

УДК 579.67:579.864:577.11

ХАРАКТЕРИСТИКА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

© 2021 г. А. В. Бегунова¹, О. С. Савинова², К. В. Моисеенко²,
О. А. Глазунова², И. В. Рожкова¹, Т. В. Фёдорова^{2, *}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, 115093 Россия

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 02.02.2021 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Кефирный грибок представляет собой естественный симбиотический консорциум бактерий и дрожжей и является уникальным источником новых пробиотических микроорганизмов. В данной работе три новых изолятов лактобацилл – *Lactobacillus helveticus* и два штамма *Lacticaseibacillus paracasei* – были выделены из кефирного грибка, происходящего из Северо-Кавказского региона России, и проведена их биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация. Для всех штаммов были описаны профили ферментативных активностей, а также проведен скрининг устойчивости к antimикробным препаратам и наличия генетических детерминант антибиотикорезистентности. При ферментации коровьего молока все три штамма показали более низкую кислотообразующую активность по сравнению с кефирной закваской, но сопоставимую с ней протеолитическую, антиоксидантную и гипотензивную активности.

Ключевые слова: кефирный грибок, лактобациллы, ферментативный профиль, протеолитическая активность, антиоксидантная активность, АПФ-ингибитирующая активность

DOI: 10.31857/S0555109921040036

За последнюю пару десятилетий произошел существенный сдвиг в понимании взаимосвязи питания и здоровья. Взгляд, который можно охарактеризовать фразой “еда как источник веществ и энергии”, постепенно дополнился новой формулировкой – “еда как лекарство” [1]. Помимо обеспечения организма питательными веществами, необходимыми для нормального протекания метаболических процессов, еда теперь рассматривается как инструмент для улучшения самочувствия и профилактики заболеваний [2]. Сегодня, более чем когда-либо прежде, потребители заинтересованы в контроле над своим здоровьем. Отражением данной тенденции является появление таких новых терминов, как “функциональное питание”, “нутрицевтики”, “пробиотики” и “пребиотики” [3].

Новый взгляд на питание изменил отношение потребителей к ряду давно известных продуктов, а в особенности к ферментированной пище. Если ранее ферментация рассматривалась как способ приготовления пищи, при котором рост и метаболическая активность микроорганизмов используются для сохранения продуктов, то

сейчас ферментированная еда рассматривается как важный источник биологически активных соединений [4]. В случае кисломолочных продуктов, последние тенденции указывают на неуклонно возрастающий интерес к продуктам, подвергающимся естественному сквашиванию при помощи спонтанно сформировавшихся микробных консорциумов [5].

Кефир – традиционный кисломолочный продукт, произведенный путем смешанного (молочнокислого и спиртового) брожения с использованием закваски, приготовленной на кефирных грибках, или “кефирных зернах” (“kefir grains”) [6, 7] без добавления чистых культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей. Кефирный грибок – единственная спонтанно сформировавшаяся естественная симбиотическая закваска, применяемая в промышленном масштабе. Кефирные грибки содержат различные бактерии и дрожжи, заключенные в матрицу белка и полисахаридов [8]. Исследования ряда авторов показали, что в качестве доминирующих микроорганизмов в составе кефирных грибков определяются лактобациллы 70–95%, лактококки – 5–8%, дрожжи – 0.5–3% и

уксуснокислые бактерии – около 0.05% [7]. Лактобациллы представлены такими видами как *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* и др.; лактококки – преимущественно *Lactococcus lactis*. Среди дрожжей идентифицированы такие виды как *Kazachstania exigua*, *Dekkera bruxellensis* и *Kluyveromyces marxianus*. Многовидовая микрофлора кефирного грибка существенно влияет на качество (вкус и консистенцию) и функциональные свойства кефира. Вместе с тем, видовой состав кефирных грибков в большой степени зависит от места их происхождения и различается в разных географических регионах [8]. Данные различия могут быть связаны как с разными источниками выделения кефирных грибков, так и с разными технологиями, используемыми во время их культивирования и обработки [9].

Изучение микробного состава и функциональных свойств кефира является одной из актуальных тем для исследований в последние десятилетия [10]. Регулярное потребление кефира улучшает пищеварение, оказывает антибактериальный, гипохолестеринемический, антигипертензивный, противовоспалительный эффекты на организм, а также способствует снижению глюкозы в плазме крови [7]. Подобные оздоровляющие эффекты кефира, как правило, связывают с наличием лактобацилл в составе кефирных грибков.

Цель работы – выделение отдельных штаммов лактобацилл из кефирного грибка и исследование их функционального потенциала, что позволит в дальнейшем разрабатывать с их использованием ассоциации заквасочных культур для производства кисломолочных продуктов с определенным направленным оздоровляющим действием.

МЕТОДИКА

Культуры. В работе использовались кефирные грибки из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ), полученные на Северных склонах кавказского хребта (Россия). Для культивирования использовали пастеризованное обезжиренное молоко.

Реактивы. В работе использовались реактивы производства фирмы “Sigma-Aldrich” (США), остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию “ос. ч.” или “х. ч.”. Все буферы, использованные в работе, были профильтрованы через нитроцеллюлозные мембранны фирмы “Millipore” (Германия) с диаметром пор 0.45 мкм.

Выделение чистых культур лактобацилл. Перед проведением исследований кефирные грибки культивировали в пастеризованном обезжиренном козьем молоке для получения кефирной закваски в

соответствии с “Технологической инструкцией по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности” [11]. После чего кефирные грибки отделяли от кефирной закваски с использованием профламбированного сита, отбирали 10 г кефирного грибка и ресуспендировали в 90 мл стерильного раствора хлористого натрия, далее гомогенизировали с использованием лабораторного блендера (“Bosh”, Германия). Из полученной суспензии готовили ряд десятикратных разведений в стерильном растворе хлористого натрия и проводили посев в MRS-бульон с добавлением 10% этанола. Посевы культивировали при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3–5 сут для обогащения среды лактобациллами. Для выделения отдельных штаммов проводили посев обогащенной культуры лактобацилл на агаризованную среду MRS (рН = 5.4) и инкубировали в анаэробных условиях с использованием газогенерирующей системы GasPak EZ Anaerobe Container System (“BD Biosciences”, США) при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3–5 сут. Среди морфологически идентичных колоний (по окраске, форме, текстуре) для выделения в чистую культуру выбирали одну и пересевали на питательную среду MRS-бульон (рН 5.4), после чего инкубировали при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч для накопления клеток.

Идентификация изолятов лактобацилл. Биохимическую идентификацию выделенных лактобацилл проводили с использованием тест-систем API 50CH (“BioMerieux”, Франция). Для этого суспензию чистой культуры микроорганизма, приготовленную по стандарту мутности 2 Mac Farland на основе жидкой среды API 50 CHL, инокулировали в лунки стрипа API 50CH сразу после приготовления. Стрипы в специальных закрытых контейнерах инкубировали в термостате при 37°C . Окончательный учёт результатов проводили через 48 ч. Видовую принадлежность микроорганизма определяли с помощью веб-сервера “APIWEB” (<https://apiweb.biomerieux.com>).

Для подтверждения фенотипической и биохимической идентификации полученных изолятов было проведено их генотипирование. Для генотипирования изолятов лактобацилл 16-часовая культура каждого штамма высевалась на жидкую MRS среду и инкубировалась анаэробно в течение 48 ч при 37°C . Геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора DNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США). Выделенную ДНК хранили при -20°C и в дальнейшем использовали во всех ПЦР в данном исследовании.

ПЦР амплификацию гена 16S рРНК проводили согласно [12] с использованием набора Таq ДНК-полимеразы (“Евроген”, Россия) и праймеров bak11w (5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3')

и bak4 (5'-AGG AGG TGA TCC ARC CGC A-3'). Для проверки успешности ПЦР-амплификации проводили электрофорез в 2%-ном агарозном геле. Успешно амплифицированные ПЦР продукты выделяли из агарозного геля с использованием коммерческого набора QIAquick Gel Extraction Kit ("Qiagen", США). Секвенирование по Сэнгеру очищенных ПЦР продуктов осуществлялось с применением тех же праймеров, что и для проведения ПЦР.

Для описания морфологии колоний и клеток микроорганизмов использовали иммерсионную микроскопию (микроскоп BX50, "Olympus", Япония).

Ферментативный профиль лактобацилл. Оценку ферментативной активности выделенных из кефирного грибка штаммов лактобацилл проводили с использованием наборов API ZYM ("Bio-Merieux", Франция). Система API ZYM позволяет проводить полуколичественное измерение ферментативных активностей. Эта система представляет собой стрип с 20 лунками, 19 из которых содержат дегидратированный хромогенный субстрат для выявления активности различных ферментов и лунку без субстрата в качестве отрицательного контроля. В лунки добавляли буфер и суспензию клеток исследуемых бактерий, после чего тест-полоска инкубировалась 48 ч при 37°C. Далее проводили визуальную оценку изменения цвета субстрата в лунке по шкале 0–5 по сравнению с контролем.

Определение антибиотикорезистентности. Антибиотическая резистентность штаммов лактобацилл анализировалась диско-диффузным методом с помощью набора дисков, пропитанных различными видами антибиотиков. Диски накладывались на плотную питательную среду, засеянную культурой исследуемого штамма, после чего осуществляли культивирование в течение суток при температуре 37°C и последующее измерение диаметра зоны задержки роста вокруг дисков.

Для проверки наличия генов антибиотикорезистентности проводили ПЦР-амплификацию с выделенной геномной ДНК, используя набор Таq ДНК-полимераза ("Евроген", Россия), согласно инструкции производителя. Последовательности праймеров и основные параметры амплификации приведены в табл. 1. Для проверки успешности ПЦР-амплификации, проводили электрофорез в 2%-ном агарозном геле.

Функциональные свойства штаммов лактобацилл и кефирной закваски. Для изучения функциональных свойств кефирной закваски и штаммов лактобацилл в стерильное обезжиренное молоко вносили 1% инокулята соответствующих микроорганизмов и проводили культивирование в термостате при температуре (24 ± 2)°С (кефирная закваска), 30°C (*L. paracasei*) и 37°C (*L. helveticus*) в

течение 72 ч. В ходе ферментации через 6, 16, 24, 48 и 72 ч стерильно отбирали аликвоты молока, после чего проводили измерение количества жизнеспособных клеток (КОЕ) и pH с использованием pH-метра Seven Easy ("Mettler Toledo", США). В белково-пептидных фракциях ферментированного молока определяли протеолитическую, антиоксидантную и АПФ-ингибитирующую (гипотензивную) активности.

Определение количества жизнеспособных клеток. В кефирной закваске определяли общее количество жизнеспособных молочнокислых микроорганизмов методом наиболее вероятного числа молочнокислых бактерий (НВЧ) при помощи посева в пробирки со стерильным обезжиренным молоком и инкубирования при 30°C в течение 72 ч. Количество клеток определяли по ГОСТ 33951–2016 [13].

Количество клеток лактобацилл определяли методом посева на питательную среду MRS-агар (ООО "НПЦ Биокомпас-С", Россия). Культивирование проводили в анаэробных условиях при 30 ± 1°C для *L. paracasei* и 37 ± 1°C для *L. helveticus* с использованием анаэростата ("Oxiod", США) и газ-пакетов GasPak ("BD Biosciences", США), подсчитывались все выросшие на среде в течение 72 ч колонии.

Получение белково-пептидных фракций. Аликвоту (15 мл) образца ферментированного молока центрифугировали при температуре 4°C в течение 30 мин при 10000 g на центрифуге 5702R ("Eppendorf", Германия) и фильтровали надосадочную жидкость вместе с жировым слоем через складчатый бумажный фильтр (MN 640W, "Macherey-Nagel", Германия). pH фильтрата доводили до 4.6 добавлением 0.1 М раствора гидроксида натрия, после чего фильтрат центрифугировали при 4°C в течение 30 мин при 10 000 g на центрифуге 5702R ("Eppendorf", Германия) и фильтровали через шприцевые фильтры с гидрофильтрной мембранный с диаметром пор 0.45 мкм ("Sartorius", Германия). Полученные белково-пептидные фракции замораживали и хранили при температуре –73°C до проведения анализа.

Перед проведением анализа образцы белково-пептидных фракций ферментированного молока размораживали и дополнительно фильтровали с помощью шприцевых фильтров с гидрофильтрной PVDF-мембранный с диаметром пор 0.45 мкм ("Carl Roth", Германия).

Протеолитическая активность. Протеолитическую активность определяли путем измерения количества высвобождаемых аминогрупп в исследуемых образцах спектрофотометрическим методом с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS) [14]. Оптическую плотность растворов определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 ("BioTek",

Таблица 1. Праймеры для проверки наличия генов антибиотикорезистентности и параметры ПЦР-амплификации

Ген	Праймеры	Последовательность	ПЦР	Ссылка	
Аминогликозиды:					
<i>aac(6')-aph(2')</i>	<i>aac_F</i>	5'-CCAAGAGCAATAAGGGCATA-3'	<i>Tm</i> = 60°C ≈220 bp	[36]	
	<i>aac_R</i>	5'-CACTATCATAACCACTACCG-3'			
<i>aad(E)</i>	<i>aad(E)_F</i>	5'-GCAGAACAGGATGAACGTATTG-3'	<i>Tm</i> = 55°C ≈369 bp	[37]	
	<i>aad(E)_R</i>	5'-ATCAGTCGAACTATGTCCC-3'			
Тетрациклины:					
<i>RPP*</i>	<i>DI</i>	5'-GAYACNCCNGGNCAVRTNGAYTT-3'	<i>Tm</i> = 50°C ≈1083 bp	[38]	
	<i>DII</i>	5'-GCCCARWANGRTTNGGNNGNACYTC-3'			
	<i>Tet-1</i>	5'-GCTCACGTTGACGCAGGAA-3'	<i>Tm</i> = 50°C ≈1300 bp		
	<i>Tet-2</i>	5'-AGGATTGGCGGGACTTCTA-3'			
<i>tet(K)</i>	<i>tet(K)_F</i>	5'-TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA-3'	<i>Tm</i> = 45°C ≈348 bp	[40]	
	<i>tet(K)_R</i>	5'-AAAGGGTTAGAAACTCTTGAAA-3'			
<i>tet(L)</i>	<i>tet(L)_F</i>	5'-GTMGTTGCGCGCTATATTCC-3'	<i>Tm</i> = 45°C ≈696 bp		
	<i>tet(L)_R</i>	5'-GTGAAMGRWAGCCCACCTAA-3'			
Амфениколы:					
<i>cat</i>	<i>cat_F</i>	5'-ATGACTTTAATATTATRAWTT-3'	<i>Tm</i> = 49°C ≈648 bp	[41]	
	<i>cat_R</i>	5'-TCATYTACMYTATSAATTATAT-3'			
MLS:					
<i>erm(A)</i>	<i>erm(A)_F</i>	5'-TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA-3'	<i>Tm</i> = 48°C ≈645 bp	[42]	
	<i>erm(A)_R</i>	5'-CTTCGATAGTTATTAAATATTAGT-3'			
<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)_F</i>	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3'	<i>Tm</i> = 50°C ≈639 bp		
	<i>erm(B)_R</i>	5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'			
<i>erm(C)</i>	<i>erm(C)_F</i>	5'-TCAAAACATAATATAGATAAA-3'	<i>Tm</i> = 43°C ≈642 bp		
	<i>erm(C)_R</i>	5'-GCTAATATTGTTAAATCGTCAAT-3'			
<i>erm(F)</i>	<i>erm(F)_F</i>	5'-CGGGTCAGCACTTACTATTG-3'	<i>Tm</i> = 500°C ≈466 bp	[43]	
	<i>erm(F)_R</i>	5'-GGACCTACCTCATAGACAAG-3'			
<i>erm(T)</i>	<i>erm(T)_F</i>	5'-CCGCCATTGAAATAGATCCT-3'	<i>Tm</i> = 55°C ≈478 bp	[44]	
	<i>erm(T)_R</i>	5'-GCTTGATAAAATTGGTTTTGGA-3'			
<i>mef(A)</i>	<i>mef(A)_F</i>	5'-ACCGATTCTATCAGCAAAG-3'	<i>Tm</i> = 43°C ≈940 bp	[45]	
	<i>mef(A)_R</i>	5'-GGACCTGCCATTGGTGTG-3'			

* *RPP* – гены, кодирующие белки-защитники рибосомы (включая *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tet(32)* и *tet(36)*).

США) при длине волны 340 нм. В качестве стандарта для определения протеолитической активности использовали L-лейцин (“Sigma-Aldrich”, США). Результаты измерений выражали в мМ эквивалентов лейцина.

Антиоксидантная активность. Антиоксидантную активность *in vitro* в образцах определяли флуоресцентным методом ORAC (oxygen radical absorbance capacity) с помощью микропланшет-

ного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (“BioTek”, США) с генерацией пероксильного радикала в реакционной среде [15].

АПФ-ингибитирующая (гипотензивная) активность. Гипотензивную активность *in vitro* в образцах определяли по их способности ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент (АПФ) – ключевое звено ренин-ангиотензиновой системы, участвующей в регуляции артериального дав-

ления — как описано в работе [15]. Измерения проводили с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (“BioTek”).

Все эксперименты были выполнены в 3 биологических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение, биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация штаммов. По результатам последних исследований перспективными источниками новых эффективных пробиотических штаммов могут быть кисломолочные продукты, получаемые путем естественного сквашивания [16]. В этом отношении внимания заслуживают естественно сформированные популяции микроорганизмов, входящие в состав кефирных грибков [8, 17].

Для выделения чистых культур микроорганизмов, кефирные зерна отделяли от закваски, гомогенизировали и вносили в жидкую накопительную среду с добавлением спирта, способствующую преимущественному росту бактерий семейства *Lactobacillaceae* (поскольку лактобациллы более спиртоустойчивы, по сравнению с лактококками). При дальнейшем высеивании накопительной культуры на агаризованную среду наблюдали поверхностные колонии округлой формы и вытянутые глубинные. При микроскопировании изолятов в первые дни после выделения наблюдали многочисленные длинные цепочки палочек, напоминающие сплетение стромы кефирного грибка. Через несколько пересевов цепочки палочек распадались и наблюдались лишь отдельные короткие и длинные палочки. В результате из кефирной закваски в чистую культуру были выделены три штамма лактобацилл.

Результаты биохимической идентификации с использованием системы API 50CH не дали однозначной идентификации в случае изолята № 1 и выделенный микроорганизм был предварительно отнесен к *Lactobacillus acidophilus* (табл. 2). Изолят № 2 и № 3 были отнесены к *Lactobacillus curvatus* (99.9% идентичности) и *Lactobacillus plantarum* (98.7% идентичности) соответственно (табл. 2). Как было отмечено ранее в работе Королевой [18], при выделении отдельных молочнокислых бактерий из кефирного грибка, возникали трудности, связанные с тем, что чистые культуры микроорганизмов, либо не росли в молоке, либо утрачивали свою биохимическую активность. В связи с этим их биохимическая идентификация могла быть затруднена, и для однозначного определения родовой и видовой принадлежности требовалось использование молекулярно-генетических методов.

На рис. 1 приведено филогенетическое дерево, построенное на основе как полученных в данной работе последовательностей 16S рРНК выделенных

лактобацилл, так и последовательностей 16S рРНК из штаммов микроорганизмов, ранее использованных в работе [19] в качестве типовых для своего вида. Расположение выделенных штаммов на дереве позволило однозначно определить их родовую и видовую принадлежность: изолят № 1 был идентифицирован как *Lactobacillus helveticus*, а изолаты № 2 и № 3 — как *Lactobacillus paracasei* (в соответствии с новой классификацией *Lacticaseibacillus paracasei*). Полученные последовательности 16S рРНК были депонированы в базу данных GenBank, а штаммам присвоены коллекционные номера: *L. helveticus* KF3 — MW558120 (изолят № 1); *L. paracasei* KF1 — MW558119 (изолят № 2); *L. paracasei* ABK — MN994625 (изолят № 3).

Интересно отметить, что штамм *L. helveticus* KF3 из кефирного грибка значительно отличался по биохимическому профилю от штамма *L. helveticus* NK1, выделенного из ЖКТ человека [20]. В отличие от последнего, он был не способен сбраживать D-фруктозу, D-целлобиозу, D-мальтозу, D-сахарозу и N-ацетилглюкозамин, однако обладал способностью утилизировать гентибиозу, гликоген и эскулин с добавлением цитрата железа (табл. 2). Что касается двух штаммов *L. paracasei*, то оба изолята были способны ферментировать рибозу, но не глицерин и ксилозу, что отличает данный вид от других родственных видов лактобацилл. Кроме того, два разных изолята *L. paracasei* отличались друг от друга по способности утилизировать арбутин и эскулин с добавлением цитрата железа, а также способностью ферментировать D-мелибиозу, D-тагатозу и гентибиозу.

Ферментативная активность штаммов лактобацилл. Актуальной задачей является исследование ферментативного профиля пробиотических штаммов бактерий, в том числе, активности протеолитических и гидролитических ферментов, а также ферментов антиоксидантной защиты. Качественные и количественные характеристики ферментативной активности молочнокислых бактерий имеют большое значение при выборе микроорганизмов в качестве заквасок и пробиотических препаратов. В результате действия ферментов, вырабатываемых населяющими кишечник микроорганизмами, образуются различные соединения, которые оказывают влияние на эпителиальный обмен, обеспечивают конъюгацию желчных кислот, принимают участие в метаболизме билирубина и восстановлении холестерина до копростирина, повышают осмотическое давление в просвете кишки при одновременном понижении pH и тем самым стимулируют перистальтику кишечника и др. [21]. Большое значение имеют также гликозил-гидролазы, которые участвуют в метаболизме многих биологически активных соединений растительного происхождения [22]. Некоторые виды микроорганизмов, используемые в качестве пробиотиков и йогуртных заквас-

Таблица 2. Биохимические свойства изолятов лактобацилл: *Lactobacillus helveticus* KF3 – (изолят № 1); *Lacticaseibacillus paracasei* ABK – (изолят № 3)

Соединение	Биохимическая реакция, № изолята			Соединение	Биохимическая реакция, № изолята		
	№ 1	№ 2	№ 3		№ 1	№ 2	№ 3
Глицерин	–	–	–	Салицин	–	+	+
Эритрол	–	–	–	D-целлобиоза	–	+	+
D-арabinоза	–	–	–	D-мальтоза	–	+	+
L-арabinоза	–	–	–	D-лактоза	+	+	+
D-рибоза	–	+	+	D-мелибиоза	–	–	+
D-ксилоза	–	–	–	D-сахароза	–	–	–
L-ксилоза	–	–	–	D-трегалоза	–	+	+
D-адонитол	–	–	–	Инулин	–	–	–
Метил-βD-ксилапиранозид	–	–	–	D-мелецитоза	–	+	+
D-галактоза	–	+	+	D-раффиноза	–	–	–
D-глюкоза	+	+	+	Крахмал	–	–	–
D-фруктоза	–	+	+	Гликоген	+	–	–
D-манноза	+	+	+	Ксилит	–	–	–
L-сорбоза	–	–	–	Гентиобиоза	+	–	+
L-рамноза	–	–	–	D-тураноза	–	+	+
Дульцитол	–	–	–	D-ликсоза	–	–	–
Инозит	–	–	–	D-тагатоза	–	+	–
D-маннит	–	+	+	D-фукоза	–	–	–
D-сорбит	–	–	–	L-фукоза	–	–	–
Метил-αD-маннопиранозид	–	–	–	D-арабит	–	–	–
Метил-αD-глюкопиранозид	–	–	–	L-арабит	–	–	–
N-ацетилглюкозамин	–	+	+	Глюконат калия	–	–	–
Амигдалин	–	–	–	2-кетоглюконат калия	–	–	–
Арбутин	–	–	+	5-кетоглюконат калия	–	–	–
Эскулин, цитрат железа	+	–	+		–	–	–

сок, являются продуcentами гликозил-гидролаз, отсутствующих или недостаточно активных у человека [23]. При употреблении людьми кисломолочных продуктов, содержащих данные микроорганизмы, в их кишечнике появляется активность α -галактозидазы и увеличивается активность β -галактозидазы (лактазы), недостаточность которой приводит к непереносимости лактозы.

Оценка ферментативной активности штаммов лактобацилл проводилась полуколичественным способом с использованием наборов API ZYM (рис. 2). Было показано, что штаммы *L. paracasei* в целом обладали выраженной и разнообразной

гликозилгидролазной активностью, в то время как у штамма *L. helveticus* KF3 были выявлены активности всего трёх гликозил-гидролаз. У всех штаммов лактобацилл была обнаружена умеренная α -галактозидазная (0.5–1 у. ед.) и высокая β -галактозидазная активность (4–5 у. ед.). У штаммов *L. paracasei* наблюдали достаточно высокую активность α -глюкозидазы (3–4 у. ед.), но при этом невысокую активность β -глюкозидазы (≤ 0.5 у. ед.) и α -фукозидазы (~ 0.5 у. ед.), а штамм *L. helveticus* KF3 не проявлял этих ферментативных активностей. Активности β -глюкуронидазы, α -маннозидазы и α -фукозидазы отсутствовали у

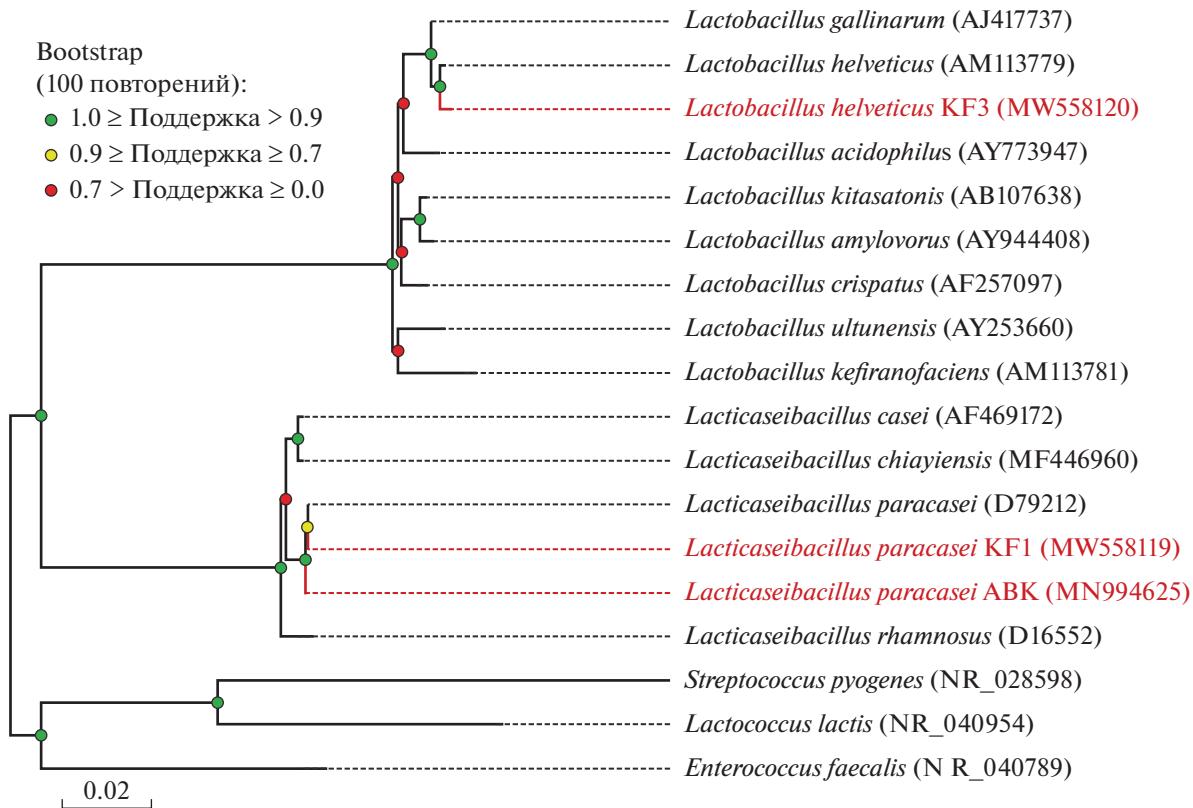


Рис. 1. Филогенетическое дерево, включающее типовые штаммы для различных видов лактобацилл и штаммы, выделенные в данной работе (отмечены красным). Эволюционное расстояние, соответствующее 1 замене нуклеотида на каждые 100, показано масштабом. Статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа, показана цветными кружками.

всех тестируемых штаммов. Штаммы *L. paracasei* показали также высокую аминопептидазную активность (лейцин- и валин аминопептидазы, 3–5 у. ед.) (рис. 2), при этом активностей протеиназ (трипсин и α -химотрипсин) обнаружено не было. Штамм *L. helveticus* демонстрировал слабые аминопептидазную и протеазную активности, но показал достаточно высокие активности кислой фосфатазы и фосфогидролазы в диапазоне 1.5–3.5 у. ед. У обоих штаммов *L. paracasei* была выявлена умеренная активность эстеразы (C4) и эстераз-липазы (C8) (средняя активность в диапазоне 1–2.5 у. ед.), у *L. helveticus* активность данных ферментов не обнаружена. У всех трех штаммов отсутствовала липазная активность (C14).

Антибиотикорезистентность штаммов лактобацилл. В работе была определена чувствительность выделенных из кефирного грибка штаммов лактобацилл к 15 антибактериальным препаратам, наиболее часто используемым в клинической практике для лечения различных кишечных и легочных инфекций, а также заболеваний мочевыводящих путей. Выбранные антибиотики относились к восьми различным структурным семействам и функционально подразделялись на ингибиторы биосинтеза клеточной стенки, белка и ДНК (рис. 3).

Как видно из рис. 3 резистентность к наибольшему числу антибиотиков наблюдалась для штамма *L. helveticus* KF3. Этот штамм был устойчив практически ко всем антибиотикам, нарушающим процесс синтеза клеточной стенки, за исключением оксациллина. Из антибиотиков, ингибирующих синтез белка, *L. helveticus* KF3 был устойчив ко всем антибиотикам, связывающимся в пептидил-трансферазном центре 50S рибосомальной субъединицы, и лишь к одному, тетрациклину, связывающемуся в А-сайте 30S субъединицы рибосомы. Также данный штамм был устойчив ко всем антибиотикам, блокирующим синтез ДНК. Крайне интересным оказался факт значительно различающейся устойчивости к антибиотикам штаммов *L. paracasei* KF1 и *L. paracasei* ABK. Эти два микроборганизма показывали совпадающие статусы антибиотикорезистентности только для неомицина, к которому оба были устойчивы, и для ампициллина, который достоверно подавлял оба штамма. Для таких антибиотиков как амоксициллин, доксициклин, тетрациклин и хлорамфеникол результаты были диаметрально противоположны: если штамм *L. paracasei* KF1 проявлял к ним резистентность, то штамм *L. paracasei* ABK имел достоверно подавлялся.

Фермент	Активность, у. ед.		
	<i>L. helveticus</i> KF3	<i>L. paracasei</i> KF1	<i>L. paracasei</i> ABK
1 Контроль	0	0	0
2 Щелочная фосфатаза	≤0.5	0.5	≤0.5
3 Эстераза (C4)	0.5	1.5	2.0
4 Эстераз-липаза (C8)	≤0.5	1.0	1.0
5 Липаза (C14)	0	0	0
6 Лейцин ариламида	1.5	3.0	4.0
7 Валин ариламида	≤0.5	4.0	4.5
8 Цистин ариламида	0	≤0.5	≤0.5
9 Трипсин	0	0	0
10 α-Химотрипсин	0	0	0
11 Кислая фосфатаза	3.0	1.5	1.0
12 Нафтол-AS-BI-фосфогидролаза	3.0	≤0.5	≤0.5
13 α-галактозидаза	1.0	≤0.5	0.5
14 β-галактозидаза	≥0.5	4.0	5.0
15 β-глюкоронидаза	0	0	0
16 α-глюкозидаза	0	3.0	4.0
17 β-глюкозидаза	0	≤0.5	≤0.5
18 N-ацетил-β-глюказаминидаза	0	0	0
19 α-манозидаза	0	0	0
20 α-фукозидаза	0	0.5	≤0.5

Рис. 2. Ферментативный профиль (API ZYM) штаммов лактобацилл.

Чтобы определить, имеет ли наблюдаемая антибиотикорезистентность штаммов лактобацилл переносимый характер, все изученные штаммы прошли ПЦР-проверку на наличие генов антибиотикорезистентности (AR-генов). Проверяемые гены (табл. 1) включали те, возможность горизонтального переноса которых была ранее показана у лактобацилл [24–28].

ПЦР-анализ показал отсутствие всех проверяемых генов у трех выделенных штаммов лактобацилл. Таким образом, с высокой вероятностью можно заключить, что наблюдаемая в тестах *in vitro*, антибиотикорезистентность штаммов носит не передаваемый характер. Возможно, различный уровень резистентности исследованных штаммов лактобацилл носит “врожденный” характер и объ-

ясняется индивидуальными мутациями и уровнями экспрессии определенных генов.

Сравнительная характеристика параметров ферментации коровьего молока кефирной закваской и выделенными чистыми культурами лактобацилл. Основные параметры ферментации и динамика изменения протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибитирующей активностей ферментированного коровьего молока для кефирной закваски и выделенных из кефирного грибка штаммов лактобацилл представлены на рис. 4. Из сопоставления графиков по изменению количества жизнеспособных клеток лактобацилл и pH можно заключить, что штамм *L. helveticus* KF3 – наименее кислотоустойчив по сравнению с обоими штаммами *L. paracasei*, его рост замедлялся уже

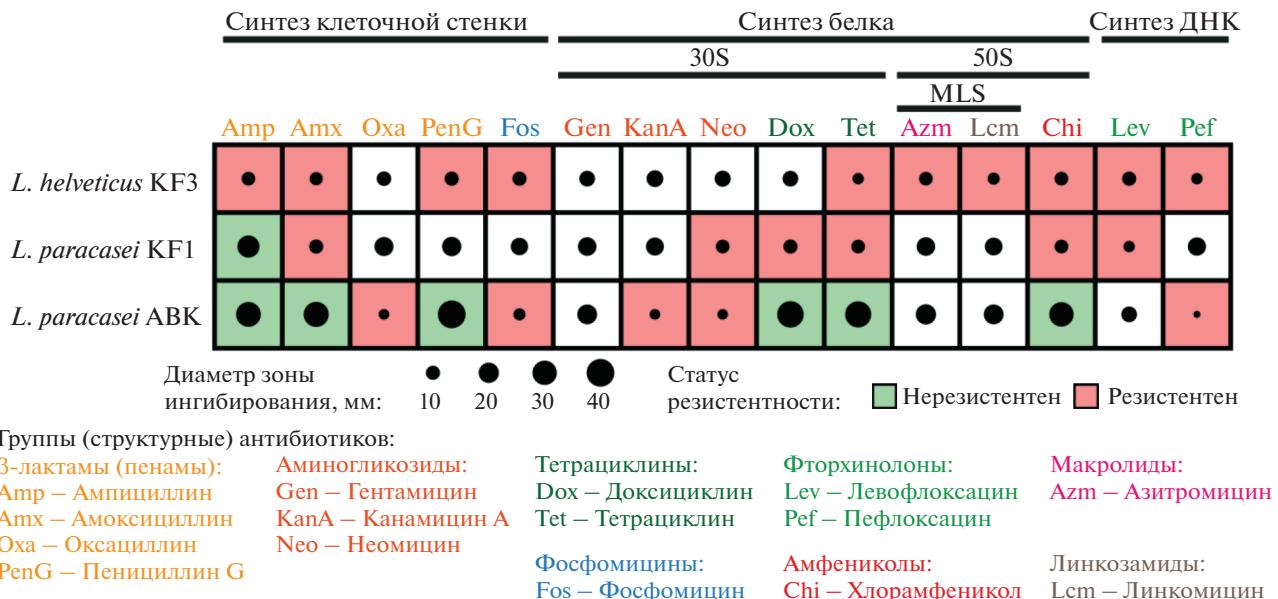


Рис. 3. Профиль антибиотикорезистентности выделенных в данной работе штаммов лактобацилл.

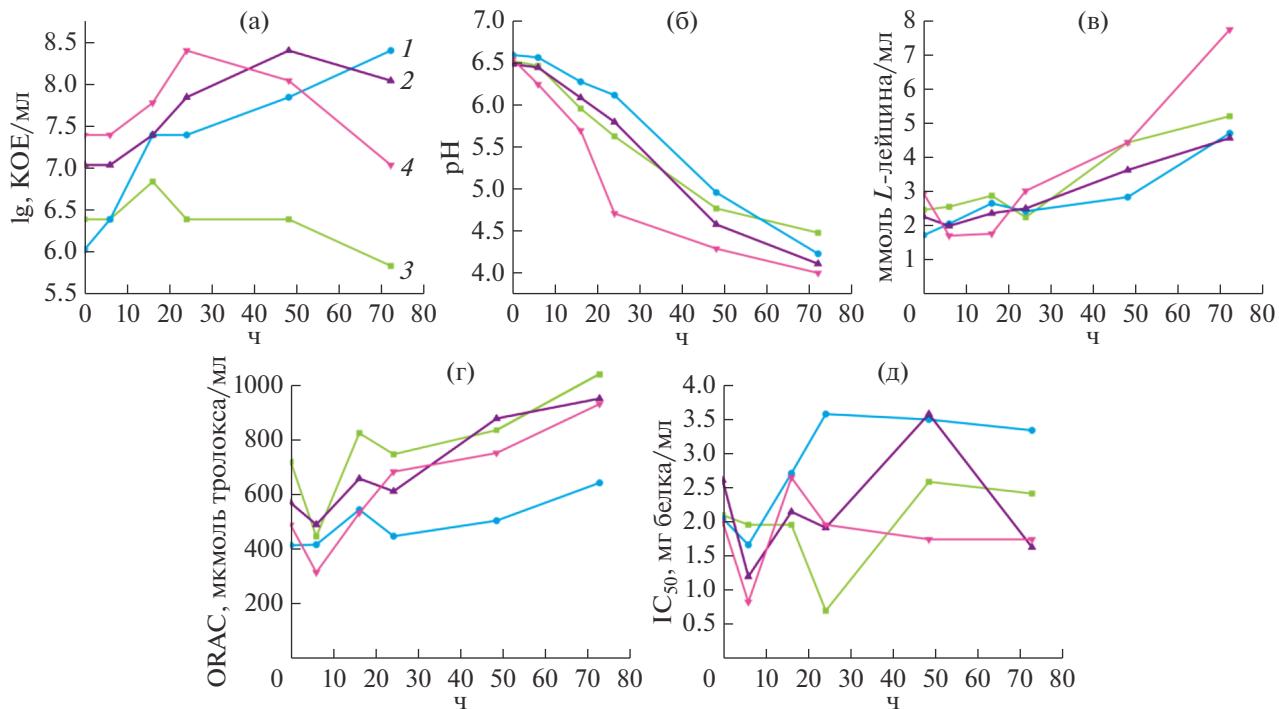


Рис. 4. Изменение количества жизнеспособных клеток лактобацилл (а), активной кислотности (б), протеолитической (в), антиоксидантной (г) и гипотензивной (д) активностей при ферментации обезжиренного коровьего молока при помощи трех штаммов лактобацилл и кефирной закваски. 1 – *L. paracasei* KF1, 2 – *L. paracasei* ABK, 3 – *L. helveticus* KF3, 4 – кефирная закваска (цвет кривых для штаммов одинаков на всех рисунках).

после 25 ч культивирования при достижении значения pH 5.5. Наиболее кислотообразующим и при этом самым кислотоустойчивым был штамм *L. paracasei* ABK, в присутствии которого закисление среды происходило быстрее остальных, но

при этом не оказывало видимого ингибирующего эффекта на его рост. Самую низкую скорость кислотообразования показал штамм *L. paracasei* KF1, для которого значения pH ферментированного молока в ходе всего культивирования, за исключ-

чением 72 ч, были выше по сравнению с двумя другими штаммами. Это объясняет его стабильный рост и замедление выхода на стационарную фазу за наблюдаемый период времени.

Несмотря на различную скорость роста штаммов, динамика их протеолитической активности была сопоставима в интервале от 0 до 48 ч. К 72 ч ферментации протеолитическая активность значительно увеличивалась у кефирной закваски, что могло быть связано с возрастающей активностью других микроорганизмов в составе закваски, таких как уксуснокислые бактерии и дрожжи, причем к этому моменту времени количество молочнокислых бактерий значительно снижалось. Как для кефирной закваски, так и для отдельных штаммов наблюдалось увеличение протеолитической активности на относительно поздних стадиях ферментации при выходе на стационарную фазу или в фазе клеточной гибели.

В целом изменение антиоксидантной активности положительно коррелировало со степенью гидролиза, в то время как АПФ-ингибирующая активность оставалась практически неизменной на поздних этапах ферментации. Наблюдаемые различия в паттернах развития антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей для исследуемых штаммов можно объяснить общими требованиями к пептидам, проявляющим данные активности. В случае антиоксидантной активности пептиды должны быть короткими (до 20 аминокислот) и содержать высокую долю гидрофобных аминокислот [29–31]. Поскольку многие пептиды могут удовлетворять этим минимальным требованиям, любая молочнокислая бактерия потенциально может продуцировать среди прочих некоторое количество таких пептидов. Следовательно, чем больше общее количество пептидов (то есть степень протеолиза) в ферментированном молоке, тем большее количество антиоксидантных пептидов оно будет содержать и тем более высокой антиоксидантной активностью оно будет обладать. Следует отметить, что такое же соотношение протеолитической и антиоксидантной активности ранее сообщалось в работах [32–34]. В отличие от антиоксидантных, АПФ-ингибирующие пептиды очень специфичны к аминокислотной последовательности, поскольку они должны осуществлять конкурентное ингибирирование катализического сайта аngiotenzin-превращающего фермента [31]. Следовательно, их продукция сильно зависит от способности протеолитической системы конкретного микроорганизма высвобождать из аминокислотной последовательности белка пептиды, состоящие из определенных аминокислот. Таким образом, только небольшая фракция пептидов, если таковая имеется, будет обладать АПФ-ингибирующей активностью независимо от степени протеолиза.

Необходимо отметить, что, несмотря на значительно большую степень протеолиза белков молока, ферментированного кефирной закваской, его антиоксидантные свойства были сопоставимы, а гипотензивные свойства (АПФ-ингибирующая активность) в первые 24 ч культивирования были слабее выражены, чем у молока, заквашенного чистыми культурами лактобацилл. Однако в ходе дальнейшей ферментации кефирной закваской АПФ-ингибирующая активность сквашенного молока увеличивалась и становилась выше, чем при ферментации отдельными штаммами лактобацилл. Это может объясняться присутствием отличных от лактобацилл микроорганизмов в составе кефирной закваски на данных этапах ферментации. Действительно, ранее была показана способность кефира снижать артериальное давление и частоту сердечных сокращений за счет ингибирирования АПФ в крови крыс с экспериментальной гипертензией [35].

Таким образом, из кефирного грибка были выделены три штамма лактобацилл, относящиеся к видам *L. helveticus* и *L. paracasei*, обладающие широким спектром ферментативных активностей, включая α - и β -галактозидазную, α -глюказидазную, фосфатазную, аминопептидазную и липазную. В тестах *in vitro* показаны антиоксидантные и гипотензивные свойства молока, ферментированного этими штаммами лактобацилл, которые сопоставимы со свойствами молока, ферментированного кефирной закваской. Как показали результаты анализа ПЦР, в геномах выделенных штаммов лактобацилл отсутствовали гены антибиотикорезистентности *aad*, *aacB'-aph2"*, *RPP* (включая *tet(M)*, *tet(O)* и др.), *tetK/L*, *ermA/B/C/F/T*, *cat*, *mefA* как в хромосомах, так и в плазмidaх. Поэтому новые штаммы лактобацилл могут быть использованы в качестве пробиотических культур при формировании ассоциаций заквасочных культур для разработки кисломолочных продуктов с лечебно-профилактическим действием, и для прямого использования в качестве пробиотиков, поскольку не могут служить источником генов устойчивости к антибиотикам в микробиоме человека. Тем не менее, необходимо подтверждение пробиотических свойств выделенных из кефирных грибков штаммов лактобацилл в *in vivo* экспериментах.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ и НИФ в рамках научного проекта № 19-54-60002 и в рамках НИР по Госзаданию (шифр темы 0578-2019-0023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turkmen N., Akal C., Özer B. // J. Funct. Foods. 2019. V. 53. P. 62–75.
2. German J.B., Zivkovic A.M., Dallas D.C., Smilowitz J.T. // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2011. V. 2. № 1. P. 97–123.

3. *Kwak N.-S., Jukes D.J.* // Food Control. 2001. V. 12. № 2. P. 99–107.
4. *Şanlier N., Gökcen B.B., Sezgin A.C.* // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2019. V. 59. № 3. P. 506–527.
5. *Gänzle M.G.* // Curr. Opin. Food Sci. 2015. V. 2. P. 106–117.
6. *Rozhkova I.V., Moiseenko K. V., Glazunova O.A., Begunova A.V., Fedorova T.V.* // Food Science and Technology / Ed. O.A. Ijabadeniyi Berlin: De Gruyter, 2020. P. 215–234.
7. *Rosa D.D., Dias M.M.S., Grześkowiak Ł.M., Reis S.A., Conceição L.L., Peluzio M. do C.G.* // Nutr. Res. Rev. 2017. V. 30. № 1. P. 82–96.
8. *Plessas S., Nouska C., Mantzourani I., Kourkoutas Y., Alexopoulos A., Bezirtzoglou E.* // Fermentation. 2016. V. 3. № 1. P. 1.
9. *Nielsen B., Gürakan G.C., Ünlü G.* // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2014. V. 6. № 3–4. P. 123–135.
10. *Leite A.M.O., Miguel M.A.L., Peixoto R.S., Ruas-Madiedo P., Paschoalin V.M.F., Mayo B., Delgado S.* // J. Dairy Sci. 2015. V. 98. № 6. P. 3622–3632.
11. Технологическая инструкция по приготовлению и применению заквасок и бактериальных концентратов для кисломолочных продуктов. Москва, 2004. С. 56.
12. *Dasen G., Smutny J., Teuber M., Meile L.* // Syst. Appl. Microbiol. 1998. V. 21. № 2. P. 251–259.
13. ГОСТ 33951-2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. Москва: Стандартинформ, 2016. Р. 15.
14. *Adler-Nissen J.* // J. Agric. Food Chem. 1979. V. 27. № 6. P. 1256–1262.
15. *Торкова А.А., Рязанцева К.А., Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Цендалович М.Ю., Фёдорова Т.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 6. С. 580–591.
16. *Zielńska D., Kolożyn-Krajewska D., Laranjo M.* // Biomed Res. Int. 2018. V. 2018. P. 5063185.
17. *Mantzourani I., Chondrou P., Bontsidis C., Karolidou K., Terpou A., Alexopoulos A., Bezirtzoglou E., Galanis A., Plessas S.* // Ann. Microbiol. Annals of Microbiology, 2019. V. 69. № 7. P. 751–763.
18. *Koroleva N.S.* // Therapeutic properties of fermented milks / Ed. R.K. Robinson. London: Elsevier Applied Science, 1991. P. 159–179.
19. *Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G.E., Gänzle M.G., Lebeer S.* // Int. J. Syst. Ev. Microbiol. 2020. V. 70. № 4. P. 2782–2858.
20. Фёдорова Т.В., Васина Д.В., Бегунова А.В., Рожкова И.В., Раскошная Т.А., Габриэлян Н.И. // Прикл. Биохимия и Микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 264–276.
21. *Moliner N., Ruiz L., Sánchez B., Margolles A., Delgado S.* // Front. Physiol. 2019. V. 10. P. 10:185.
22. *Braune A., Blaut M.* // Gut Microbes. 2016. V. 7. № 3. P. 216–234.
23. *Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutchins R.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2017. V. 44. P. 94–102.
24. *Sharma P., Tomar S.K., Goswami P., Sangwan V., Singh R.* // Food Res. Int. 2014. V. 57. P. 176–195.
25. *Roberts M.C.* // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 245. № 2. P. 195–203.
26. *Roberts M.C.* // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 282. № 2. P. 147–159.
27. *Mathur S., Singh R.* // Int. J. Food Microbiol. 2005. V. 105. № 3. P. 281–295.
28. *Ammor M.S., Belén Flórez A., Mayo B.* // Food Microbiol. 2007. V. 24. № 6. P. 559–570.
29. *Sarmadi B.H., Ismail A.* // Peptides. 2010. V. 31. № 10. P. 1949–1956.
30. *Pihlanto A.* // Int. Dairy J. 2006. V. 16. № 11. P. 1306–1314.
31. *Udenigwe C.C., Aluko R.E.* // J. Food Sci. 2012. V. 77. № 1. P. R11–R24.
32. *Ramesh V., Kumar R., Singh R.R.B., Kaushik J.K., Mann B.* // Dairy Sci. Technol. 2012. V. 92. № 2. P. 179–188.
33. *Virtanen T., Pihlanto A., Akkanen S., Korhonen H.* // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 102. № 1. P. 106–115.
34. *Begunova A. V., Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K. V., Rozhkova I. V., Fedorova T. V.* // Foods. 2021. V. 10. № 1. P. 17.
35. *Kanbak G., Uzuner K., Kuşat Ol K., Oğlakçı A., Kartkaya K., Şentürk H.* // Clin. Exp. Hypertens. 2014. V. 36. № 1. P. 1–8.
36. *Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C.* // Int. J. Food Microbiol. 2006. V. 111. № 3. P. 234–240.
37. *Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerckhoven V., Kahlmeter G., Hildebrandt B., Müller-Bertling S., Witte W., Goossens H.* // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 59. № 5. P. 900–912.
38. *Clermont D., Chesneau O., De Cespédes G., Horaud T.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. V. 41. № 1. P. 112–116.
39. *Barbosa T.M., Scott K.P., Flint H.J.* // Environ. Microbiol. 1999. V. 1 № 1. P. 53–64.
40. *Gevers D., Danielsen M., Huys G., Swings J.* // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 2. P. 1270–1275.
41. *Hummel A., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P.* // Syst. Appl. Microbiol. 2007. V. 30. № 1. P. 1–7.
42. *Rizzotti L., Simeoni D., Cocconcelli P., Gazzola S., Dellaglio F., Torriani S.* // J. Food Prot. 2005. V. 68. № 5. P. 955–965.
43. *Roberts M.C., Chung W.O., Roe D., Xia M., Marquez C., Borthagaray G., Whittington W.L., Holmes K.K.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. № 6. P. 1367–1372.
44. *Woodbury R.L., Klammer K.A., Xiong Y., Bailiff T., Glennen A., Bartkus J.M., Lynfield R., Van Beneden C., Beall B.W.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. № 3. P. 1140–1143.
45. *Luna V.A., Cousin S.J., Whittington W.L.H., Roberts M.C.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. № 9. P. 2503–2506.

Characterization and Functional Properties of Lactobacilli Isolated from Kefir Grains

**A. V. Begunova^a, O. S. Savinova^b, K. V. Moiseenko^b, O. A. Glazunova^b,
I. V. Rozhkova^a, and T. V. Fedorova^{b,*}**

^aAll-Russia Research Institute of the Dairy Industry, Moscow, 115093 Russia

^bA.N. Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

**e-mail: fedorova_tv@mail.ru*

Being a natural symbiotic consortium of bacteria and yeasts, kefir grains provide a unique source of new probiotic microorganisms. In this work, three new isolates of lactobacilli – *Lactobacillus helveticus* and two strains of *Lacticaseibacillus paracasei* – were isolated from kefir grains originating from the North Caucasian region of Russia, and their identification via biochemical and genetic methods was carried out. For all strains, enzyme activity profiles were described, and antimicrobial resistance and genetic determinants of antibiotic resistance were screened. During fermentation of cow's milk, all three strains showed lower acid-forming activity, but comparable proteolytic, antioxidant and hypotensive activities in comparison with kefir starter culture.

Keywords: kefir grains, lactobacilli, enzymatic profile, proteolytic activity, antioxidant activity, ACE-inhibitory activity