

УДК 616-001.17-08:613.29.292

¹А.Р. Кушугулова*, ¹С.А. Садуахасова, ²Ю.А. Синявский, ²Л.И. Каламкарова,
²Л.П. Мамонова, ¹Г.С. Шахабаева, ¹С.С. Кожаметов, ¹И.К. Тыныбаева,
¹Т.С. Нургожин, ¹Ж.Ш. Жумадилов

¹ Центр наук о жизни, Казахстан, г. Астана

²Казахская академия питания, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: akushugulova@nu.edu.kz

Скрининг представителей нормофлоры желудочно-кишечного тракта по пробиотической активности

Лактобактерии проявляют выраженное пробиотическое действие на организм. Перспективным направлением является поиск новых штаммов пробиотических лактобактерий. В нашей работе культуры были изолированы из традиционных казахских кисломолочных продуктов. В данном исследовании используются классические микробиологические методы по изучению биологических характеристик лактобактерий, а также оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Из различных регионов Казахстана выделено 148 изолятов. Изучены их пробиотический потенциал. Отобраны 20 пробиотически активных штаммов бактерий.

Ключевые слова: пробиотик, антагонизм, ДНК-протекторное действие, антиоксиданты.

A.R. Kushugulova, S.A. Saduakhasova, J.A. Sinyavskii, L.I. Kalamkarova,
L.P. Mamonova, G.S. Shahabaeva, S.S. Kozhakmetov, I.K. Tynybaeva, T.S. Nurgozhin, Z.S. Zhumadilov
Screening of the gastrointestinal components of normoflora according to their probiotic activity

Lactobacilli tend to exhibit a pronounced probiotic effect on the organism. The search for new strains of probiotic lactobacilli is considered to be a prospective research direction. Bacterial cultures have been isolated from the traditional Kazakh dairy products for this research.

The classical microbiological techniques to study the biological characteristics of lactobacilli, and the evaluation of genotoxic properties *in vitro* by the comet assay were conducted. 148 cultures of lactic acid bacteria were isolated from the various regions of Kazakhstan. Their probiotic potential was investigated. 20 strains of active probiotic bacteria were selected.

Key words: Probiotic, antagonism, DNA-protective effect, antioxidants.

А.Р. Кушугулова, С.А. Садуахасова, Ю.А. Синявский, Л.И. Каламкарова, Л.П. Мамонова, Г.С. Шахабаева,
С.С. Кожаметов, И.К. Тыныбаева, Т.С. Нургожин, Ж.Ш. Жумадилов

Асқазан-ішек жолдарының нормофлора өкілдерінің пробиотикалық белсенділіктері бойынша скрининг жүргізу

Лактобактериялардың организмге пробиотикалық әсері айқын. Пробиотикалық лактобактериялардың жаңа штамдарын іздестіру перспективті бағыт болып табылады. Біздің жұмысымызда культуралар қазақтың дәстүрлі сүт қышқылды тағамдарынан бөлініп алынды.

Осы зерттеуде лактобактериялардың биологиялық сипаттамасын анықтау мақсатында классикалық микробиология әдістері қолданылды, сондай-ақ генотоксикалық қасиеттері ДНК-комет *in vitro* бағаланды. Қазақстанның түрлі аймақтарынан 148 изолят бөлініп алынды. Олардың пробиотикалық шамасы зерттелді. Пробиотикалық белсенділігі жоғары 20 бактерия штамдары іріктелініп алынды.

Түйін сөздер: пробиотик, антагонизм, ДНК-протекторлық әсері, антиоксидантар.

Современным представлением механизма положительного действия пробиотиков является их многогранность, ассоциированная с подавлением патогенных и условнопатогенных микроорганизмов за счет продукции биологически активных веществ, конкуренции за лимитируемые нутриенты, влиянии на ферментативную активность желудочно-кишечного тракта, стимуляции иммунной системы организма хозяина.

Другими физиологическими преимуществами пробиотиков являются удаление канцерогенных веществ, снижению холестерина, иммуностимулирующее и снижение аллергического эффекта, синтез и повышение биодоступность питательных веществ, борьба с нетерпимостью лактозы [1].

Стабильность микробных ассоциаций в кишечнике имеет чрезвычайно важное значение для жизнедеятельности человека и является одним из показателей его здоровья. В этой связи особого внимания заслуживает вопрос о поддержании микрoэкологического равновесия в желудочно-кишечном тракте.

В настоящее время особое внимание уделяется возможности коррекции кишечной микрофлоры организма человека с помощью препаратов – пробиотиков, в состав которых входят живые, физиологически активные микроорганизмы.

Основной целью нашего исследования являлось изучение пробиотических характеристик и скрининг по выраженности пробиотических свойств вновь выделенных штаммов лактобактерий.

Материалы и методы

Выделение молочнокислых бактерий. Культуры молочнокислых бактерий были изолированы из казахских традиционных кисломолочных продуктов домашнего производства (кумыс, шубат, айран, курт, cottage cheese). Культуры молочнокислых бактерий выделяли общепринятыми методами. Чистые культуры получали 5-6-кратным рекультивированием единичных колоний на среде MRS agar. Культуры были охарактеризованы по окраске по Грамму, клеточной морфологии и реакции на каталазу. Культуры отнесенные к роду *Lactobacillus* закладывались на хранение при температуре -20°C в среде MRS broth с добавлением 25% (v/v) glycerol. Для ру-

тинных анализов культуры двукратно субкультивировали в среде MRS broth в течение 24 ч. при температуре 37°C. Отобранные изоляты были идентифицированы по последовательности гена 16S rRNA [2].

Устойчивость к экстремальным условиям ЖКТ. Определение устойчивости к неблагоприятным условиям желудочно-кишечного тракта (устойчивость к фенолу, желчи, желудочному соку) проводили классическими микробиологическими методами [3].

Кислотообразующая активность. Энергию кислотообразования определяли по количеству молочной кислоты (метод Тернера), накопленной молочнокислыми бактериями при минимальном заражении обезжиренного молока за 17 часов [4].

Оценка антиоксидантных свойств. Общую антиоксидантную активность исследовали по следующей схеме: стандартную линоленовую кислоту (L 2376; Sigma) добавляли к изотоническому солевому раствору в соотношении 8 мл : 1 л. После этого отбирали 0,4 мл получившегося раствора и добавляли к нему 0,1 г лаурила сульфата и лизат клеток. Свободнорадикальную реакцию провоцировали добавлением $Fe^{2+} SO_4$, инкубировали смесь в течение 60 минут при 37°C. Реакцию окисления остановили добавлением 0,035 мл.бутилата гидрокситолуина (В-1378; Sigma), после чего вносили 0,5 мл буферного ацетата (рН 3,5), состоящего из ледяной уксусной кислоты и ацетатного тригидрата (А-6283 и S -8625; Sigma). После добавления в смесь тиобарбитуратовой кислоты (в соотношении 1:10) ее прогревали при 80°C 40 минут. После охлаждения в раствор вносили 0,5 мл соляной кислоты и 1,7 мл бутанола, центрифугировали при 3 тыс. оборотах 10 минут. ТБК-реактивные продукты бутаноловой фракции оценивали спектрофотометрически при 534 нм [5]. Общая антиоксидантная активность (ОАА) рассчитывалась по формуле:

$$TAA = (1 - \frac{A_{sample}}{A_{control}}) \times 100,$$

где А – плотность, $A_{control}$ – плотность окисленной линоленовой кислоты.

Антибактериальная активность (Метод отсроченного антагонизма) [6]. Антибактериальная активность изучалась методом отсро-

ченного антагонизма (Баженов Л.Г., 1997) по отношению к тест-культурам микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* 534, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* K₁ 5054, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Salmonella typhimurium*. Индикаторные культуры были инкубированы в питательном бульоне (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) при 37°C в течение 18 ч. Для измерения антибактериальной активности, LAB были культивированы в питательной среде MRS broth при 37°C в течение 18 ч.

ДНК – протекторное действие. Для проведения анализа использовали клетки САСО-2. Смешивали клетки с Comet LMAgarose в пропорции 1:6,5 при +37°C. Переносили 75 мкл полученной смеси на слайд, равномерно распределив по поверхности. Помещали в холодильник на +4°C на 30 мин. Погружали в предварительно охлажденный Lysis Solution инкубировать в течение 60 мин. Выдерживали 60 мин в свежеприготовленном Alkaline Solution, рН>13 при комнатной температуре в защищенном от света месте. Отмывали 2-крат-

но в ТЕ-буфере. Электрофорез проводили в ТВЕ-буфере при напряжении 1 вольт/см в течение 10 мин. Отмывку проводили в 70% этаноле. Окрашивали препарат нанесением красителя SYBR Green I [7].

Результаты и их обсуждение

В результате работы из различных регионов Казахстана было выделено 148 культур молочнокислых бактерий. Из них 27 из молока, 19 из кумыса, 34 из айрана, 17 из шубата, 28 из курта, 23 из твердых сыров (таблица 1).

Отобранные изоляты были дифференцированы на основе морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков. Изоляты являлись каталазаотрицательными гармположительными палочками, не образующими эндоспор. Обладали умеренным ростом на среде MRS agar. Являлись факультативными анаэробами. Для идентификации использовался анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента *16S rRNA* гена с применением международных баз данных GeneBank, а также с применением программного обеспечения MicroSeq ID (Applied Biosystems).

Таблица 1 – Количество изолятов, выделенных из традиционных продуктов по регионам

Области	Молоко	Кумс	Айран	Шубат	Курт	Твердые сыры	Итого
Акмолинская область	4	7	8	-	4	4	27
Алматинская область	2	4	-	-	6	3	15
Восточно-Казахстанская область	5	3	6	-	7	3	24
Западно-Казахстанская область	6	-	6	14	6	4	36
Северо-Казахстанская область	8	1	9	-	2	3	23
Южно-Казахстанская область	2	4	5	3	3	6	23
Итого	27	19	34	17	28	23	148

Общая длина фрагмента амплификации *16S rRNA* гена составила 798 п.н. В результате анализа нуклеотидной последовательности консервативного локуса *16S rRNA* достоверно идентифицированы до вида штаммы, принадлежащие *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*

casei, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*.

Выживаемость пробиотических штаммов за-

висит от их резистентности и факторов макроорганизма.

Устойчивость к фенолу оценивали культивированием в обезжиренном молоке с добавлением 8%-го раствора фенола. Анализ представленных данных позволяет установить, что культуры *L. plantarum* и *L. rhamnosus* устойчивы к фенолу и могут развиваться при указанной его концентрации. Необходимо отметить, что у культур *L. paracasei* время свертывания молока при добавлении фенола составляло менее 24 часов, что указывает на их высокую устойчивость. Корреляция данных от источника и региона выделения не установлена.

Соляная кислота желудочного сока является одним из основных факторов защиты организма от проникновения микроорганизмов. Результаты исследований показали, что лишь 21 из исследуемых культур (14%) продемонстрировал устойчивость к высоким концентрациям соля-

ной кислоты, все культуры выделены из таких продуктов, как кумыс, айран, cottage cheese.

Большинство пробиотических бактерий имеют системы, кооперирующиеся с активными формами кислорода. Stecchini et al. (2000) назвал такими системами супероксид дисмутаза и большое содержание внутренних ионов Mn^{+2} [8]. Были получены данные касательно штамма *Lactobacillus fermentum*, который обладал высокими показателями антиоксидантной активности, вырабатывал супероксид дисмутаза, снижал уровень гидроксильных радикалов и продуцировал малое количество глутатиона, потенциального клеточного антиоксиданта [5]. Knauf et al. утверждал, что некоторые лактобациллы продуцируют псевдокаталазу, способную расщеплять высокие концентрации H_2O_2 , таким образом останавливая последующее формирование гидроксильных радикалов [9].



Рисунок 1 – Общая антиоксидантная активность

Saide J.A. и S.E. Gilliland (2005), изучая антиоксидантную активность 19 культур молочнокислых бактерий (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*), выявили, что клеточный лизат проявляет большую активность, чем интактные клетки [10].

В наших исследованиях для определения общей антиоксидантной активности использовался метод, основанный на ингибировании окисления линоленовой кислоты лизатом клеток культур.

Как видно из рисунка, антиоксидантная активность является штамм специфичным свойством. Из изученных 148 культур высокую активность проявили 23 (15,5%), среднюю – 56 (37,8%), низкую – 48 (32,5) и 21 (14,2%) не проявили активности.

Общеизвестно, что антагонизм является одним из основных свойств молочнокислых бактерий, обуславливающих их конкурентоспособность и выживаемость в определенных экологических нишах. Антагонизм лактоба-

цилл складывается из действия органических кислот, перекиси водорода, действия лизоцима, диацетила, образования углекислого газа, продукции бактериоцинов. В основе действия таких метаболитов – снижение рН, ингибирование роста бактерий. Лактобациллы обладают антагонистическими свойствами по отношению к кишечной и сенной палочкам, сальмонелле, клостридии, псевдомонадам,

стафилакоккам, стрептококкам, листерии, пиогенному микрококку, а также бактериям тифа, дизентерии и кандидам [11, 12, 13]. Поэтому с целью селекции и отбора молочнокислых бактерий по выраженности антимикробных свойств нами у изолятов молочнокислых бактерий были изучены антагонистическая активность по отношению к условнопатогенной и патогенной микрофлоре.

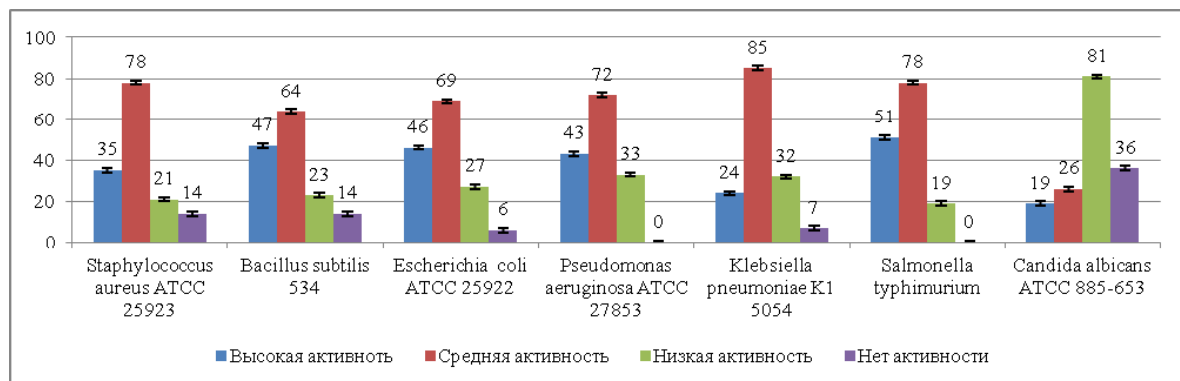


Рисунок 2 – Антагонистическая активность лактобактерий

Таким образом, исследование антагонистической активности у изолятов молочнокислых бактерий по отношению к условнопатогенной и патогенной микрофлоре выявили среди их числа подавляющее большинство антагонистов (67%) со средней активностью, высокую степень антагонистической активности показали 35 изолятов в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 47 в отношении *Bacillus subtilis* 534, 46 в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922, 43 в отношении *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 24 в отношении *Klebsiella pneumoniae* K₁ 5054, 51 в отношении *Salmonella typhimurium*, 19 в отношении *Candida albicans* ATCC 885-653.

На сегодняшний день известно, что пробиотические культуры обладают ДНК-протекторным действием [14]. Пробиотические бактерии обладают предотвращающим действием пищевых канцерогенов [15]. Для проведения анализа клетки САСО-2 предварительно обработанные культурами лактобактерий смешивали с Comet LM агарозой, лизировали и проводили электрофорез единичных клеток. После того проводили прокраску клеток. Анализ осуществляли на основе сравнения индексов повреждения экспериментальных образцов с контролем.

Показателем генотоксического действия является индекс повреждения (ИП), который вычисляется по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{«\% ДНК в хвосте» в опытной группе}}{\text{«\% ДНК в хвосте» в контрольной группе}}$$

Результаты проведенных работ показали, что изученные культуры в той или иной степени обладают защитным эффектом (ИП > 2,0). Высокую степень ДНК-протекторного действия обладали 23 культуры с индексом повреждения 0,31 – 0,36. Подавляющее большинство культур проявило среднее антигенотоксическое действие ИП – 0,37 – 0,65.

Таким образом, в ходе скрининга по пробиотическим свойствам выделено 148 изолятов лактобактерий, генетическая идентификация которых позволила отнести их к следующим видам *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*. Результаты изучения устойчивости к высоким концентрациям соляной кислоты показали, устойчивость 14% культур. 23 изолята показали высокую

антиоксидантную активность. Высоким антагонизмом ко всем тест организмам обладали 24 исследуемых культур. Выраженное антигенотоксическое

действие проявили 23 культуры с ИП 0,31 – 0,36. В результате отобрано 20 культур, обладающих высоким пробиотическим статусом.

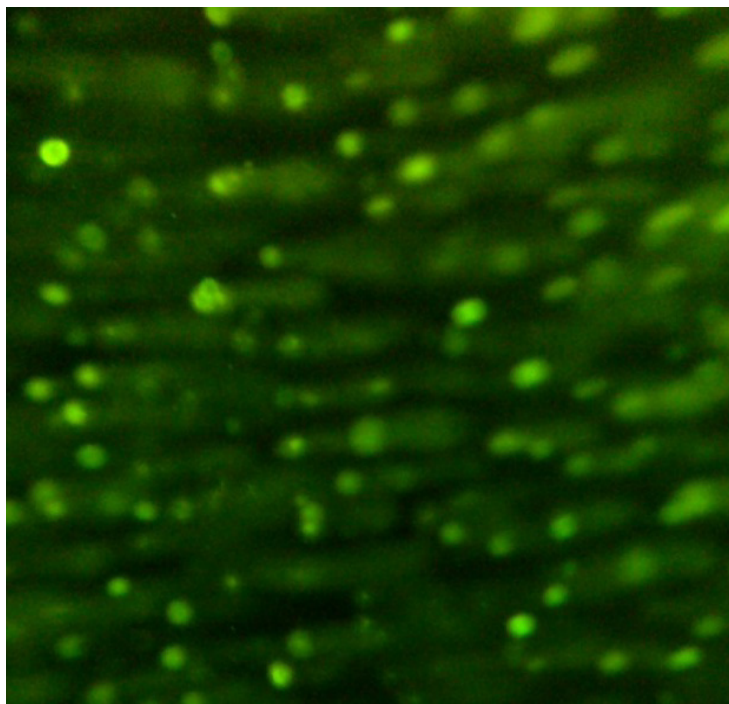


Рисунок 3 – Антигенотоксическое действие лактобактерий

Литература

- 1 Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S., Kim H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health // *Journal of Applied Microbiology*. – 2006. – V.100, № 6. – P.1171– 1185.
- 2 Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* – 1991. – V.173, № 2. – P. 697– 703.
- 3 Graciela F., V. De, María P.T. *Food Microbiology Protocols*. – New Jersey: Humana Press Inc., 2001. – P.173– 181.
- 4 Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова– М.: МГУ, 1995. – 186 с.
- 5 Kullisaar T., Zilmer M., Mikelsaar M., Vihalemm T., Annuk H., Kairane C., Kilk A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics // *International Journal of Food Microbiology*. – 2002. – V.72, №3. – P.215– 224.
- 6 Баженов Л.Г., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. Изучение антагонистического действия лактобацилл на *Helicobacter pylori* // *Журн. микробиол.* – 1997. – № 3. – С. 89– 91.
- 7 ITRC: THE SCGE/ COMET ASSAY PROTOCOL
- 8 Stecchini M.L., Del Torre M., Munari M. Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria // *Int J Food Microbiol.* – 2001. – V. 28, №64. – P.183– 188.
- 9 Knauf H.J., Vogel R.F., Hammes W.P. Cloning, sequencing, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH667 // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V.58, №3. – P.832–839.
- 10 Saide J.A., Gilliland S.E. Antioxidative activity of lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity // *J. Dairy Sci.* – 2005. – V.88, №4. – P.1352– 1357.
- 11 Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds // *Food Control*. – 2006. – V.17, № 6. – P.454– 461.
- 12 Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 2 – Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria // *Food Control*. – 2006. – V.17, № 6. – P.462– 468.

13 Todorov S.D., Dicks L.M.T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins // *Process Biochemistry*. – 2006. – V.41, № 1. – P.11– 19.

14 Burns A.J., Rowland I.R. Anti-Carcinogenicity of Probiotics and Prebiotics // *Curr Issues Intest Microbiol*. – 2000. – V.1, №1. – P.13– 24.

15 Pool-Zobel B.L. Neudecker C., Domizlaff I. Ji. S, Schillinger U., Rumney C., Moretti M., Vilarini I., Scasellati-Sforzolini R., Rowland I.R. Lactobacillus and Bifidobacterium mediated antigenotoxicity in the colon of rats // *Nutr. Cancer*. – 1996. – V.26, № 3. – P.365– 380.

References

1 Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S., Kim H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health // *Journal of Applied Microbiology*. – 2006. – V.100, № 6. – R.1171– 1185.

2 Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol*. – 1991. – V.173, № 2. – R. 697– 703.

3 Graciela F., V. De, Maria P.T. *Food Microbiology Protocols*. – New Jersey: Humana Press Inc., 2001. – P.173– 181.

4 Rukovodstvo k prakticheskim zanjatijam po mikrobiologii / pod red. N.S. Egorova– M.: MGU, 1995. – 186 s.

5 Kullisaar T., Zilmer M., Mikelsaar M., Vihalemm T., Annuk H., Kairane C., Kilk A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics // *International Journal of Food Microbiology*. – 2002. – V.72, №3. – R.215– 224.

6 Bazhenov L.G., Bondarenko V.M., Lykova E.A. Izuchenie antagonisticheskogo dejstviya laktobacill na *Helicobacter pylori* // *Zhurn. mikrobiol*. – 1997. – № 3. – S. 89– 91.

7 ITRC: THE SCGE/ COMET ASSAY PROTOCOL

8 Stecchini M.L., Del Torre M., Munari M. Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria // *Int J Food Microbiol*. – 2001. – V. 28, №64. – R.183– 188.

9 Knauf H.J., Vogel R.F., Hammes W.P. Cloning, sequencing, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH667 // *J. Appl. Environ. Microbiol*. – 1992. – V.58, №3. – R.832–839.

10 Saide J.A., Gilliland S.E. Antioxidative activity of lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity // *J. Dairy Sci*. – 2005. – V.88, №4. – R.1352– 1357.

11 Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds // *Food Control*. – 2006. – V.17, № 6. – R.454– 461.

12 Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 2 – Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria // *Food Control*. – 2006. – V.17, № 6. – R.462– 468.

13 Todorov S.D., Dicks L.M.T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins // *Process Biochemistry*. – 2006. – V.41, № 1. – R.11– 19.

14 Burns A.J., Rowland I.R. Anti-Carcinogenicity of Probiotics and Prebiotics // *Curr Issues Intest Microbiol*. – 2000. – V.1, №1. – R.13– 24.

15 Pool-Zobel B.L. Neudecker C., Domizlaff I. Ji. S, Schillinger U., Rumney C., Moretti M., Vilarini I., Scasellati-Sforzolini R., Rowland I.R. Lactobacillus and Bifidobacterium mediated antigenotoxicity in the colon of rats // *Nutr. Cancer*. – 1996. – V.26, № 3. – R.365– 380.