

МЕТАБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *Lactobacillus acidophilus*, ВХОДЯЩИХ В КОМПЛЕКСНЫЕ ЗАКВАСКИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

© 2022 г. Л. Г. Стоянова¹*, С. Д. Дбар¹, И. С. Полянская²

¹Биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

²ФГБОУ ВО Вологодская государственная молочнохозяйственная
академия им. Н.В. Верещагина, г. Вологодская обл., с. Молочное, 160555 Россия

*e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Поступила в редакцию 10.09.2021 г.

После доработки 15.10.2021 г.

Принята к публикации 18.10.2021 г.

Исследованы метабиотические свойства 6 штаммов *Lactobacillus acidophilus*, включаемых в состав симбиотических заквасок для производства пробиотических молочнокислых продуктов. Изучен антимикробный спектр действия этих штаммов по отношению к контаминантам, способным развиваться в процессе ферментации. Определено время культивирования штаммов для максимального накопления количества клеток и антимикробных метаболитов. Проведено сравнение активности при действии на тестовые микроорганизмы живых культур и лизатов, образующихся в процессе ферментации или в стрессовых условиях желудочно-кишечного тракта. Бактерицидная активность ряда штаммов была до 40% выше в лизатах, чем в культуральной жидкости. Фунгицидная активность проявлялась на более поздней стадии роста лактобацилл. Наиболее активные штаммы можно рекомендовать в качестве пробиотических культур с метаболитными свойствами для включения в состав комплексных заквасок при создании продуктов функциональных пищевых и фармацевтических.

Ключевые слова: антимикробная активность, бактериоцины, лизаты, метабиотики, пробиотики, фунгициды, *Lactobacillus acidophilus*

DOI: 10.56304/S0234275822010070

Молочнокислые бактерии и ферментированные ими пищевые продукты обладают множеством важных питательных и терапевтических свойств, полезных для здоровья человека. Бактерия *Lactobacillus acidophilus* сопровождает человека с рождения и на протяжении всей его жизни оказывает целый комплекс полезных услуг, главная из которых — активное участие в системе защиты организма хозяина от вредного действия нежелательных патогенных бактерий и сдерживание на безопасном уровне популяции условно-патогенных микробов, а также в стабилизации общего микробного пейзажа в ферментированных продуктах [1]. Ключевую роль в

поддержании гомеостаза организма и здоровья человека играет кишечная микробиота, которая насчитывает в суммарной численности 10^{14} клеток микроорганизмов с массой более 2 кг [2]. Как правило, кишечник человека содержит некоторое количество видов бактерий, которые считаются “дружественными”. Длительные нарушения в микробиоте (дисбиоз), возникшие в результате различных экзо- и эндогенных факторов, играют определенную роль в ослаблении иммунитета, развитии аллергии и метаболического синдрома, отягощающих течение заболеваний [3, 4]. Наличие выраженных антагонистических свойств по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам является определяющим требованием к пробиотическим культурам [5]. Интерес к антимикробным метаболитам, среди которых определяющая роль принадлежит бактериоцинам, в настоящее время возрос в связи с появлением полирезистент-

Список сокращений: МКБ — молочнокислые бактерии, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, КЖ — культуральная жидкость, МЕ/мл — ингибиторная активность в международных единицах в пересчете на коммерческий препарат низина, ОП₅₄₀ — оптическая плотность при 540 нм.

ных возбудителей инфекционных заболеваний. Большинство бактериоцинов, продуцируемых разными штаммами *L. acidophilus*, являются одним и тем же соединением или вариантами этого соединения белковой природы. Однако при сходстве структур эти бактериоцины могут обладать совершенно разными механизмами и спектром действия [6, 7].

Структурные компоненты пробиотических микроорганизмов и/или их метаболиты, включая бактериоцины, органические и короткоцепочечные жирные кислоты, биогенные поверхностно-активные вещества, белки, ферменты, витамины, антиоксиданты и другие сигнализирующие молекулы, способные оптимизировать специфические физиологические функции, метаболические реакции, связанные с деятельностью макроорганизма и его микробиоты, объединены общим понятием метабиотики [8].

В ферментированных молочных продуктах длительного срока созревания были обнаружены биоактивные пептиды с молекулярной массой от 10 до 50 кДа, показавшие хорошую антимикробную активность против патогенов, мощную антиоксидантную, ангиотензивную активность, которые могут быть использованы в составе укрепляющих здоровье нутрицевтиков, а также в качестве сильнодействующих лекарств с четко определенными фармакологическими эффектами. Исследователи возлагают на бактериоцины большие надежды как на новое поколение антибиотиков [9, 10].

Лактобациллы *Lactobacillus acidophilus*, при отмирании клеток в субстрате накапливают метаболиты, оказывающие антибиотическое действие, аналогичное действию живых культур, которое проявляется как защитное действие на микробный пейзаж сбраживаемого молока, способствует стабилизации технологического процесса, улучшению качества продукта [11]. Закваски на основе штаммов ацидофильной палочки *L. acidophilus* способствуют выработке кисломолочных продуктов, которые защищают макроорганизм при приеме антибиотиков и подавляют болезнетворные бактерии. Пробиотические штаммы *L. acidophilus* устойчивы к воздействию агрессивной среды желудочного сока и способны доходить в кишечник невредимыми. Кроме этого, эти бактерии очень хорошо приживаются в кишечнике, где и выполняют свои основные функции, помогают восстановить микробиоту ЖКТ после экстраемальных нагрузок (стресса, приема антибиотиков).

К тому же сегодня иммунологи рассматривают применение бактериальных лизатов как очень перспективное направление повышения антиинфекционного и противовирусного иммунитета при лечении вторичных иммунодефицитов, поскольку данные препараты не содержат живые бактериаль-

ные культуры, способные изменить микробиом. Метабиотики в сравнении с пробиотиками имеют более длительный период сохранности, четкие мишени приложения, их легче дозировать, их безопасность легче контролировать, они лучше метаболизируются, распределяются по тканям и органам, быстрее и в большей степени элиминируются из организма. Применение метабиотиков позволяет создать управляемый микробиоценоз кишечника, поскольку метаболические, сигнальные, транспортные и другие функции представителей эндогенной микробиоты имеют большее значение, чем количественное содержание в биотопе микроорганизмов тех или иных видов. Следовательно, пробиотики и их биологически активные вещества (метабиотики) следует учитывать для контроля эпигенетических явлений, чтобы исключить их возможные побочные эффекты [12].

Хотя ацидофильная палочка известна и целенаправленно используется уже давно, она все еще обладает большим потенциалом для исследований. Потенциальная способность к накоплению биологически-активных веществ различна и зависит от видовой/штаммовой принадлежности, а также проявляется в определенных условиях культивирования. Это определяет целесообразность конструирования консорциума микроорганизмов, включающих в свой состав бактерии с разным механизмом биологической активности с целью улучшения их биотехнологических свойств, спектра их пробиотического действия.

Целью работы являлось изучение метабиотических свойств разных штаммов *Lactobacillus acidophilus* из состава комплексных заквасок при производстве пробиотических продуктов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для исследования использовали лиофилизированные культуры штаммов *L. acidophilus*, включаемые в состав консорциумов, синергидно взаимодействующих с другими культурами в бактериальных концентратах для производства ферментированных молочных продуктов Экспериментальной биофабрики ВНИИМИ (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности”), а штамм № 3 — из коллекции Экспериментальной биофабрики, г. Углич (табл. 1).

Слизистые штаммы № 1, 3 и № 6 используются для производства кисломолочных напитков: ацидофильного молока, ацидофилина, детской ацидофильной простокваши, могут быть применены для производства кисломолочного мороженого.

Остальные (№ 2, 4, 5) — неслизистые штаммы; используют в производстве ацидофильного творога, ацидофильной пасты, ацидофильного сыра.

Таблица 1. Культуры *Lactobacillus acidophilus*, отобранные из коллекций микроорганизмов
Table 1. *Lactobacillus acidophilus* cultures selected from collections of microorganisms

№	Наименование штамма	Коллекция
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 5е слиз.	ВНИИМИ, г. Москва
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> К ₁₀	ВНИИМИ, г. Москва
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 22 _{2w} , вязкий	Экспериментальная биофабрика, г. Углич
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 18	ВНИИМИ, г. Москва
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 20r	ВНИИМИ, г. Москва
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3е слиз.	ВНИИМИ, г. Москва

Лиофильные культуры лактобацилл восстанавливали в стерильной воде в течение 30 мин (из расчета $2 \pm 0.01\%$ влажности), культивировали в стационарных условиях при 37°C в жидкой среде МРС следующего состава (г/л): гидролизат казеина – 10.0; глюкоза – 20.0; гидрофосфат калия – 2.0; дрожжевой экстракт – 5.0; ацетат натрия – 5.0; цитрат аммония – 2.0; сульфат магния – 0.2; сульфат марганца – 0.05; цистеин – 0.17.

Динамику роста лактобацилл в течение 60 ч в жидкой среде МРС изучали по изменению ее оптической плотности ОП₅₄₀ при $\lambda = 540$, $l = 1.0$ см на ФЭК–56 (АООТ “Загорский оптико-механический завод”, Россия), снижению рН и антимикробной активности.

Активную кислотность среды измеряли портативным рН-метром (Testo-205, Германия).

Антибиотическую активность вышеуказанных штаммов определяли микробиологическим методом диффузии в агаровую среду, засеянную тест-культурами и оценивали в соответствии с зоной ингибирования их роста в мм [13].

В качестве тест-культур использовали суточные культуры разных групп микроорганизмов из КМ-коллекции культур кафедры микробиологии МГУ: грамположительные бактерии – *Micrococcus flavus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus* KM52, штамм грамотрицательных *Proteus vulgaris* KM28. Фунгицидную активность определяли по отношению к микромицетам *Aspergillus niger* INA 00760 из коллекции Института по изысканию новых антибиотиков.

Тестовые бактерии культивировали на МПА при 37°C, а микромицеты – при 28°C на среде Сабуро следующего состава (г/л): глюкоза – 40.0; пептон – 10.0; агар – 20.0, рН 5.6 ± 0.2 . Среды стерилизовали 15 мин при 121°C. Для придания селективных свойств в среду Сабуро вносили 0.05 г суццината левомецетина (хлорамфеникола).

Количественное определение антибиотической активности проводили измерением зон подавления роста тест-культур с дальнейшим пересчетом по калибровочной кривой стандартных растворов антибиотиков [13].

В качестве стандарта для определения уровня антимикробной активности против грамположительных бактерий был использован коммерческий препарат низина А с активностью 1×10^6 МЕ/г (Nisaplin, Aplin & Barrett, Ltd, Великобритания). За единицу активности принимали количество низина, подавляющего рост *Streptococcus agalactiae* (стрептококка группы В, присутствующего в ЖКТ) в 1 мл питательного бульона за 16 ч инкубирования, учитывая, что 1 мг чистого низина содержит 40000 МЕ [14].

Стандартом воздействия на грамотрицательные бактерии был левомецетин – растворы 100, 50 и 25 ед/мл антибиотика в буфере с рН 5.5 (препарат в виде таблеток (0.5 мг) ОАО “Татхимфармпрепараты”, Россия), а для микромицетов – коммерческий препарат нистатин с активностью 4670 ед./ мг (Sigma, США)

Уровень антибиотической активности по отношению к тест-культурам определяли как в культуральной жидкости (КЖ) штаммов *L.acidophilus* на разных стадиях роста в течение 60 ч инкубирования, так и в их лизатах, полученных обработкой клеток в КЖ смесью ацетон: уксусная кислота: вода ($\text{CH}_3\text{COCH}_3 : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$) в соотношении 4 : 1 : 5 с последующей выдержкой при 55°C в течение 90 мин. Для снижения действия использованной в экстрагирующей среде ледяной уксусной кислоты (хч, ОАО “Невинномысский Азот”, Россия) в лизаты добавляли (1 : 10) предварительно стерилизованный при 1 атм в течение 20 мин фосфатный буфер (рН 5.5). Экспериментальные растворы вносили в лунки на агаровой среде с тест-организмом в чашках Петри или лотках, а затем культивировали в течение 24 ч.

Опыты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием компьютерных программ Excel 2016 (Microsoft Inc., Statistica for Windows, v.5.0 StatSoft Inc), рассчитывая среднее арифметическое, доверительные интервалы, стандартное отклонение. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Значения $p \leq 0.05$ считали статистически значимыми.

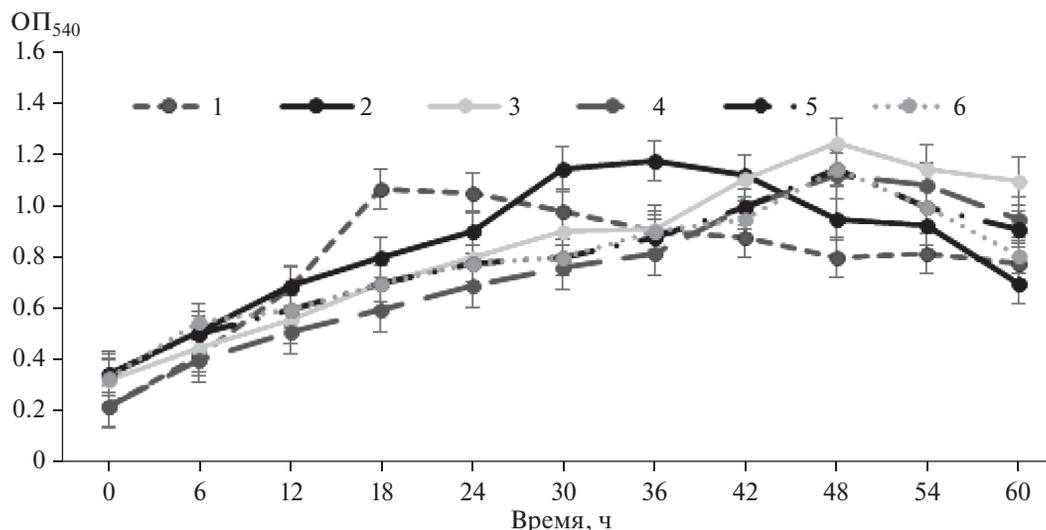


Рис. 1. Динамика роста штаммов *Lactobacillus acidophilus* в жидкой среде МРС.
Fig. 1. Growth dynamics of *Lactobacillus acidophilus* strains in MRS liquid medium.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамику роста в жидкой среде МРС штаммов *L. acidophilus*, входящих в состав пробиотических симбиотических заквасок, изучали в течение 60 ч. Увеличение числа клеток у штаммов происходило по-разному. Слизеобразующий штамм №1 уже к 18 ч достигал максимального уровня, затем темп роста снижался по ОП₅₄₀ от 1.07 до 0.80 к 48 ч культивирования. Штамм №2 медленно накапливал биомассу в течение 30 ч, достиг своего максимума к 36 ч (ОП₅₄₀ 1.18), после чего началась стационарная фаза до 54 ч, затем скорость резко снизилась до значения ОП₅₄₀ 0.57. Остальные штаммы №3, 5, 6 имели схожую тенденцию увеличения количества биомассы: экспоненциальная фаза роста длилась до 48 ч культивирования, после чего наблюдали уменьшение скорости, что проявлялось в снижении ОП₅₄₀ культуральной жидкости (рис. 1). Следует отметить, что уровень накопления биомассы штаммами лактобацилл растянут во времени в зависимости от их включения в процесс молочнокислого брожения.

Штаммы *L. acidophilus* сбраживают углеводы, присутствующие в среде, по типу гомоферментативного молочнокислого брожения — основного энергетического процесса у лактобацилл, т.е. пируват, образовавшийся в результате гликолиза, под действием лактатдегидрогеназы превращается в молочную кислоту — основной конечный продукт брожения [14, 15].

В среде МРС, содержащей 2% глюкозы, за весь период культивирования (60 ч) pH в КЖ разных штаммов снизился от нейтрального до 3.7–2.8 (табл. 2). Наибольшей кислотообразующей способностью обладал штамм №3 (*L. acidophilus* 22_w,

вяз.), который за 60 ч снизил pH до значения 2.8, а наименьшей — штамм №6 (pH 3.7).

Само название бактерий указывает на то, что в процессе гомоферментативного молочнокислого брожения они синтезируют молочную кислоту как конечный продукт сбраживания лактозы, что важно для создания безлактозных продуктов питания для людей с лактазной недостаточностью [15].

В прямой корреляции с ростом, накоплением биомассы и снижением pH увеличивалась и антибиотическая активность штаммов по отношению к тест-культурам. Это связано с синтезом антимикробных метаболитов, особое место среди которых занимают бактериоцины — метаболиты белковой природы. Тестовой культурой, используемой в научных исследованиях при определении уровня активности полипептидных антибиотиков типа низина, является *Micrococcus flavus* [14, 16].

Антагонистическая активность штаммов *L. acidophilus* является их индивидуальным физиологическим свойством, а степень его выраженности зависит от накопления биомассы, степени подкисления среды, времени культивирования и свойств тест-организма.

Известно, что бактериоцины синтезируются параллельно росту бактерий [13, 16]. Их образование начинается в экспоненциальной фазе роста продуцента и достигает своего максимума к стационарной фазе (для штамма №1 к 18 ч, №2 к 36 ч, для других штаммов лактобацилл к 48 ч культивирования).

Культуральная жидкость, в отличие от лизата, содержала живые клетки (пробиотик) и экзометаболиты, выделяемые штаммами в сбраживаемый субстрат. В КЖ наибольшая бактерицидная ак-

Таблица 2. Динамика роста и развития штаммов *Lactobacillus acidophilus* в жидкой среде МРС в течение 60 ч
Table 2. Dynamics of growth and development of *Lactobacillus acidophilus* strains in liquid MRS medium for 60 h

Время культивирования, ч	Штаммы, №											
	1		2		3		4		5		6	
	ОП ₅₄₀	pH										
0	0.22	7.0	0.35	7.0	0.32	7.0	0.22	7.0	0.35	7.0	0.33	7.0
6	0.42	6.6	0.51	6.4	0.45	6.4	0.40	6.5	0.50	6.4	0.55	6.2
12	0.68	5.6	0.69	5.5	0.56	5.4	0.51	6.0	0.60	6.2	0.60	5.6
18	1.07	4.2	0.80	4.6	0.70	4.0	0.60	5.9	0.80	5.6	0.70	4.8
24	0.98	3.4	0.90	4.4	0.80	3.8	0.69	5.8	0.90	5.0	0.78	4.6
30	0.95	3.2	1.16	4.2	0.90	3.6	0.72	4.4	0.92	4.9	0.80	4.4
36	0.90	3.2	1.18	3.8	0.91	3.4	0.78	4.2	0.95	4.6	0.90	4.2
42	0.88	3.2	1.07	3.4	1.11	3.2	0.81	4.0	0.95	3.8	1.0	4.0
48	0.80	3.2	0.95	3.4	1.23	2.8	1.12	3.6	1.10	3.6	1.05	3.8
54	0.82	3.2	0.63	3.2	1.210	2.8	1.08	3.6	0.99	3.4	0.91	3.7
60	0.78	3.2	0.57	3.2	1.10	2.8	0.78	3.5	0.82	3.4	0.90	3.7

Примечание: Достоверность различий между средними величинами полученных экспериментальных данных по *t*-критерию Стьюдента в пределах $p \leq 0.05$.

Note: The reliability of the differences between the average values of the experimental data obtained by the Student's *t*-test is within $p \leq 0.05$.

тивность была у штамма № 3 (2000 МЕ/мл), у которого при высоком уровне накопления биомассы (ОП₅₄₀ 1.25) за 48 ч pH среды снизился до 2.8, что подтверждает активацию антимикробных метаболитов в кислой среде (табл. 2, 3).

Антибиотическая активность у изучаемых штаммов лактобацилл была выше в лизатах, чем в КЖ без обработки, причем в разной степени: у штамма № 3 на 14%, у № 1 на 42%. Это позволяет предположить, что антагонизм лактобацилл обусловлен действием молочной кислоты и антибактериальных метаболитов, локализованных внутри клеток или связанных с клеточной стенкой продуцента. В результате экстракции разрушается клеточная стенка, выделяются связанные с клеткой и мембранами эндометаболические вещества, включая и бактериоцины. Нейтрализация экстрактов образцов в экстрагирующей смеси фосфатным буфером (pH 5.5) исключала действие молочной кислоты. Можно предположить, что антибактериальное вещество — это связанный с клеточной стенкой продуцента эндометаболический метаболит — бактериоцин.

У штамма № 1 синтезируемый бактериоцин, по-видимому, в большей мере локализован внутри клетки или связан с клеточной стенкой, чем у штамма № 3.

Штамм №1 обладал высокой ингибиторной активностью при действии на *Micrococcus flavus* несмотря на относительно низкий уровень биомассы. Активность проявлялась как в КЖ с сильным подкислением среды (pH 3.2), так и в лизатах, нейтрализованных фосфатным буфером до pH 5.5. Максимальный уровень активности в экстрактах

составил 3000 МЕ/мл (по низину) у 17 часовой культуры и сохранялся при дальнейшем инкубировании.

Активность штаммов № 2 и № 3 составила 1700–1750 МЕ/мл только к 48 ч культивирования, что совпадает с переходом их роста в стационарную фазу. Однако это значение на 32% ниже, чем у штамма №1 (табл. 3).

Штамм № 2 наиболее активен и против второй тест-культуры из группы грамположительных бактерий *S. aureus* — оппортунистической условно-патогенной бактерии, способной вызвать как относительно легкие кожные инфекции, так и смертельно опасные заболевания: пневмонию, менингит, инфекционно-токсический шок и др. [11–17]. Максимальный уровень активности штамма № 2 в лизате составил 2900 МЕ/мл у 48 часовой культуры, что почти в 2 раза выше, чем в 17 часовой (рис. 2, табл. 4) и совпадает с временем максимального накопления биомассы (рис. 1). Однако следует отметить, что активность этого штамма в КЖ была на 35% ниже. Остальные штаммы были активны после 36 или 48 ч культивирования как в КЖ, так и в лизатах. Их активность была на уровне 2700–2000 МЕ/мл в лизате 48 часовой культуры, что значительно выше, чем в КЖ (табл. 4, рис. 2).

Важным критерием оценки эффективности синтезируемого бактериоцина является его активность по отношению к разным группам микроорганизмов, включая патогенные и условно-патогенные формы, относящиеся к грамотрицательным бактериям — представителям семейства *Enterobacteriaceae*.

Таблица 3. Ингибиторная активность культуральной жидкости и лизатов штаммов *Lactobacillus acidophilus* при действии на *Micrococcus flavus***Table 3.** Inhibitory activity of the culture fluid and lysates of *Lactobacillus acidophilus* strains when acting on *Micrococcus flavus*

№ штамма	Культуральная жидкость				Лизаты			
	17 ч		48 ч		17 ч		48 ч	
	д, мм*	МЕ/мл	д, мм*	МЕ/мл	д, мм*	МЕ/мл	д, мм*	МЕ/мл
1	18.5	1900 ± 37	19.0	1950 ± 12	26.0	3000 ± 14	26.0	3000 ± 25
2	12.5	1200 ± 22	14.5	1350 ± 25	15.0	1460 ± 15	19.6	1750 ± 12
3	13.4	1300 ± 12	18.5	1830 ± 13	18.0	1700 ± 25	23.5	2580 ± 20
4	11.5	1100 ± 25	15.0	1470 ± 7.5	13.0	1250 ± 12	18.5	1700 ± 14
5	12.0	1140 ± 39	14.5	1430 ± 11	15.0	1500 ± 8	18.0	1650 ± 17
6	13.0	1250 ± 25	16.0	1550 ± 25	14.5	1460 ± 25	17.5	1600 ± 25

Примечание: д, мм* – достоверность различий между средними величинами размера зон ингибирования по *t*-критерию Стьюдента в пределах $p \leq 0.05$.

Note: d, mm * – reliability of differences between the average values of the size of the zones of inhibition by the Student's *t*-test within $p \leq 0.05$.

Бактерии *Proteus vulgaris* называют “вездесущими мусорщиками”, виновниками не только горького, гнилостного, но и осалистого, прогорклого вкуса продуктов, что часто обусловлено совместным развитием микрококков и протей [17].

Результаты исследований показали, что наибольшей активностью на *Proteus vulgaris* обладали 48 часовые культуры штаммов № 1 и 4 (слизеооб-

разующие штаммы из коллекции ВНИМИ). Причем, активность проявлялась в большей степени в лизатах с рН 5.5, чем в КЖ с сильным подкислением среды (рН 3.2). Максимальный уровень антибактериальной активности в лизатах составил 2500–2200 мкг/мл (по левомицетину), соответственно, что на 34% выше, чем в КЖ. Активность штамма № 5 составила в лизате 1700 мкг/мл, что на 32% ниже, чем у штамма № 1 (рис. 3).

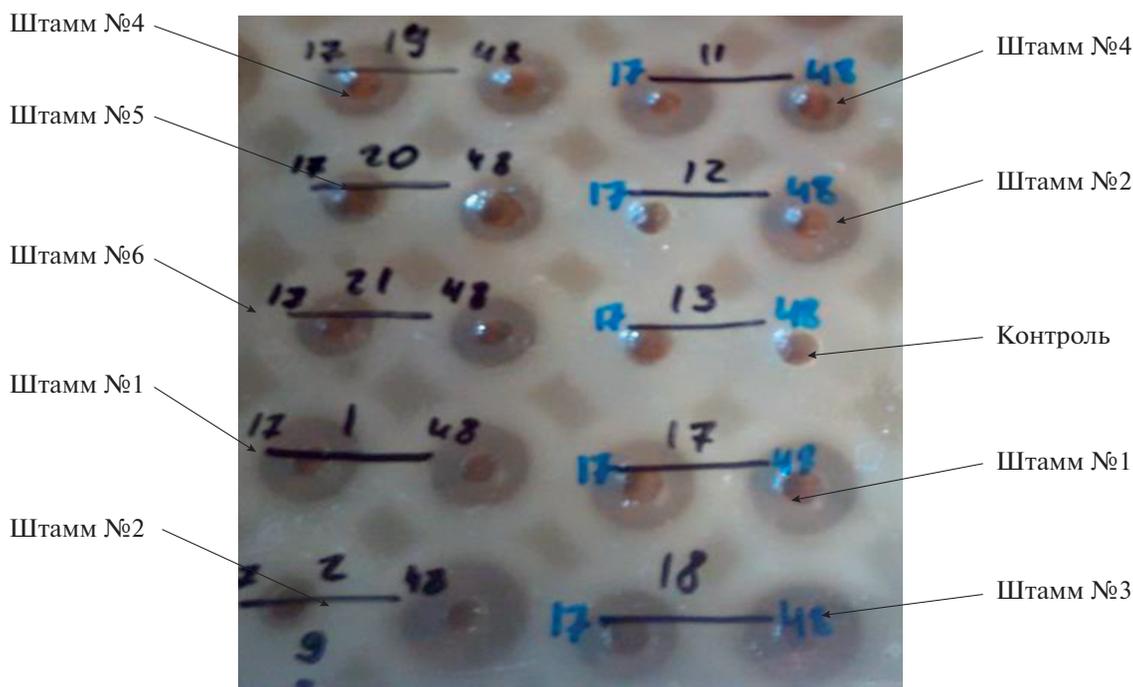


Рис. 2. Ингибиторная активность на *Staphylococcus aureus* лизатов штаммов *Lactobacillus acidophilus* после 17 и 48 ч инкубирования в среде МРС.

Fig. 2. Inhibitory activity on *Staphylococcus aureus* of lysates of *Lactobacillus acidophilus* strains after 17 and 48 h incubation in MRS medium.

Таблица 4. Ингибиторная активность культуральной жидкости и лизатов штаммов *Lactobacillus acidophilus* при действии на *Staphylococcus aureus***Table 4.** Inhibitory activity of culture fluid and lysates of *Lactobacillus acidophilus* strains when acting on *Staphylococcus aureus*

№ штамма	Культуральная жидкость				Лизаты			
	время инкубирования /диаметр зоны(мм)/активность (МЕ/мл)							
	17 ч		48 ч		17 ч		48 ч	
	д,мм*	МЕ/мл	д,мм*	МЕ/мл	д,мм*	МЕ/мл	д,мм*	МЕ/мл
1	18.3	2000 ± 51	11.5	1200 ± 16	22.0	2650 ± 17	22.0	2600 ± 15
2	12.1	1150 ± 16	16.0	1900 ± 31	12.2	1200 ± 21	25.0	2900 ± 14
3	12.2	1280 ± 41	14.1	1800 ± 63	22.6	2650 ± 18	23.0	2700 ± 31
4	13.7	1700 ± 33	14.0	1800 ± 21	21.0	2500 ± 15	20.2	2450 ± 15
5	11.0	1000 ± 21	12.1	1150 ± 36	11.2	1100 ± 19	18.9	2000 ± 37
6	11.3	1100 ± 30	12.2	1200 ± 17	20.1	2450 ± 12	20.4	2450 ± 52

Примечание: д, мм* – достоверность различий между средними величинами размера зон ингибирования по *t*-критерию Стьюдента в пределах $p \leq 0.05$.

Note. d. mm* – reliability of differences between the average values of the size of the zones of inhibition by Student's *t*-test within $p \leq 0.05$.

В основе антагонистического действия *L. acidophilus* лежат неспецифические и специфические механизмы. Общим свойством МКБ является продуцирование молочной кислоты (которая сама по себе проявляет определенный бактерицидный эффект) и связанное с этим снижение pH среды до значений, несовместимых с жизнедеятельностью многих групп микроорганизмов. Кроме того, в кислых условиях может усиливаться действие специфических факторов антагонизма. Известна способность *L. acidophilus* к синтезу бактериоцинов, способных встраиваться в клеточную мембрану па-

тогенов, приводя к нарушению ее проницаемости и протонного потенциала, блокировать репликацию ДНК и белковый синтез, мешать делению клеток, то есть, вызывать изменения, которые несовместимы с жизнедеятельностью клетки – “мишени” [7]. Активность бактериоцинов, синтезируемых ацидофильной палочкой, в отношении патогенных сапрофитных видов кислотоустойчивых бактерий и плесневых грибов проявляется при pH 5.0–5.6 [6, 7].

Предполагается, что органические кислоты, синтезируемые лактобациллами, могут активировать и фунгицидную активность. Отмечен ан-

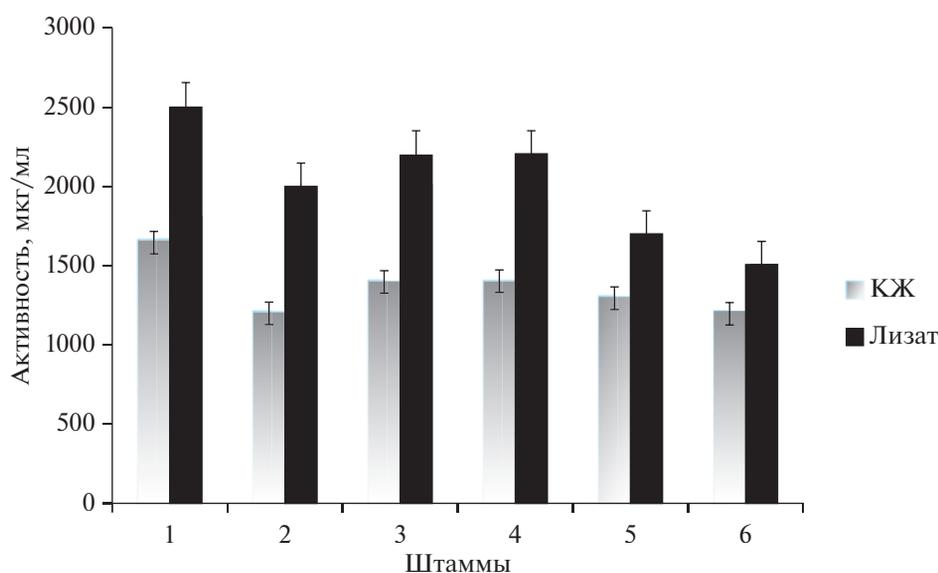
**Рис. 3.** Ингибиторная активность культуральной жидкости и лизатов 48 часовой культуры *Lactobacillus acidophilus* при действии на *Proteus vulgaris*.**Fig. 3.** Inhibitory activity of the culture fluid and lysates of a 48-hour culture of *Lactobacillus acidophilus* when acting on *Proteus vulgaris*.

Таблица 5. Ингибиторная активность культуральной жидкости и лизатов культур *Lactobacillus acidophilus* при действии на *Aspergillus niger***Table 5.** Inhibitory activity of the culture fluid and lysates of *Lactobacillus acidophilus* cultures when acting on *Aspergillus niger*

№ штамма	Культуральная жидкость		Лизаты	
	д, мм*	ед/мл	д, мм*	ед/мл
1	12.2	610 ± 25	14.5	780 ± 29
2	12.2	610 ± 28	13.4	660 ± 31
3	15.2	830 ± 36	15.4	830 ± 37
4	13.1	660 ± 27	13.2	660 ± 21
5	12.3	610 ± 32	14.6	780 ± 43
6	0	0	0	0

Примечание: д, мм* – достоверность различий между средними величинами размера зон ингибирования по *t*-критерию Стьюдента в пределах $p \leq 0.05$.

Note: d, mm * – reliability of differences between the average values of the size of the zones of inhibition by Student's *t*-test within $p \leq 0.05$.

тагонизм ацидофильной палочки по отношению к условно-патогенным и патогенным микромицетам, включая плесени и дрожжи [18]. Выделено новое противогрибковое соединение пептидной природы, синтезируемое *Lactobacillus acidophilus*, которое активировалось низкими значениями pH: активность этого пептида оставалась стабильной при значениях pH 3.0–4.5, но быстро снижалась при pH 6.0 [19].

Для изучения фунгицидной активности штаммов *Lactobacillus acidophilus* в качестве индикаторной культуры отобран *Aspergillus niger*. Развитие плесневых грибов *Aspergillus* в продуктах вызывает накопление токсинов, опасных для здоровья. Штамм № 1 *L. acidophilus*, обладающий высокой бактерицидной активностью, проявил и высокую фунгицидную активность против *Aspergillus niger* (табл. 5).

Однако максимальной активностью при действии на *Aspergillus niger* обладал штамм № 3 из коллекции биофабрики г. Углич, используемый для изготовления сыров. Из всех исследованных штаммов у этого уровень накопления биомассы и степень закисления среды в КЖ были максимальными. После 48 ч культивирования его активность и в лизате и в КЖ составила 830 ед/мл (по нистатину), что на 6.4% выше, чем у штаммов №№ 1 и 5, и на 20.5%, чем у штаммов №№ 2 и 4. Фунгицидная активность штамма № 4 была одинакова и в КЖ, и в лизате 48 часовой культуры (660 ед/мл). В КЖ активность против аспергилл ниже чем в лизате у штамма № 1 на 18%, а у штамма № 2 на 8%. У штамма № 6 фунгицидной активности против *Aspergillus niger* не выявлено ни в КЖ, ни в экстрактах (табл. 5).

Противогрибковая активность лактобацилл традиционно связана с закислением среды, в которой они находятся, что обусловлено синтезом молочной кислоты. Но кроме нее в среде присутствуют дополнительные специфические метаболиты

(белковые соединения, фенолмолочная кислота, циклические дипептиды, капроновая кислота, реутерин), которые также обладают фунгицидной активностью [18–20].

Лактобациллы *L. acidophilus* характеризуются высокими адгезивными свойствами, что обуславливает их высокую способность прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника человека, конкурируя с патогенами за субстрат обитания, а вследствие выделения экзополисахаридов (слизи) повышает их выживаемость в неблагоприятных условиях ЖКТ [21].

Lactobacillus acidophilus — это бактерии, входящие в состав комплексной закваски при изготовлении пробиотических продуктов питания и являющиеся симбионтами микробиоты ЖКТ. При исследовании метаболической активности штаммов *L. acidophilus* выявлено, что они обладают широким спектром антимикробного действия, подавляя рост патогенных бактерий и микромицетов. В то же время антимикробная активность штаммоспецифична. Бактерицидная активность лизатов, полученных обработкой клеток ацетон-уксусной смесью, более чем на 40% превышает активность КЖ, содержащей живые клетки с неповрежденной клеточной стенкой и экзометаболитами. Фунгицидная активность штаммов *L. acidophilus* проявляется после 48 ч культивирования в среде МРС как в КЖ, так и в лизатах. Отбор пробиотических штаммов с высокой антимикробной активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микробам важен для создания консорциумов ферментативных заквасок для приготовления ферментированных молочных продуктов с лечебно-профилактическим назначением. В связи с тем, что порядка 90% всех заквасок, бактериальных концентратов для производства ферментированных молочных продуктов поставляются из-за рубежа, необходимо еще раз подчеркнуть

необходимость укрепления отечественных биофабрик [22].

На основании представленных результатов лактобациллы *L. acidophilus* можно отнести сразу к двум типам пробиотиков — метаболизирующим и антимикробным. Метаболизирующую активность следует рассматривать как доминирующую, поскольку кроме защитного эффекта, обусловленного накоплением антимикробных метаболитов, а именно: молочной кислоты как основного конечного продукта молочнокислого брожения и бактериоцинов, ацидофильная палочка выделяет в ЖКТ полезные экзометаболиты. Последние обладают антиоксидантной, протеолитической, антихолестериновой активностью и повышают терапевтический эффект при употреблении в пищевом рационе содержащие их продукты [5, 8, 20–22].

Явные преимущества фармацевтических препаратов и БАДов в виде лизатов КЖ перед кисло-молочными продуктами, содержащими аналогичные живые пробиотические бактерии, заключаются в повышенной концентрации метаболитов полезных бактерий, их антагонистической активности, длительном сроке годности и меньшей требовательности к температурному режиму хранения лизатов. Процессы промышленного масштаба, включая развитие технологии наноинкапсулирования и микрокапсулирования, широко используются для повышения стабильности пептидов во время ферментативного расщепления в ЖКТ [23, 24]. Эта область исследований обещает создать широкий спектр фармацевтических пищевых продуктов и биомедицинских терапевтических средств, оказывающих большое влияние на здоровье человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F. J., Gil-Campos M., Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. Nutr.*, 2019, 10(1), 49–66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
2. Хайтович А.Б., Воеводкина А.Ю. Микробиом и его влияние на здоровье человека. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*, 2019, 9(1), 61–65.
3. Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Аладышева Ж.И., Мацулевич Т.В. Пробиотики и механизмы их лечебного действия. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 2004, 3, 83–87.
4. Prakash S., Rodes L., Coussa-Charley M., Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 2011, 5, 71–86. <https://doi.org/10.2147/BTT.S19099>
5. Осипова И.Г., Евлашкина В.Ф., Сакаева И.В., Саканян Е.И. К вопросу разработки стандартов качества на иммунобиологические лекарственные средства-пробиотики. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*, 2013, 3, 55–57.
6. Han K.-S., Kim Y., Kim S.-H., Oh S. Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 17(5), 774–783.
7. Dean S.N., Rimmer M.A., Turner K.B., et al. *Lactobacillus acidophilus* Membrane Vesicles as a Vehicle of Bacteriocin Delivery. *Front. Microbiol. Actions*, 2020, 30(1), 710. PMID: 32425905 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.0071032425905>
8. Polyanskaya I.S., Sorokina N.P., Popova V.L. Starter culture phagolysis in dairy industry. *J. Hyg. Eng. Des.*, 2019, 29, 41–45.
9. Park Y.W., Nam M.S. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products. A Review. *Korean. J. Food Sci. Anim. Resour.*, 2015, 35(6), 831–840.
10. Mohanty D., Jena R., Choudhury P.K., Pattnaik R., Mohapatra S. Milk Derived Antimicrobial Bioactive Peptides: A Review. *Intern. J. Food Properties*, 2016, 19(4), 837–846. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1048356>
11. Свириденко Г.М., Сорокина Н.П., Кураева Е.В., Кучеренко И.В. Практические аспекты применения защитных культур. *Молочная промышленность*, 2018, (8), 5–17.
12. Шендеров Б.А. Метабиотики — новая технология профилактики заболеваний, связанных с микробиологическим дисбалансом человека. *Вестник восстановительной медицины*, 2017, 4(80), 40–49.
13. Устюгова Е.А., Федорова Г.Б., Стоянова Л.Г., Катруха Г.С. Изучение антибиотического комплекса, образуемого *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 194 вариант К. *Микробиология*, 2011, 80, 5, 644–650.
14. Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор). *Прикл. Биохим. Микробиол.*, 2012, 48(3), 259–275.
15. Savaiano D.A. Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2014, 99(5), 1251–1255.
16. Riley M.A., Wertz J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2002, 56(1), 117–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
17. Рябцева С.А., Ганина В.И., Панова Н.М. Микробиология молока и молочных продуктов: учебное пособие. Санкт-Петербург: Лань, 2020, 192.
18. Cortés-Zavaleta O., López-Malo A., Hernández-Mendoza A., García H.S. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Intern. J. Food Microbiol.*, 2014, 173, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016>
19. Magnusson J., Schnürer J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, 16, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>

20. Анохина И.П., Кравцов Е.Г., Яшина Н.В. и др. Характеристика поверхностных адгезинов лактобактерий, используемых при изготовлении препаратов пробиотиков. *Бюллетень' экспериментальной биологии и медицины*, 2006, 141(6), 664–667.
21. Головин М.А., Ганина В.И., Машенцева Н.Г. Холестерин-редуцирующие пробиотические бактерии в молочной продукции. *Молочная промышленность*, 2014, 5, 46–47.
22. Ганина В.И. Рынок заквасок в России. *Молочная промышленность*, 2018, 12, 29–30.
23. Polyanskaya I. Quasicapsulation of probiotics. *J. Hyg. Eng. Des.*, 2018, 24, 31–38.
24. de Almada C.N., De Almada C.N., Martinez R.C.R., de Souza Sant'Ana A. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, 4175–4199.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6582-5>

Metabiotic Properties of *Lactobacillus acidophilus* Strains Included in Complex Starter Cultures for Probiotic Dairy Products

L. G. Stoyanova^{a, *}, S. D. Dbar^a, and I. S. Polyanskaya^b

^aFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bVologda State Dairy-Farming Academy named after N.V. Vereshchagin, Vologda Oblast, Molochnoye settl., 160555 Russia

*e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Abstract—The metabiotic properties of 6 *Lactobacillus acidophilus* strains, included in the composition of symbiotic starter cultures for the manufacture of probiotic lactic acid products, have been studied. The antimicrobial activity spectrum of these strains in relation to contaminants that can develop during fermentation was studied. The time of cultivation of strains for the maximum accumulation of the number of cells and antimicrobial metabolites was determined. Activity against test microorganisms was compared under the action of living lactobacillus cultures and lysates formed during fermentation or under stressful conditions of the gastrointestinal tract. The bactericidal activity of a number of strains in the lysates was up to 40% higher than in the culture liquid. Fungicidal activity was manifested at the later stages of growth of lactobacilli. The most active strains can be recommended as probiotic cultures with metabolic properties for inclusion in complex starter cultures when creating functional food and pharmaceutical products.

Keywords: antimicrobial activity, bacteriocins, lysates, metabiotics, probiotics, fungicides, *Lactobacillus acidophilus*