

Штамм *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д – основа бактериального препарата с бета-галактозидазной активностью «ИМ-лакзим»

А.Н. МОРОЗОВА, Н.А. ГОЛОВНЕВА, Н.Е. РЯБАЯ

Бактериальный концентрат «ИМ-лакзим» предназначен для получения низколактозных молочных продуктов. Препарат разработан на основе штамма *B. longum* БИМ В-813Д, обладающего высокой β -галактозидазной активностью. «ИМ-лакзим» рекомендуется для использования в пищевой промышленности как пробиотический компонент в составе различных комплексных заквасок.

Ключевые слова: бифидобактерии, β -галактозидаза, трансгликозилирование, бактериальный препарат.

The bacterial concentrate «IM-lakzim» was created to obtain low-lactose dairy products with improved consumer qualities. This drug is developed based on the strain *B. longum* BIM B-813D, which has high β -galactosidase activity. «IM-lakzim» is recommended for use in the food industry as a probiotic part of various complex starter cultures.

Keywords: bifidobacteria, beta-galactosidase, transglycosylation, bacterial preparation.

Введение. Одним из актуальных направлений в области переработки молока является использование ферментных препаратов, среди которых важная роль отводится β -галактозидазе (лактаза, β -D-галактозидгидролаза, ЕС 3.2.1.23). Применение этого фермента при переработке молочного сырья позволяет ускорить процесс молочнокислого брожения, повысить качество молочных продуктов и придать им функциональные, лечебные свойства [1].

Включение бифидобактерий, продуцирующих β -галактозидазу, в состав заквасок приводит к повышению степени сладости готового продукта примерно в 3 раза, улучшает усвояемость лактозы в ЖКТ [2]. Установлено, что в результате трансгликозилирующего действия β -галактозидаз бифидобактерий в молоке образуются галактоолигосахариды, повышающие питательную ценность продуктов и стимулирующие развитие полезной микробиоты [3]. В Беларуси препараты и продукты для коррекции дефицита лактазы присутствуют в незначительном количестве. Импортные препараты, существующие на фармацевтическом рынке, не удовлетворяют спрос в полном объеме и, кроме того, имеют высокую стоимость. В связи с этим проблема создания конкурентоспособного отечественного высокоэффективного бактериального препарата на основе штамма бифидобактерий с β -галактозидазной активностью, который может быть использован как для предварительного гидролиза лактозы в молоке и молочных продуктах, так и в качестве компонента заквасочной микрофлоры, является актуальной.

Цель работы – исследование свойств штамма *B. longum* БИМ В-813Д с высокой β -галактозидазной активностью, который является основой бактериального концентрата «ИМ-лакзим».

Работа проводилась совместно с кафедрой технологии молока и молочных продуктов «Могилевского государственного университета продовольствия».

Объекты и методы исследования. Объектом исследований служил штамм *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д (реклассифицирован из *B. adolescentis* БИМ В-813Д в результате полногеномного секвенирования) [4]. С использованием данного штамма создан концентрат «ИМ-лакзим», который содержит лиофильно высушенные клетки бифидобактерий с показателем жизнеспособности не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г.

Культуры бифидобактерий поддерживали на среде MRS [5] методом субкультивирования, хранили при температуре плюс 5–6°C.

Биомассу бактерий определяли нефелометрически, путем измерения оптической плотности суспензии бактерий при λ -590 нм.

Количество жизнеспособных клеток бактерий в 1 мл суспензии (число колониеобразующих единиц – КОЕ) определяли методом предельных разведений при высеве на полуагаризованные питательные среды с 0,2 % агар-агара.

Титруемую кислотность молока, культуральных сред и кисломолочных продуктов определяли титриметрическим методом по ГОСТ 3624-92. Предел кислотообразования определяли после 7 суток культивирования штамма в молоке. Активную кислотность продуктов определяли на рН-метре.

Активность β -галактозидазы оценивали колориметрически по количеству освободившегося о-нитрофенола из о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (о-НФГ) согласно модифицированному методу Миллера. В реакционную смесь добавляли неионный детергент Triton X-100 в концентрации 1 %. Активность β -галактозидазы рассчитывали в единицах Миллера по следующей формуле:

$$\text{Единицы Миллера} = [1000 * OD_{420}] / [V * T * OD_{595}],$$

где OD_{420} – измеренные значения для реакционной смеси; OD_{590} – отражает плотность клеточной суспензии; T – время реакции в минутах; V – объем пробы, взятой для определения, в мл [6].

В молоке и кисломолочных продуктах массовую долю лактозы определяли йодометрическим методом.

Процент сброженной лактозы (Π_l , %) определяли по формуле

$$\Pi_l = \frac{(L_{исх} - L) \cdot 100}{L_{исх}},$$

где $L_{исх}$ – массовая доля лактозы в исходном молоке, %; L – массовая доля лактозы в кисломолочном продукте, %.

При проведении экспериментов применяли статистические методы обработки экспериментальных данных. Повторность опытов принята трехкратная.

Тонкослойную хроматографию олигосахаридов проводили на пластинках силикагеля с алюминиевой подложкой марки Silufol. В качестве разделительной смеси использовали систему растворителей бутанол : этанол : вода (5:3:2). Хроматографическое разделение выполняли в стандартных условиях: камера $21,5 \times 17 \times 7$ см, насыщенная парами элюирующей системы; длина пробега фронта подвижной фазы 12 см. Для расчета R_f использовали результаты трех измерений. Соединения обнаруживали по окрашиванию после опрыскивания реактивом с 1,0 % раствором α -нафтола в этиловом спирте, смешанном с фосфорной кислотой в соотношении 1:10. Для развития окраски пластинку прогревали 5 мин при температуре плюс 105°C .

Результаты. В предыдущих исследованиях показано, что штамм *B. longum* БИМ В-813Д характеризуется высоким уровнем продукции β -галактозидазы [7]. Для сравнительной характеристики ферментативной активности использовались штаммы бактерий, которые входят в состав разных продуктов и заквасок: *Enterococcus faecium* В 5000, *E. faecium* В 2579, *E. faecium* В 3491, *Lactococcus lactis* В 5739, *L. lactis* В 9230, *Propionibacterium freudenreichii* В 2162, *Streptococcus thermophilus* В 5392. Активность фермента определяли в культуральной жидкости после 18 ч роста бактерий. Показано, что *B. longum* БИМ В-813Д проявляет наиболее высокий уровень гидролитической активности β -галактозидазы по сравнению с исследуемыми культурами бактерий (рисунок 1).

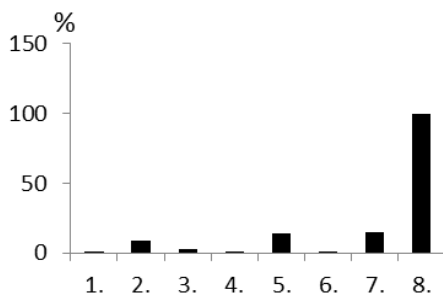


Рисунок 1 – Гидролитическая активность β -галактозидаз штаммов: 1. *E. faecium* В 5000; 2. *E. faecium* В 2579; 3. *E. faecium* В 3491; 4. *L. lactis* В-5739; 5. *L. lactis* В 9230; 6. *P. freudenreichii* В 2162; 7. *Str. termophilus* В 5392; 8. *B. longum* БИМ В-813Д

Аналогичные результаты получены при сравнительном исследовании активности β -галактозидазы *B. longum* БИМ В-813Д и коммерческого штамма *B. lactis* Bb-12, широко используемого в составе детских смесей, в пищевых добавках и кисломолочных продуктах (рисунок 2).

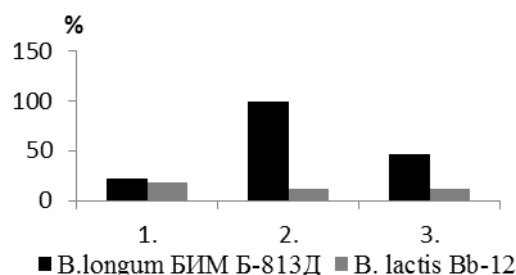


Рисунок 2 – β -галактозидазная активность *B. longum* БИМ В-813Д и *B. lactis* Bb-12 на молочных средах: 1 – культивирование в нормализованном молоке, 2 – культивирование в среде с молочной сывороткой, 3 – культивирование в восстановленном сухом молоке; за 100 % принята активность *B. longum* БИМ В-813Д на среде 2

Для коммерческого использования штамма бифидобактерий с β -галактозидазной активностью важным параметром является жизнеспособность клеток и высокая активность фермента в неблагоприятных условиях – при снижении pH среды, в присутствии растворенного кислорода, температурного или осмотического стрессов.

Определение кислотоустойчивости *B. longum* БИМ В-813Д проводили при культивировании бактерий на среде MRS с pH от 4,0 до 7,5 и восстановленном молоке. При низких значениях pH активность фермента составила 27 ед. Миллера. При pH 4,5 активность β -галактозидазы была выше этого показателя в 18, при pH 5,0 – в 22 раза. Активный рост штамма наблюдался при pH от 5,5 до 7,5 (таблица 1). Наиболее высокая активность фермента (до 2000 ед. Миллера) установлена при pH 6,5 – 7,5.

Таблица 1 – Накопление биомассы и продукция β -галактозидазы в зависимости от начального pH среды культивирования *B. longum* БИМ В-813Д

pH среды культивирования	Активность β -галактозидазы, ед. Миллера	Биомасса, мг/мл
4,0	27 ± 7	0,26
4,5	481 ± 32	0,3
5,0	610 ± 38	0,84
6,0	677 ± 55	1,225
6,5	780 ± 70	1,26
7,2	1755 ± 184	1,365
7,6	1781 ± 187	1,47

Для определения выживаемости бифидобактерий после осмотического стресса клетки, выращенные на оптимальной для роста среде до 24 ч, отмывали от остатков питательной среды, помещали на 3 ч в свежую питательную среду с 3–10 % NaCl, затем определяли КОЕ/мл. Показано, что при внесении в среду 3 % NaCl жизнеспособность сохраняют 100 % клеток, при 10 % NaCl – 86 % от контроля, при этом, несмотря на снижение жизнеспособности клеток, отмечена стабильность фермента.

Чувствительность бактериальных клеток *B. longum* БИМ В-813Д к кислороду исследована при хранении культуры при температуре +4°C в течение недели в лабораторной посуде без доступа кислорода и в колбах при соотношении объема культуральной жидкости и сосуда 1:1 и 1:10. Показатель КОЕ/мл в условиях эксперимента составил $2 \cdot 10^9$; $1 \cdot 10^8$ и $5 \cdot 10^5$, соответственно, активность β -галактозидазы оставалась относительно стабильной (рисунок 3).

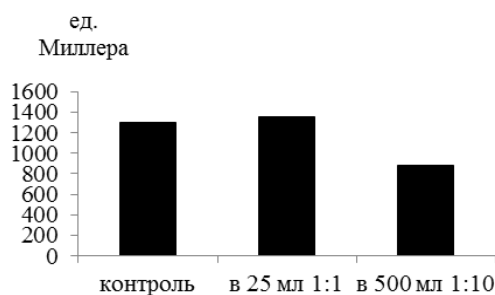


Рисунок 3 – Изменение активности β -галактозидазы *B. longum* БИМ В-813Д при хранении культуры в течение 7 суток при плюс 4°C в зависимости от условий аэрации

Ранее показано, что для очищенной β -галактозидазы оптимальной температурой реакции гидролиза является 50°C. Исследование технологических свойств восстановленного бактериального препарата с β -галактозидазной активностью – жизнеспособности клеток, активной и титруемой кислотности, активности фермента, потребление лактозы, образование олигосахаридов проводили при температурах 37°C и 45°C.

Установлено, что активность ацидогенеза восстановленного препарата «ИМ-лакзим» в первые 12 ч практически одинакова при температуре 37° и 45°C (рисунок 4). После 24 ч действия концентрата титруемая кислотность отличалась незначительно, от 70°Т при 37°C до 76°Т при температуре 45°C; активная кислотность молока при этом составила 5,6 и 5,9, соответственно.

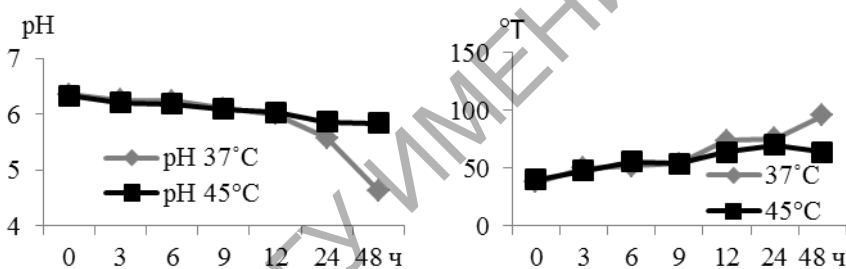


Рисунок 4 – Изменение активной и титруемой кислотности молока после внесения препарата «ИМ-лакзим» при температуре 37 и 45°C

Активность β -галактозидазы в молоке при температуре 45°C в период с 3 до 48 ч практически не менялась, тогда как при 37°C отмечено снижение активности в первые 9 ч ферментации, которое сменилось незначительным ростом впоследствии. Снижение содержания лактозы происходит активнее при 45°C. Первые 9 ч ферментации с препаратом «ИМ-лакзим» показали, что концентрация дисахарида снижается на 8,5 %, тогда как при температуре 37°C – лишь на 6,2 %. Однако после 12 ч ферментации содержание лактозы меньше в продукте, полученном при 37°C – на 17,4 %, а при температуре 45°C – 13,1. После 24 ч ферментации этот показатель составил, соответственно, 30 % и 25 % (рисунок 5).

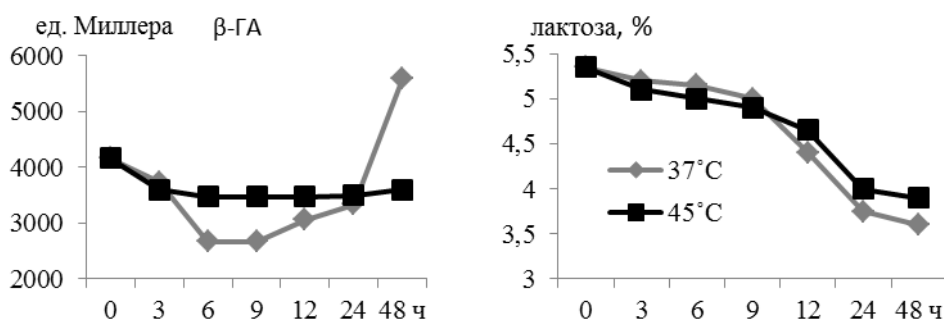


Рисунок 5 – Изменение β -галактозидазной активности и концентрации лактозы в молоке после внесения препарата «ИМ-лакзим» при температуре 37 и 45°C

В процессе утилизации лактозы молока обнаружена продукция галактоолигосахаридов. Методом ТСХ показан гидролиз лактозы за 4 ч ферментации с образованием фракции олигосахаридов (рисунок 6).

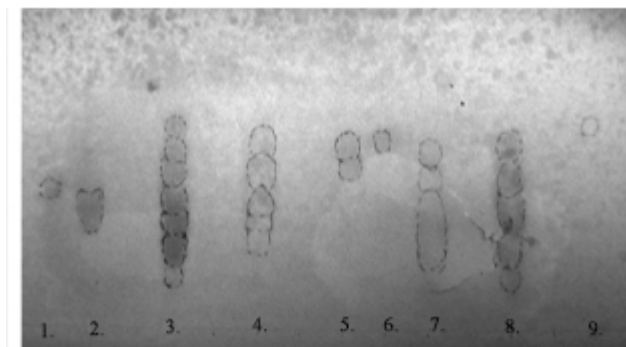


Рисунок 6 – Трансгликозилирующее действие бифидобактерий *B. longum* БИМ В-813Д и препарата «ИМ-лакзим» при ферментации лактозы обезжиренного молока: 1 – лактоза, 2 – лактулоза, 3 – метаболиты *B. longum* БИМ В-813Д, 11 ч, 4 – метаболиты препарата «ИМ-лакзим», 11 ч, 5 – лактоза, 6 – глюкоза, 7 – метаболиты *B. longum* БИМ В-813Д, 24 ч, 8 – метаболиты *B. longum* БИМ В-813Д, 24 ч, 9 – глюкоза

Так как установленная продукция биоактивных метаболитов-пребиотиков представляет интерес для производства функциональных продуктов питания, исследованы условия трансгликозилирующего действия β -галактозидазы *B. longum* БИМ В-813Д.

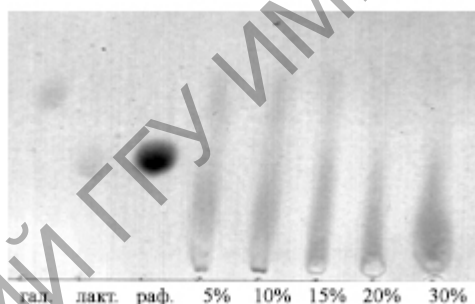


Рисунок 7 – Накопление галактоолигосахаридов в зависимости от концентрации лактозы в реакционной смеси (5–30 %)

Исследовано накопление галактоолигосахаридов в условиях *in vitro* при использовании в реакционной смеси клеток бифидобактерий и очищенной β -галактозидазы, выделенной из *B. longum* БИМ В-813Д. При использовании в реакционной смеси клеток *B. longum* БИМ В-813Д показано, что накопление галактоолигосахаридов возрастает при увеличении концентрации лактозы в реакционной смеси от 5 до 30 %.

Максимальное количество олигосахаридов после 18 ч реакции обнаружено при использовании 30 % лактозы в инкубационной среде (рисунок 7).

Для изучения влияния pH на трансгликозилирующую активность β -галактозидазы отмытые от остатков среды клетки бифидобактерий помещали в 0,02 М цитратно-фосфатный буфер pH 4,5; 6,5 или 7,2, содержащий 30 % лактозы и оставляли на 18 ч при 37°C. Анализ продуктов реакции показал, что максимальное количество олигосахаридов обнаруживается в реакционной смеси при pH 7,0–7,2 и температуре 37–50°C (рисунок 8).

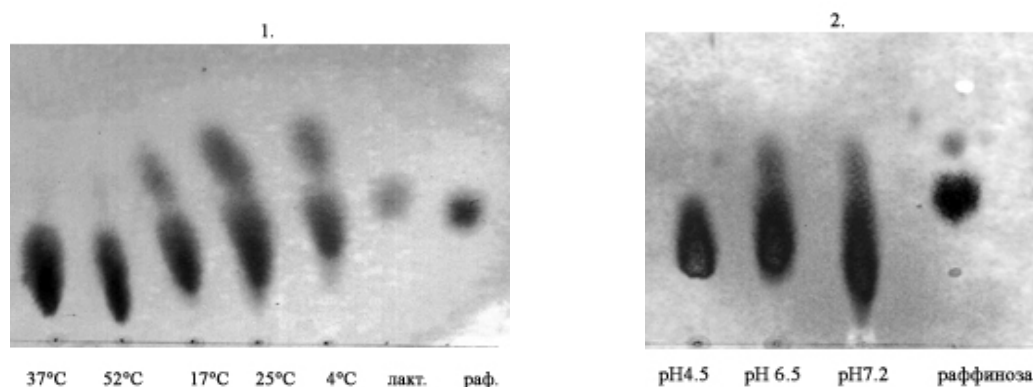


Рисунок 8 – Влияние температуры (1) и pH реакционной смеси (2) на накопление галактоолигосахаридов в результате трансгликозилирующего действия β -галактозидазы *B. longum* БИМ В-813Д

Исследовано трансгликозилирующее действие β -галактозидаз, изолированных из клеток *B. longum* БИМ В-813Д, выращенных на средах с разными источниками углеродного питания. Белки с β -галактозидазной активностью элюировали после электрофоретического разделения в ПААГ. Эффективность трансгликозилирования трех фракций белков с β -галактозидазной активностью оценивали по хроматографической подвижности продуктов реакции методом тонкослойной хроматографии. Использовали 30 % раствор лактозы в реакционной смеси. Накопление галактоолигосахаридов после 18 ч реакции показано для всех исследуемых ферментов (рисунок 9).

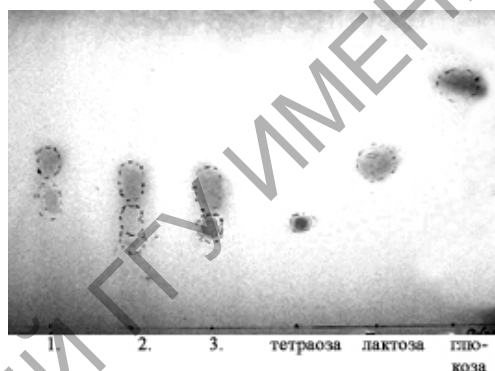


Рисунок 9 – Трансгликозилирующее действие β -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813Д, выделенных из клеток, выращенных на средах с лактозой и глюкозой: 1. фермент с $R_f = 0,243$ из клеток после культивирования на лактозе; 2. фермент с $R_f = 0,44$ из клеток после культивирования на лактозе; 3. фермент с $R_f = 0,243$ из клеток после культивирования на глюкозе

Таким образом, показано, что β -галактозидаза *B. longum* БИМ В-813Д проявляет трансгликозилирующее действие независимо от источника углерода в среде роста бифидобактерий. Олигосахариды обнаружены в реакционной смеси при использовании клеток бифидобактерий и белков с β -галактозидазной активностью, элюированных после электрофоретического разделения в ПААГ. Трансгликозилирующее действие β -галактозидазы *B. longum* БИМ В-813Д зависит от pH реакционной смеси и температуры реакции, более выражено при длительном воздействии фермента и высокой концентрации субстрата. Оптимальными условиями трансгликозилирования являются pH 7,0–7,5, температура – 37–50°C.

Заключение. Показатели роста и ферментативной активности при культивировании *B. longum* БИМ В-813Д в молочных средах, стабильность технологически важных свойств свидетельствуют о том, что бактериальный концентрат «ИМ-лакзим» (ТУ ВУ 100289066.118-2014) может быть использован в составе заквасок для получения ферментированных молочных продуктов с пониженным содержанием лактозы, а также для разработки новых продуктов функционального питания содержащих галактоолигосахариды, стимулирующие развитие полезной кишечной микрофлоры.

Литература

1. Bifidobacteria and their health-promoting effects / C. Hidalgo-Cantabrana [et al.] // *Microbiol. Spectr.* – 2017. – Vol. 5, № 3.2. – DOI: 10.1128 / microbiolspec.BAD-0010-2016.
2. Microbial β -Galactosidases of industrial importance: Computational studies on the effects of point mutations on the lactose hydrolysis reaction / B. C. Andrade [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 2020. – Vol. 36, № 4. – DOI: 10.1002 / btpr.2982.
3. Corzo, N. Prebiotics: concept, properties and beneficial effects / N. Corzo // *Nutr. Hosp.* – 2015. – № 1. – P. 98–118.
4. Особенности генома *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д, отражающие адаптацию бактерий к среде обитания / А. Н. Морозова, А. Э. Охремчук, Н. А. Головнева // *Микробные биотехнологии : фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / редкол.: Э. И. Коломиец [и др.].* – Мн, 2021. – Т. 13. – С. 66–76.
5. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. De Man, M. Rogosa, M. E Sharpe // *J. Appl. Bacteriol.* – 1960. – Vol. 23, № 1. – P. 130–135.
6. Miller, J. H. A short course in bacterial genetics / J. H. Miller. – N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. – 456 p.
7. Морозова, А. Н. Характеристика свойств β -галактозидаз, синтезируемых *Bifidobacterium adolescentis* CF-G / А. Н. Морозова, Н. А. Головнева // *Молодежь в науке – 2012 : материалы международной научной конференции молодых ученых, Минск, 17–20 апреля 2012 г. / НАН Беларуси.* – Мн., 2012. – С. 59–62.

Институт микробиологии
НАН Беларуси

Поступила в редакцию 02.11.2021