

УДК 663.18

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *LACTOBACILLUS HELVETICUS***Занданова Туяна Нимбуевна***кандидат технических наук, доцент, Арктический государственный агротехнологический университет, г. Якутск, Россия, tuyana35@mail.ru*

Аннотация. Поиск и создание новых пробиотических кисломолочных продуктов является перспективным направлением в технологии молочных продуктов. Молочнокислые бактерии *Lactobacillus helveticus* издавна использовали для производства твердых сычужных сыров. Широкое применение *L. helveticus* в сыроделии обусловлено их высокой протеолитической активностью по сравнению с другими лактобактериями. Эта особенность бактерий связана с их потребностью к составу питательной среды и эволюционно сформировавшейся протеолитической системой, позволяющей самим обеспечивать свои потребности в питательных веществах. Современные методы исследования протеолиза белковых соединений, позволили установить антагонистическое воздействие различных пептидов, полученных при гидролизе *L. helveticus* молочного белка, по отношению к патогенным бактериям и даже вирусам. В данной статье представлены результаты исследования пробиотических и биохимических свойств штамма *L. helveticus*. Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости штамма к эндоэкологическим условиям желудочно-кишечного тракта, высокой ферментативной и антагонистической активности. Результаты исследования каталазы и супероксиддисмутазы свидетельствуют о наличии у штамма механизмов антиокислительной защиты от токсичного воздействия окислительных процессов.

Ключевые слова: питательная среда, желчь, активная кислотность, ферментативная активность, белки, каталаза, супероксиддисмутазы, углеводы, лактобактерии, пробиотики.

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF *LACTOBACILLUS HELVETICUS***Zandanova Tuyana Nimbuevna***Candidate of Technical Sciences, Associate Professor, Arctic State Agrotechnological University, Yakutsk, Russia, tuyana35@mail.ru*

Annotation. The search and creation of new probiotic fermented milk products is a promising direction in the technology of dairy products. The lactic acid bacteria *Lactobacillus helveticus* a long time used to produce hard rennet cheeses. The widespread use of *L. helveticus* in cheesemaking is due to their high proteolytic activity compared to other lactobacilli. This feature of bacteria is associated with their exactingness to the composition of the nutrient medium and the evolutionarily formed proteolytic system, which allows them to provide their own needs for nutrients. Modern methods for studying the proteolysis of protein compounds have made it possible to establish the antagonistic effect of various peptides obtained by hydrolysis of the *L. helveticus* milk protein in relation to pathogenic bacteria and even viruses. This article presents the results of a study of the probiotic and biochemical properties of the *L. helveticus* strain. The results indicate the resistance of the strain to the endoecological conditions of the gastrointestinal tract, high enzymatic and antagonistic activity. The results of the study of catalase and superoxide dismutase indicate that the strain has mechanisms of antioxidant protection against the toxic effects of oxidative processes.

Keywords: nutrient medium, bile, active acidity, enzymatic activity, proteins, catalase, superoxide dismutase, carbohydrates, lactobacilli, probiotics.

Введение. Для расширения ассортимента кисломолочных продуктов необходим поиск новых штаммов пробиотических бактерий и создание полезных для здоровья человека продуктов. *Lactobacillus helveticus* гомоферментативная термофильная молочнокислая бактерия, используемая в производстве швейцарских и итальянских сыров с созреванием. Применение *L.helveticus* в сыроделии связано с ее высокой протеолитической активностью.

Griffiths M.W. и *Tellez A.M.* установили, что употребление молочных продуктов, содержащих *L.helveticus*, способно снижать артериальное давление, способствует усвоению кальция и оказывать противовирусное действие на патогены. Эти полезные эффекты обусловлены различными пептидами, высвобождаемыми при гидролизе молочных белков протеолитической системой *L. helveticus* [3]. По мнению *Hebert E.M. and et.al* штаммы *L. helveticus* являются одними из наиболее требовательных к питательным веществам молочнокислых бактерий, они ауксотрофны по аминокислотам [4]. Для обеспечения питательных потребностей *L.helveticus* обладает более высокой в сравнении с другими лактобациллами протеолитической системой. Она способна производить короткие пептиды и высвобождать аминокислоты из казеиновой матрицы[6]. Протеолитическая система *L.helveticus* и большинство молочнокислых бактерий состоят из протеиназ, которые первоначально расщепляют казеины до крупных пептидов, пептидаз (внутриклеточных), которые в дальнейшем расщепляются до аминокислот и специфических транспортных белков, которые транспортируют аминокислоты и пептиды через цитоплазматическую мембрану [5]. Приведенные выше данные свидетельствуют о пробиотическом потенциале *L.helveticus* и перспективах применения для производства кисломолочной продукции.

Цель работы: исследование биотехнологических свойств *L. helveticus* и его устойчивости к эндоэкологическим условиям желудочно-кишечного тракта.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали чистые культуры *L.helveticus* из Всероссийской коллекции производственных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт».

В работе использованы современные стандартные микробиологические методы исследования. Количественный учет микроорганизмов, морфологию клеток изучали по ГОСТ 10444.11-2013. Динамику накопления биомассы клеток оценивали по КМАФАнМ, среде MRS и молоке (М). Титруемую кислотность определяли титрометрическим методом ГОСТ 3624-92.

Для оценки устойчивости к фенолу, соли, желчи, способности усваивать углеводы использовали питательную среду MRS с различной концентрацией соответствующего вещества. Активность каталазы определяли колориметрическим методом. Активность супероксиддисмутазы (СОД) измеряли

по аутоокислению адреналина.

Антагонизм *L. helveticus* определяли по степени задержки роста условно-патогенных микроорганизмов при совместном культивировании бактерий в условиях оптимальных для роста тестовых культур. В качестве тестовых культур использовали *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*. Степень антагонистической активности оценивали по зоне задержки роста бактерий: до 10 мм – слабая, 10–20мм – средняя, больше 20 мм – высокая. Учет зоны задержки роста проводили через 48 часов культивирования [2].

Результаты исследований и их обсуждение. Пробиотические микроорганизмы, согласно регламентированным требованиям (ГОСТ Р 52349—2005 Продукты пищевые функциональные. Термины и определения) это живые непатогенные нетоксигенные микроорганизмы, нормализующие состав микрофлоры и/или повышающие биологическую активность нормальной микрофлоры кишечника. Они должны обладать антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям, выживать в условиях желудочно-кишечного тракта. Кроме этого, обладать активной ферментирующей активностью необходимой для сквашивания молока. Результаты исследования пробиотических и технологических свойств *L. helveticus* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Сведения о биохимических свойствах *L. helveticus*

Наименование показателей	Значения показателя
Культурально-морфологические свойства	
Морфология клетки	Длинные палочки, с закругленными концами, которые могут образовывать цепочки
Окраска по Грамму	+
Внешний вид колонии на среде MRS	Удлиненная округлая форма
Физиолого-биохимические свойства	
Температура культивирования, °С	37-40 ^{0С}
Продолжительность сквашивания молока, час	5±2
Ферментативная активность	
Каталаза, мкат/мл	2162,4
СОД (супероксиддисмутаза), ед/мг белка	1,37
Кислотность титруемая, °Т	73
активная. рН	4,75
Выживаемость в условиях ЖКТ NaCl, %	
2	+

4	+
6	+
Устойчивость к фенолу, % 0,4	+
Желчь, % 20 40	+ -
Предельные рН 3,5 8,3	+ +
Ферментативная активность по отношению к углеводам:	
Глюкоза	+
Галактоза	+
Трегалоза	+
Лактоза	+
Манит	+
Мальтоза	+
Раффиноза	-
Ксилоза	-
Арабинозу	-

Из данных таблицы 1 видно, что штамм *L. helveticus* обладает высокой ферментирующей активностью, через 5 часов сквашивания молока формирует плотный сгусток с титруемой кислотностью 73⁰Т. Исследуемый штамм выдерживает высокие концентрации соли, желчи. Предельное значение активной кислотности среды, при которой штамм сохраняет жизнеспособность, составила 3,4-8,3 ед. Наблюдали активный рост бактерий на питательных средах с глюкозой, галактозой, трегалозой, лактозой, манитом и мальтозой.

Изучение антиоксидантных свойств показало наличие каталазы 2162,4 мкат/мл и СОД 1,37 ед/мг белка. Известно, что продукты восстановления кислорода- пероксид водорода, супероксид-радикал и гидроксил-радикал токсичны для клеток и приводят к повреждению клеточных макромолекул. Для снижения токсичного эффекта кислорода факультативные анаэробы содержат ферменты антиокислительной защиты, такие как каталаза и супероксиддисмутаза. Основная физиологическая их роль состоит в предотвращении кислородных повреждений клеток путем нейтрализации реакционноспособного свободного супероксид-радикала[1].

Результаты исследования антагонистической активности штамма *L. helveticus* представлены в таблице 2.

Таблица 2

Антагонистическая активность штамма *L. Helveticus*

Наименование образца	Зона задержки роста, мм/ M±m			
	Sh.flexneri	E.coli	S.aureus	Pr.vulgaris
<i>L. helveticus</i>	22±1,6	18±2,0	25±1,2	20±0,6

Из данных таблицы 2 видно, что штамм *L. helveticus* обладает антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре.

Наращивание биомассы штамма исследовали на питательной среде КМАФАнМ, среде MRS и обезжиренном молоке (М). О накоплении биомассы судили по количеству жизнеспособных клеток и росту титруемой кислотности.

Таблица 3

Влияние питательной среды на динамику биомассы и роста титруемой кислотности штамма *L. Helveticus*

Питательная среда	Время культивирования, час					
	12		24		48	
	Логарифм числа клеток /см ³	T ⁰	Логарифм числа клеток /см ³	T ⁰	Логарифм числа клеток /см ³	T ⁰
КМАФАнМ	7,8	84	9,0	101	7,2	158
MRS	8,2	90	9,2	118	7,4	212
М	8,4	82	8,6	106	7,6	164

Из таблицы 3 видно, что штамм максимально накапливает микробную массу к 12 часам культивирования на среде MRS и молоке. Наиболее активный рост микроорганизмов наблюдали на питательной среде MRS. Рост бактерий на молоке был на один порядок ниже, чем на питательных средах.

Заключение. Таким образом, изучаемый нами штамм *L. helveticus* технологичен, поскольку размножается в различных питательных средах с накоплением производственной биомассы с высокой концентрацией жизнеспособных клеток, обладает антагонистической активностью к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, проявляет устойчивость к условиям желудочно-кишечного тракта.

Список литературы

1. Брюханов А.Л. Каталаза и супероксиддисмутаза у метаногенных архей: Автореферат дисс. канд. биолог. наук – Москва. 2002.- 25с. URL: <https://istina.msu.ru/dissertations/482089/>

2. Иркитова А.Н., Я.Р. Каган, Соколова Г.Г.(2015) Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий. Биологические науки. с.41-44 URL: <http://izvestia.asu.ru/2012/3-1/bios/TheNewsOfASU-2012-3-1-bios-09.pdf>
3. Griffiths M.W. and Tellez A.M. (2013) *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. Front. Microbiol. 4:30. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00030
4. Hebert E.M., Raya,R.R., and de Giori G.S. (2000). Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL (1062). Appl. Environ. Microbiol. 66, 5316–5321.
5. Kenny O., FitzGerald R. J., O’Cuinn G., Beresford T., and Jordan K. (2003). Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. Int.Dairy J. 13, 509–516.
6. Savijoki K., and Palva, A. (2000). Purification and molecular characterization of a tripeptidase (PepT) from *Lactobacillus helveticus*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 794–800.