

## ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

И.С. Хамагаева, д-р техн. наук, проф.  
Н.А. Цыремпилова, канд. вет. наук, докторант  
И.В. Бояринева, канд. техн. наук, доц.  
Л.Н. Дармажапова, канд. техн. наук, доц.  
E-mail: [tmpp@eestu.ru](mailto:tmpp@eestu.ru)

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ

УДК 637.1:579

### ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОТНОГО СТРЕССА У ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

*В статье приведены результаты исследования устойчивости пропионовокислых бактерий к кислотному стрессу. Объект исследований выбран в связи с тем, что пропионовокислые бактерии рассматриваются как перспективные пробиотики, положительное влияние которых на здоровье человека общепризнано. Они подавляют активность патогенных микроорганизмов, образуют витамины группы В и в большом количестве витамин В<sub>12</sub>, обладают антимутагенными свойствами, обеспечивают защиту от кишечных инфекций, некоторые штаммы вызывают торможение роста раковых клеток. Установлено, что наиболее высокой устойчивостью к кислотному стрессу обладают пропионовокислые бактерии *P. freundenreichii* subsp. *freundenreichii* 216 В-2. Выживаемость данного штамма через 1,5 ч инкубации при рН 2 составляет 64%, а наименее устойчивого штамма *P. freundenreichii* subsp. *shermanii* АС-2503 – 36%. Высокая жизнеспособность пропионовокислых бактерий при низких значениях рН объясняется системой антиокислительной защиты, которая характеризуется реакцией толерантности к кислоте, что обеспечивает им повышенную выживаемость при низкой кислотности.*

**Ключевые слова:** пропионовокислые бактерии, кислотный стресс, стратегия выживания.

I.S. Khamagaeva, Dr. Sc. Engineering, Prof.  
N.A. Tsyrempilova, Cand. Sc. Veterinary, PhD  
I.V. Boyarineva, Cand. Sc. Engineering  
L.N. Darmazhapova, Cand. Sc. Engineering

### THE STUDY OF THE ACID STRESS OF THE PROPIONIC ACID BACTERIA

*The article presents the results of the stability studying of propionic acid bacteria to acid stress. The object of the research is chosen due to the fact that propionic acid bacteria and probiotics are considered as promising and their positive influence on human health is generally accepted. They inhibit the activity of pathogenic microorganisms, form B vitamins and a large amount of vitamin B<sub>12</sub>, have antimutagenic properties, will provide protection against intestinal infections, some strains cause inhibition of growth of cancer cells. It was found that a propionic acid bacteria *P. freundenreichii* subsp. *freundenreichii* 216 В-2 has the most highly resistance to acid stress. The survival rate of this strain after 1.5 hours of incubation at pH 2 is 64%, and the least resistant strain of *P. freundenreichii* subsp. *shermanii* АС-2503 - 36%. High viability of propionic acid bacteria at low pH is due to antioxidant defense system, which is characterized by the reaction of tolerance to acid, which gives them increased survival with low acidity.*

**Key words:** propionic acid bacteria, acid stress survival strategy.

#### Введение

Любое стрессовое воздействие приводит к изменению функционирования бактериальной клетки. Во-первых, смена благоприятных условий на неблагоприятные вызывает переход популяции к несбалансированному росту, когда в результате изменения физико-химических условий меняются скорость реакции биохимического синтеза и, как следствие, соотношение макромолекулярных компонентов в клетках [1].

Во-вторых, сложная система, состоящая из множества сенсорных компонентов, генных регуляторных сетей, воспринимает сигналы среды и реагирует на них, запуская те или иные механизмы физиологической адаптации [2, 3]. Оба процесса в итоге приводят к тому, что множество клеток популяции сталкиваются с необходимостью выбора стратегии выживания.

Одна стратегия стрессовых ответов направлена на нейтрализацию и избежание стрессового удара. Такие ответы уникальны для каждого стресса. Стрессовые ответы такого типа называют специфическими. К ним относят голодовый, окислительный, кислотный стрессы.

Если воздействие стресса не удастся избежать, то это может привести к повреждению молекул (ДНК, белки, клеточные покровы), поэтому существует вторая стратегия, направленная на предотвращение и репарацию повреждений клетки, что делает ее устойчивой не только к данному стрессу, но и к другим. Она называется глобальным стрессовым ответом. Глобальный стрессовый ответ возникает при летальных воздействиях [4, 6, 7].

Известно, что кислотность среды является важным фактором, определяющим биохимическую активность пропионовокислых бактерий. Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на микроорганизмы прямо (путем непосредственного воздействия H<sup>+</sup>) или косвенно – через влияние на стабильность макромолекул, равновесие электрических зарядов.

Пропионовокислые бактерии предпочитают расти в нейтральном диапазоне pH, но необходимо отметить, что эти бактерии подвергаются кислотному стрессу в желудочно-кишечном тракте. Кислотный стресс определяется как комбинированный биологический эффект низкого значения pH и слабых органических кислот, являющихся продуктами ферментации – ацетата, пропионата. Органические кислоты в своей протонированной, т.е. незаряженной форме при низких значениях pH могут диффундировать через клеточную мембрану, затем диссоциируя внутри клетки, и снижать цитозольный pH.

Следует отметить, что вопросы кислотного шока пропионовокислых бактерий изучены недостаточно и для их практического использования необходимы детальные исследования.

### **Материалы и методы исследования**

Целью данной работы является исследование устойчивости пропионовокислых бактерий к кислотному стрессу.

Экспериментальная часть исследований проводилась в лаборатории кафедры «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров» и малом инновационном предприятии «Бифивит» ВСГУТУ.

Объектами исследований служили чистые культуры пробиотических бактерий: *Propionibacterium freundenreichii subsp. shermanii* AC 2503, *P. freundenreichii subsp. freundenreichii* AC 2500, *P. cyclohexanicum Kusano* AC 2559, *P. cyclohexanicum Kusano* AC 2560, полученных из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (г. Москва); *P. Freundenreichii* Ш85, *P. Freundenreichii subsp. freundenreichii* 216 В-2, *Propionibacterium freundenreichii subsp. freundenreichii* 216 II, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика», *P. freundenreichii subsp. shermanii* КМ 186, приобретенный из коллекции проф. Л.И. Воробьевой (МГУ).

Активизировали штаммы биотехнологическим методом, разработанным в Восточно-Сибирском государственном университете технологий и управления [5].

Питательной средой для наращивания биомассы пропионовокислых бактерий служила осветленная творожная сыворотка с добавлением ростовых факторов. После наращивания биомассы кислотность среды регулировали соляной кислотой.

Количественный учет клеток пропионовокислых бактерий проводили методом предельных разведений по ТУ 10-10-02-789-192-95 на среде ГМК.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди штаммов пропионовокислых бактерий, полученных из различных источников, был проведен скрининг с целью изучения их устойчивости к кислой реакции среды и отбора наиболее перспективных штаммов. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица

Сводные данные кислотоустойчивости пробиотических микроорганизмов

Название штамма	Контроль рН=6(КОЕ/см <sup>3</sup> )	Опыт (рН=2) КОЕ/см <sup>3</sup>		
		продолжительность (ч)		
		1,5	2,5	3,5
<i>Propionibacterium freundenreichii</i> subsp. <i>freundenreichii</i> AC-2500	2x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>4</sup>
<i>P. cyclohexanicum</i> Kusano AC-2260	1x10 <sup>11</sup>	3x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>4</sup>
<i>P. cyclohexanicum</i> Kusano AC-2259	2x10 <sup>11</sup>	6x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>5</sup>
<i>P. freundenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> AC-2503	4x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>3</sup>
<i>P. freundenreichii</i> Ш85	1x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>8</sup>	7x10 <sup>7</sup>	3x10 <sup>4</sup>
<i>P. freundenreichii</i> subsp. <i>freundenreichii</i> 216 В-2	5x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>8</sup>	3x10 <sup>8</sup>	3x10 <sup>4</sup>
<i>P. freundenreichii</i> subsp. <i>freundenreichii</i> 216 II	1x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>4</sup>
<i>P. fredenrichii</i> subsp. <i>shermanii</i> КМ 186	2x10 <sup>11</sup>	5x10 <sup>8</sup>	3x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>4</sup>

Анализ данных таблицы 1 свидетельствует о том, что пропионовокислые бактерии достаточно устойчивы к низким значениям рН. Наиболее высокой устойчивостью обладает штамм *P. freundenreichii* subsp. *freundenreichii* 216 В-2, где через 2,5 ч инкубации при рН 2 количество жизнеспособных клеток составляет 10<sup>8</sup> КОЕ в 1 см<sup>3</sup>.

Следует отметить, что у пропионовокислых бактерий *P. freundenreichii* Ш85 и *P. fredenrichii* subsp. *shermanii* КМ 186 количество жизнеспособных клеток на порядок ниже, что также свидетельствует о хорошей выживаемости данных культур в кислой среде. Дальнейшая выдержка в течение 3,5 ч приводит к гибели культур.

Выживаемость наиболее и наименее устойчивых культур пропионовокислых бактерий при воздействии кислой реакции среды представлена на рисунке.

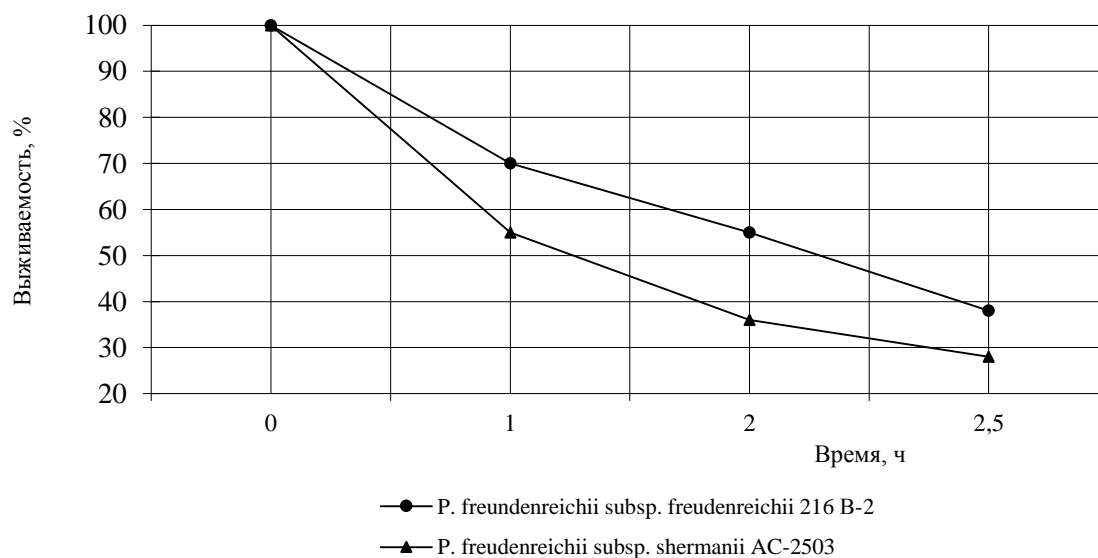


Рисунок – Выживаемость пропионовокислых бактерий при рН 2

Из рисунка видно, что с увеличением времени инкубации происходит заметное снижение количества жизнеспособных клеток. Через 1 ч инкубации при pH 2 выживаемость пропионовокислых бактерий *P. freundenreichii subsp. freudenreichii* 216 В-2 составляет 83%, тогда как у пропионовокислых бактерий *P. freundenreichii subsp. shermanii* АС-2503 сохраняется 56% количества жизнеспособных клеток.

Вероятно, у пропионовокислых бактерий имеется система антиокислительной защиты, обладающая индуцибельным гомеостазом в отношении pH. Они характеризуются реакцией толерантности к кислоте (РТК), что обеспечивает им повышенную выживаемость при низкой кислотности. При низких значениях pH синтезируются белки кислотного шока, которые вовлекаются в защиту макромолекул. При этом аварийные системы pH гомеостаза стремятся поддерживать внутриклеточный pH не ниже 5,0.

### Выводы

Установлено, что сохранение выживаемости на более высоком уровне наблюдается у пропионовокислых бактерий *P. freundenreichii subsp. freudenreichii* 216 В-2, которые являются более устойчивыми к кислотному стрессу. При этом через 2,5 ч инкубации у пропионовокислых бактерий *P. freundenreichii subsp. freudenreichii* 216 В-2 оставалось 64% жизнеспособных клеток, а выживаемость *P. freundenreichii subsp. shermanii* АС-2503 составила 36%.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что пропионовокислые бактерии обладают адаптивными системами к кислотному стрессу и могут выживать в желудочно-кишечном тракте человека в зонах с кислой реакцией среды.

### Библиография

1. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Новикова Т.М. и др. Антистрессовое перекрестное действие внеклеточных метаболитов бактерий, архий и дрожжей // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49, № 4. – С. 333–344.
2. Магданова Л.А., Голясная Н.В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 1. – С. 3–13.
3. Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г. Адаптация дрожжей *Yarrowia lipolytica* к этанолу // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2.
4. Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю. и др. Адаптация дрожжей *Yarrowia lipolytica* к тепловому стрессу // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 184–190.
5. Хамагаева И.С., Качанина Л.М., Тумурова С.М. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий: монография. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – С. 172.
6. Bjedov I., Tenaillon O., Gerard B. et al. Stress – Induced mutagenesis in bacteria // Science. – Vol. 300. 5624. – P. 1404–1409.
7. Kivisaar M. Stationary phase mutagenesis mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress // Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 5. – P. 814–827.

### Bibliography

1. Vorobyeva L.I., Khodjaev E.Yu., Novikova T.M. et al. Anti-Stress Cross-Action of Extracellular Metabolites of Bacteria, Arhi and Yeast // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2013. – Vol. 49, N 4. – P. 333–344.
2. Magdanova L.A., Golana N.In. Heterogeneity, as an Adaptive Property of Bacterial Populations // Microbiology. – 2013. – Vol. 82, N 1. – P. 3–13.
3. Biryukova E.N., Arinbasarova A.Yu., Mezentsev A.G. Adaptly yeast *Yarrowia lipolytica* to Ethanol // Microbiology. – 2007. – Vol. 76, N 2.
4. Biryukova E. N., Mezentsev A., Arinbasarova A.Yu. et al. Adaptation of the Yeast *Yarrowia lipolytica* to Heat Stress // Microbiology. 2007. – Vol. 76, N 2. – P. 184–190.
5. Khamagaeva I.S., Kachanina L.M., Tumurova M.S. Biotechnology of Starter Cultures of Propionic Acid Bacteria: Monograph. – Ulan-Ude: Publishing house of ESSTU, 2006. – P. 172.
6. Bjedov I., Tenaillon O., Gerard B.et. al. Stress – Induced Mutagenesis in Bacteria // Science. – Vol. 300.5624. – P. 1404–1409.
7. Kivisaar M. Stationary Phase Mutagenesis Mechanisms that Accelerate Adaptation of microbial Populations under Environmental Stress // Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 5. – P. 814–827.