

Использование биопрепаратов

УДК: 579.676

Е.П. РЫЖКОВА^{1,*}, В.В. СЕРЕБРОВ², И.В. ДАНИЛОВА^{1,*}, Т.В. БЫКОВЧЕНКО³

¹ФГБУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ), кафедра микробиологии, Москва, 119991

²«Государственный научный центр биотехнологии «Вектор»», Кольцово, Новосибирская область, 630559

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности» (ФГБНУ НИИХП), Москва, 107553

e-mail: epr322@mail.ru

Предпосылки для испытаний штамма *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf в качестве компонента клинического питания

Показано, что штамм *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf (ВКПМ В-9654; International GenBank AC: no. EU418709), выделенной в 1988 г. из твердого сыра типа «Швейцарский», обнаруживает пробиотически значимые свойства, оказывая соответствующее действие на организм животных (на примере перепелов). Он сохраняет довольно высокую жизнеспособность (60% по log КОЕ/мл) в условиях модельной системы агрессивной среды ЖКТ. В отличие от молочнокислых бактерий *P. freudenreichii* характеризуется низкими ростовыми потребностями, но при этом образует и выделяет из клеток разнообразные вещества-нутрицевтики, среди которых витамины группы В, бифидогенный фактор, незаменимые аминокислоты и др. В связи с вышесказанным, а также с показанной ранее выраженной антиоксидантной активностью исследуемый штамм интересен как транзиторный пробиотик, активность которого может проявляться *in vivo*. В настоящей работе приведены данные об эффективном образовании им пропионатов, высоком уровне продукции витамина В₁₂, антибактериальной активности широкого спектра, протеолитической активности в нейтральной среде и иммуномодулирующей активности (по стимуляции синтеза цитокинов *ex vivo*). В совокупности происхождение, свойства и характер действия штамма позволяют рекомендовать его для испытаний в клиническом питании человека.

Ключевые слова: антибактериальный спектр, витамин В₁₂, выживаемость, иммунотропная активность, модельный ЖКТ, пробиотическое действие, пробиотический потенциал, пропионаты, протеолитическая активность, цитокины, *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf.

Propionibacterium freudenreichii — классическая («молочная») пропионовокислая бактерия (ПКБ), которая участвует в созревании твердых сыров типа «Швейцарского» (доминирует в них над другими видами пропионовокислых бакте-

рий). Микроорганизм относится к «пищевым», т.е. безопасным для человека. Действительно, его безопасность признана Европейским комитетом по безопасности Микроорганизмов (EFSA); он имеет статус QPS (Qualified Presumption of Safety)

Рыжкова Евгения Петровна, Серебров Валерий Владимирович, Данилова Ирина Валентиновна, Быковченко Татьяна Вениаминовна.

Список сокращений: АСБ — абсолютно сухая биомасса; ГКС — глюкозо-кукурузная среда; ЖКТ — желудочно-кишечный тракт; ИЛ — интерлейкин; ИС — индекс стимуляции; ИФН — интерферон; КЖ — культуральная жидкость; КОЕ — колониеобразующая единица; ЛЖК — летучие жирные кислоты; МКБ — молочнокислые бактерии; ПА — протеолитическая активность; ПКБ — пропионовокислая бактерия; ФНО — фактор некроза опухолей; EFSA — Европейский комитет по безопасности микроорганизмов; GRAS (Generally Recognized as Safe) — в целом признанная безопасной; MRSA метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus*; РНА — фитогемагглютинин; QPS (Qualified Presumption of Safety) — предположительная квалификация в качестве безопасного.

* Авторы для переписки.

с 2007 г. В 2008 г. бактерию внесли также в «Список GRAS» (Generally Recognized as Safe, USA) под номером 21 CFR133.195.

Однако вопрос о том, оказывает ли тот или иной штамм *P. freudenreichii* непосредственное положительное воздействие на организм человека при поступлении в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) был до сих пор обойден вниманием. Большой интерес в научном и практическом плане вызывают молочнокислые (МКБ) и бифидобактерии как эубиотики, т.е. микроорганизмы, колонизирующие эпителий кишечника. Однако пропионовокислые бактерии в качестве транзитных пробиотиков (не обладающих способностью к специфической адгезии к внутренней поверхности ЖКТ) также могут быть существенно полезными для здоровья человека.

Для клеток некоторых штаммов *P. freudenreichii* показана слабая (около 12% клеток) и неспецифическая адгезия к эпителиальной ткани. Тем не менее, они присутствуют в ЖКТ, осуществляя пропионовокислородное брожение с выделением пропионатов [1—4]. Путем анализа транскриптом *in vivo* показано также, что *P. freudenreichii*, штамм CIRM BIA1 осуществляет метаболизм в среде прямой кишки включая особый углеводный обмен с образованием NADH, NADPH, АТФ и предшественников различных путей биосинтеза. Субстратом этого обмена служит не только глюкоза, которой мало в прямой кишке, но и пропандиол, глюконат, лактат, пурины, пиримидины и аминокислоты [5]. При наличии пробиотически значимых свойств у штамма ПКБ его можно было бы использовать как транзитный пробиотик, о которых известно, что они сохраняют жизнеспособность и проявляют метаболическую активность, продвигаясь по ЖКТ в течение примерно 20 ч. Пробиотики разделяют на три функциональные категории: антимикробные, иммуномодулирующие и метаболические [6].

Сведения в пользу пробиотического действия *P. freudenreichii* немногочисленны, при этом эффект является штаммоспецифичным. В опытах *ex vivo* было выявлено, что *P. freudenreichii* SI41 вызывает отмирание опухоли прямой кишки — колоректальной карциномы [7]. Молоко, ферментированное только *P. freudenreichii*, способствовало апоптозу клеток опухоли желудка человека (HGT-1) и усиливало цитотоксическое действие камптотецина, применяемого в химиотерапии данного вида рака [8]. Это же молоко положительно влияло на поросят при болезни воспаленного кишечника [9]. В Индии в 2004 г. большую выборку детей родителей-добровольцев, больных желудочно-кишечными заболеваниями, подвергли масш-

табному эксперименту по использованию в питании йогуртов, в состав которых вводили штамм *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* (обозначение штамма отсутствует); контролем служили готовые йогурты на основе *L. acidophilus* [10]. Эксперимент выявил высокое излечивающее действие пропионобактерий в отношении диареи. Некоторые штаммы *P. freudenreichii* были эффективны в клинических экспериментах по борьбе с инфекцией, вызванной метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA), которому свойственна множественная лекарственная устойчивость [11]. Хотя в отношении *Helicobacter pylori*, инфицирующей эпителиальные клетки желудка, прямой подавляющий эффект штамма *P. freudenreichii* Js не выявлен, он вызывал заметное снижение адгезии патогена на эпителии при высокой концентрации живых клеток пропионовокислой бактерии (10^9 /мл) и задерживал деструкцию цитоплазматических мембран эпителиальных клеток [12]. Таким образом, определенным штаммам *P. freudenreichii* свойственны пробиотические эффекты.

Важное пробиотически значимое свойство штаммов *P. freudenreichii* состоит в том, что в отличие от МКБ они способны продуцировать ряд полезных соединений-нутрицевтиков, проявляя при этом низкие ростовые потребности (глюкозо-минеральная среда с добавлением только двух витаминов). Экзометаболитами ПКБ являются витамины группы В (рибофлавин, пиридоксин, никотиновая и фолиевая кислоты), антимикробные факторы, конъюгаты линолевой кислоты [13, 14], экзоферменты и антимутагенные факторы [15, 16], а также бифидогенные факторы — стимуляторы роста бифидобактерий [17, 18]. Биосинтез больших количеств корриноидов — внутриклеточных соединений группы витамина В₁₂ — известная метаболическая особенность пропионовокислых бактерий, которая существенна как для организма животного (человека), так и для микробиоты ЖКТ. Известна способность эубиотиков усиливать адгезию ПКБ на внутренней поверхности ЖКТ [2]. Следовательно, не исключается образование сообщества бактерий-пробиотиков в ЖКТ. Штамм *P. freudenreichii*, физиология которого давно изучается в нашей лаборатории, обнаружил биосовместимость (отсутствие взаимного подавления роста) с молочнокислыми эубиотиками, такими как *Lactobacillus casei* и *L. acidophilus* (данные не опубликованы).

Пробиотически значимым свойством исследуемого штамма является выраженная антиоксидантная активность, которая была показана ранее методом вольтамперометрии [19].

Многие пробиотически значимые свойства бактерий того или иного вида, как сейчас становится понятным, штаммоспецифичны [20]. Поэтому говорить о пробиотическом свойстве (эффекте) бактерии как вида в целом нецелесообразно.

Исследуемый в настоящей работе штамм *P. freudenreichii* RVS-4-irf претендует на испытания в клиническом питании пациентов-добровольцев в качестве полезного для здоровья препарата прежде всего в России. В связи с этим целью настоящей работы была оценка пробиотического потенциала штамма *P. freudenreichii* RVS-4-irf и выявление его реального пробиотического действия на организм животного, которое складывается из ряда компонентов: продукции пропионатов и витамина B₁₂, антибактериальной и иммуномодулирующей активности, в том числе в условиях *in vivo* и *ex vivo*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Классическая (молочная) пропионовокислая бактерия *P. freudenreichii* RVS-4-irf выделена из твердого сыра, произведенного в Эмментале (Швейцария) из натурального альпийского молока на основе спонтанной микробиоты (1988 г.). Бактерия хранится во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером В-9654 и в личной коллекции автора — Е.П. Рыжковой (кафедра микробиологии МГУ). Рабочее обозначение штамма — Pfr-4; штамм зарегистрирован в International GenBank AC под номером EU418709.

Культивирование штаммов. Pfr-4 растили и поддерживали на глюкозо-кукурузной среде (ГКС, состав, %: глюкоза — 2; кукурузный экстракт (ПО "Углич", Россия) — 1,0; (NH₄)₂SO₄ — 0,2; CoCl₂ · 6H₂O — 0,0001; вода водопроводная; pH ~ 7,0. Среду стерилизовали при 0,5 ати 30 мин). В опытах использовали также среду Блаурока, состоящую из 1 л приготовленного в лаборатории печеночного бульона с 10 г пептона (BD, США), 5 г NaCl, 0,1 г цистеина (Sigma, США), 0,9 г агара (Serva, Нидерланды), 1 мл твина-80 (Serva), 1 мг CoCl₂ · 6H₂O (pH 7,0, «Химмед», Россия); минимальную синтетическую среду А, которая содержала, г/л: глюкозу («Реахим», Россия) — 20,0; (NH₄)₂SO₄ — 3,0; KH₂PO₄ — 1,5; MgSO₄ · 7H₂O — 0,25; мг/л: CoCl₂ · 6H₂O — 1,0; NaCl — 5,0; MnSO₄ · 5H₂O — 5,0; ZnSO₄ · 7H₂O — 0,01; FeCl₃ · 6H₂O — 0,005 (все соли производства «Химмед»); мг/л: пантотенат кальция — 1000,0 (Sigma); тиамин — 200,0 (Sigma); биотин — 1,0 (Sigma) (вода дистиллированная; pH 6,8—7,0); а также полусин-

тетическую среду А-тн, которая отличалась от среды А присутствием 0,05% триптона (Fergak, Германия) или 0,1% пептона (Serva, Германия). В опытах по иммунным эффектам бактерию Pfr-4 культивировали на богатой полужидкой среде Б, содержащей 0,9 г/л агара; глюкозу, пептон, дрожжевой экстракт («Хеликон», Россия) (по 1%) и 10 мг/л хлористого кобальта. Штаммы *Bacillus subtilis* 40, *Bacillus cereus* 9, *Pseudomonas aeruginosa* 50, *P. putida* 96 и *Escherichia coli* K12 (из коллекции кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ) культивировали, как описано ранее [21]. Все культуры выращивали при 30°.

Влияние метаболитов штамма Pfr-4 на рост перепелов. Пятьдесят однодневных птенцов перепела, выращенных на ферме Сибирского научно-исследовательского и проектно-технического института животноводства СО РАСХН, разделили на группы по массе и содержали в одинаковых условиях по стандартной методике, разработанной СибНИПТИЖ. Культуральную жидкость (КЖ), полученную после выращивания *P. freudenreichii* Pfr-4 на среде Блаурока, ежедневно добавляли в питьевую воду (0,1 мл на птенца) в течение 10 дней.

Моделирование условий желудочно-кишечного тракта. Клетки культуры Pfr-4, выращенной на ГКС (72 ч), осаждали центрифугированием, ресуспендировали в равном объеме желудочного сока (ФГУП НПО «Микроген») с добавлением 17% по массе овсяных хлопьев и выдерживали 3 ч при 37° и pH 3,0. Затем смесь нейтрализовали, вносили 5% (по массе) смеси желчных кислот (ООО «Самсон-Мед», Россия) и инкубировали 5 ч при 37° и pH 8,0. Количество жизнеспособных клеток в реакторах, частично имитирующих ЖКТ, выражали в КОЕ/мл; колонии получали инкубированием на твердой ГКС в анаэробе при 30° в течение 6 сут.

Измерение концентрации пропионовой и уксусной кислот в КЖ проводили методом газовой хроматографии с использованием аппаратно-программируемого комплекса на базе газового хроматографа «Кристалл 2000М» (производитель СКБ «Хроматэк», Йошкар-Ола, Россия). Использовали колонки НР FFAP 50 × 0,32 × 0,5 мм и пламенно-ионизационный детектор. Образцы готовили путем перевода солей ЛЖК в форму кислоты.

Измерение суммарной протеолитической активности КЖ Pfr-4 проводили спектрофотометрически с использованием азоказеина (Sigma), который в своем составе содержит азокраситель, высвобождаемый при гидролизе белка [22].

ПА выражали в оптических единицах при λ=440 нм на 1 мг белка пробы (ед/мг).

Таблица 1

Выживаемость *P. freudenreichii* RVS-4-irf в модельном ЖКТ

Число живых клеток, КОЕ/мл		
До обработки	После обработки	Уменьшение количества клеток
$9,7 \cdot 10^8$	$9,1 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^3$
$2,8 \cdot 10^9$	$4,6 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^2$
$3,7 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^3$

Оценку иммунных свойств осуществляли путем измерения активности иммунной системы по образованию цитокинов *ex vivo* (в отобранной свежей крови человека). Для этого отмытые физиологическим раствором клетки Pfr-4, выращенные на среде Б, вводили в цельную человеческую кровь, взятую у здоровых доноров и разведенную 1:4 средой DMEM M (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор») с добавлением L-глутамина (0,6 мг/мл, Sigma) и гентамицина (100 мкг/мл, Fluka, Швейцария) и инкубировали 24 ч при 37°. Концентрацию цитокинов определяли в супернатанте крови с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия). В качестве положительного контроля использовали фитогемагглютинин (реакция непрямого гемагглютинации, ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор", 10 мг/мл). Проведены три независимых эксперимента, результаты которых различались в пределах менее 10%. Усредненные данные представляют собой медиану трех вариантов наиболее типичного из трех независимых экспериментов; отклонения составляли менее 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К пробиотически значимым свойствам штамма относят: 1) выживаемость клеток в условиях агрессивной среды ЖКТ; 2) способность к образованию и выделению в среду антимикробных факторов, существенных для удаления нежелательной (вредной) микробиоты ЖКТ; 3) обогащение среды полезными для макроорганизма метаболитами; 4) активация иммунной системы хозяина; 5) образование полезных для функционирования ЖКТ экзоферментов и других компонентов; 6) общее позитивное воздействие на организм хозяина.

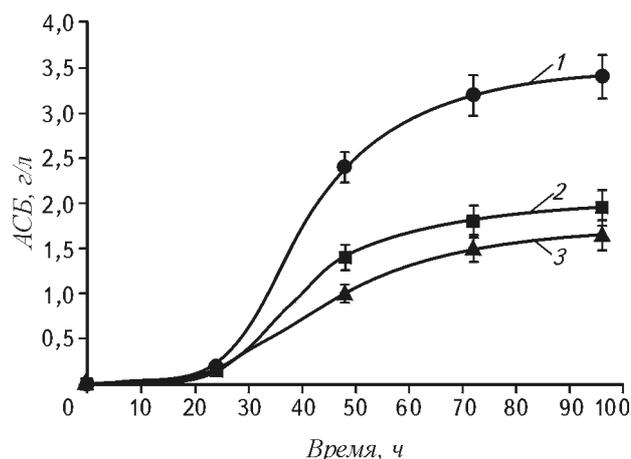
Были изучены свойства штамма Pfr-4 в указанной выше последовательности.

1). Для того, чтобы служить транзитным пробиотиком, штамм Pfr-4 должен быть устойчивым к агрессивной среде ЖКТ. Пробиотики, как известно, проявляют разную выживаемость при указанных стрессах. Лактобациллы более устойчивы при пассаже через желудок человека, в то время как бифидобактерии менее резистентны [23, 24]. Возможность некоторых пропионовокислых бактерий выживать в агрессивной среде желудка и верхних отделов кишечника была показана ранее [3, 25]. Выживаемость бактерий может быть увеличена с помощью предварительного воздействия факторов стресса в небольших дозах [26] в присутствии ферментированных молочных продуктов или других экранирующих пищевых матриц [27, 28].

Мы оценили последовательное воздействие желудочного сока и желчных кислот на выживаемость клеток штамма ПКБ в трех независимых экспериментах с использованием модельного ЖКТ (табл. 1). Установлено, что после стресса количество живых бактерий уменьшается на 3 порядка; жизнеспособность при этом сохраняется более чем на 60% (по logКОЕ/мл).

Исследовали влияние агрессивных факторов ЖКТ на кинетику роста штамма Pfr-4 (рисунок). Данные, представленные на рисунке, показывают, что после стрессов бактерии растут медленнее, накапливая в стационарной фазе роста в 2 раза меньше биомассы. Желудочный сок действует на клетки сильнее, чем желчные кислоты (см. рисунок).

2). Идея использования штамма Pfr-4 в качестве антимикробного агента возникла на основании результатов, полученных при разработке спо-



Рост *P. freudenreichii* RVS-4-irf на глюкозо-кукурузной среде после обработки клеток желудочным соком и солями желчных кислот: 1 — контроль (клетки без обработки); 2 — клетки после обработки солями желчных кислот; 3 — клетки после обработки желудочным соком

собов защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни», т.е. от поражения бациллами [29].

Пропионовокислое брожение — основной энергетический процесс у пропионовокислых бактерий, который приводит к накоплению в среде пропионовой и уксусной кислот обычно в соотношении 2:1. Известно, что пропионовая кислота — наиболее эффективный антимикробный фактор широкого спектра действия среди ЛЖК и более активный, чем молочная кислота, причем указанная активность свойственна не только кислоте, но и ее солям (пропионатам) [21]. КЖ штамма Pfr-4 в зависимости от состава среды и времени культивирования содержат 1,0—1,2% пропионовой кислоты.

В наших экспериментах методом лунок на газонах показано, что жидкие культуры штамма Pfr-4 при нейтральном значении pH подавляют развитие и грамположительных, и грамотрицательных бактерий, таких как *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* и *E. coli*. Оценивали зависимость ингибирующего эффекта КЖ от концентрации в ней пропионата натрия. Наиболее чувствительными к действию этого соединения оказались штаммы *B. subtilis*, *B. cereus* и *P. putida*; концентрация пропионата натрия, вызывающая 90%-ное подавление роста жидких культур, составила 0,10—0,15%. Антибактериальная активность данного штамма, предположительно связанная с наличием пропионатов, может рассматриваться как его пробиотически значимое свойство. Толстый кишечник имеет близкую к нейтральной среду. По нашим наблюдениям (данные не приведены), пропионаты действуют избирательно: эубиотики *L. casei* и *L. acidophilus* устойчивы к пропионату натрия вплоть до его концентрации 0,5%. Пропионовокислые бактерии осуществляют специфическое брожение внутри ЖКТ. Брожение включает функционирование метилмалонил-КоА-транскарбоксилазы — одного из ключевых ферментов процесса, его активности предшествует V_{12} -зависимое превращение сукцинил-КоА в метилмалонил-КоА. Показано, что разные штаммы *P. freudenreichii*, введенные в кишечник животного (в который привнесена микробиота человека), были метаболически активны, о чем судили по выявлению в кишечнике транскриптов ключевого фермента пропионовокислого брожения — метилмалонил-КоА-транскарбоксилазы [4]. Поэтому возможно, что пероральное введение даже отмытых живых клеток Pfr-4 (без культуральной жид-

кости) в концентрации до 10^9 — 10^{10} КОЕ/мл будет обеспечивать положительное воздействие на ЖКТ за счет контроля микробиоты предположительно с помощью выделяемых пропионатов. Отметим, что пропионовая кислота (пропионаты) участвует не только в регуляции состава микробиоты ЖКТ, но и в энергетическом обмене эпителиальных клеток кишечника, а также выступает как эффектор* иммунной системы животных и человека [30].

По нашим наблюдениям, антимикробная активность культуры Pfr-4, выращенной на минимальной среде А, зависит не только от пропионатов, но и от высокомолекулярной фракции КЖ, свободной от пропионатов и триптона (пептиды триптона, модифицированные при ферментации, могут обладать антимикробным эффектом). Активность этой фракции против бацилл исчезала после ее обработки протеиназой К, что указывает на полипептидную природу данного внеклеточного антимикробного фактора. Недавно было показано, что суммарная антимикробная активность одного из штаммов *P. freudenreichii* выше, чем у содержащихся в ней пропионатов. Дополнительный антибактериальный фактор инактивируется действием протеиназы К. По-видимому, данный активный компонент имеет липопротеидную природу. Это термостабильное соединение проявило себя как антимикробный и антиадгезивный фактор в отношении широкого круга патогенных бактерий и грибов [31].

3). Бактерия образует на порядок больше корриноидов, чем требуется для метилмалонил-КоА-мутазной реакции пропионовокислого брожения, что обусловлено многими другими метаболическими функциями корриноидов у данной бактерии [32]. Высокий уровень образования витамина V_{12} в любом случае практически значим как пробиотическое свойство. Оно присуще пропионовокислым, но не молочнокислым или бифидобактериям. Были измерены внутри- и внеклеточная концентрации витамина V_{12} у культуры Pfr-4, выращенной на полусинтетической среде А-тн. Витамин V_{12} был обнаружен по характерному спектру поглощения корриноидов после воздействия нитрита натрия (появление пика с максимумом в области 360 нм) в КЖ бактерии. Однако его количество, измеренное микробиологически с тест-культурой *E. coli* 113-3, было на 3—4 порядка ниже, чем то, которое было обнаружено спектрофотометрически. Если в среде присутствует хлористый кобальт в концентрации 1 мг/л, корриноиды в

* Фактор, воздействующий на гуморальную составляющую иммунной системы.

клетках пропионовокислых бактерий содержатся в количестве 1000—1500 мкг/г АСБ, или 3,0—4,5 мкг на 1 мл КЖ. В стадии завершения экспоненциальной фазы роста содержание живых клеток составляет $(3,3—4,0) \cdot 10^9$ /мл. Однако в КЖ исследуемого штамма было обнаружено лишь 0,3—0,4 нг/мл витамина В₁₂. Следует учесть, что, во-первых, в процессе приготовления пробиотического препарата культура может быть сконцентрирована по крайней мере в 10 раз, и, во-вторых, большая часть клеток в агрессивной среде ЖКТ, теряя жизнеспособность в результате лизиса, неизбежно обеспечит дополнительное поступление витамина В₁₂ в КЖ.

4). Одним из важных пробиотических проявлений бактерий признано их воздействие на иммунную систему. Известно, что кожные ПКБ, например *P. acnes* (а точнее, структуры, входящие в состав их клеточной стенки), способны проявлять иммуностропные свойства. Мы наблюдали, что штамм классической (молочной) пропионовокислой бактерии — *P. freudenreichii* RVS-4-irf — также обладает иммуномодулирующей активностью, а именно, индуцирует образование цитокинов — соединений белковой природы, которые являются медиаторами иммунокомпетентных клеток крови. Человеческая кровь содержит моноциты — продуценты цитокинов и является адекватной моделью для исследования иммуномодифицирующих свойств бактерий *ex vivo*.

Показано, что отмытые клетки штамма Pfr-4, выращенного на среде Б, стимулировали об-

разование четырех цитокинов из 6 анализируемых (ИЛ-β, ИЛ1-РА, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α, ИФН-γ) в системе *ex vivo* в крови здоровых доноров (табл. 2). Степень активности цитокинов зависела от концентрации клеток бактерии в препарате: наименьшая из доз (2,0 мкг/мл нативных клеток) оказывала наибольшее стимулирующее действие. Стимуляция синтеза цитокинов препаратом Pfr-4 значительно превышала таковую фармацевтического препарата «Иммунал», взятого в различных концентрациях.

Таким образом, воздействие штамма Pfr-4 на иммунную систему человека *ex vivo* можно рассматривать как его важное пробиотическое свойство. Заметим, что иммуностропная активность бактерий штаммоспецифична. Она не выявлена у некоторых молочнокислых бактерий, таких как *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, однако штамм *P. freudenreichii* JS индуцировал образование цитокинов моноцитами крови [20]. Наличие иммуностропной активности у классической пропионовокислой бактерии была подтверждена в работе французских исследователей [33]. Авторы измерили уровень образования цитокинов клетками эпителия при действии 10 штаммов молочных пропионовокислых бактерий, среди которых были известные штаммы *P. freudenreichii* SI41 и SI48. Был зарегистрирован высокий уровень образования интерлейкина ИЛ-10 и крайне низкий ФНО-α и ИФН-γ. Данные этих авторов отличаются от представленных нами в табл. 2; причинами могут быть как штаммовые

Таблица 2

Индекс стимуляции образования некоторых цитокинов (ИС) в крови человека *ex vivo* под действием клеток RVS-4-irf и иммуностропного фармацевтического препарата

Препарат	Концентрация добавленного в кровь препарата, мкг/мл	ИС*			
		ИЛ 1-РА	ИЛ-8	ФНО-α	ИФН-γ
Сырая биомасса отмытых клеток <i>P. freudenreichii</i> RVS-4-irf	2,0	5,51	18,30	641,50	0,870
	10,0	0,65	8,59	696,70	0,145
	50,0	—	3,82	179,20	0,200
«Иммунал», фармацевтический препарат	3,0	0,00	1,60	2,51	0,410
	30,0	0,00	4,46	2,95	0,770
	300,0	0,33	8,65	2,80	0,510

* Показатель рассчитывали относительно уровня спонтанно образованных цитокинов в каждом отдельном эксперименте.

Обозначения: ИЛ — интерлейкины, факторы взаимодействия между лейкоцитами; ФНО-α — фактор некроза опухолей, обладающий цитотоксической активностью; ИФН-γ — интерферон-гамма, цитокин с противовирусной активностью.

особенности, так и различия в постановке эксперимента. В наших опытах эффект достигался под влиянием свободных от КЖ (пропионатов) клеточек. Следовательно, можно допустить, что клеточные стенки бактерий или ее поверхностные полимеры воздействуют *in vivo* на иммунокомпетентные эпителиальные клетки кишечника, которые передают сигнал в кровь. Во время написания настоящей статьи были опубликованы данные, показывающие, что поверхностные белки пробиотического штамма *P. freudenreichii* (идентифицированы методами протеомики) обеспечивают иммуномодулирующий эффект, который проявляется в противовоспалительном действии [34].

5). Жизнеспособные клетки Pfr-4 проявляли суммарную внеклеточную протеолитическую активность (ПА), величина которой зависела от состава и pH среды. Наибольшую ПА (2,0—2,2 ед/мг) наблюдали у культуры, растущей на ГКС при pH 7,0 в течение 48 ч. Это значение оказалось ниже, чем при использовании *Lactobacillus casei* C1 (коллекция Института хлебопекарной промышленности, ФГБНУ НИИХП). Однако наличие даже относительно невысокой ПА, обеспечивающей гидролиз трудно перевариваемых белков, перешедших в толстый кишечник, в совокупности с другими пробиотически значимыми свойствами имеет дополнительное положительное значение для организма хозяина.

6). Общее положительное действие Pfr-4 на организм животного выявляли также путем оценки физиологического состояния птиц (птенцов перепелов), потребляющих экзометаболиты данного штамма (табл. 3) в составе его КЖ (бактерии культивировали на среде Блаурока в течение 3 сут). При выращивании птенцов перепелов через 10 дней

в условиях опыта их живая масса была примерно на 5% выше, чем в среднем в контрольной группе I и на 2—3% выше, чем в контрольной группе II. В животноводстве это считается высоким эффектом. Полученные результаты для исследуемого штамма находятся в соответствии с данными, полученными ранее на цыплятах для *Propionibacterium jensenii* 702 [23].

Известно, что пробиотический потенциал и пробиотический эффект во многом определяются штаммом бактерии, т.е. являются штаммоспецифичными. Представленный штамм оказался наиболее перспективным среди семи исследуемых в лаборатории штаммов *P. freudenreichii* по урожайности на разных средах, содержанию корриноидов в клетках и образованию пропионовой кислоты (пропионатов). В данной работе показано также, что штамм RVS-4-irf действует как пробиотик (показано на примере птицы) и выживает в условиях агрессивной среды, моделирующей желудочно-кишечный тракт. Штамм оказался также способен осуществлять иммуностропное действие *ex vivo* (в крови человека).

Как уже было сказано, для различных штаммов *P. freudenreichii* ранее были показаны выраженная антиоксидантная активность, высокий уровень образования витамина B₁₂ и антибактериальная активность широкого спектра. На основании представленных результатов данный штамм можно отнести сразу к трем категориям пробиотиков: метаболизирующим, антимикробным (с некоторой долей вероятности) и иммуностропным. Метаболизирующую активность (в частности, образование продуктов пропионовокислого брожения) следует, на наш взгляд, рассматривать как доминирующую, ибо две другие являются производ-

Таблица 3

Средний прирост массы птенцов перепелов в эксперименте (при введении в их рацион КЖ *P. freudenreichii* RVS-4-irf) и в контроле

Показатель	Контроль I	Контроль II	Опыт
Средняя живая масса перепелов в начале эксперимента, г	8,4±0,08	8,2±0,08	8,2±0,10
Средняя живая масса перепелов в конце эксперимента, г	169,0±2,7	172,2±3,0	177,5±2,8
Прирост средней живой массы перепелов за период эксперимента, г	160,4±3,7	164,0±2,4	169,3±4,8

Примечание: контроль I — птицу содержали на стандартном рационе; контроль II — птице скармливали среду Блаурока; опыт — птице дополнительно к стандартному рациону скармливали КЖ штамма Pfr-4.

ными от нее, причем специфическая адгезия клеток данного штамма на эпителиальных клетках, судя по данным литературы, не выражена, хотя контакты клеточных оболочек и поверхностных белков с эпителием могут быть причиной наблюдаемого иммунотропного проявления штамма. Наиболее вероятно, что штамм *P. freudenreichii* RVS-4-irf обладает свойствами транзитного, но по аналогии с другими штаммами данной бактерии он предположительно осуществляет пропионовокислое брожение и выделяет полезные экзо-метаболиты-нутрицевтики в ЖКТ. В связи с вышесказанным данный штамм классической пропионовокислой бактерии может быть рекомендован для испытаний в качестве компонента клинического питания.

Получено 22.05.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Jan, G. Survival and beneficial effects of propionibacteria in human gut: in vivo and in vitro investigations / G. Jan., P. Le-verrier, I. Proudly, N. Roland // Lait. — 2002. — V. 82. — N 1. — P. 131—144.
2. Ouwehand, A.C. In vivo Adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus / A.C. Ouwehand, T. Suomalainen, S. Tolkkio, S. Salminen // Lait. — 2002. — V. 82. — N 1. — P. 123—130.
3. Adams, M.C., Huang, Y. Probiotic *Propionibacterium* // United States Patent 7427397 B2, 424/93.4, 435/4, 426/72. 2008.
4. Lan, A. Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats / A. Lan, A. Bruneau, C. Philippe, V. Rochet, A. Rouault, C. Herve', N. Roland, S. Rabot, G. Jan // Brit. J. Nutr. — 2007. — V. 97. — N 4. — P. 714—724.
5. Saraoui, T. A unique in vivo experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to the colon environment / T. Saraoui, S. Parayre, G. Guerneq, V. Loux, J. Montfort, A. Le Cam, G. Boudry, G. Jan, H. Falentin // BMC Genomics. — 2013. — V. 14. — P. 911.
6. Суворов А.Н. Теоретические аспекты клинического использования пробиотиков // Клиническое питание (научно-практический журнал). — 2007. — № 1—2. (243). — С. А68.
7. Jan, G. Helping cancer cells to commit suicide. Probiotic potential of dairy propionibacteria: Int. Symp. on Propionibacteria and Bifidobacteria: dairy and probiotic application. (INRA — STANDA INDUSTRIE, 2004). France. Saint-Malo, 2d—4th June 2004. — Saint-Malo: INRA-STANDA INDUSTRIE, 2004. — 17 p.
8. Cousin, F.J. Milk fermented by induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells / F.J. Cousin, S. Jouan—Lanhouet, M.T. Dimanche-Boitrel, L. Corcos, G. Jan // PLoS One. — 2012. — V. 7. — N 3. — e31892.
9. Cousin, F.J. Assessment of the probiotic potential of a dairy product fermented by *Propionibacterium freudenreichii* in piglets / F.J. Cousin, B. Foligne', S.M. Deutsch, S. Massart, S. Parayre, Y. Le Loir, G. Boudry, G. Jan // J. Agric. Food Chem. — 2012. — V. 60. — N 32. — P. 7917—7927.
10. Khedkar, C.D. Patil, M.R., Guanath, G., Bajad, D.N., Sarode, A.R., Khojare, A.S., Hajare, S.T. Studies on effect of feeding probiotic *Lactobacillus* supplemented with *Propionibacterium* cultures on gastrointestinal microflora of ribal children: Int. Symp. on Propionibacteria and Bifidobacteria: dairy and probiotic application. (INRA — STANDA INDUSTRIE, 2004). France. Saint-Malo, June 2d—4th 2004. — Saint-Malo: INRA-STANDA INDUSTRIE, 2004. — 26 p.
11. Sikorska, H. Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / H. Sikorska, W. Smoragiewicz // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2013. — V. 42. — N 6. — P. 475—481.
12. Myllyluoma, E. Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection in vitro / E. Myllyluoma, A.-M. Ahonen, R. Korpela, H. Vapaatalo, E. Kankuri // Clin. Vaccine Immunol. — 2008. — V. 15. — N 9. — P. 1472—1482.
13. Hugenholz, J. Nutraceutical production by propionibacteria / J. Hugenholz, J. Hunik, H. Santos, E. Smid // Lait. — 2002. — V. 82. — N 1. — P. 103—112.
14. Poonam. Multifaceted attributes of dairy propionibacteria: a review / Poonam, S.D. Pophaly, S.K. Tomar, S. De, R. Singh // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2012. — V. 28. — N 11. — P. 3081—3095.
15. Vorobjeva, L. Physiological peculiarities of propionibacteria — present facts and prospective applications // Sci Progress. — 2000. — V. 83. — N 3. — P. 277—301.
16. Воробьева Л.И. Внеклеточный белок пропионовокислых бактерий ингибирует индуцируемые мутации у штаммов *Salmonella typhimurium* / Л.И. Воробьева, Е.Ю. Ходжаев, Г.М. Пономарева // Микробиология. — 2001. — Т. 70. — № 1. — С. 31—35.
17. Warminsko-Radiko, I. Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibacteria / I. Warminsko-Radiko, L. Laniewska-Moroz, A. Babuchowski // Lait. — 2002. — V. 82. — N 1. — P. 113—121.
18. Isawa, K. Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 / K. Isawa, K. Hojo, N. Yoda, T. Kamiyama, S. Makino, M. Saito, H. Sugano, C. Mizoguchi, S. Kurama, M. Shibasaki, N. Endo, Y. Sato // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2002. — V. 66. — N 3. — P. 679—681.
19. Драчева Л.В. Вольтамперометрическое исследование антиоксидантной активности жидких культур пропионовокислых бактерий / Л.В. Драчева, Е.В. Дорожко, О.А. Аврамчук, Е.И. Короткова, Е.П. Рыжкова, Хао Ли, И.В. Данилова // Вестник Московского университета. Биология. — 2009. — № 4. — С. 24—28.
20. Kekkonen, R.A. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults / R.A. Kekkonen, N. Lumme-la, H. Karjalainen, S. Latvala, S. Tynkynen, S. Jarvenpaa, H. Kautiainen, I. Julkunen, H. Vapaatalo, R. Korpela // World J. Gastroenterol. — 2008. — V. 14. — N 13. — P. 2029—2036.

21. Danilova, I.V. *Propionibacterium freudenreichii* strains as antibacterial agents at neutral pH and their production on food-grade media fermented by some lactobacilli / I.V. Danilova, E.P. Ryzhkova, H. Lee, T.P. Tourova, A.I. Netrusov // *J. Food Safety*. — 2012. — V. 32. — N 1. — P. 48—58.
22. Vinokurov, K.S. Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion / K.S. Vinokurov, E.N. Elpidina, B. O'p'ert, S. Prabhakar, D.P. Zhuzhikov, Y.E. Dunaevsky, M.A. Belozersky // *Comp. Biochem. Physiol.* — 2006. — B. 145. — S. 126—137.
23. Luo, J. Effect of probiotic *Propionibacterium jensenii* 702 supplementation on layer chicken performance / J. Luo, S. King, M.C. Adams // *Benef. Microbes*. — 2010. — V. 1. — N 1. — P. 53—60.
24. O'Mahony, L. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings / L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan, J.K. Collins // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2001. — V. 73. — N 2. — P. 386S—392S.
25. Cousin, F.J. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence / F.J. Cousin, D.D.G. Mater, B. Foligne, G. Jan // *Dairy Sci. Technol.* — 2011. — V. 91. — N 1. — P. 1—26.
26. Leverrier, P. Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation reveals both common and distinct response pathways in *Propionibacterium freudenreichii* / P. Leverrier, J.P.C. Vissers, A. Rouault, P. Boyaval, G. Jan // *Arch. Microbiol.* — 2004. — V. 181. — N 3. — P. 215—230.
27. Leverrier, P. In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices / P. Leverrier, Y. Fremont, A. Rouault, P. Boyaval, G. Jan // *Food Microbiol.* — 2005. — V. 22. — N 1. — P. 11—18.
28. Cousin, F.J. The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo / F.J. Cousin, S. Lousdon, M.-B. Maillard, S. Parayre, H. Falentin, S.-M. Deutsch, G. Boudry, G. Jan // *J. Food Microbiol.* — 2012. — V. 32. — N 1. — P. 135—146.
29. Рыжкова Е.П. Микробиологическая защита пшеничного хлеба с использованием трофической цепи *Lactobacillus delbrueckii* и *Propionibacterium freudenreichii* / Е.П. Рыжкова, Хао Ли, Т.В. Быковченко, И.В. Данилова, Р.Д. Поландова // *Биотехнология*. — 2009. — № 2. — С. 29—37.
30. Белобородова Н.В. Метаболиты анаэробных бактерий (летучие жирные кислоты) и реактивность макроорганизма / Н.В. Белобородова, С.М. Белобородов // *Антибиотики и химиотерапия*. — 2000. — № 2. — С. 28—36.
31. Hajfarajollah, H. Newly antibacterial and antiadhesive lipopeptide biosurfactant secreted by a probiotic strain, *Propionibacterium freudenreichii* / H. Hajfarajollah, B. Mokhtarani, K.A. Noghahi // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2014. — V. 174. — N 8. — P. 2725—2740.
32. Рыжкова (Иордан) Е.П. Множественные функции корриноидов в биологии прокариотических организмов (обзор) // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2003. — Т. 39. — № 2. — С. 133—159.
33. Foligne, B. Promising immunomodulatory effects of selected strains of dairy propionibacteria as evidenced *in vitro* and *in vivo* / B. Foligne, S.-M. Deutsch, J. Breton, F.J. Cousin, J. Dewulf, M. Samson, B. Pot, G. Jan // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — V. 76. — N 24. — P. 8259—8264.
34. Le Marechal, C. Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its antiinflammatory properties / C. Le Marechal, V. Peton, C. Ple, C. Vroland, J. Jardin, V. Briard-Bion, G. Durant, V. Chuat, V. Loux, B. Foligne, S. M. Deutsch, H. Falentin, G. Jan // *J. Proteomics*. — 2015. — V. 113. — P. 447—461.

E.P. RYZHKOVA^{1,*}, V.V. SEREBROV², I.V. DANILOVA^{1,*}, and T.V. BYKOVCHENKO³

¹The Dept. of Microbiology, Lomonosov Moscow State University (MGU), 119991, Moscow, Russia

²The State Research Center for Biotechnology *Vector*, 630559, Kol'tsovo. Novosibirskaya oblast Russia

³The Research Institute for Baking Industry, (NIIKP), 107553, Moscow Russia

e-mail: epr322@mail.ru

Grounds for the *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf Strain Clinical Trials as a Nutrient Component (nourishment)

The strain of *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf (VKPM B-9654; International GenBank AC: no. EU418709) isolated in 1988 from Swiss-type cheese manifests some probiotic-significant features having appropriate effects on animal organism (quails). Its cells demonstrate rather high level of survival under aggressive conditions of a model system of GIT, about 60% log CFU/ml. Unlike lactic acid bacteria, *P. freudenreichii* has low growth requirements, which is accompanied by the production of multiple nutraceuticals: vitamins of the B group, bifidogenic factor, essential amino acids and others. In view of the above said and the previously shown pronounced antioxidant activity, the investigated strain is of interest as a transient probiotic with the putative *in vitro* activity. The *P. freudenreichii* strain is capable of producing a high level of vitamin B₁₂ and propionates, demonstrated proteolysis at neutral pH-values and a spectrum of antibacterial activity and immunotropic effects determined from the cytokine biosynthesis stimulation (shown *ex vivo*). As a whole, the origin, properties and effects of the strain allows us to recommend it for trials in human clinic nutrition.

Key words: antibacterial spectrum, cytokines, immunomodulation, model GIT, probiotic effect, probiotic potential, propionates, *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf, proteolytic activity, survival, vitamin B₁₂.

* Authors for correspondence.