

Биологические свойства штаммов *L. helveticus*

Виктория Александровна Леонова, младший научный сотрудник

E-mail: v.leonova@vniimi.org

Анна Васильевна Бегунова, канд. техн. наук, научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности

Изучены биологические свойства трех штаммов *L. helveticus*. Все исследуемые штаммы метаболизируют D-галактозу. Штамм *L. helveticus* AB утилизирует D-глюкозу, D-фруктозу, N-ацетилглюкозамин и D-трегалозу; *L. helveticus* 20T — D-маннозу, N-ацетилглюкозамин; *L. helveticus* H-9 — D-глюкозу, D-лактозу, D-трегалозу. У всех штаммов выявлена высокая β -галактозидазная активность, а также активность кислой фосфатазы, нафтол-AS-BI-гидролазы, лейцин ариламидазы и цистин ариламидазы. У штаммов *L. helveticus* 20T и *L. helveticus* AB обнаружена активность валин ариламидазы. Все штаммы чувствительны к гентамицину, ампициллину, тетрациклину, азитромицину, линкомицину, левомицетину. Полученные данные свидетельствуют о безопасности использования штаммов в составе заквасок и в качестве продуцентов метаболитных добавок с точки зрения снижения рисков распространения антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: антимикробная активность, биохимическая активность, ферментативная активность, ферменты, устойчивость к антибиотикам, пробиотические культуры.

Leonova V. A., Begunova A. V. Biological properties of *L. helveticus* strains

All-Russian Dairy Research Institute

The biological properties of three strains of *L. helveticus* were studied. All studied strains metabolize D-galactose. The *L. helveticus* AB strain utilizes D-glucose, D-fructose, N-acetylglucosamine, and D-trehalose; *L. helveticus* 20T — D-mannose, N-acetylglucosamine; *L. helveticus* H-9 — D-glucose, D-lactose, D-trehalose. All strains showed high β -galactosidase activity, as well as the activity of acid phosphatase, naphthol-AS-BI hydrolase, leucine arylamidase, and cystine arylamidase. For *L. helveticus* 20T and *L. helveticus* AB strains, valine arylamidase activity was found. All strains are sensitive to gentamicin, ampicillin, tetracycline, azithromycin, lincomycin, chloramphenicol. The data obtained indicate the safety of using strains as part of starter cultures and as producers of metabolite additives in terms of reducing the risk of spreading antibiotic resistance.

Key words: antimicrobial activity, biochemical activity, enzymatic activity, enzymes, antibiotic resistance, probiotic cultures.

Возрастающий спрос на продукты здорового питания способствует развитию производства продуктов с функциональными свойствами. Наиболее распространены среди таких продуктов кисломолочные. Молочнокислые бактерии, обеспечивающие полезные свойства кисломолочных продуктов, в процессе жизнедеятельности продуцируют биологически активные вещества [1, 2].

Наиболее часто в производственной практике используются представители рода *Lactobacillus*, являющиеся комменсальными микроорганизмами ЖКТ. К их положительным свойствам относятся: антагонистическая активность по отношению к патогенным микроорганизмам, антиоксидантная активность, повышение биологической ценности молочных продуктов [2–4].

Накопленные знания о метаболизме и физиологии молочнокислых бактерий позволяют использовать их не только для производства кисломолочных продуктов, но и в качестве продуцентов различных биологически активных веществ: органических кислот, полисахаридов, витаминов, ферментов [4–6].

При подборе штаммов молочнокислых бактерий большое внимание уделяется их биологическим свой-

ствам (ферментативной активности и способности утилизировать углеводы) [3], а также безопасности с точки зрения распространения резистентности к клинически важным антибиотикам.

Существуют различные механизмы устойчивости к антибактериальным препаратам, которые условно делятся на две группы: природные и приобретенные. Приобретенная устойчивость может возникать в результате хромосомных мутаций или при передаче мобильных генетических элементов (плазмид) между микроорганизмами разных видов. Считается, что приобретенная устойчивость имеет более высокий риск распространения между различными видами микроорганизмов.

Согласно литературным данным [7–9], молочнокислые бактерии способны приобретать гены антибиотикорезистентности и передавать их другим штаммам микроорганизмов. Поэтому исследование биологических свойств молочнокислых микроорганизмов для определения возможности их использования при производстве кисломолочных продуктов и в качестве продуцентов метаболитных добавок, в том числе с функциональными свойствами, является актуальным.

Цель работы — изучение биохимической активности, ферментативного профиля и устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов *L. helveticus* 20T, *L. helveticus* AB и *L. helveticus* H-9 из коллекции молочнокислых, пробиотических бактерий и заквасок Центральной лаборатории микробиологии ВНИМИ.

Коллекционные штаммы *L. helveticus* культивировали на стерильном обезжиренном молоке в течение 16 ч при 37 ± 1 °C. Затем высевали на агаризованную среду MRS (ООО «НПЦ Биоконпас-С», Россия) и инкубировали в анаэробных условиях с использованием анаэрогастата «OXOID» с атмосферой, содержащей 10 % CO₂, генерируемой газ-пакетами («Анаэрогаз», ООО «ИНКО», Россия) при 37 ± 1 °C в течение 24 ч.

Данные по биохимической активности получали с использованием тест-системы API 50 CH («BioMérieux», Франция). Для этого из культур, полученных на MRS-агаре, готовили суспензии в среде API 50 CHL Medium с мутностью, эквивалентной 2 ед. по MacFarland. Суспензии вносили в лунки стрипов API 50 CH сразу после приготовления, стрипы инкубировали при 37 ± 1 °C в течение 48 ч. После инкубации отмечали изменение окраски индикатора в лунках, что свиде-

№	Субстрат	Биохимическая реакция			№	Субстрат	Биохимическая реакция			№	Субстрат	Биохимическая реакция		
		AB	20T	H-9			AB	20T	H-9			AB	20T	H-9
0	Контроль	●	●	●	17	Инозит	●	●	●	34	D-мелешитоza	●	●	●
1	Глицерин	●	●	●	18	D-маннит	●	●	●	35	D-раффиноза	●	●	●
2	Эритрол	●	●	●	19	D-сорбит	●	●	●	36	Амидон	●	●	●
3	D-арабиноза	●	●	●	20	Метил-α-D-маннопиранозид	●	●	●	37	Гликоген	●	●	●
4	L-арабиноза	●	●	●	21	Метил-α-D-глюкопиранозид	●	●	●	38	Ксилит	●	●	●
5	D-рибоза	●	●	●	22	N-ацетилглюкозамин	●	●	●	39	Гентобиоза	●	●	●
6	D-ксилоза	●	●	●	23	Амигдалин	●	●	●	40	D-гураноза	●	●	●
7	L-ксилоза	●	●	●	24	Арбутин	●	●	●	41	D-ликсоза	●	●	●
8	D-адонитол	●	●	●	25	Эксудин	●	●	●	42	D-тагатоza	●	●	●
9	Метил-β-D-ксилопиранозид	●	●	●	26	Железа шитрат	●	●	●	43	D-фруктоза	●	●	●
10	D-галактоза	●	●	●	27	Салицин	●	●	●	44	L-фруктоза	●	●	●
11	D-глюкоза	●	●	●	28	D-мальтоза	●	●	●	45	D-арабит	●	●	●
12	D-фруктоза	●	●	●	29	D-лактоза(бычья)	●	●	●	46	L-арабит	●	●	●
13	D-манноза	●	●	●	30	D-мелибиоза	●	●	●	47	Калия глюконат	●	●	●
14	L-ксилоза	●	●	●	31	D-сахароза	●	●	●	48	Калия-2-кетоглюконат	●	●	●
15	L-рамноза	●	●	●	32	D-трегалоза	●	●	●	49	Калия-5-кетоглюконат	●	●	●
16	Дульцитол	●	●	●	33	Инулин	●	●	●					

● положительная реакция ● отрицательная реакция

Рис. 1. Биохимическая активность штаммов *L. helveticus*

Фермент	Активность, у.е.					
	20T	AB	H-9	AB	20T	AB
Контроль	○	0	○	0	○	0
Щелочная фосфатаза	○	0	○	≤0,5	○	0
Эстераза (C4)	○	0	○	0	○	0
Эстераза-липаза (C8)	○	0	○	0	○	0
Липаза	○	0	○	0	○	0
Лейцин ариламидаза	●	5,0	●	4,0	●	5,0
Валин ариламидаза	●	4,0	○	0	●	4,0
Цистин ариламидаза	●	4,0	●	3,0	●	4,0
Трипсин	○	0	○	0	○	0
α-химотрипсин	○	0	○	0	○	0
Кислая фосфатаза	○	1,0	○	1,5	○	1,0
Нафтол-AS-BI-фосфогидролаза	●	3,0	●	4,0	●	3,0
α-галактозидаза	○	0	○	0	○	0
β-галактозидаза	●	4,0	●	4,0	●	4,0
β-глюкорнидаза	○	0	○	0	○	0
α-глюкозидаза	○	0	○	0	○	0
β-глюкозидаза	○	0	○	0	○	0
N-ацетил-β-глюкозаминидаза	○	0	○	0	○	0
α-маннозидаза	○	0	○	0	○	0
α-фруктозидаза	○	0	○	0	○	0

Рис. 2. Профили ферментативной активности штаммов *L. helveticus*

тельствует об утилизации субстрата. Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения «APIWEB®».

Для оценки профиля ферментативной активности использовали тест-системы API®ZYM («BioMérieux»,

Франция), позволяющие проводить полуколичественное измерение активности ферментов. Из культур, выращенных на MRS-агаре, готовили суспензии в среде API Suspension Medium с мутностью, эквивалентной 5–6 ед. по MacFarland. Суспензии

вносили по 65 мкл в лунки стрипов API®ZYM, стрипы инкубировали при 37±1 °C в течение 4 ч. После инкубации в каждую лунку стрипа вносили реагенты ZYM A и ZYM B. Через 5 мин визуально оценивали изменения окраски субстрата в лунках по шкале от 0 до 5 по сравнению с контролем.

Устойчивость культур к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом по МУ 2.3.2.2789–10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов». Из культур, полученных на MRS-агаре, готовили суспензии в 0,9 % растворе натрия хлористого, соответствующие мутности 5 ед. по MacFarland. На поверхность питательной среды MRS-агар наносили 1 см³ суспензии исследуемой культуры и равномерно распределяли шпателем Дригальского. После инокуляции на поверхность питательной среды стерильным пинцетом наносили диски (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Россия) с антибактериальными препаратами (АБП). После аппликации дисков чашки Петри помещали дном вверх в анаэробный стат с атмосферой, содержащей 10 % CO₂, генерируемой газ-пакетами («Анаэрогаз», ООО «ИНКО», Россия). Анаэробный стат с чашками Петри помещали в термостат и инкубировали при 37±1 °C в течение 24 ч. После инкубации измеряли зоны полного подавления видимого роста культур.

Профили биохимической активности штаммов *L. helveticus* различны (рис. 1). Все штаммы ферментируют D-галактозу. Штамм *L. helveticus* AB утилизирует D-глюкозу, D-фруктозу, N-ацетилглюкозамин и D-трегалозу; *L. helveticus* 20T — D-маннозу, N-ацетилглюкозамин; *L. helveticus* H-9 — D-глюкозу, D-лактозу, D-трегалозу.

У всех исследуемых штаммов выявлена высокая β-галактозидазная активность, а также активность кислой фосфатазы, нафтол-AS-BI-гидролазы, лейцин ариламидазы и цистин ариламидазы (рис. 2). У штаммов *L. helveticus* 20T и *L. helveticus* AB обнаружена активность валин ариламидазы.

Кислая фосфатаза и нафтол-AS-BI-гидролаза являются важными ферментами ЖКТ человека, поскольку участвуют в реакциях освобождения и присоединения фосфорильных групп

Зоны подавления видимого роста штаммов *L. helveticus*

Антибактериальный препарат	Количество вещества на диске, мкг	Диаметр зоны задержки роста, мм (чувствительность)		
		<i>L. helveticus</i> 20T	<i>L. helveticus</i> H-9	<i>L. helveticus</i> AB
Гентамицин	10	30±1,0 (S)	24±1,0 (S)	29±1,0 (S)
Ампициллин	10	35±1,0 (S)	30±1,0(S)	46±1,0 (S)
Тетрациклин	30	30±1,0 (S)	25±1,0(S)	45±1,0 (S)
Азитромицин	15	31±1,0 (S)	24±1,0 (S)	37±1,0 (S)
Линкомицин	15	26±1,0 (S)	25±1,0(S)	26±1,0 (S)
Левомецетин	30	30±1,0 (S)	23±1,0(S)	37±1,0 (S)

от других молекул в процессе пищеварения. Фермент β-галактозидаза представляет биотехнологический интерес, так как облегчает симптомы непереносимости лактозы [10].

Устойчивость штаммов *L. helveticus* 20T и *L. helveticus* AB изучали по отношению к АБП различных групп (см. таблицу). Данные по штамму *L. helveticus* H-9 получены ранее [11].

Штаммы *L. helveticus* оказались чувствительны к гентамицину, ампициллину, тетрациклину, азитромицину, линкомицину и левомецетину. Отсутствие устойчивости к антибактериальным препаратам позволяет сделать вывод о безопасности использования штаммов *L. helveticus* с точки зрения распространения антибиотикорезистентности к исследуемым антибактериальным препаратам. **М**

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Донская, Г. А.** Молочные продукты массового потребления с натуральными пищевыми ингре-

диентами профилактической направленности/Г. А. Донская// Инновационные технологии обогащения молочной продукции (теория и практика): монография. Под общ. ред. О. Б. Федотовой. — М.: Франтера, 2016. С. 62–87.

2. **Зобкова, З. С.** Зависимость относительной биологической ценности кисломолочных напитков от вида заквасочных микроорганизмов/З. С. Зобкова// Молочная промышленность. 2020. № 8. С. 36–37.

3. **Chamberlain, M. C.** Metabolomic Analysis of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, and *Lactocaseibacillus rhamnosus* Strains in the Presence of Pomegranate Extract/M. C. Chamberlain [et al.]// *Frontiers in Microbiology*. 2022. V. 13. P. 863228.

4. **Wang, Y.** Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry/Y. Wang [et al.]// *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2021. V. 9. P. 612285.

5. **Gaspar, P.** From physiology to systems metabolic engineering for the

production of biochemicals by lactic acid bacteria/P. Gaspar [et al.]// *Biotechnology advances*. 2013. V. 31. № 6. P. 764–788.

6. **Thorakkattu, P.** Postbiotics: Current trends in food and Pharmaceutical industry/P. Thorakkattu [et al.]// *Foods*. 2022. V. 11. № 19. P. 3094.

7. **Nunziata, L.** Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria strains of dairy origin: An update/L. Nunziata [et al.]// *Food Microbiology*. 2022. V. 1. P. 103999.

8. **Zarzecka, U.** Microorganisms from starter and protective cultures-Occurrence of antibiotic resistance and conjugal transfer of tet genes in vitro and during food fermentation/U. Zarzecka, W. Chajęcka-Wierzychowska, A. Zadernowska// *LWT*. 2022. V. 153. P. 112490.

9. **Wang, K.** Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China/K. Wang [et al.]// *Journal of Agriculture and Food Research*. 2019. V. 1. P. 100006.

10. **Luz, C.** Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product/C. Luz [et al.]// *Journal of Functional Foods*. 2021. V. 84. P. 104599.

11. **Бегунова, А. В.** Антибиотикорезистентность молочнокислых бактерий с пробиотическими свойствами/А. В. Бегунова, И. В. Рожкова// Молочная промышленность. 2020. № 9. С. 48–50.