

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 579.222

**Ингибирование автоокисления аскорбата
новыми штаммами молочнокислых бактерий****А.И. Климко^{*} , Т.А. Чердынцева , А.И. Нетрусов , А.Л. Брюханов **

Кафедра микробиологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12

^{*}e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Аскорбат натрия является сильным восстановителем и способен вступать в неферментативные реакции с активными формами кислорода. Настоящая работа была посвящена скринингу штаммов молочнокислых бактерий (МКБ) из коллекции кафедры микробиологии (биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова) и отбору наиболее перспективных штаммов, относящихся к родам *Lactobacillus* и *Lactococcus*. Исследовали 16 новых штаммов МКБ на предмет возможного ингибирования их клетками автоокисления аскорбата. Наибольший ингибирующий эффект вызвали следующие штаммы: *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 161 (42,9%), *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 520 (36,6%), *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 508 (33%) и *Lactobacillus paracasei* КМ МГУ 527 (38,1%). Практически не оказали влияния на автоокисление аскорбата штаммы *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 162, *Lactocaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529, *Lactobacillus paracasei* КМ МГУ 544, *Lactobacillus caucasicus* КМ МГУ 155, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* КМ МГУ 170. Данные штаммы сравнили со штаммами из других коллекций. В частности, большинство штаммов *Lactobacillus plantarum*, а также *Lactobacillus brevis* КМ МГУ 535 (20,7%) из коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова продемонстрировали более высокую эффективность ингибирования автоокисления аскорбата по сравнению со штаммами лактобацилл из коллекций ATCC и DSMZ. Показано, что данный метод можно использовать в качестве экспресс-теста для выявления общей способности клеток молочнокислых бактерий к противостоению активным формам кислорода и оценки их антиоксидантного статуса. Таким образом, способность к ингибированию автоокисления аскорбата возможно применять в качестве одного из факторов отбора перспективных пробиотических штаммов МКБ.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, молочнокислые бактерии (МКБ), пробиотики, антиоксиданты, автоокисление аскорбата, витамин С

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используют во многих ферментационных процессах при приготовлении разнообразных продуктов питания, включающих в себя не только молочные и мясные, но также и овощные продукты. Основной функцией МКБ в этих процессах является синтез молочной кислоты (в качестве основного метаболита), которая снижает pH среды и предотвращает рост гнилостных бактерий. Вторичные метаболиты, такие как уксусная кислота, этанол и экзополисахариды, важны для создания желаемого вкуса и текстуры ферментированных продуктов [1].

Стоит отметить, что МКБ широко применяют и в медицине. Так, употребление пробиотиков способствует улучшению здоровья организма-хозяина [2]. Данные микроорганизмы способны эффективно взаимодействовать с эпителиальными клетками кишечника, что удерживает их в организме хозяина относительно длительное время

и положительно влияет на автохтонную микробиоту желудочно-кишечного тракта [3].

В ходе промышленных биотехнологических процессов МКБ часто подвергаются различным окислительным стрессам, которые возникают из-за накопления активных форм кислорода (АФК) внутри клеток. АФК образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода до супероксид-радикала ($O_2^{\cdot-}$), пероксида водорода (H_2O_2) или гидроксильного радикала ($OH^{\cdot}$); они вызывают повреждения клеточных макромолекул (белков, липидов и нуклеиновых кислот), что, в свою очередь, может приводить к подавлению роста микробных культур и последующей гибели клеток [1, 4].

Для нейтрализации токсичных молекул АФК клетки многих организмов, включая человека, синтезируют антиоксидантные ферменты и различные восстановители, которые вместе с антиоксидантами, содержащимися в пище, образуют ба-

рьеры антиоксидантной защиты. Тем не менее, при определенных обстоятельствах такие системы не всегда эффективно защищают клетку от окислительных стрессов. Следовательно, усиление антиоксидантной защиты считается важным фактором в поддержании здоровья человека и профилактике многочисленных болезней, в том числе сердечно-сосудистых [5, 6]. Многие штаммы МКБ обладают хорошо выраженной антиоксидантной активностью и могут быть использованы для производства пробиотических и ферментированных продуктов, которые улучшают общий антиоксидантный статус организма-хозяина [7].

Аскорбиновая кислота (витамин С) относится к ряду жизненно необходимых соединений и широко известна как мощный антиоксидант, восстановитель токсичных свободных радикалов [8]. Витамин С требуется для нормального функционирования соединительной и костной ткани. В частности, он влияет на биосинтез и сохранение коллагена, что важно и для поддержания тонуса желудочно-кишечного тракта [7, 9]. В восстановленной форме аскорбат способствует лучшему усвоению организмом железа, защищает липиды от перекисного окисления, участвует в различных нейрофизиологических процессах [10]. Однако под действием АФК витамин С окисляется, что ведет к потере его функциональных качеств в организме [11]. Поэтому поддержание данного химического вещества в активной форме является очень важным процессом. Пробиотические метаболические виды активности могут оказывать антиоксидантное воздействие путем удаления токсичных окислителей или путем предотвращения их возникновения в кишечнике за счет хелатирования ионов металлов, в частности, Cu(II) и Fe(II), а также снижения активности некоторых ферментов в путях образования АФК. Кроме того, многие пробиотики способствуют сокращению выброса аскорбата (природного восстановителя) и ингибированию его самоокисления. Таким образом, способность МКБ к ингибированию автоокисления аскорбата, относящегося к ряду жизненно необходимых соединений, является одним из их важных пробиотических свойств [9, 12, 13].

По мнению Спиропулоса с соавт. [14], пробиотические штаммы МКБ могут в значительной мере усиливать антиоксидантную защиту клеток хозяина, синтезируя и высвобождая глутатион и аскорбат, которые абсорбируются и распределяются в организме. Способность аскорбата к автоокислению используют для экспериментов по выявлению антиоксидантных свойств у разных микроорганизмов, в том числе и у МКБ. Данный метод позволяет оценить общую способность того или иного штамма к инаktivации АФК [15] и, следовательно, определить штаммы, наиболее эффективно препятствующие автоокислению аскорбата, перспективные для дальнейшего использо-

вания в биотехнологии и для изучения клеточных механизмов антиоксидантной защиты.

Ранее нами были исследованы 33 новых штамма МКБ на пробиотические свойства: адгезию, образование биопленок, агглютинацию с конканавалином А, антимикробную активность и т.д. [16]. Для изучения антиоксидантной активности были отобраны штаммы с наиболее высокими показателями вышеперечисленных свойств. Целью данной работы было проанализировать способность молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* из коллекции кафедры микробиологии МГУ подавлять процесс автоокисления аскорбата и отобрать наиболее активные и перспективные для дальнейшей работы штаммы, которые могут быть использованы для производства пробиотических препаратов и продуктов питания.

Материалы и методы

Штаммы МКБ. Эксперимент проводили с использованием 16 новых штаммов молочнокислых бактерий из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Для активирования лиофилизированных культур и их проверки на чистоту в пробирки с лиофилизированными клетками добавляли жидкую питательную среду MRS и высевали на агаризованную среду MRS по методу Коха, растирая шпателем по 5–10 чашкам Петри. Морфологический контроль культур осуществляли просмотром фиксированных и окрашенных метиленовым синим препаратов бактерий под световым микроскопом (увеличение $\times 100$).

Ингибирование клетками МКБ автоокисления аскорбата. Анализ проводили по модифицированному методу Мишры и Ковачича [17]. Бактериальные штаммы культивировали в течение 20 ч в жидкой питательной среде MRS при температуре 37 °С. Клетки три раза промывали 0,2 М фосфатным буферным раствором (рН 7,0). При λ 560 нм измеряли начальную оптическую плотность суспензии клеток и доводили ее до 0,9–1,1 единиц оптической плотности в 3 мл фосфатного буферного раствора. Затем к 4,9 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,0) добавляли 50 мкл 5 мМ аскорбата натрия и 50 мкл соответствующей суспензии клеток (в случае контроля – 50 мкл буферного раствора). В течение 30 мин с интервалом в 30 с измеряли оптическую плотность образца при λ 265 нм. Итоговое значение выражали в виде процента ингибирования автоокисления аскорбата (ИАА), которое рассчитывали по формуле, где представлена оптическая плотность образца (раствор аскорбата натрия с суспензией клеток; $A_{\text{образец}}$) и оптическая плотность контроля (раствор аскорбата натрия без суспензии клеток; $A_{\text{контроль}}$):

$$\text{ИАА}\% = \left(1 - \frac{A_{\text{образец}}}{A_{\text{контроль}}} \right) 100\%.$$

Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Средние значения и среднеквадратичные отклонения были рассчитаны и отображены в таблице. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Замедление процесса автоокисления аскорбата в растворе определяется снижением концентрации АФК. Таким образом, чем медленнее аскорбат окисляется, тем эффективнее система антиоксидантной защиты в клетках. Аскорбат натрия используется в качестве стандартной аналитической системы, которая позволяет определить возмож-

ный потенциал устойчивости к АФК у микроорганизмов [13]. В настоящей работе показано, что наиболее эффективно ингибировали автоокисление аскорбата клетки штамма *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 161 (таблица). В целом, способность замедлять автоокисление аскорбата показана для большинства исследованных штаммов рода *Lactobacillus* (10 из 15). Это свидетельствует о том, что многие МКБ, в том числе и из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова, могут эффективно противостоять АФК.

Некоторые исследованные нами штаммы МКБ показали весьма высокий процент ингибирования автоокисления аскорбата. В частности, это относится к ряду новых штаммов лактобацилл

Таблица

Сравнение полученных экспериментальных и литературных [15] данных по ингибированию автоокисления аскорбата натрия клетками МКБ

Штамм из коллекции кафедры микробиологии МГУ	Ингибирование автоокисления аскорбата натрия, %	Штамм (по Амаретти и др. [15])	Ингибирование автоокисления аскорбата натрия, % [15]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	0	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ 23033	20,0
		<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	82,0
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 160	4,0 ± 0,4	<i>Lactobacillus brevis</i> DSMZ 23034	16,0
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 521	15,5 ± 1,6		
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 535	20,7 ± 0,2		
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 542	11,2 ± 1,1		
<i>Lactobacillus caucasicus</i> КМ МГУ 155	0	—	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> КМ МГУ 571	17,0 ± 1,7	—	
<i>Lactobacillus paracasei</i> КМ МГУ 544	0	—	
<i>Lactobacillus paracasei</i> КМ МГУ 527	38,1 ± 3,8		
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 162	0	<i>Lactobacillus plantarum</i> MB 395	5,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 508	33,0 ± 3,3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LN 3	15,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 520	36,6 ± 3,6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 1	16,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 161	42,9 ± 4,3		
<i>Lactobacillus reuteri</i> КМ МГУ 570	17,5 ± 1,7	—	
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> КМ МГУ 529	0	—	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> КМ МГУ 170	0	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	25,0
		<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ATCC 19257	35,0

Примечание: зеленым цветом выделены штаммы МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, показавшие по данным трех независимых экспериментов лучшую способность к ингибированию автоокисления аскорбата, чем известные по литературным данным штаммы соответствующих видов. Прочерк — отсутствие культур в статье Амаретти и др. для сравнения результатов.

L. plantarum (33,0–42,9%), *L. paracasei* (38,1%) и *L. brevis* (11,2–20,7%). Однако *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* КМ МГУ 170, напротив, не проявил такой активности. В таблице представлены сравнительные результаты с использованием новых штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова и известных штаммов МКБ из различных мировых коллекций микроорганизмов – АТСС, DSMZ и др. [15].

Показано, что многие штаммы МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова обладают антиоксидантным потенциалом на уровне и даже выше многих известных штаммов (в особенности это относится к *L. plantarum*) и, таким образом, в дальнейшем могут быть использованы для создания эффективных пробиотических антиоксидантных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terpou A., Papadaki A., Lappa I.K., Kachrimanidou V., Bosnea L.A., Kopsahelis N. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value // *Nutrients*. 2019. Vol. 11. N 7: 1591.
2. Gao D., Gao Z., Zhu G. Antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2 // *Food Funct.* 2013. Vol. 4. N 6. P. 982–989.
3. Alp D., Kuleaşan H. Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. Vol. 35. N 10: 156.
4. Redanz S., Cheng X., Giacaman R.A., Pfeifer C.S., Merritt J., Kreth J. Live and let die: hydrogen peroxide production by the commensal flora and its role in maintaining a symbiotic microbiome // *Mol. Oral Microbiol.* 2018. Vol. 33. N 5. P. 337–352.
5. Mozaffari H., Daneshzad E., Larijani B., Surkan P.J., Azadbakht L. Association of dietary total antioxidant capacity to anthropometry in healthy women: a cross-sectional study // *Nutrition*. 2020. Vol. 69: 110577.
6. Aguilar-Toalá J.E., Garcia-Varela R., Garcia H.S., Mata-Haro V., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordoba B., Hernández-Mendoza A. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field // *Trends Food Sci. Technol.* 2018. Vol. 75. P. 105–114.
7. Virtanen T., Pihlanto A., Akkanen S., Korhonen H. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria // *J. Appl. Microbiol.* 2007. Vol. 102. N 1. P. 106–115.
8. Njus D., Kelley P.M., Tu Y.-J., Schlegel H.B. Ascorbic acid: the chemistry underlying its antioxidant properties // *Free Radic. Biol. Med.* 2020. Vol. 159. P. 37–43.
9. Azcárate-Peril M.A., Sikes M., Bruno-Bárcena J.M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011. Vol. 301. N 3. P. G401–G424.
10. Rahate K.A., Madhumita M., Prabhakar P.K. Nutritional composition, anti-nutritional factors, pre-treatments-cum-processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.): a comprehensive review // *LWT – Food Sci. Technol.* 2021. Vol. 138: 110796.
11. Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. Vol. 63. N 2. P. 463–468.
12. Hou Y., Li X., Liu X., Zhang Y., Zhang W., Man C., Jiang Y. Transcriptomic responses of Caco-2 cells to *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus plantarum* J26 against oxidative stress // *J. Dairy Sci.* 2019. Vol. 102. N 9. P. 7684–7696.
13. Zhitkovich A. Nuclear and cytoplasmic functions of vitamin C // *Chem. Res. Toxicol.* 2020. Vol. 33. N 10. P. 2515–2526.
14. Spyropoulos B.G., Misiakos E.P., Fotiadis C., Stoidis C.N. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis // *Dig. Dis. Sci.* 2011. Vol. 56. N 2. P. 285–294.
15. Amaretti A., di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M., Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97. N 2. P. 809–817.
16. Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2020. Vol. 12. N 3. P. 1139–1148.
17. Mishra O.P., Kovachich G.B. Inhibition of the autoxidation of ascorbate and norepinephrine by extracts of *Clostridium butyricum*, *Megasphaera elsdenii* and *Escherichia coli* // *Life Sci.* 1984. Vol. 35. N 8. P. 849–854.

Поступила в редакцию 09.09.2021

После доработки 31.10.2021

Принята в печать 15.11.2021

SHORT COMMUNICATION

Inhibition of ascorbate autoxidation by new strains of lactic acid bacteria

A.I. Klimko^{*} , T.A. Cherdyntseva , A.I. Netrusov , A.L. Bryukhanov 

Microbiology Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234 Russia

^{*}e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Sodium ascorbate is a strong reducing agent able to participate in non-enzymatic reactions with reactive oxygen species. The research work was dedicated to screening of lactic acid bacteria (LAB) strains from the Collection of Microorganisms of the Department of Microbiology (Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University) and to selection of the most promising strains belonged to genera *Lactobacillus* and *Lactococcus*. We have investigated the ability to inhibit the ascorbate autoxidation by cells of 16 new strains of LAB from the Collection of Microorganisms of the Department of Microbiology, Lomonosov Moscow State University (CM MSU). *Lactobacillus plantarum* CM MSU 161 (42.9%), *Lactobacillus plantarum* CM MSU 520 (36.6%), *Lactobacillus plantarum* CM MSU 508 (33%) and *Lactobacillus paracasei* CM MSU 527 (38.1%) had the greatest inhibitory effect on ascorbate autoxidation. *Lactobacillus acidophilus* CM MSU 146, *Lactobacillus plantarum* CM MSU 162, *Lactocaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529, *Lactobacillus paracasei* CM MSU 544, *Lactobacillus caucasicus* CM MSU 155, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CM MSU 170 had no detectable effect on inhibition of ascorbate autoxidation. These strains were compared with strains from other collections. In particular, the majority of *Lactobacillus plantarum* strains as well as *Lactobacillus brevis* CM MSU 535 (20.7%) from the CM MSU demonstrated a higher percentage of inhibition of ascorbate autoxidation compared with the strains from the ATCC and the DSMZ collections. We have shown that this method can be used as an express testing to reveal the general ability of lactic acid bacterial cells to resist reactive oxygen species and to assess their antioxidant status. Thus, the ability to inhibit autoxidation of ascorbate can be used as one of the potential positive factors for selection of probiotics among LAB.

Keywords: *Lactobacillus*, lactic acid bacteria (LAB), probiotics, antioxidants, ascorbate autoxidation, vitamin C

Funding: The work was carried out within the framework of the state task on the topic of the Department of Microbiology of MSU “Physiology and Biochemistry of Phototrophic and Chemotrophic Microorganisms” (CITIS number 121032300094-7).

Сведения об авторах

Климко Алена Игоревна — аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23, e-mail: alenaklimko221@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6188-6525>

Чердынцева Татьяна Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-45, e-mail: taniacherd@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8764-0200>

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-83, e-mail: anetrusov@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>

Брюханов Андрей Леонидович — канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23, e-mail: brjuchanov@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1807-297X>