

## МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.0:579.872.1:57.013

**ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЖИДКИХ КУЛЬТУР  
ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ****Л.В. Драчёва\*, Е.В. Дорожко\*, О.А. Аврамчук\*, Е.И. Короткова\*,  
Е.П. Рыжкова, Хао Ли, И.В. Данилова***(кафедра микробиологии; e-mail: epr322@mail.ru)*

Прямым высокочувствительным вольтамперометрическим методом установлено, что жидкие культуры штаммов *Propionibacterium freudenreichii* способны проявлять высокий антиоксидантный эффект. Это позволило рассчитать величину кинетического критерия, количественно характеризующего антиоксидантную активность данных культур.

**Ключевые слова:** *вольтамперометрический метод, Propionibacterium freudenreichii, жидкие культуры, антиоксидантная активность.*

*Propionibacterium freudenreichii* (*P. freudenreichii*) относится к группе так называемых классических или “молочных” пропионовокислых бактерий (ПКБ). По ряду свойств они близки к лактобациллам и бифидобактериям, для которых ранее было установлено, что они обладают выраженными антиоксидантными свойствами (Драчёва, 2005, 2007; Драчёва и др., 2008). Основным продуктом жизнедеятельности ПКБ является пропионовая кислота. Наряду с ней они активно продуцируют и такие жизненно важные экзометаболиты, как витамины группы В, в том числе В<sub>12</sub> и фолиевую кислоту (Hugenholtz et al., 2002), а также свободные нуклеотиды (Иконников и др., 1982). Отличительной особенностью ПКБ является повышенное содержание в их клетках корриноидов, т.е. соединений группы витамина В<sub>12</sub> (Рыжкова (Иордан), 2003).

Неоднозначность метаболизма ПКБ, возможность его перестроек впервые была выявлена при изучении влияния молекулярного кислорода на энергетический обмен этих бактерий. Пропионовокислое брожение (с участием витамина В<sub>12</sub>) является основным энергодающим процессом, однако определенный вклад в его протекание вносят фумаратное (анаэробное) и кислородное дыхание. Молекулярный кислород и витамин В<sub>12</sub> служат факторами перестройки энергетического обмена.

Естественный высокий уровень корриноидов, на 2–3 порядка превышающий таковой у многих прототрофов, оказался существенным для аэротолерантности *P. freudenreichii* на минимальной среде (Рыжкова, 2003). Корриноиды — сложные биомоле-

кулы с уникальной кобальт-углеродной связью, обратимое расщепление которой определяет их множественные химические и биохимические функции. В защите клеток анаэробных прокариот возможно их участие как древних неспецифических факторов-антиоксидантов для тиоловых соединений. Возможно, это обусловлено особенностью генезиса ПКБ в условиях древней Земли. Вместе с тем ПКБ содержат ферменты, которые участвуют в антиокислительной защите собственных клеток. Среди них — флавиновые оксидазы, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, цитохромы (Краева, Воробьева, 1981). Однако сами эти ферменты могут быть уязвимы при воздействии кислорода (Pritchard et al., 1977; Pritchard, Asmundson, 1980) и нуждаются в защите.

В связи с вышесказанным штаммы *P. freudenreichii* были выбраны нами в качестве объектов исследования. Это имеет и практическую направленность, поскольку ПКБ сейчас рассматривают в качестве пробиотиков и как факторы антимикробной защиты пищевых продуктов. Продуцируя экзометаболиты, такие как пропионовая и уксусная кислоты, диацетил, пропионицины, данные бактерии проявляют антимикробные свойства, подавляя рост бактерий разных видов, а также микроскопических грибов (Lind et al., 2007).

Активные формы кислорода (АФК) в умеренных концентрациях в живом организме выступают в роли медиаторов процессов передачи клеточного сигнала. Но в условиях повышенного содержания они оказывают повреждающее действие в виде избыточной концентрации свободных радикалов, по-

\* Томский политехнический университет: 634035, г. Томск, пр-т Ленина, 43.

ражающих биомакромолекулы (белков, ДНК) и клетки организма, в первую очередь разрушая липиды их мембран. В ходе эволюции в организме человека возникла защитная антиоксидантная система, которая базируется на комплексе ферментов: оксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы, а также витаминов А, С, Е и некоторых коферментов.

К антиоксидантам относится широкий круг органических соединений, обладающих антирадикальной и антиокислительной способностью. Разнообразие этих соединений обусловлено различиями в механизме их окисления-восстановления. Важно отметить, что для эффективного поддержания оптимальной концентрации АФК в организме человека, особенно при оксидативном стрессе (для защиты его естественной иммунной системы), целесообразно использовать экзогенные антиоксиданты, в том числе и микроорганизмы, обладающие такими свойствами.

Целью настоящей работы явилось исследование антиокислительных (антиоксидантных) свойств жидких культур пропионовокислых бактерий (двух штаммов *Propionibacterium freudenreichii*) при использовании высокочувствительного вольтамперометрического метода.

### Материалы и методы

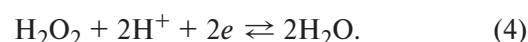
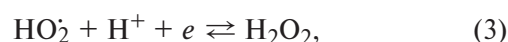
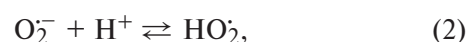
В работе использовали жидкие культуры штаммов *Propionibacterium freudenreichii* RVS-2-ims (I) и *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf (II), которые были изолированы из твердых сыров, идентифицированы (фенотипически и филогенетически) и депонированы в ВКПМ под номерами В-9653 and В-9654 соответственно.

Бактерии культивировали на глюкозо-минеральной (минимальной) питательной среде 72 ч при 30° при свободном доступе воздуха и при периодической нейтрализации образуемых кислот. Образцы для анализа были нейтральными (рН 6,8–7,0). Концентрация живых клеток в конце культивирования составляла  $(3-4) \times 10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Микроскопию клеток проводили с помощью микроскопа Laboval-4 (фирма “Karl Zeiss Jena”, Германия). Выращенные культуры хранили более двух недель при 6°.

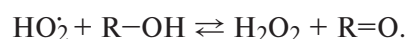
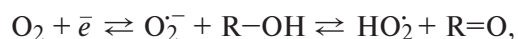
Для изучения антиоксидантной активности ПКБ использовали электрохимический метод катодной вольтамперометрии. Методика эксперимента заключалась в получении вольтамперограмм катодного восстановления кислорода с помощью портативного программируемого анализатора “Антиоксидант” (фирма “Полиант”, г. Томск). Электрохимическая ячейка прибора представляла собой стеклянный стаканчик, в который последовательно помещали фоновый электролит и анализируемые образцы биопрепаратов. В качестве фонового электролита был выбран фосфатный буфер (рН 6,86). В электрохими-

ческой ячейке также находился индикаторный ртутно-пленочный электрод, хлорид-серебряный электрод сравнения и хлорид-серебряный вспомогательный электрод. Объемы отбираемых проб составляли 0,1; 0,5 и 1,0 см<sup>3</sup>. В работе использовали магнитную мешалку.

Антиоксидантную активность образцов определяли, используя метод катодной вольтамперометрии, в частности процесс электровосстановления кислорода, ЭВ O<sub>2</sub> (стадии 1–4). Он обладает рядом преимуществ, но главное — в его основе лежит модельная реакция ЭВ O<sub>2</sub>, протекающая на индикаторном электроде по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в тканях и клетках организма человека:



В данном способе рассматривается одноэлектронное восстановление кислорода с образованием активных кислородных радикалов: O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, HO<sub>2</sub><sup>·</sup> (стадии 1–3). Предполагается, что антиоксиданты, имеющие восстановительную природу, реагируют с кислородом и его активными радикалами на поверхности индикаторного электрода, что отражается в уменьшении катодного тока ЭВ O<sub>2</sub> на ртутно-пленочном электроде в области потенциалов от 0 до –0,7 В по следующему механизму:

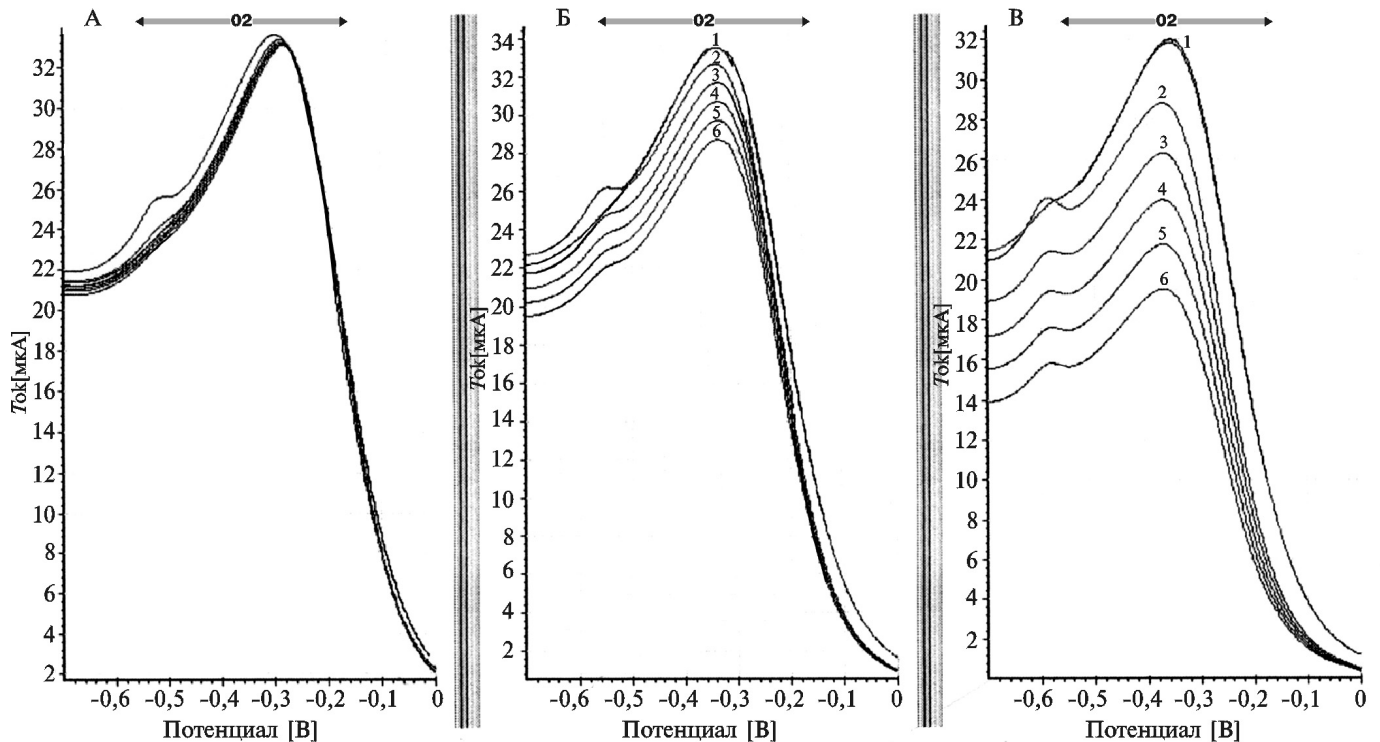


Описанным выше вольтамперометрическим методом исследовали антиоксидантные свойства образцов двух анализируемых культур ПКБ и среды, на которой культивировали бактерии, в качестве контроля.

### Результаты и обсуждение

На рисунке представлены вольтамперограммы электровосстановления кислорода в отсутствие и в присутствии образцов культуры *P. freudenreichii* RVS-2-ims при разбавлении 1:100 (рисунок, А), 1:20 (рисунок, Б) и 1:10 (рисунок, В) и различном времени проведения эксперимента (от 4 до 20 мин).

На примере исследованных образцов штамма видно, что они проявляют выраженную антиоксидантную активность, уменьшая величину тока. При этом наиболее значительно эффект проявляется



Вольтамперограммы электровосстановления кислорода в отсутствие (1) и в присутствии (2–6) образца *Propionibacterium freudenreichii* RVS-2-ims при разбавлении 1 : 100 (А), 1 : 20 (Б) и 1 : 10 (В) и при времени опыта  $t = 4$  мин (2),  $t = 8$  мин (3),  $t = 12$  мин (4),  $t = 16$  мин (5),  $t = 20$  мин (6)

при наименьшем (1 : 10) разбавлении. Таким образом, чем выше концентрация культуры ПКБ в анализируемом образце, тем более высокую антиоксидантную активность проявляет биопрепарат. Также следует отметить, что и питательная среда, хотя и в незначительной степени, но также обладает антиоксидантными свойствами.

В результате проведенных исследований строили зависимость изменения предельного тока электровосстановления кислорода от времени протекания процесса.

На основании полученных данных была рассчитана количественная характеристика антиоксидантной активности ПКБ, в качестве которой использовали кинетический критерий  $K$ , мкмоль/дм<sup>3</sup> · мин. Он отражает количество прореагировавших с анализируемым образцом кислородных форм во времени, следствием чего является эффективность взаимодействия образца с кислородными радикалами, которая определяется по формуле

$$K = \frac{C_{O_2}}{t} \left( 1 - \frac{I_i}{I_0} \right),$$

где  $C_{O_2}$  — концентрация кислорода в фоновом растворе, мкмоль/дм<sup>3</sup>;  $I_i$  — текущее значение предельного тока ЭВ  $O_2$  в присутствии анализируемого образца ПКБ, мкА;  $I_0$  — значение предельного тока ЭВ  $O_2$  в отсутствие анализируемого образца ПКБ, мкА;  $t$  — время протекания процесса, мин.

Полученные результаты были обработаны статистически следующим образом:

$K_{sr}$  — среднее значение кинетического критерия:  $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^3 X_i}{3}$ ,

$S_i$  — стандартное отклонение одного определения:

$$S_i = \sqrt{S_i^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2},$$

$S_r$  — относительное стандартное отклонение:

$$S_r = \frac{S}{\bar{X}}.$$

Рассчитанные значения кинетического критерия антиоксидантной активности для исследуемых образцов жидких культур ПКБ приведены в таблице.

Значения кинетического критерия антиоксидантной активности образцов жидких культур ПКБ и питательной среды ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Наименование образца	Разбавление	$K_{sr}$ , мкмоль/дм <sup>3</sup> · мин	$S_r$
<i>P. freudenreichii</i> RVS-2-ims:			
Образец Ia	1 : 100	0,41	0,084
	1 : 20	1,62	0,071
	1 : 10	4,12	0,031

Окончание таблицы

Наименование образца	Разбавление	$K_{sr}$ , мкмоль/дм <sup>3</sup> · мин	$S_r$
Образец Iб	1 : 100	0,53	0,047
	1 : 20	1,84	0,038
	1 : 10	1,84	0,014
<i>P. freudenreichii</i> RVS-4-irf.			
Образец Ia	1 : 100	0,51	0,031
	1 : 20	1,53	0,016
	1 : 10	3,68	0,020
Образец Iб	1 : 100	0,41	0,057
	1 : 20	1,56	0,049
	1 : 10	3,82	0,020
Питательная среда	1 : 100	0,12	0,021
	1 : 20	0,24	0,023
	1 : 10	0,38	0,022

Представленные данные свидетельствуют о том, что культуры исследованных штаммов *Propionibacterium freudenreichii* RVS-2-ims (I) и *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf (II) обладают выражен-

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Драчева Л. В. 2005. Антиоксидантные свойства пробиотических биопрепаратов // Сб. мат-лов III съезда Общества биотехнологов России. Москва, 25–27 октября 2005 г. М. С. 41.

Драчева Л. В. 2007. Антиоксидантная активность пробиотических биоантиоксидантов // Клиническое питание. № 1–2. 39.

Драчева Л. В., Короткова Е. И., Дорожко Е. В. 2008. Применение вольтамерметрического метода при изучении биоантиоксидантов // Пищ. промышленность. № 4. 28–29.

Иконников Н. П., Иордан Е. П., Воробьева Л. И. 1982. Выделение нуклеотидов и их производных иммобилизованными клетками *Propionibacterium shermanii* // Прикл. биохим. и микробиол. 8. № 1. 34–40.

Краева Н. И., Воробьева Л. И. 1981. Супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза пропионово-кислых бактерий // Микробиология. 50. № 5. 813–817.

ными антиоксидантными свойствами. При этом образцы культур штамма I проявляют более высокую антиоксидантную активность в соответствии с величиной кинетического критерия по сравнению с образцами штамма II.

## Закключение

Полученные результаты позволяют заключить, что исследованные штаммы пропионово-кислых бактерий вида *P. freudenreichii* обладают существенными антиоксидантными свойствами, т.е. могут служить в качестве эффективно действующих биоантиоксидантов. Это имеет научное и практическое значение, так как расширяет возможности использования ПКБ, например, для обогащения биологически активными веществами пищевых продуктов, в частности при создании физиологически функциональных продуктов питания.

В настоящее время European Food Safety Authority (EFSA) включил *Propionibacterium freudenreichii* в список безопасных пищевых микроорганизмов, т.е. присвоил данной бактерии статус Qualified Presumption of Safety (QPS). Рассматривается возможность включения классических ПКБ в список GRAS (USA).

Рыжкова (Иордан) Е. П. 2003. Множественные функции корриноидов в биологии прокариотических организмов // Прикл. биохим. и микробиол. 39. № 2. 133–159.

Hugenholtz J., Hunik J., Santos H., Smid E. 2002. Nutraceutical production by propionibacteria // Le Lait (Dairy Science & Technol). 82. N 1. 103–112.

Lind H., Sjögren J., Gohil S., Kenne L., Schnürer J., Broberg A. 2007. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains // FEMS Microbiol. Lett. 271. N 2. 310–315.

Pritchard G.G., Asmundson R.V. 1980. Aerobic electron transport in *Propionibacterium shermanii* effects of cyanide // Adv. Microbiol. 126. 167–173.

Pritchard G.G., Wimpenny J.W.T., Morris H.A., Levis M.W.A., Hughes D.E. 1977. Effects of oxygen on *Propionibacterium shermanii* grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. 102. N 1. 223–233.

Поступила в редакцию  
31.03.09

#### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROPIONIC ACID BACTERIA (IN LIQUID CULTURES) INVESTIGATED WITH VOLT-AMPEROMETRY

L.V. Dracheva, E.V. Dorozhko, O.A. Avramchuk, E.I. Korotkova,  
E.P. Ryzhkova, H. Lee, I.V. Danilova

We have demonstrated for the first time that liquid cultures of *Propionibacterium freudenreichii* possessed significant antioxidant activity. High sensitive volt-ampere-metric approach was applied. Kinetic criterion of the activity has been calculated based on experimental data.

**Key words:** *volt-amperometric method, Propionibacterium freudenreichii, liquid cultures, anti-oxidant activity.*

**Сведения об авторах:**

*Драчёва Лидия Васильевна* — канд. хим. наук, науч. консультант кафедры электрохимических методов анализа. Тел. (3822)563-832; e-mail: npp-poliant@yandex.ru

*Дорожко Елена Владимировна* — аспирант кафедры электрохимических методов анализа. Тел. (3822)563-832; e-mail: npp-poliant@yandex.ru

*Аврамчук Олеся Александровна* — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. кафедры электрохимических методов анализа. Тел. (3822)563-832; e-mail: npp-poliant@yandex.ru

*Короткова Елена Ивановна* — канд. хим. наук, доц. кафедры электрохимических методов анализа. Тел. (3822)563-832; e-mail: npp-poliant@yandex.ru

*Рыжкова Евгения Петровна* — докт. биол. наук, доцент по званию, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-45-45; e-mail: epr322@mail.ru

*Хао Ли* — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-30-60; e-mail: lihaohao1980@mail.ru

*Данилова Ирина Валентиновна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-45-45; e-mail: danlip@mail.ru