

Н. С. Карамова, Р. Э. Хабибуллин

## АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* n.v.Ер. 317/402 *IN VITRO*

*Ключевые слова:* свободные радикалы, *Lactobacillus acidophilus*, антирадикальная активность.

*Антирадикальные свойства штамма Lactobacillus acidophilus n.v.Ер. 317/402 были исследованы с использованием метода ингибирования свободных радикалов 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ). Показано, что как культуральная жидкость, так и супернатант лизата клеток лактобацилл вызывают снижение уровня радикалов ДФПГ. Наивысшую антирадикальную активность (41,9%) демонстрировал супернатант лизата клеток лактобацилл, находящихся в начале экспоненциальной фазы роста.*

*Key words:* free radicals, *Lactobacillus acidophilus*, antiradical activity.

*The antiradical activity of Lactobacillus acidophilus n.v.Ер. 317/402 with the in vitro scavenging abilities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical was studied. We found DPPH radical scavenging activity in both bacterial culture supernatant and supernatant of cell lysate. Highest antiradical activity showed the supernatant of lactobacilli cell lysate in early exponential growth phase.*

### Введение

*Lactobacillus* - род молочнокислых бактерий, осуществляющих гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение. Лактобациллы являются важным компонентом резидентной микрофлоры человека и животных [1, 2]. Они обладают выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [3-6]. Основными продуктами метаболизма лактобацилл являются лактат и ацетат, присутствие которых приводит к снижению рН и ингибированию роста многих патогенных микроорганизмов (сальмонелл, эшерихий, клостридий и некоторых видов дрожжей). Кроме того, что лактобациллы выступают в роли барьера для потенциальных патогенов, они могут оказывать иммуностимулирующее действие, активизируя специфическую и неспецифическую защиту организма хозяина [7, 8].

Лактобациллы нашли свое применение в производстве продуктов функционального питания, в сельском и домашнем хозяйстве [9, 10], многие виды используются в производстве молочнокислых сыров, в хлебопечении и при производстве сырокопченых и сыровяленых мясных продуктов [6, 11, 12]. Ранее уже изучали их положительное влияние на функционально-технологические и микроструктурные свойства говяжьих субпродуктов, а также на свойства получаемых из них мясopодуков [13-15].

В настоящее время получены данные, свидетельствующие об антигенотоксических и антиоксидантных свойствах представителей рода *Lactobacillus* [16-21]. В связи с этим представляется весьма перспективным использование таких видов лактобацилл в качестве пробиотиков, а также в виде стартовых культур в технологии пищевых (в частности, мясных сырокопченых и сыровяленых) продуктов с целью профилактики онкологических, сердечно-сосудистых и других заболеваний.

Целью настоящего исследования явилась оценка антирадикальных свойств штамма *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402 *in vitro*.

### Материалы и методы исследований

#### Бактериальные штаммы

В работе применяли штамм *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402, используемый для приго-

товления кисломолочного продукта «Нарине» (ООО «Нарэкс», Республики Армения).

#### Исследование динамики роста штамма *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402

Культуру лактобацилл со скошенного MRS-агара переносили в пробирки с 5 мл MRS-бульона для получения «ночной» культуры. После 17-20 часов культивирования при 37°C 2 мл «ночной» культуры бактерий разводили 30 мл свежей среды MRS. Далее культуру лактобацилл инкубировали в термостате при 37°C. За динамикой роста следили по изменению оптической плотности бактериальной культуры при 600 нм (OD<sub>600</sub>) на спектрофотометре СФ-2000 (Россия).

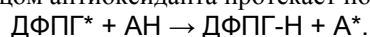
#### Оценка антирадикальной активности *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер.317/402

##### Подготовка образцов

Ночную культуру лактобацилл разводили свежим MRS-бульоном и инкубировали в течение 25 ч при 37°C. Периодически отбирали пробы бактериальной суспензии. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. Супернатант культуры - культуральную жидкость (КЖ) - использовали для измерения антиоксидантной активности. Осадок дважды отмывали в изотоническом растворе и ресуспендировали в 0,2 М фосфатном буфере. Полученную бактериальную суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции (10 циклов обработки длительностью по 30 с, перерывы между ними 1 мин.). Для удаления обломков клеток суспензию центрифугировали 10 мин. при 10000 g. Супернатант лизата клеток (СЛК) использовали для измерения антиоксидантной активности.

##### Определение антирадикальной активности

Антирадикальную активность исследуемых образцов определяли согласно методу Главинда [22] по ингибированию радикалов 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ, CalBiochem, Germany). Раствор ДФПГ в этаноле имеет максимум поглощения на 517 нм (фиолетовый цвет). Реакция ДФПГ с образцом антиоксиданта протекает по схеме:



В результате восстановления ДФПГ антиоксидантом снижается интенсивность фиолетовой окраски ДФПГ, а реакция контролируется по изменению оптической плотности раствора на спектрофотометре при 517 нм.

0,2 мМ спиртовой раствор ДФПГ (1 мл) смешивали с 1 мл исследуемого образца и тщательно перемешивали. Полученную смесь оставляли на 30 мин. в темноте. Изменение максимума поглощения раствора ДФПГ в присутствии исследуемых образцов определяли на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ. Антирадикальный эффект оценивали по проценту ингибирования радикалов ДФПГ, рассчитанному как отношение изменения оптической плотности спиртового раствора 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (ДФПГ) при добавлении исследуемых образцов.

$$A = [(A_c - A_i) / A_c] \times 100\%$$

где A - антирадикальная активность (%); A<sub>c</sub> - оптическая плотность исходного раствора ДФПГ (положительный контроль); A<sub>i</sub> - оптическая плотность раствора ДФПГ после добавления исследуемого образца.

Антирадикальную активность исследуемых образцов определяли на разных фазах роста культуры *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. (2, 4, 7 и 25 часов инкубирования). В качестве позитивного контроля использовали растворы аскорбиновой кислоты (0,25 - 2 мг/мл).

#### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в стандартной компьютерной программе. Данные представлены в виде среднего значения ± среднеквадратическое отклонение. Для оценки достоверности различий между результатами в вариантах опыта использовали t-критерий Стьюдента. Различие между группами считали достоверным при уровне значимости p ≤ 0.05.

#### Результаты исследований и их обсуждение

##### Анализ динамики роста штамма *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402

Результаты по изучению динамики роста штамма *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402 представлены на рисунке 1. Как видно из графика,

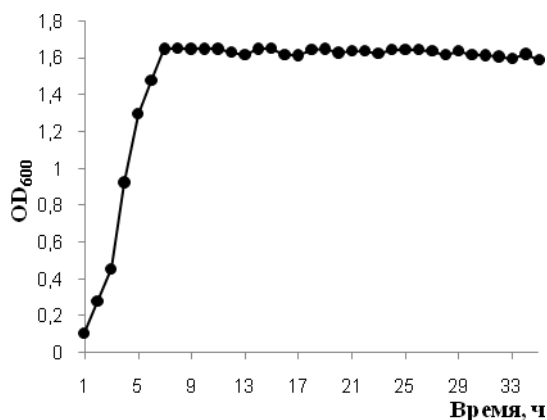


Рис. 1 – Динамика роста штамма *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402

начальная фаза роста (лаг-фаза) у штамма длится 2 часа. Затем в течение экспоненциальной фазы происходило быстрое размножение клеток, которое длилось до 7 часов роста культуры. Далее следовали фазы замедления и стационарная фаза роста.

При оценке антиоксидантных свойств *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402 для отбора проб нами были выбраны точки 2 ч, 4 ч, 7 ч и 25 ч культивирования, которые соответствуют разным фазам роста данного штамма лактобацилл.

##### Антирадикальная активность *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402

Результаты по определению антирадикальной активности *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402 представлены в таблице 1 и рисунке 2. Мы наблюдали снижение оптической плотности раствора ДФПГ при добавлении как культуральной жидкости, так и супернатанта лизата клеток лактобацилл (табл. 1).

Таблица 1 – Ингибирование свободных радикалов ДФПГ культуральной жидкостью и супернатантом лизата клеток *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402

Образцы	Оптическая плотность, OD <sub>517</sub>			
	2ч.	4ч.	7ч.	25ч.
ДФПГ	1,78±0,09	1,78±0,09	1,78±0,09	1,78±0,09
КЖ	1,09±0,08*	1,08±0,07*	1,14±0,09*	1,17±0,07*
СЛК	1,03±0,09*	1,09±0,06*	1,13±0,09*	1,15±0,06*

\*достоверно отличается от OD<sub>517</sub> для ДФПГ, p ≤ 0.05

Следует отметить, что антирадикальная активность исследованных образцов зависела от фазы роста культуры лактобацилл. Согласно полученным результатам, восстановление ДФПГ наиболее интенсивно происходило при воздействии исследуемых образцов, отобранных в начале экспоненциальной фазы роста бактерий. При переходе культуры лактобацилл в стационарную фазу роста наблюдалось снижение антирадикального эффекта как КЖ, так и СЛК. Наивысшую антирадикальную активность (41,9%) демонстрировал СЛК лактобацилл, находящихся в начале экспоненциальной фазы роста (рис. 2).

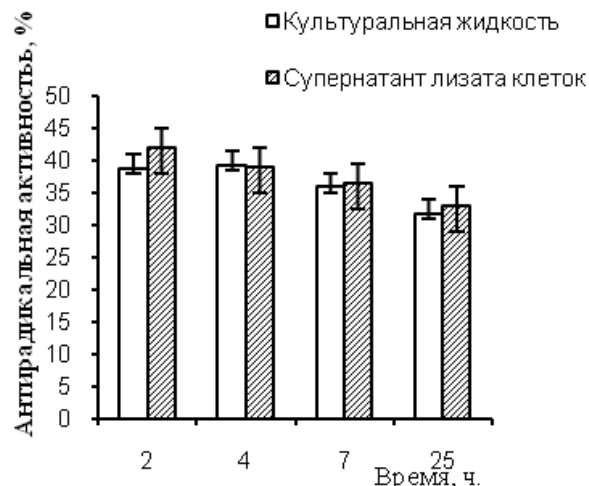
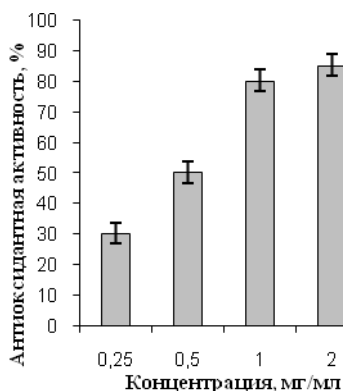


Рис. 2 – Антирадикальная активность КЖ и СЛК *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402



**Рис. 3 – Антирадикальная активность аскорбиновой кислоты**

Антиоксидантные свойства изучены у различных видов лактобацилл: *L. fermentum* [20, 23], *L. Plantarum* [24], *L. casei* [25], *L. acidophilus* [19, 26], *L. ingluviei* [21] и др. Известно, что наиболее распространенные способы антиоксидантной защиты у лактобацилл связаны с работой ферментов супероксиддисмутазы и высокой внутриклеточной концентрацией ионов  $Mn^{2+}$ , а также пероксидазы [27]. Кроме ферментов, определенную роль в снижении уровня свободных радикалов в клетках лактобацилл могут играть различные соединения. В частности, такие свойства были показаны для низкомолекулярной фракции (< 10 кДа), полученной из супернатанта лизата клеток лактобацилл [28]. Полученные нами результаты также подтверждают антирадикальный эффект компонентов, содержащихся в супернатанте лизатов клеток. Также в литературе имеются данные, что антиоксидантными свойствами обладают экзополисахариды лактобацилл [29-31].

Ранее были опубликованы данные, свидетельствующие о том, что культура штамма *Lactobacillus acidophilus* п.в.Ер. 317/402 *in vitro* снижает уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс, а также повреждений ДНК в клетках кишечника крыс [32]. Учитывая, что окислительный стресс является одной из ведущих причин повреждений ДНК [33, 34], на основании полученных нами результатов мы можем предположить, что антирадикальная активность штамма *Lactobacillus acidophilus* п.в.Ер. 317/402 играет значительную роль в защите ДНК от повреждений в клетках млекопитающих.

### Литература

- L.J. Fooks, R. Fuller, G.R. Gibson, Int. Dairy J., 9, 53–61 (1999).
- S. Roos, L. Engstrand, H. Jonsson, International journal of systematic and evolutionary microbiology, 55, 77-82 (2005).
- S. Salminen, E. Isolauri, E. Salminen, Antonie van Leeuwenhoek, 70, 347–358 (1996).
- A.L. Servin, FEMS microbiology reviews, 28, 405-440 (2004)
- B.K. Nomoto, J. Biosci. Bioeng., 100, 583–592 (2005).

- C.R. Socol, L.P. de Souza Vandenberghe, M.R. Spier, A.B.P. Medeiros and C.T. Yamaguishi et al., Food Technol. Biotechnol., 48, 413-434 (2010).
- П.П. Степаненко, Микробиология молока и молочных продуктов. Все для Вас – Подмоскowie, Сергиев Посад, 2003. 415 с.
- Chin-Feng Liu, Tseng Kuo-Chuan, Chiang Shen-Shih, Lee Bao-Hong, Hsua Wei-Hsuan and Pana Tzu-Ming, IJ Sci Food Agric., 91, 2284 (2291- 011).
- J.A. Patterson, K.M. Burkholder, Poultry Sci., 82, 627–631 (2003).
- B. Matijasic, S. Stojkovic, J. Salobir, S. Malovrh, I. Rogelj, Anim. Res., 53, 35–44 (2004).
- C.J. Ziemer, G.R. Gibson, Int. Dairy J, 8 473–479 (1998).
- A.C. Ouwehand, S. Salminen, E. Isolauri, Antonie Van Leeuwenhoek, 82, 279 – 289 (2002).
- П.Э. Хабибуллин, Х.П.Хусаинова, Э.И.Минива-леева, О.А.Решетник, Вестник Казанского технологического университета, 16, 187-194 (2011).
- П.Э. Хабибуллин, М.С.Ежкова, Э.И.Минива-леева, О.А.Решетник, Вестник Казанского технологического университета, 15, 189-194 (2011).
- П.Э. Хабибуллин, Х.П.Хусаинова, Э.И.Минива-леева, О.А.Решетник, Вестник Казанского технологического университета, 16, 203-209 (2011).
- L.I. Vorobjeva, S. K. Abilev, Applied Biochemistry and Microbiology, 38, 97–10 (2002).
- A. Duda-Chodak, T. Tarko, M. Statek, Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 7, 4, 39-5 (2008).
- V. I. Chalova, Journal of Environmental Science and Health, Part B, 43, 193 — 198 (2008).
- H. S. Kim, H. S. Chae, S. G. Jeong, J. S. Ham, S. K. Im, C. N. Ahn and J. M. Lee, Asian-Aust. J. Anim. Sci., 19, 2, 262-265 (2006).
- A.N. Wang, X.W. Yi, H.F. Yu, B. Dong and S.Y. Qiao, Journal of Applied Microbiology, 107, 1140–1148 (2009).
- A. Mandal, T. Paul, S. Roy, S. Mandal, S. Pradhan, K.Ch. Mondal, D.K. Nandi, Indian J Exp Biol., 51, 2, 174-80 (2013).
- J. Glavind, Acta Chem Scand., 13, 1635—1640 (1963).
- S. Klayraung, and S. Okonogi, Braz. J. Microbiol., 40, 757-766 (2009).
- P. Nedelcheva, Z. Denkova, P. Denev, A. Slavchev, A. Krastanov, Biotechnol. & Biotechnol. Eq., 24, 1624-1630 (2010).
- S. Kapila; P.R. Vibha, Sinha, Indian J Med Sci, 60, 9, 361-370 (2000).
- M. Y. Lin, and F. J. Chang, Dig. Dis. Sci., 45, 1617-1622 (2000).
- M.L. Stecchini, M. Del Torre, M. Mutari, International journal of microbiology, 64, 183-188 (2000).
- Yuji Yamamoto, In Report of NISR Research GRANT Young Investigator Research Grant, 2009. P. 57-58.
- P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon, International Dairy Journal., 12, 163–171 (2002).
- S. Gorska, W. Jachymek, J. Rybka, M. Strus, P.B. Heczko, A. Gamian, Carbohydrate Research, 345, 108–114 (2010).
- Li Zhanga, Chunhong Liub, Da Li, Yujuan Zhaoa, Xue Zhanga, Xianpeng Zenga, Zhennai Yangad, Shengyu Li, International Journal of Biological Macromolecules, 54, 270–275 (2013).
- A.K. Nerseyan In Food and cancer prevention, Cambridge UK, Royal Soc of Chem Publ, 1993. P. 62-64.
- В.И. Кулинский, Соросовский образовательный журнал, 1, 2-7 (1999).
- M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez, Free Rad Biol Med., 32, 1102–1115 (2002).