

С.Л. Василенко, С.Б. Борунова, Н.Н. Фурик
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИШЕЧНИКА ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

(Поступила в редакцию 12.04.2011)

*У 18 штаммов лактобацилл изучена активность протеолитических ферментов. Установлено, что бактерии *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, 2 штамма *L. rhamnosus* обладают низкой протеолитической активностью, для остальных штаммов показана средняя (2 штамма *L. rhamnosus*) и высокая (штаммы *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*) протеолитическая активность. Протеолитическая активность лактобацилл возрастала при увеличении продолжительности культивирования в молоке до шести суток. Протеолитическая активность всех изученных штаммов лактобацилл, культивируемых на пастеризованном молоке, была выше, чем их активность, определенная при культивировании на восстановленном обезжиренном молоке.*

Введение. Регулярное употребление кисломолочных продуктов и препаратов на основе пробиотических микроорганизмов, главным образом лактобацилл и бифидобактерий, оказывает на организм человека положительное влияние, выражающееся в изменении состава бактериальной микрофлоры кишечника и в профилактике и лечении желудочно-кишечных заболеваний [1]. При систематическом употреблении пробиотических продуктов происходит регуляция состава кишечной микрофлоры, что предохраняет организм человека от болезнетворных микроорганизмов за счет адгезии пробиотических бактерий на слизистой оболочке кишечника. Продуцируя антимикробные вещества, пробиотические микроорганизмы создают неблагоприятные условия для роста многих болезнетворных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [1, 2]. Пробиотические микроорганизмы непосредственно обеспечивают организм β -галактозидазой, что особенно важно для людей, страдающих непереносимостью лактозы. Благодаря употреблению пробиотических продуктов, которые, как известно, обладают антимуtagenными и анти-

канцерогенными свойствами, происходит укрепление иммунной системы. Благодаря способности данных бактерий продуцировать витамины как побочные продукты клеточного метаболизма происходит обогащение организма человека витаминами группы В, биотином, РР, фолиевой кислотой, викасолом, токоферолом, аскорбиновой кислотой и рядом других [1–4].

В настоящее время препараты и продукты, созданные с использованием пробиотических микроорганизмов, рассматриваются в качестве основы функционального питания человека и способствуют профилактике ряда заболеваний. Положительный эффект достигается как путем введения живых клеток бактерий непосредственно в организм человека, так и путем использования этих микроорганизмов в составе заквасок при получении продуктов питания, в том числе на основе молока.

В последние годы все более широкое распространение получает пищевая аллергия, вызванная употреблением в пищу животных белков, в том числе содержащихся в молочных продуктах. Это обуславливает необходимость использования микроорганизмов, активно синтезирующих ферменты протеолитического комплекса, для производства гипоаллергенных диетических и лечебно-профилактических продуктов питания на основе гидролизатов молочного белка.

Протеиназы играют ключевую роль в функционировании микробной клетки, процессах ее роста и морфогенеза, активации зимогенов, транспорте секреторных белков и пептидов, преодолении последствий патологических процессов и др. Внеклеточные протеиназы микроорганизмов участвуют главным образом в гидролизе крупных белковых молекул до небольших пептидных остатков, которые затем транспортируются внутрь клетки и используются ею как источники азотного питания. В то же время внутриклеточные протеолитические ферменты регулируют клеточный метаболизм. Протеолитические ферменты микроорганизмов весьма многочисленны и различаются по субстратной специфичности и физико-химическим характеристикам [5, 6].

Цель данной работы – изучение протеолитической активности штаммов лактобацилл, выделенных из содержимого кишечника здоровых людей.

Материалы и методы исследования. Объектами исследований являлись 18 штаммов лактобацилл из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий – *L. delbrueckii subsp. lactis* L1/2, *L. delbrueckii subsp. lactis* L39/4, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* L32/2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* L33/1, *L. helveticus* L27/4, *L. helveticus* L38/1, *L. acidophilus* L35/6, *L. gasseri* L9/1, *L. gasseri* L34/5, *L. plantarum* L21/3, *L. plantarum* L31/1, *L. paracasei* L12/1, *L. rhamnosus* L6/2, *L. rhamnosus* L21/4, *L. rhamnosus* L24/1, *L. rhamnosus* L26/4, *L. fermentum* L36/2, *L. fermentum* L38/5.

В работе использовали питательные среды: MRS [7], BOM-10, среды для определения наличия протеолитической активности.

Среда BOM-10 (10%-ное восстановленное обезжиренное молоко). В (900±10) см³ подогретой до (47±2) °С воды растворяли (100±1) г сухого обезжиренного молока, выдерживали в течение (35±5) мин при периодическом перемешивании, разливали в колбы или пробирки и стерилизовали при (121±1) °С в течение (12±2) мин.

Среду 1 для определения протеолитической активности готовили следующим образом. 100 мл среды BOM-10 смешивали с 50 мл 3%-ного раствора агара, стерилизованного при (121±1) °С в течение (12±2) мин, и с 15 мл 10%-ного дрожжевого экстракта, стерилизованного при (121±1) °С в течение (10±1) мин. рН готовой среды – 6,3.

Среда 2 для определения протеолитической активности. Для приготовления среды смешивали следующие компоненты: 10 г панкреатического гидролизата казеина, 5 г дрожжевого экстракта, 20 г казеината натрия, 8,9 г натрия лимоннокислого, 4,4 г хлорида кальция, 20 г глюкозы, 15 г агара, после чего доводили до 1 л дистиллированной водой, нагревали до растворения всех компонентов среды, стерилизовали автоклавированием (15±1) мин при (121±1) °С. рН среды 2а – 7,0±0,1. рН среды 2б – 6,0±0,1.

Среда 3 для определения протеолитической активности. Для приготовления среды смешивали следующие компоненты: 10 г панкреатического гидролизата казеина, 5 г дрожжевого экстракта, 20 г казеината натрия, 8,9 г натрия лимоннокислого, 4,4 г хлорида кальция, 20 г лактозы, 15 г агара, после чего объем доводили до 1 л дистиллированной водой,

нагревали до растворения всех компонентов среды, стерилизовали автоклавированием (15 ± 1) мин при (121 ± 1) °С. рН среды 3а – $7,0 \pm 0,1$. рН среды 3б – $6,0 \pm 0,1$.

Раствор тирозина и триптофана, 0,2 М натрий-фосфатный буфер рН=7,0, растворы 10%-ной трихлоруксусной кислоты и 1М карбоната натрия готовили согласно [8].

Реактив Фолина-Циокальто – использовали коммерческий раствор производства «Реахим» (Россия), который разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1 : 6 непосредственно перед проведением экспериментов.

Определение наличия протеолитической активности у пробиотических бактерий (качественный метод). Культуры пробиотических бактерий выращивали в течение (16 ± 2) ч при 37 °С в MRS-среде, содержащей 0,15% агара, после чего суспензию клеток тщательно перемешивали и наносили по 0,05 мл на поверхность сред 1, 2а, 2б, 3а, 3б для определения протеолитической активности. Чашки Петри инкубировали в анаэробных условиях в течение 72 ч. О наличии протеолитической активности судили по появлению зон просветления вокруг выросших колоний.

Определение протеолитической активности (метод М.Е. Hull в модификации М.В. Залашко и соавт) [8]. Лактобациллы выращивали в течение (16 ± 2) ч в среде ВОМ-10, после чего 0,1 мл выросшей культуры вносили в 100 мл среды ВОМ-10 или 100 мл пастеризованного молока и термостатировали при (37 ± 1) °С в течение определенного времени (3 сут или 6 сут), после чего сквашенное молоко тщательно перемешивали и 3 мл вносили в пробирку, содержащую 2 мл дистиллированной воды и 10 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Смесь тщательно ресуспендировали, выдерживали 10 мин при комнатной температуре, после чего фильтровали через двойной бумажный фильтр. В колбу переносили 5 мл фильтрата, содержащую 38 мл дистиллированной воды и 5 мл 1М Na_2CO_3 , после чего добавляли 2 мл фенольного реактива Фолина-Циокальто, разбавленного перед определением дистиллированной водой в соотношении 1 : 6, тщательно перемешивали и выдерживали 5 мин, в результате чего раствор принимал голубую окраску, интенсивность которой определяли спектрофотометрически при 650 нм. В качестве кон-

троля использовали молоко той же партии, обработанное аналогичным образом.

Результаты и их обсуждение. Лактобациллы обнаруживаются на всем протяжении ЖКТ человека, а также являются основной микрофлорой влагалища. Источником лактобацилл, колонизирующих ЖКТ у младенцев, являются родовые пути матери, а также грудное молоко. Высокая адгезивность к слизистым оболочкам и слабовыраженная антигенная нагрузка лактобацилл способствует развитию их тесной взаимосвязи со слизистыми, вплоть до образования поверхностного защитного биослоя. Представители данного рода не участвуют в возникновении каких-либо патологических процессов в организме человека, а напротив, оказывают позитивное воздействие на здоровье человека [1, 9, 10].

Препараты, содержащие лактобациллы, широко применяются в гастроэнтерологической практике, так как они предотвращают развитие колита, в том числе язвенного (снижают активность фермента миелопероксидазы), колонизируют защитный покров слизистой, не проникая в крипты (можно применять при неспецифическом язвенном колите), оказывают ингибирующее действие на возбудителя язвенной болезни человека и животных – бактерии *Helicobacter pylori* [11].

Бактерии *L. acidophilus* обладают выраженной противоопухолевой активностью в отношении злокачественных новообразований в кишечнике, а также обладают выраженным вирусоцидным действием благодаря продукции высокоактивной перекиси водорода. В высоких концентрациях *L. acidophilus* оказывает вирусоцидное действие в отношении вируса иммунодефицита человека. Бактерии *L. casei* обладают наиболее высокой противоопухолевой активностью в отношении сарком [11].

Бактерии р. *Lactobacillus* обладают иммуностимулирующим действием, в первую очередь за счет наличия в их клеточной стенке пептидогликанов и тейхоевых кислот, известных поликлональных индукторов иммуномодуляторов. Исследование противоинойфекционной и иммуностимулирующей активности *L. plantarum* показало, что представители этого вида лактобацилл обладают выраженной способностью в анаэробных условиях образовывать уксусную и молочную кислоту, а также катаболизировать аргинин и генерировать окись азота, которая участвует в

таких функциях кишечника, как бактериостаз, секреция мускуса, перистальтика, обеспечение местного иммунитета [12].

Употребление бифидо- и лактобактерий часто ведет к стабилизации артериального давления. Так, у больных гипертензией на фоне приема *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *L. casei*, *L. helveticus* наблюдали снижение артериального давления [1].

Для качественной оценки протеолитической активности лактобацилл использовали чашечный метод отбора, который основан на выращивании микроорганизмов на агаризованной питательной среде с восстановленным обезжиренным молоком или казеинатом натрия в качестве белкового субстрата. Проявляющие протеолитическую активность культуры образуют вокруг колоний зоны просветления различного радиуса, который определяли как расстояние от края колонии до окончания зоны просветления. При исследовании 18 штаммов лактобацилл на среде 1, содержащей в качестве белкового субстрата молоко, наличия протеолитической активности выявлено не было. При изучении протеолитической активности с использованием в среде в качестве белкового компонента казената натрия у штаммов лактобацилл выявлены зоны просветления среды разного радиуса. На среде, имеющей нейтральный рН=7,0 (среда 2б и среда 3б, содержащие в качестве источника углерода и энергии глюкозу и лактозу соответственно), лактобациллы практически не проявляли протеолитической активности, за исключением штаммов *L. rhamnosus* L24/1, *L. rhamnosus* L26/4, *L. helveticus* L27/4, *L. plantarum* L31/1, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* L32/2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* L33/1, радиус зоны просветления среды для которых составил 1–2 мм. При снижении активной кислотности среды до рН=6,0 наблюдали увеличение зоны просветления вокруг колоний от 2 до 6 мм.

На следующем этапе работы определяли протеолитическую активность для 18 исследуемых штаммов лактобацилл с использованием количественных методов. Использовали метод М.Е. Hull в модификации М.В. Залашко и соавт. [8], преимуществами которого является его простота, высокая чувствительность, относительно короткое время культивирования микроорганизмов, возможность использования естественного питательного субстрата (молока).

Для определения протеолитической активности был построен калибровочный график зависимости изменения оптической плотности реакционной смеси от содержания в ней свободных аминокислот. Использовали водный раствор смеси тирозина и триптофана в соотношении 4 : 1, поскольку именно в данном сочетании аминокислоты находятся в молоке [13]. Минимальная концентрация аминокислот в растворе составила 0,01 мг/мл, интервалы между последующими концентрациями – 0,01 мг/мл, максимальная концентрация – 0,2 мг/мл. Растворы аминокислот обрабатывали согласно методике определения протеолитической активности. На основании измерения оптической плотности каждой концентрации был построен калибровочный график, установлена математическая зависимость изменения оптической плотности от содержания аминокислот, на основании которой определяли прирост тирозина и триптофана в процессе протеолиза (рис. 1).

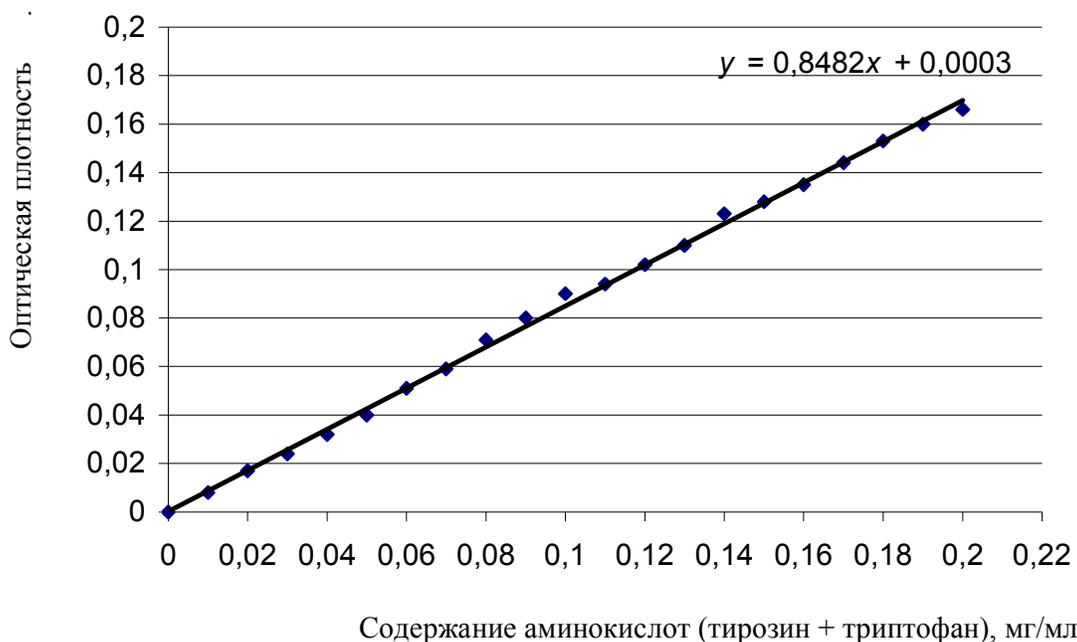


Рисунок 1 – Калибровочный график для определения зависимости изменения оптической плотности реакционной смеси от содержания в ней свободных аминокислот (тирозина и триптофана)

Протеолитическую активность (ПА) лактобацилл (мг% тирозина и триптофана) определяли по формуле

$$ПА = (D_{650} - 0,0003) \times 100 / 0,8482, \quad (1)$$

где D_{650} – оптическая плотность раствора, измеренная на спектрофотометре при 650 нм.

При определении протеолитической активности использовали стерильное восстановленное обезжиренное молоко и пастеризованное цельное молоко. Исследования показали (табл. 1, рис. 2), что низкой протеолитической активностью в отношении белков молока обладают бактерии *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*. Так, штаммы *L. plantarum* L31/1 и *L. plantarum* L21/3 обладали минимальной протеолитической активностью, которая достигала 1,1 мг% тир+трп и 1,7 мг% тир+трп соответственно при культивировании в восстановленном обезжиренном молоке и 2,2 мг% тир+трп и 2,1 мг% тир+трп соответственно при культивировании в пастеризованном молоке (на 6-е сутки культивирования). Штамм *L. delbrueckii subsp. lactis* L1/2 обладал средним уровнем протеолитической активности – 7,9 мг% тир+трп и 10,6 мг% тир+трп соответственно при культивировании в среде ВОМ-10 и пастеризованном молоке в течение 6 сут.

Для остальных штаммов лактобацилл был показан высокий уровень протеолитической активности (превышал 10 мг% тир+трп на 3-е сутки культивирования), который различался у штаммов, относящихся к одному виду, но выделенному из фекалий разных людей. Так, протеолитическая активность бактерий *L. delbrueckii subsp. lactis* различалась у штаммов L1/2 и L39/4 практически в 2,0–2,5 раза, в зависимости от времени и среды культивирования. Штамм *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* L33/1 обладал более высоким уровнем протеолитической активности, чем штамм *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* L32/2 (разница составила 1,5 раза), активность протеолитических ферментов штамма *L. helveticus* L38/1 была выше в 1,6 раза, чем у штамма *L. helveticus* L27/4 (табл. 1, рис. 2).

Максимальным уровнем активности протеаз обладал штамм *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* L33/1 (при культивировании в течение 3 сут. в восстановленном обезжиренном молоке), *L. gasseri* L34/5 (при культивировании в течение 6 сут в восстановленном обезжиренном молоке) и *L. gasseri* L9/1 (при культивировании в пастеризованном молоке). Протеолитическая активность всех изученных штаммов лактобацилл, культивируемых на пастеризованном молоке, была выше, чем их актив-

ность, определенная при культивировании на восстановленном обезжиренном молоке. При увеличении времени культивирования до 6 сут протеолитическая активность всех исследованных штаммов лактобацилл увеличивалась при их выращивании как на пастеризованном молоке, так и на восстановленном обезжиренном молоке (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1 – Протеолитическая активность пробиотических штаммов лактобацилл, мг% тир+трип

Штамм	Протеолитическая активность при сквашивании			
	восстановленного обезжиренного молока в течение		цельного молока в течение	
	3 сут	6 сут	3 сут	6 сут
<i>L. fermentum</i> L36/2	0,8	3,3	0,3	3,7
<i>L. fermentum</i> L38/5	1,6	4,7	6,0	7,9
<i>L. plantarum</i> L21/3	0,8	1,7	1,7	2,1
<i>L. plantarum</i> L31/1	0,8	1,1	0,6	2,2
<i>L. paracasei</i> L12/1	4,7	5,6	4,8	7,9
<i>L. rhamnosus</i> L6/2	2,7	6,0	3,6	10,6
<i>L. rhamnosus</i> L21/4	5,0	7,5	8,1	8,9
<i>L. rhamnosus</i> L24/1	2,1	4,6	3,7	9,2
<i>L. rhamnosus</i> L26/4	5,6	6,3	8,2	9,0
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> L1/2	6,4	7,9	9,9	10,6
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> L39/4	16,7	19,5	19,9	25,4
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> L32/2	14,1	15,4	18,8	19,4
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> L33/1	20,7	23,0	24,5	26,1
<i>L. helveticus</i> L27/4	11,2	14,1	14,0	16,1
<i>L. helveticus</i> L38/1	18,2	23,9	22,1	24,7
<i>L. acidophilus</i> L35/6	10,5	12,5	13,1	19,1
<i>L. gasseri</i> L34/5	10,1	25,9	14,6	27,1
<i>L. gasseri</i> L9/1	15,2	18,9	32,6	34,2

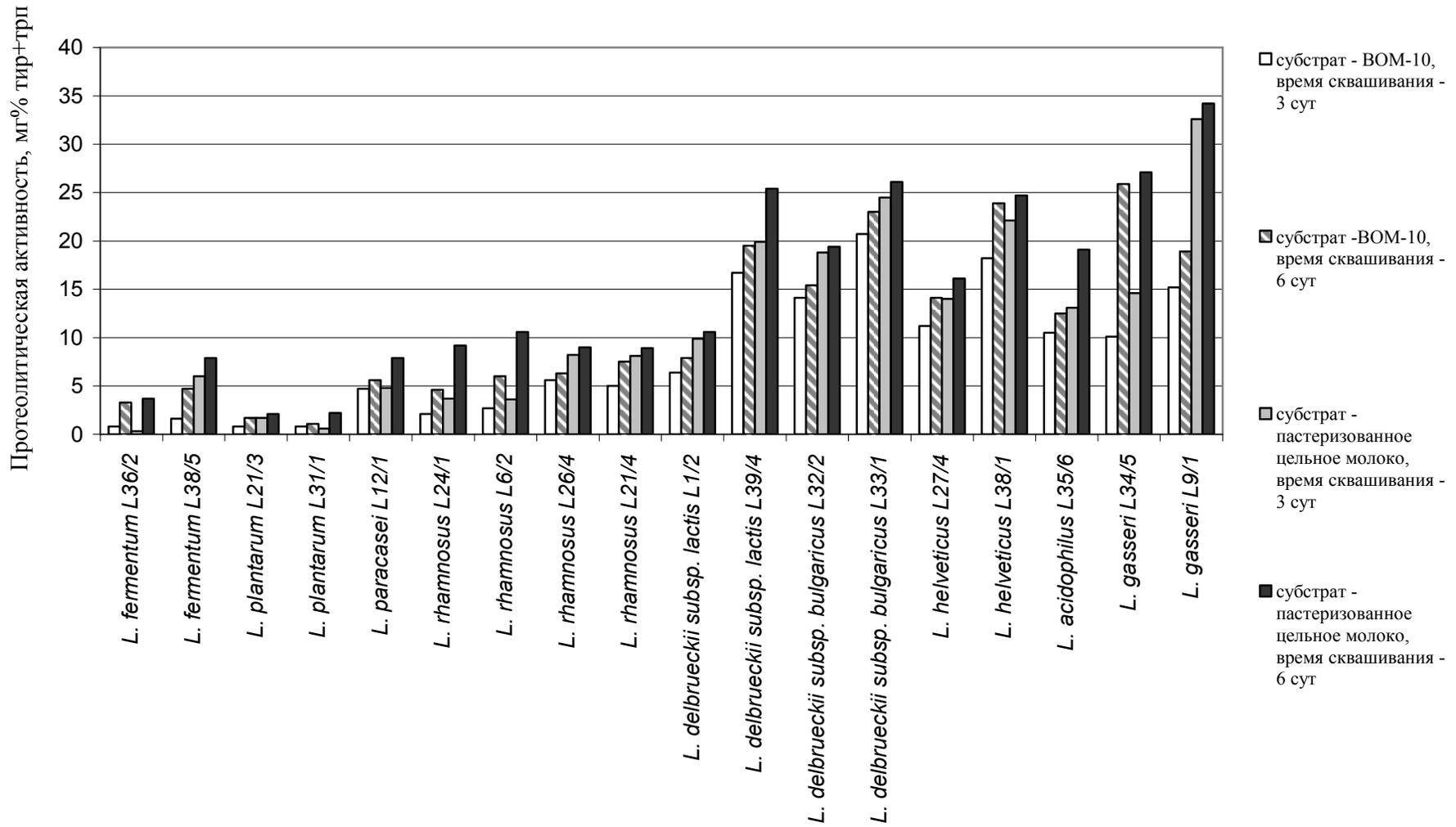


Рисунок 2 – Протеолитическая активность пробиотических штаммов лактобацилл

Заключение. Таким образом, у штаммов пробиотических лактобацилл, выделенных из содержимого кишечника здоровых людей, изучена активность протеолитических ферментов. Установлено, что бактерии *L. plantarum* (штаммы L31/1 и L21/3), *L. fermentum* (штаммы L36/2 и L38/5), *L. paracasei* L12/1, *L. rhamnosus* (штаммы L6/2 и L24/1) обладают низкой протеолитической активностью (менее 6 мг% тирозина+триптофана в течение 3 сут культивирования в пастеризованном молоке), для остальных штаммов показана средняя и высокая протеолитическая активность (6–10 мг% тирозина+триптофана и свыше 10 мг% тирозина+триптофана, соответственно при культивировании в молоке в течение 3 сут). Протеолитическая активность штаммов лактобацилл увеличивалась при увеличении продолжительности культивирования в молоке до 6 сут. Протеолитическая активность всех изученных штаммов лактобацилл, культивируемых на пастеризованном молоке, была выше, чем их активность, определенная при культивировании на восстановленном обезжиренном молоке.

Литература

1. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров. – М.: Грантъ, 2001. – Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. – 288 с.
2. Гончарова, Г.И. Бифидофлора человека и необходимость ее оптимизации / Г.И. Гончарова // Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве / под ред. Д.П. Никитина. – Москва, 1986. – С. 10–17.
3. Лянная, А.М. Биологические и экологические особенности рода *Bifidobacterium* / А.М. Лянная, М.М. Интизаров, Е.Е. Донских / Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве / под ред. Д.П. Никитина. – Москва, 1986. – С. 32–38.
4. Overview of gut flora and probiotics / W.H. Holzapfel [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 1998. – Vol. 41. – P. 85–101.
5. Barrett, A. Classification of peptidases / A. Barrett // Methods Enzymol. – 1994. – Vol. 244, N 1. – P. 1–15.
6. Phadatarе, S. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.120): enzyme production and compatibility with

commercial detergents / S. Phadatare, M. Scrivivasan, V. Desphande // *Enzyme Microb. Technol.* – 1993. – Vol. 15, N 1. – P. 72–76.

7. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // *J. Appl. Bacteriol.* – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.

8. Залашко, М.В. Исследование протеолитической активности молочнокислых бактерий / М.В. Залашко, Н.В. Образцова, Э.И. Савченко // *Физиология и биохимия микроорганизмов.* – Минск, 1970. – С. 56–68.

9. Hammes, W.P. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* / W.P. Hammes, N. Weiss, W. Holzapfel // *The Prokaryotes* / A. Balows [et al.]. 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY. – 1992. – P. 1535–1594.

10. Блохина, И.Н. Дисбактериозы. / И.Н. Блохина, В.Г. Дорофейчук. – Москва: Медицина, 1979. – 178 с.

11. Tanaka, R. Clinical effects of bifidobacteria and lactobacilli / R. Tanaka // *Probiotics: prospects of the use in opportunistic infections* / R. Fuller [et al]. Hrborn-Dill, Germany. – 1995. – P. 141–157.

12. Knorr, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods / D. Knorr // *Trends in Food Sci. Tech.* – 1998. – Vol. 9. – P. 295–306.

13. Чеботарев, А.И. Биохимические основы созревания сыров / А.И. Чеботарев. – Вологда, 1959. – 170 с.

S. Vasylenko, S. Barunova, N. Furik

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF LACTOBACILLUS FROM FECES OF HEALTH PEOPLE

Summary

Proteolytic activity of 18 *Lactobacillus* strains was investigated. Bacteria *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, 2 strains *L. rhamnosus* had low level of proteolytic activity. For other bacteria proteolytic activity was medium (2 strain *L. rhamnosus*) or high (strains *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*). Proteolytic activity of *Lactobacillus* was higher when time of milk fermentation increased until six days. Proteolytic activity of *Lactobacillus* was more higher in pasteurized milk than in reconstituted skim milk.