 8.** Световая микроскопия комплексной закваски натуральной мучной среды на основе *L. delbrueckii* и *P. freudenreichii* RVS-4-irf: *а* – первый этап; *б* – пятый этап

Таким образом, исследованные штаммы *P. freudenreichii* проявили пробиотическое действие на животной организм, частично выживали в условиях агрессивной среды ЖКТ и обладали существенными пробиотическими свойствами. Учитывая признанную безопасность бактерии, её биопротекторные возможности, мы рекомендуем по крайней мере два наших штамма: *P. freudenreichii* RVS-2-ims и *P. freudenreichii* RVS-4-irf и для испытаний на добровольцах в функциональном (клиническом) питании, и для биоконсервирования пищевых продуктов.

## ВЫВОДЫ

1. Филогенетический анализ семи штаммов *p. Propionibacterium*, изолированных и фенотипически охарактеризованных ранее, позволил установить их принадлежность к одному и том же виду: *P. freudenreichii*, несмотря на существенные фенотипические различия. Принадлежность к этому виду свидетельствует о безопасности данных бактерий для животных и человека. Два штамма: RVS-2-ims и RVS-4-irf, депонированы в ВКПМ; последний заявлен и зарегистрирован в International GenBank (AC number EU418709).

2. На примере *P. freudenreichii* штамм RVS-4-irf с использованием модельного (неполного) желудочно-кишечного тракта показали, что пропионовокислые бактерии способны сохранять жизнеспособность, при этом концентрация живых

клеток снижается с  $10^9$  до  $10^6$ .

**3. Проведены испытания действия штаммов *P. freudenreichii* RVS-2-ims и RVS-4-irf на организм животного (птицы). Пробиотический эффект штаммов обнаружен.**

**4. Выявлены и частично изучены пробиотически значимые свойства исследуемых штаммов:**

- иммуностропные (по стимуляции образования цитокинов в крови в системе *ex vivo*);
- избирательные антимикробные на основе пропионатов и бактериоцин-подобных веществ, действующих в нейтральных условиях;
- антиокислительные (показано для жидких культур методом катодной вольтамперометрии);
- экзометаболитные и экзоферментные (низкое внеклеточное содержание витамина B<sub>12</sub> может быть существенным в сконцентрированных препаратах; протеолитическая активность проявляется как в кислых, так и в нейтральных условиях).

**Для испытаний и применения в качестве пробиотических препаратов могут быть рекомендованы штаммы *P. freudenreichii* RVS-2-ims и RVS-4-irf как наиболее изученные и эффективно действующие.**

**5. Разработан новый способ применения *P. freudenreichii* в заквасочной технологии производства пшеничного хлеба для его защиты от гнилостных бактерий («картофельной болезни» хлеба): он включает последовательное культивирование на мучной среде *L. delbrueckii* и пропионовокислой бактерии.**

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Поландова Р.В., Быковченко Т.Б., Рыжкова Е.П., Данилова И.В., Хао Ли (КНР), Шестаков А.И. Состояние и перспективы использования пропионовокислых бактерий в производстве пшеничного хлеба // Хранение и переработка сельхозсырья. 2007. № 5. С. 54-57.
2. Рыжкова Е.П., Ли Хао, Быковченко Т.В., Данилова И.В., Поландова Р.Д. Микробиологическая защита пшеничного хлеба с использованием трофической цепи *Lactobacillus delbrueckii* и *Propionibacterium freudenreichii* // Биотехнология. 2009. № 2. С. 29-37.
3. Драчева Л.В., Дорожко Е.В., Аврамчук О.А., Короткова Е.И., Рыжкова Е.П., Ли Хао, Данилова И.В. Вольтамперометрическое исследование антиоксидантной активности жидких культур пропионовокислых бактерий // Вестник Московского университета. Биология. 2009. № 4. (в печати).

4. Поландова Р.Д., Быковченко Т.В., **Ли Хао** (КНР), Данилова И.В., Александрийская Г.В., Рыжкова Е.П. Способ предотвращения заболевания хлеба картофельной болезнью // Патент РФ (Регистрационный № 2008146213 от 25.11.2008, положительное решение).

5. Данилова И.В., **Ли Хао**., Быковченко Т.В., Рыжкова Е.П. «Пропионовокислые бактерии в защите пищевых продуктов от посторонней микробиоты». Тезисы и доклад на Всероссийском симпозиуме «Автотрофные микроорганизмы». МГУ, биологический факультет, декабрь 2005. Москва. Макс Пресс. 2005. С. 87.

6. Данилова И.Д., **Ли Хао** (КНР), Мао Ю (КНР), Рыжкова Е.П. «Биосовместимость пропионовокислых бактерий с другими пробиотическими культурами». Тезисы и доклад на Международном конгрессе «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания». Санкт-Петербург, 15-16 мая 2007 г. Опубликовано в журнале «Клиническое питание» 2007. № 1-2. А37.

-----