

УДК 637.1

## ОЦЕНКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ *Lactobacillus reuteri* LR1 *in vitro*

© 2020 г. А. В. Бегунова<sup>1</sup>, О. С. Савинова<sup>2</sup>, И. В. Рожкова<sup>1</sup>, Ю. И. Крысанова<sup>1</sup>, Т. В. Фёдорова<sup>2</sup>, \*

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, 115093 Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: fedorova\_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2020 г.

После доработки 17.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Изучение влияния различных антимикробных препаратов на штамм *Lactobacillus reuteri* LR1 показало его чувствительность к линкомицину, амоксициллину и левомецитину и устойчивость к остальным исследованным антибиотикам. Установлено, что при ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 в течение 24 ч происходило достоверное повышение антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей на фоне снижения количества L-лейциновых эквивалентов по сравнению с исходным молоком. В процессе дальнейшего культивирования увеличивались протеолитическая, антиоксидантная и ингибирующая активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), достигая наибольшего значения через 96 ч. ВЭЖХ-МС/МС анализ пептидного профиля ферментированного лактобактерией молока показал наличие пептидов, обладающих АПФ-ингибирующей, антимикробной, антиоксидантной и иммуномодуляторной активностями. Анализ субстратной специфичности СЕР-протеиназы *L. reuteri* LR1 в отношении фрагмента (f1-23)  $\alpha_{s1}$ -казеина показал его уникальную специфичность, что может указывать на его принадлежность к P1/P11 типу.

**Ключевые слова:** *Lactobacillus reuteri* LR1, устойчивость к антибактериальным препаратам, протеолитическая активность, антиоксидантная активность, АПФ-ингибирующая активность, пептидный профиль, биологически активные пептиды

**DOI:** 10.31857/S0555109920050049

Современная наука определяет микробиоценоз как единую систему организма человека и его микробиома. При этом микробиом представляет собой разнообразные ассоциации микроорганизмов и продукты их метаболизма, обитающие в определенном биотопе [1].

Появляется все больше доказательств того, что различные диеты и факторы окружающей среды оказывают значительное влияние на метаболизм, иммунный ответ и восприимчивость человека к болезни в результате изменения видового состава микробных ассоциаций в его желудочно-кишечном тракте [2–4].

С 2001 г. термин “пробиотики” означает живые микроорганизмы, прием которых в адекватных количествах оказывает благоприятное воздействие на организм хозяина [5]. Поэтому очень важно понимать механизм воздействия пробиотического микроорганизма на макроорганизм, что постоянно исследуется в экспериментах *in vitro*.

Полезные для здоровья человека свойства молочнокислых бактерий (МКБ) интенсивно изуча-

ются. В настоящее время проводятся исследования и накапливаются данные о более широкой пробиотической активности микроорганизмов, которые способны нормализовать функции микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), усиливать иммунитет, снижать проявления пищевой аллергии, облегчать симптомы непереносимости лактозы, оказывать гипохолестеринемическое, антиканцерогенное и антимуtagenное действие [6, 7]. В нижних отделах кишечника пробиотические микроорганизмы способны продуцировать антиоксиданты, гормоноподобные вещества и ферменты, которые участвуют в метаболических процессах макроорганизма [8].

Применение пробиотических, в том числе молочнокислых микроорганизмов при производстве кисломолочных продуктов направленного действия позволит добавить продукту ряд функциональных свойств [9, 10]. Доказано, что введение в организм пробиотических штаммов в составе кисломолочных продуктов более эффективно по сравнению с приемом пробиотических штаммов в ви-

де лекарственных форм [11]. В настоящее время представители рода *Lactobacillus* являются наиболее широко изученными пробиотическими микроорганизмами в группе молочнокислых бактерий [12]. Известно, что род *Lactobacillus* включает виды с различным спектром физиологических и биохимических свойств. Интерес к *Lactobacillus reuteri*, одному из уникальных микроорганизмов семейства *Lactobacillaceae* с различными механизмами действия, возрастает. В связи с тем, что пробиотические свойства лактобактерий являются штамм-специфичными, исследование свойств конкретного штамма с целью его дальнейшего применения в качестве заквасочной или пробиотической заквасочной культуры является актуальным.

Исследуемый в данной работе штамм *Lactobacillus reuteri* LR1, был выделен в 2014 г. в Центральной лаборатории микробиологии Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Россия) из фекалий (каловые массы) здорового человека и идентифицирован современными биохимическими и молекулярно-генетическими методами [13]. Ранее было показано, что штамм *L. reuteri* LR1 обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и синтезирует в присутствии глицерина бактериоциноподобное соединение – реутерин [13, 14].

Цель работы – исследование пробиотического потенциала и функциональных свойств штамма *L. reuteri* LR1.

## МЕТОДИКА

**Культуры.** В работе использовался штамм молочнокислых бактерий *L. reuteri* LR1 из фонда Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Москва, Россия). Для культивирования лактобактерий использовали стерильное обезжиренное молоко.

**Определение количества клеток.** Количество клеток *L. reuteri* LR1 определяли методом посева на питательную среду MRS-агар (“НПЦ Биокомпас-С”, Россия). Культивирование проводили в анаэробных условиях при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в анаэроостате OXOID и газ-пакетах GasPak (“BD Biosciences”, США). Подсчитывали все выросшие на среде колонии в течении 72 ч.

**Устойчивость к антибиотикам.** Устойчивость штамма *L. reuteri* LR1 к антибиотикам *in vitro* определяли диско-диффузионным методом, который основан на способности антимикробных препаратов диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов на поверхности агаризованной среды. Интерпретацию результатов по оцен-

ке чувствительности лактобактерий проводили по МУ 2.3.2.2789-10 “Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов” (<https://ohrana-truda.ru/upload/iblock/846/4293757373.pdf>).

**Получение белково-пептидных фракций.** Аликвоту (15 мл) образца ферментированного молока центрифугировали при температуре  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин при 10000 г на центрифуге 5702R (“Eppendorf”, Германия), фильтровали надосадочную жидкость вместе с жировым слоем через складчатый бумажный фильтр (MN 640W, “Macherey-Nagel”, Германия). рН фильтрата довели до 4.6 добавлением 0.1 М раствора гидроксида натрия с последующим центрифугированием полученной смеси при  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин при 10000 г на центрифуге 5702R (“Eppendorf”, Германия) и фильтрацией надосадочной жидкости через шприцевые фильтры с гидрофильной мембраной с диаметром пор 0.2 мкм (“Sartorius”, Германия). Полученные белково-пептидные фракции замораживали и хранили при температуре  $-73^\circ\text{C}$  до проведения анализа.

Перед проведением анализа образцы белково-пептидных фракций ферментированного молока размораживали и дополнительно фильтровали с помощью шприцевых фильтров с гидрофильной PVDF-мембраной с диаметром пор 0.45 мкм (“Carl Roth”, Германия).

В полученных таким образом образцах белково-пептидных фракций ферментированного молока определяли протеолитическую, антиоксидантную и АПФ-ингибирующую (гипотензивную) активности, а также содержание органических кислот.

**Протеолитическая активность.** Протеолитическую активность определяли количественно путем измерения количества высвобождаемых аминокислот в супернатантах с использованием метода, описанного в работе [15] с 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) (“Sigma-Aldrich”, США). Оптическую плотность растворов определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 (“BioTek”, США) при длине волны 340 нм. В качестве стандарта для определения протеолитической активности использовали L-лейцин (“Sigma-Aldrich”, США). Результаты измерений выражали в ммоль/л-эквивалентов лейцина.

**Антиоксидантная активность.** Антиоксидантную активность *in vitro* определяли флуоресцентным методом ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) с генерацией пероксильного радикала в реакционной среде с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2, как описано [16, 17]. Пероксильный радикал генерировался не-

посредственно в реакционной среде при термическом распаде азосоединения 2,2'-азобис(2-иетилпропионамидина) дигидрохлорида (ААРН) (“Sigma”, США), при инкубации в течение 10 мин при 37°C. Кинетику уменьшения флуоресценции регистрировали в течение 1 ч с интервалом измерений 60 с при температуре 37°C на фотометре-флуориметре Synergy 2 в режиме регистрации интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения – 485 нм, длина волны испускания – 528 нм). Величину антиоксидантной активности образцов ферментированного молока по отношению к пероксильному радикалу рассчитывали в мМ эквивалентов тролокса (ТЭ).

**АПФ-ингибирующая активность.** Анализ АПФ-ингибирующей активности проводили в 96-луночных полипропиленовых черных несорбирующих микропланшетах (“Greiner Bio One”, Германия). Кинетику увеличения интенсивности флуоресценции исследовали в течение 15 мин с интервалом в 20 с на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy 2 при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  и длине волны возбуждения и регистрации флуоресценции – 320 и 420 нм соответственно.

С помощью графика зависимости ингибирования АПФ (%) от десятичного логарифма фактора разбавления исходного образца ферментированного молока методом линейной интерполяции определяли фактор разбавления образца, при котором наблюдалось 50%-ное ингибирование активности АПФ ( $IC_{50}$ ). Величину  $IC_{50}$  для образцов ферментированного молока, выраженную в мг белка/мл, рассчитывали путем деления концентрации белка в образце (в мг/мл) на величину фактора разбавления, при котором наблюдалось 50%-ное ингибирование активности АПФ.

**Содержание органических кислот.** Определение содержания органических кислот (молочной и уксусной) в процессе ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Agilent 1290 Infinity (“Agilent Technologies”, США) с детекцией на диодно-матричном детекторе при длине волны 210 нм с использованием колонки Zorbax SB-C8 ( $4.6 \times 50$  мм, 1.8 мкм).

**Определение пептидного профиля.** Анализ пептидного профиля был выполнен в системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (“Agilent Technologies”, США) и tandemного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (“Thermo”, Германия). Для разделения пептидов использовали обращенно-фазовую градиентную хроматографию [18]. Контроль результатов ВЭЖХ-МС проводили с помощью программы QualBrowser. С помощью программы Raw2msm из масс-хроматограмм были получены списки точных масс пептидов и масс их фрагментов и использованы для поиска и идентификации

белков по базе данных при помощи программы Peaks Studio (“Bioinformatics Solutions Inc.”, США, version 8.5). Для идентификации пептидов использовали аминокислотные последовательности белка согласно базе данных UniprotKB. Для идентификации использовали следующие параметры поиска: фермент – None (нативные пептиды); точность масс для родительского иона – 15 ppm; точность масс для MS/MS фрагментов – 0.50 Да. *De novo* секвенирование выполнено при помощи программы Peaks Studio.

Концентрацию белка в препаратах определяли с использованием набора BCA Assay kit (“ThermoFisher”, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Все экспериментальные работы проводились в 3–5 кратной повторности. Построение графиков диаграмм, таблиц и статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием программ Microsoft Office и Statistica 10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные исследования доказали, что биологические эффекты и, как следствие, пробиотический потенциал разных штаммов лактобактерий одного вида могут достаточно сильно варьировать и являться штаммоспецифичной характеристикой [19–21]. Для повышения эффективности применения пробиотических микроорганизмов необходимо также понимать механизмы, обуславливающие биологическое действие конкретного штамма.

Проведенные ранее исследования показали выраженные антимикробные свойства у штамма *L. reuteri* LR1 при сокультивировании с условно-патогенными микроорганизмами, возбудителями нозокомиальных и пищевых токсикоинфекций, что является одним из основных показателей пробиотической активности данного штамма [13, 22].

**Устойчивость к антибиотикам.** Поскольку при использовании пробиотиков немаловажную роль играет их резистентность к антибиотикам, была изучена чувствительность штамма *L. reuteri* LR1 к 15 антимикробным препаратам, относящихся к различным группам: пенициллины, тетрациклины, аминогликозиды, фторхинолоны, макролиды и др. (табл. 1). Используемые препараты применяются в клинической практике для лечения различных кишечных инфекций, инфекций дыхательных и мочевыводящих путей и др. В результате проведенных исследований показано, что штамм *L. reuteri* LR1 был чувствителен к линкомицину, амоксицилину и левомицетину, проявлял промежуточную устойчивость к ампициллину и неомицину, и обладал устойчивостью к осталь-

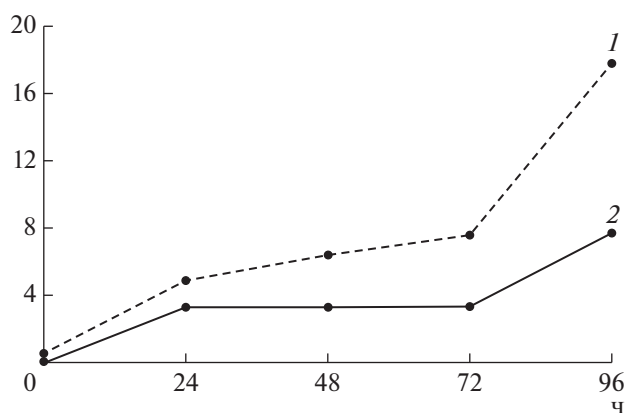
**Таблица 1.** Устойчивость *Lactobacillus reuteri* LR1 к антимикробным препаратам

№ п/п	Препарат	Содержание вещества в диске, мкг	Диаметр зоны ингибирования роста, мм	Оценка чувствительности лактобактерий
Группа аминогликозидов				
1	Гентамицин	120 мкг	12	Устойчивый
2	Канамицин	30 мкг	8–10	Устойчивый
3	Неомицин	30 мкг	12–14	Промежуточно-устойчивый
Группа пенициллинов				
4	Амоксициллин	20 мкг	25–26	Чувствительный
5	Ампициллин	10 мкг	15–16	Промежуточно-устойчивый
6	Бензилпенициллин	10 Ед.	10	Устойчивый
7	Оксациллин	1 мкг	9–10	Устойчивый
Группа тетрациклинов				
8	Доксициклин	30 мкг	8	Устойчивый
9	Тетрациклин	30 мкг	–	Устойчивый
Группа фторхинолонов				
10	Левوفлоксацин	5 мкг	8–10	Устойчивый
11	Пефлоксацин	5 мкг	–	Устойчивый
Группа макролидов-азалидов				
12	Азитромицин	15 мкг	9	Устойчивый
Другие				
13	Линкомицин	15 мкг	27	Чувствительный
14	Левомецетин	30 мкг	30–32	Чувствительный
15	Фосфомицин	200 мкг	10	Устойчивый

ным тестируемым антимикробным препаратам. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм *L. reuteri* LR1 является относительно устойчивым к антибиотикам и может быть рекомендован для применения в виде бактериального препарата или в составе кисломолочного продукта для нормализации микрофлоры ЖКТ при антибактериальной терапии различных инфекций.

**Биологическая и протеолитическая активность *in vitro*.** В процессе ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 происходило снижение активной кислотности в результате сбраживания углеводов молока с образованием органических кислот, в первую очередь молочной кислоты, а также ферментативный гидролиз белков молока, преимущественно различных фракций казеина, синтезируемыми *L. reuteri* LR1 протеазами с образованием пептидов. Данные по изменению содержания количества органических кислот при культивировании *L. reuteri* LR1 в стерильном обезжиренном молоке представлены на рис. 1. При этом в течение 24 ч ферментации молока происходило достоверное повышение антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активности на фоне снижения количества эквивалентов L-лейцина по сравнению с исходным молоком (табл. 2). Это обусловлено достаточно низкой протеолитической активностью

штамма *L. reuteri* LR1 в отношении казеиновых белков молока, в связи с чем, наблюдался медленный рост клеточной биомассы, количество клеток *L. reuteri* LR1 увеличивалось незначительно с  $1.2 \times 10^7$  КОЕ/мл до  $1.9 \times 10^7$  КОЕ/мл. В последующие 24 ч культивирования количество клеток *L. reuteri* LR1 увеличивалось с большей скоростью и достигало наибольшего значения



**Рис. 1.** Динамика изменения содержания органических кислот (мг/мл) при культивировании штамма *L. reuteri* LR1 на молоке: 1 — молочная кислота, 2 — уксусная кислота.

**Таблица 2.** Динамика изменения протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей в процессе культивирования штамма *Lactobacillus reuteri* LR1 на молоке

Продолжительность культивирования, ч	Количество клеток <i>L. reuteri</i> LR1, КОЕ/мл	Антиоксидантная активность (ORAC), мкМ ТЭ/мг белка	АПФ-ингибирующая активность, (IC <sub>50</sub> ) мг белка/мл	Протеолитическая активность, (эквиваленты L-лейцина), мМоль
0	$1.2 \times 10^7$	205.6	26.2	8.1
24	$1.9 \times 10^7$	374.9	12.6	6.2
48	$3 \times 10^9$	295.1	11.2	6.0
72	$9.4 \times 10^8$	361.5	7.1	8.5
96	$9.3 \times 10^8$	453.6	1.6	10.4

**Таблица 3.** Количество идентифицированных уникальных пептидов казеиновых и неказеиновых белков в образцах исходного и ферментированного штаммом *Lactobacillus reuteri* LR1 молока

Образцы	Идентифицировано (всего)	Казеин β	Казеин α <sub>s1</sub>	Казеин κ	Казеин α <sub>s2</sub>	Неказеиновые белки
Контроль (молоко)	126	39	61	6	12	8
Ферментированное молоко	151	54	75	10	3	9

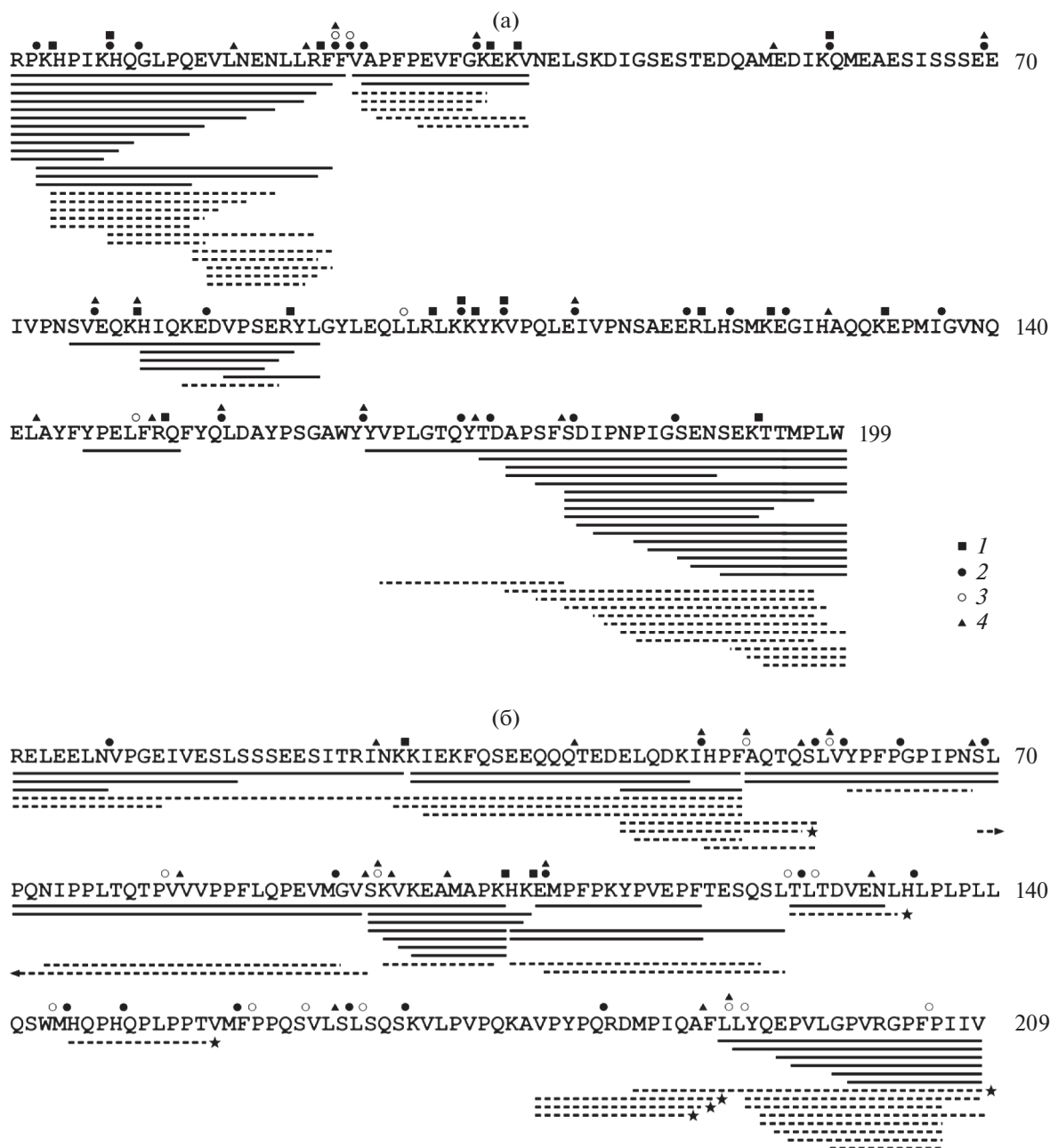
$3 \times 10^9$  КОЕ/мл, при этом наблюдалось незначительное снижение антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей на фоне неизменяющегося количества эквивалентов L-лейцина. При дальнейшем культивировании наблюдали увеличение протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей, наибольшее значение которых достигалось на 96 ч культивирования (табл. 2). При этом количество жизнеспособных клеток *L. reuteri* LR1 практически не изменялось с 72 ч культивирования (табл. 2), что может быть объяснено достижением культуры стационарной фазы роста и возможным ингибированием роста из-за накопления в среде молочной и уксусной кислот (рис. 1).

**Пептидный профиль и субстратная специфичность протеаз.** В результате ВЭЖХ-МС/МС анализа пептидных фракций образцов не ферментированного (контроль) и ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока идентифицировано 277 пептидов (табл. 3). В основном пептиды принадлежали казеиновым белкам, среди неказеиновых белков в наибольшем количестве были идентифицированы α-лактальбумин и β-лактоглобулин, лактоферин, остеопонтин и др.

В ферментированном молоке через 24 ч культивирования *L. reuteri* LR1 было идентифицировано порядка 150 олигопептидов, содержащих от 5 до 52 аминокислотных остатков (табл. 3, рис. 2 и 3). Анализ аминокислотных последовательностей олигопептидов показал, что большая часть из них, также присутствовала в исходном молоке до вне-

сения закваски, а другая часть являлась фрагментами этих пептидов (рис. 2 и 3). Из всех уникальных олигопептидов, идентифицированных в ферментированном *L. reuteri* LR1 молоке, только 7 образовались в результате гидролиза непосредственно β-казеина, а не олигопептидов, присутствующих в исходном молоке (рис. 2). Наличие пептидов в исходном неферментированном молоке указывало на активность эндогенных молочных протеаз, в основном, таких как плазмин, эластаза и катепсин D, В и G (рис. 2) [23]. При этом плазмин мало или совсем не активен в отношении κ-казеина и сывороточных белков, которых обнаружено значительно меньше, по сравнению с пептидами из β- и α<sub>s1</sub>-казеинов (табл. 2, рис. 3). Отсутствие некоторых пептидов после ферментация молока, вероятно, обусловлено либо их гидролизом под действием внеклеточных протеаз *L. reuteri* LR1, или их потреблением клетками.

Полученные данные пептидного профиля согласуются с результатами определения протеолитической активности. Так в течение 48 ч культивирования *L. reuteri* LR1 наблюдали снижение количества эквивалентов L-лейцина с 8.1 мМ в исходном молоке до 6.0–6.2 мМ (табл. 2), что свидетельствовало об уменьшении суммарного количества пептидов, присутствовавших в молоке. Таким образом, в качестве источника азотного питания клетки *L. reuteri* LR1 использовали пептиды, исходно содержащиеся в молоке. Причем в течение ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 сгусток не образовывался. Аналогичные резуль-



**Рис. 2.** Пептиды  $\alpha_1$ -казеина (а) и  $\beta$ -казеина (б), идентифицированные в составе образцов не ферментированного (контроль) и ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока. Сплошная линия – пептиды, обнаруженные как в контрольном образце молока, так и в ферментированном *L. reuteri* LR1; пунктиром обозначены уникальные пептиды, обнаруженные только в образце ферментированного молока, звездочкой – пептиды, образовавшиеся в результате гидролиза  $\beta$ -казеина, а не его олигопептидов, присутствующих в исходном молоке. Сайты расщепления эндогенных молочных протеаз: 1 – плазмин; 2 – катепсин В; 3 – катепсин D; 4 – катепсин G [23].

таты были получены ранее в работе [24]. Авторы показали, что рост и развитие штаммов лактобацилл *L. reuteri* JCM 1112 и *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 значительно улучшалось в предварительно гидролизованном молоке по сравнению с цельным обезжиренным. В качестве источника азота для роста в молоке этим штаммам требовались именно

олигопептиды, а не белки или свободные аминокислоты.

Лактобактерии содержат различные протеиназы клеточной стенки (ПКС, CEP – Cell Envelope Proteinase), ответственные за гидролиз преимущественно казеиновых белков и высвобождение различных биоактивных пептидов. В настоящее

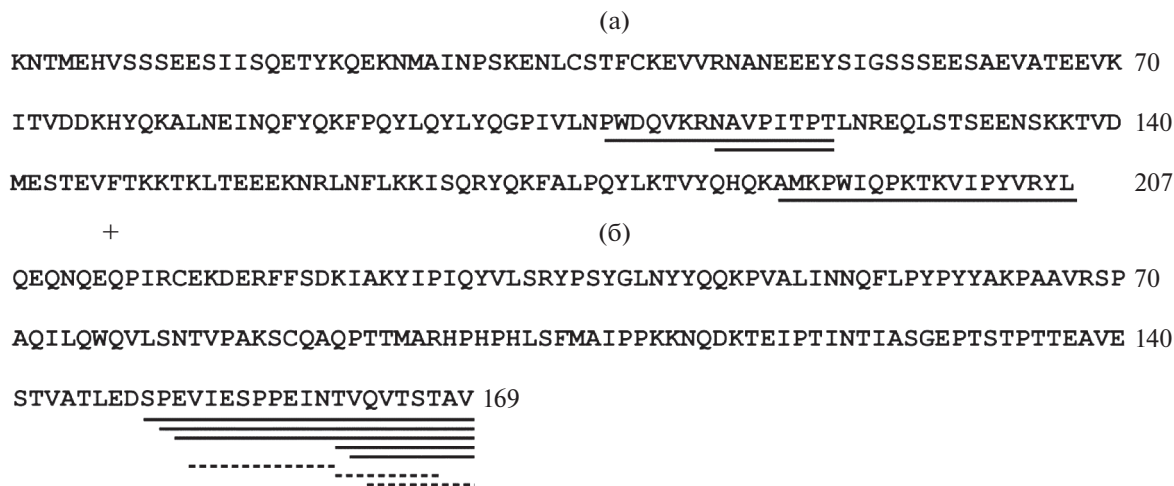


Рис. 3. Пептиды  $\alpha_2$ -казеина (а) и  $\kappa$ -казеина (б), идентифицированные в составе образцов не ферментированного (контроль) и ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока. Сплошная линия – пептиды, обнаруженные как в контрольном образце молока, так и в ферментированном лактобациллой, пунктирные – пептиды, обнаруженные только в образце ферментированного молока.

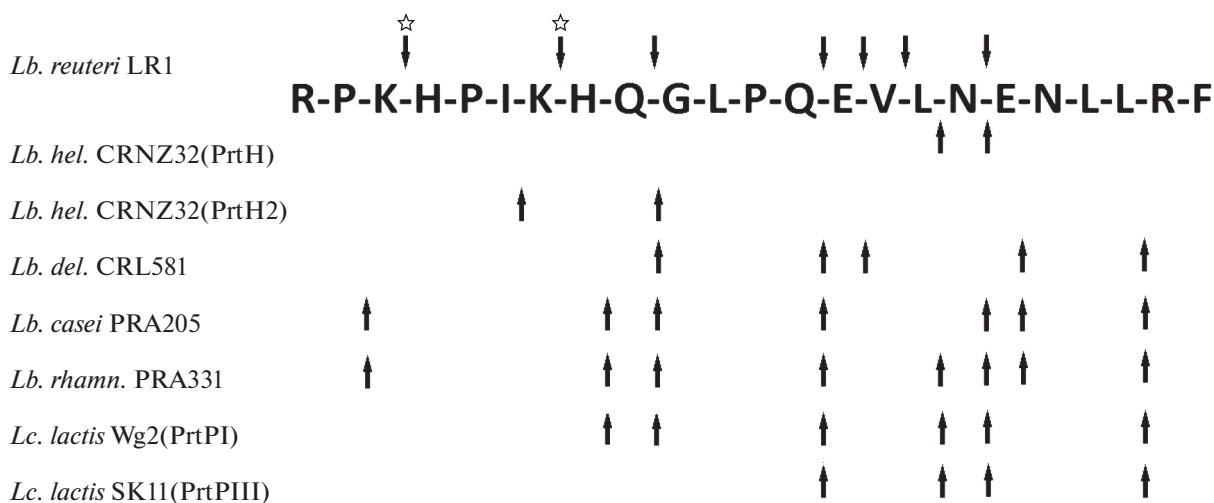


Рис. 4. Специфичность протеиназ клеточной стенки (ПКС) различных лактобактерий, в том числе штамма *L. reuteri* LR1 в отношении  $\alpha_1$ -казеина (f1–23). Сайты расщепления обозначены стрелками; сайты расщепления, не характерные для ПКС лактобактерий, отмечены звездочками. *Lb. hel.* – *L. helveticus* CRNZ32 [30]; *Lb. del.* – *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL581 [28]; *Lb. casei* – *L. casei* PRA205 [29]; *Lb. rhamn.* – *L. rhamnosus* PRA331 [29]; *Lc. lactis* Wg2 – *Lactococcus lactis* Wg2 [28]; *Lc. lactis* SK11 – *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 [32].

время охарактеризованы пять различных типов ПКС (СЕР) лактобактерий: **PrtP** из *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus paracasei*, **PrtH** из *Lactobacillus helveticus*, **PrtR** из *Lactobacillus rhamnosus*, **PrtS** из *Streptococcus thermophilus* и **PrtB** из *Lactobacillus bulgaricus* [25]. ПКС обычно классифицируются в соответствии с их спецификой гидролиза фрагмента  $\alpha_1$ -казеина, содержащего остатки от 1 до 23 [26]. Как правило, определяют два типа ПКС: PI и PIII тип. Предпочтительным субстратом протеиназ типа PI является  $\beta$ -казеин и, в меньшей степени,  $\kappa$ -казеин, в то время как тип PIII

способен гидролизовать  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеины в равной степени. Для лактобацилл были показаны типы протеиназ: PI- и PIII-типов, а также промежуточного PI/PIII с новым типом субстратной специфичности [27].

*L. reuteri* LR1 гидролизует (f1–23) фрагмент  $\alpha_1$ -казеина в следующих положениях: K3–H4, K7–H8, Q9–G10, Q13–E14, E14–V15, V15–L16, N17–E18 (рис. 4). Большинство из данных сайтов расщепления типичны для ПКС смешанного типа PI/PIII, выделенных из лактобактерий, таких как *S. thermophilus* CNRZ385, *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

*lactis* CRL581 и *L. helveticus* L89, *L. casei* PRA205 и *L. rhamnosus* PRA331 [25, 28, 29]. Для ПКС *L. reuteri* LR1 не характерны сайты рестрикции в положениях H8-Q9, L16-N17 и E18-N19, описанные для протеиназ других лактобактерий (рис. 4). Однако обнаружено 3 дополнительных сайта в позициях K3-N4, K7-N8 и V15-L16. Известно, что (f1–9) последовательность аминоконцевой области  $\alpha_{s1}$ -казеина гидролизуеться только внутриклеточными эндопептидазами PerO2 и PerO3 из *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 по связи P5-I6 [30]. Кроме того, эти же авторы показали, что сайты K3-N4 и K7-N8 чувствительны к действию эндопептидазы PerE *L. helveticus* CNRZ32. Однако рост бактериальной биомассы и отсутствие лизиса клеток (табл. 2, рис. 1) в процессе ферментации в первые 24 ч исключает вероятность влияния внутриклеточных протеаз на наблюдаемый гидролиз казеина штаммом *L. reuteri* LR1. Более того ранее было показано наличие субстратной специфичности в отношении K3-N4 сайта у ПКС *L. helveticus* Zuc2 [31]. Сайты рестрикции K7-N8 и V15-L16 показаны впервые для ПКС лактобацилл, что подчеркивает уникальную специфичность данной протеиназы *L. reuteri* LR1, которая может быть отнесена к PI/PIII типу, демонстрируя более высокую активность в отношении  $\beta$ -,  $\alpha_{s1}$ -казеинов, по сравнению с  $\kappa$ - и  $\alpha_{s2}$ -казеинами коровьего молока.

**Биологически активные пептиды.** При сравнении идентифицированных пептидов с базой данных Milk Bioactive Peptide Database были обнаружены пептиды, функциональные свойства которых ранее были описаны в научной литературе [33]. Например, такие как  $\beta$ -казеиновые пептиды: YQEPVLG-PVRGPFPIIV (f193–209), YQEPVLG-PVRGPFPIIV (f193–206) и QEPVLG-PVRGPFPIIV (f194–209), обладающие АПФ-ингибирующей, антимикробной и иммуномодуляторной активностями;  $\kappa$ -казеиновый пептид VQVTSTAV (f162–169) – антимикробной и  $\beta$ -казеиновый YPFPGIPN (f60–68) – АПФ-ингибирующей активностями. Для обнаруженного  $\alpha_{s1}$ -казеинового пептида EVLNENLLRF (f14–23) в работе [34] было показано наличие АПФ-ингибирующей активности, пептидная фракция, содержащая данный пептид, имела значение  $IC_{50} < 10$  мкг/мл.

Среди идентифицированных обнаружены пептиды, содержащие остатки редокс-активных аминокислот (тирозина, триптофана, метионина, цистеина и гистидина), определяющих наличие у данных пептидов антиоксидантных свойств. Так в ферментированном молоке идентифицирован  $\beta$ -казеиновый октапептид VKEAMAPK (f98–104), для которого показано наличие антиоксидантной активности.

Анализ идентифицированных пептидов показал, что в состав ферментированного *L. reuteri* LR1 молока также входят пептиды, содержащие в своем составе фрагменты, для которых по литературным данным показано наличие гипотензивных свойств, обусловленных их АПФ-ингибирующим действием (табл. 4). В отличие от пептидов, обладающих АПФ-ингибирующей активностью, иммуномодулирующие пептиды, высвобождаемые из  $\beta$ -казеина, описаны реже. Однако те пептиды, которые были описаны как многофункциональные пептиды, такие как  $\beta$ -казеиновый пептид (f59–68), проявляющий антиоксидантную, опиоидную и АПФ-ингибирующую активности, и пептид (f193–209), проявляющий антимикробную, иммуномодулирующую, антитромботическую, АПФ-ингибирующую и антиоксидантную активности, происходят из С-концевой области  $\beta$ -казеина [33]. Недавно был охарактеризован  $\beta$ -казеиновый пептид DMPIQAFLLYQEPVLGPVR (f184–202), обладающий противовоспалительным действием [33]. В ферментированном *L. reuteri* LR1 молоке были также обнаружены пептиды из С-концевой области  $\beta$ -казеина, такие как MPIQAFLLYQEPVLGPVRG-PFPIIV (f185–209), VPYPQRDMPIQ (f178–188), VPYPQRDMPIQA (f178–189) и VPYPQRDMPIQAF (f178–190). Все эти пептиды образовались в результате гидролиза белковой последовательности  $\beta$ -казеина, а не его олигопептидов, присутствующих в исходном молоке, на рис. 2 обозначены звездочкой. Можно предположить, что пептиды, высвобождаемые из этой части  $\beta$ -казеина, могут быть ответственны за возможное противовоспалительное и/или иммуномодулирующее действие ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока.

Таким образом, в результате детальной характеристики пептидного профиля белково-пептидной фракции молока, ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1, в его составе идентифицированы пептиды, отвечающие за антиоксидантные, гипотензивные и антимикробные свойства, что подтверждается наличием соответствующих активностей ферментированного молока в тестах *in vitro* (табл. 2). Полученные значения протеолитической и антиоксидантной активности для штамма *L. reuteri* LR1 соответствуют имеющимся в литературе данным для других пробиотических штаммов лактобацилл. Так ферментированное лактобациллой *L. plantarum* молоко через 48 ч культивирования имело сопоставимую с полученными в данной работе для штамма *L. reuteri* LR1 антиоксидантную активность – 250–350 мкМ эквивалентов тролокса (ORAC) [45]. Протеолитическая активность штамма *L. reuteri* LR1 через 72 ч ферментации на молоке составляла 8.5 мМоль L-лейциновых эквивалентов, что сопоставимо с активностью штаммов *L. rhamnosus* PRA331 и *L. casei* PRA205 через



**Таблица 4.** Предсказанные гипотензивные пептиды с АПФ-ингибирующей активностью, идентифицированные в составе ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока

Идентифицированный пептид*	Пептид с гипотензивной активностью	IC <sub>50</sub> , мкМ	Ссылка
SLPQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGV CASB (f69–95)	LVYFPFGPIPNLSLPQNIPP	5.3	[35]
	NIPPLTQTPV	173	[36]
	TPVVPPFLQP	749	[37]
YFPFGPIPN CASB (f60–68)	VYFPFGPI	500	[36]
	SKVYFPFGPI	1.7	[38]
	YFPFGPIPN	15	[39]
	TPVVPPFLQP	749	[37]
	IPPLTQTPVVPP	9.0	[40]
NIPPLTQTPVVPPFLQPEVM CASB (f73–93)	FAQTQSLVYP	25	[41]
	DKIHFP	257	[36]
ELQDKIHFPFAQTQ CASB (f44–56)	KIHFPFAQTQSLVYP	39	[41]
ELQDKIHFPFAQTQS CASB (f44–57)	ELQDKIHFP	–	[42]
LQDKIHFP CASB (f45–55)	VAPFPEVF	363	[43]
VAPFPEVFGK CASA1 (f25–34)	FVAPFPEV	476	
	FFVAPFPEVFGK	18	[44]
VAPFPEVFGKEKV CASA1 (f25–37)			
APFPEVFGK CASA1 (f26–34)			
APFPEVFGKEKV CASA1 (f26–37)			
APFPEVFG CASA1 (f26–33)			
PFPEVFGKEKV CASA1 (f27–37)			
EVFGKEKV CASA1 (f30–37)			
VLNENLLR CASA1 (f30–37)	NENLLRFFVAPFPEVFG	55	[42]
VLNENLLRF CASA1 (f30–38)	ENLLRFFVAPFPEVFG		
LNENLLR CASA1 (f31–37)	LNENLLRFFVAPFPEVFG		

\* CASB – β-казеин; CASA1 – α<sub>s1</sub>-казеин.

72 ч ферментации молока – 6.4 и 10.9 мМоль L-лейциновых эквивалентов соответственно [29]. По величине АПФ-ингибирующей активности ферментированное штаммом *L. reuteri* LR1 молоко (IC<sub>50</sub> = 7–11 мг/мл) по диапазону величин IC<sub>50</sub> не отличается от описанных в литературе для ферментированных молочных напитков [46]. Однако АПФ-ингибирующая активность ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока на порядок ниже, чем показана для штамма *L. acidophilus* ATCC 4356 и которая через 24 ч ферментации молока составляла IC<sub>50</sub> = 0.42 мг/мл [47], что связано с более низкой протеолитической активностью *L. reuteri* LR1 по сравнению с *L. acidophilus* ATCC 4356. У последнего уже через 24 ч роста протеолитическая активность составляла 10 мМоль L-лейциновых эквивалентов (рН 5.6), а количество жизнеспособных клеток 6.4 × 10<sup>8</sup> КОЕ, в то время как у *L. reuteri* LR1 – 6.2 мМоль L-лейциновых эквивалентов и 1.9 × 10<sup>7</sup> КОЕ.

Проведенные *in vitro* исследования позволяют сделать вывод, что штамм *L. reuteri* LR1 обладает выраженными антиоксидантными, гипотензивными и антимикробными свойствами и может

быть использован как заквасочная культура с пробиотическими свойствами.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в части определения протеолитической, антиоксидантной, АПФ-ингибирующей активностей штамма *L. reuteri* LR1 и определения его пептидного профиля (проект № 16-16-00094).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kundu P., Blacher E., Elinav E., Pettersson S. // Cell. Elsevier Inc. 2017. V. 171. № 7. P. 1481–1493.
2. Ly N.P., Litonjua A., Gold D.R., Celedon J.C. // Allergy Clin. Immunol. 2011. V. 127. № 5. P. 1087–1094.
3. Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. // Int. Dairy J. 2017. V. 67. P. 46–60.

4. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutkins R. // *Curr. Opin. Biotech.* 2017. V. 44. P. 94–102.
5. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. World Health Organization. FAO Food and Nutritional Paper 85. Rome: FAO/WHO working group, 2006. P. 56
6. Freeman H.J. // *Cancer Research.* 1986. V. 46. № 11. P. 5529–5532.
7. Le-Blanc J.G., Garro M.S., Savoy de Giori G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 65. № 1. P. 119–123.
8. Ahotupa M., Saxelin M., Korpela R. // *Nutr. Today Suppl.* 1996. V. 31. P. S51–S52.
9. Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 9. P. 4322–4327.
10. O'Connor P.M., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D. // *Curr. Opin. Food Sci.* Elsevier Ltd. 2015. V. 2. P. 51–57.
11. Буланова Е.М., Буланова У.М., Богданова Н.М., Лобанова Е.А., Габруская Т.В. // *Педиатрия.* 2010. Т. 89. № 3. С. 84–90.
12. Naghmouchi K., Belguesmia Y., Bendali F., Spano G., Seal B.S., Drider D. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688250>
13. Фёдорова Т.В., Васина Д.В., Бегунова А.В., Рожкова И.В., Раскошная Т.А., Габриэлян Н.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2018. Т. 54. № 3. С. 1.
14. Бегунова А.В., Рожкова И.В., Ширшова Т.И., Глазунова О.А., Фёдорова Т.В. // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. № 5. С. 58–69.
15. Adler-Nissen J. // *J. Agric. Food Chem.* 1979. V. 27. № 6. P. 1256–1979.
16. Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49. P. 4619–4626.
17. Moore J., Cheng Z., Su L., Yu L. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 9032–9045.
18. Торкова А.А., Рязанцева К.А., Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Центалович М.Ю., Фёдорова Т.В. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 6. С. 580–591.
19. Owusu-Kwarteng J., Tano-Debrah K., Akabanda F., Jespersen L. // *BMC Microbiology.* 2015. 15:261. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0602-6>
20. Fontana A., Falasconi I., Molinari P., Treu L., Basile A., Vezzi A., Campanaro S., Morelli L. // *Front. Microbiol.* 2019. 10:1380. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01380>
21. Pino A., Bartolo E., Caggia C., Cianci A., Randazzo C.L. // *Scientific Reports.* 2019. 9:3355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40304-3>
22. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В., Фёдорова Т.В., Ширшова Т.И. // *Вопросы питания.* 2018. Т. 87. № 5. С. 54–61.
23. Baum F., Fedorova M., Ebner J., Hoffmann R., Pischetsrieder M. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. P. 5447–5462. <https://doi.org/10.1021/pr4003273>
24. Arakawa K., Matsunaga K., Takihiro S., Moritoki A., Ryuto S., Kawai Y., Masuda T., Miyamoto T. // *J. Dairy Sci.* 2015. V. 98. P. 1593–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8860>
25. Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S., Gagnaire V. // *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 146. P. 1–13.
26. Exterkate F.A. // *Int. Dairy J.* 1995. V. 5. P. 995–1018.
27. Villegas J.M., Brown L., Savoy de Giori G., Hebert E.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 4277–4286.
28. Hebert E.M., Mamone G., Picariello G., Raya R.R., De Giori G.S., Ferranti P., Addeo F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 3682–3689.
29. Solieri L., De Vero L., Tagliacucchi D. // *Int. Dairy J.* 2018. V. 85. P. 237–246.
30. Sridhar V.R., Hughes J.E., Welker D.L., Broadbent J.R., Steele J.L. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 6. P. 3025–3033. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3025-3032.2005>
31. Scolari G., Vescovo M., Zacconi C., Vescovi F. // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 89. P. 3800–3809.
32. Reid J.R., Moore C.H., Midwinter G.G., Pritchard G.G. // *Appl. Microbiol. Biot.* 1991. V. 35. P. 222–227.
33. Nielsen S.D., Beverly R.L., Qu Y., Dallas D.C. // *Food Chem.* 2017. V. 232. P. 673–682.
34. Torres-Llanez M.J., González-Córdova F., Hernández-Mendoza A., García H.S., Vallejo-Cordoba B. // *J. Dairy Sci.* 2011. V. 94. P. 3794–3800. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4237>
35. Miguel M., Recio I., Ramos M., Delgado M.A., Alexandre M.A. // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 89. P. 3352–3359.
36. Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D.B., Voragen A.G. // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. № 10. P. 2938–46.
37. Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. // *J. Dairy Sci.* 1998. V. 81. P. 3131–3138.
38. Korhonen H., Pihlanto A. // *Curr. Pharm. Des.* 2007. V. 13. P. 829–843.
39. FitzGerald R.J., Murray B.A., Walsh D.J. // *J. Nutr.* 2004. V. 134. P. 980S–988S.
40. Ali E., Nielsen S.D., Abd-El Aal S., El-Leboudy A., Saleh E., LaPointe G. // *Front. Nutr.* 2019. V. 6. P. 152. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00152>
41. Kohmura M., Nio N., Ariyoshi Y. // *Agric. Biol. Chem.* 1990. V. 54. P. 1101–1102.
42. Robert M.C., Razaname A., Mutter M., Juillerat M.A. // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. P. 6923–6931. <https://doi.org/10.1021/jf049510t>
43. Del Mar Contreras M., Carrón R., Montero M.J., Ramos M., Recio I. // *Int. Dairy J.* 2009. V. 19. P. 566–573. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.05.004>
44. Tauzin J., Miclo L., Gaillard J.-L. // *FEBS Lett.* 2002. V. 531. P. 369–374.
45. Aguilar-Toalá J.E., Santiago-López L., Peres C.M., Peres C., Garcia H.S., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A. // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100. № 1. P. 65–75.
46. Nejati F., Rizzello C.G., DiCagno R., Sheikh-Zeinodin M., Diviccaro A., Minervini F., Gobbetti M. // *LWT – Food Sci. Technol.* 2012. V. 51. P. 183–189.
47. Pihlanto A., Virtanen T., Korhonen H. // *Int. Dairy J.* 2010. V. 20. P. 3–10.

## ***In vitro* Evaluation of Probiotic Potential and Functional Properties of *Lactobacillus reuteri* LR1**

**A. V. Begunova<sup>a</sup>, O. S. Savinova<sup>b</sup>, I. V. Rojkova<sup>a</sup>, U. I. Krisanova<sup>a</sup>, and T. V. Fedorova<sup>b,\*</sup>**

<sup>a</sup>All-Russian Research Institute of Dairy Industry, Moscow, 115093 Russia

<sup>b</sup>Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: fedorova\_tv@mail.ru

A study of the strain *Lactobacillus reuteri* LR1 sensitivity to various antimicrobial agents showed its sensitivity to lincomycin, amoxicillin and chloramphenicol and resistance to other antibiotics studied. Upon fermentation of milk with the *L. reuteri* LR1 strain for 24 h, there was a significant increase in antioxidant and ACE inhibitory activities against the background of a decrease in the number of L-leucine equivalents compared to the original milk. During further cultivation, the proteolytic, antioxidant and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) increased, reaching its highest value after 96 hours. HPLC-MS/MS analysis of the peptide profile of milk fermented with lactobacillus showed the presence of peptides with ACE-inhibiting, antimicrobial, antioxidant and immunomodulatory activity. Analysis of the substrate specificity of *L. reuteri* LR1 CEP proteinase for the (f1–23)  $\alpha_{s1}$  casein fragment showed its unique specificity, which may indicate PI/PIII type.

**Keywords:** *Lactobacillus reuteri* LR1, resistance to antibacterial drugs, proteolytic activity, antioxidant activity, ACE inhibitory activity, peptide profile, biologically active peptides