

*Л.Ю. Полончук, І.М. Корнієнко
(Національний авіаційний університет, Україна)*

Адаптивні властивості молочнокислих бактерій до несприятливих умов та факторів навколишнього середовища

Описано вплив несприятливих (стресових) умов на ріст МКБ, а також їх захисні механізми.

Останнім часом суттєво розширився ринок кисломолочних продуктів, в технології приготування яких, молочнокислі бактерії (МКБ) виконують принципово важливі функції, що визначають характерні особливості і якість кінцевого продукту. Штами МКБ вважаються пробіотичними препаратами при пероральному введенні в життєздатній формі в достатній кількості. Останніми роками вони привертають увагу як функціональні продукти харчування, так і потенційні фармацевтичні засоби. Тому інтерес до їх вивчення зростає все більше. [1-2].

Також відомо, що пробіотики є основними до вживання для людей, що тривало перебувають в умовах космічного польоту. Адже це може призвести до виникнення хронічних рецидивуючих інфекцій, алергічних захворювань, функціональних кишкових розладів і т.д. Тому саме пробіотики є ефективними для профілактики і лікування подібного роду захворювань космонавтів. При цьому необхідно враховувати, що на сьогоднішній день твердо доведеним є положення про те, що клітини мікроорганізмів, що знаходяться в метаболічно активному стані (у вигляді кисломолочного продукту), мають більш високий пробіотичний потенціал.

Наразі інтенсивно розвивається біотехнологія пробіотичних препаратів, що використовуються для корекції та профілактики мікроекологічних порушень у шлунково-кишковому тракті людини. Ефективність цих препаратів визначається сукупністю біологічних властивостей штамів, що входять до його складу. Виробничі штами бактерій повинні володіти набором характеристик, що дозволяють їм конкурувати з патогенними та умовно патогенними МО [3].

Однією з вимог, що висуваються до заквасочних культур для виробництва функціональних продуктів з пробіотичними властивостями на основі МО – нормальних представників мікрофлори кишківника людини, є здатність даних МО до адгезії.

Під час процесів бродіння молока МКБ піддаються різним стресовим умовам навколишнього середовища, таким як коливання температури, кислота, рН, високий осмотичний тиск і відсутність доступних поживних речовин. Як і інші бактерії, МКБ розвинули в собі складні системи реакції на стрес, які дозволяють їм пристосовуватися до несприятливих умов, щоб вижити. В останні роки реакції на стрес промислово важливих видів лакто- та біфідобактерій викликають підвищений інтерес [1-2].

Під час стресу клітини намагаються адаптуватися за допомогою відповідних молекулярних реакцій, намагаючись пом'якшити негативні наслідки

та відновити ріст або потенціал виживання. Ці адаптивні або стресові реакції є основним напрямком досліджень фізіології стресу МКБ. Бактерії постійно відстежують зміни в навколишньому середовищі та реагують, коли це необхідно. Реакції на стрес були пов'язані зі специфічними фенотипами, щоб їх можна було індукувати контрольованим і відтвореним способом.

Одним із таких фенотипів є фенотип адаптованої клітини. Цей тип адаптивної реакції здебільшого спрацьовує швидко, у перші хвилини чи години впливу легкого стресу. Молекулярні механізми, що лежать в основі тимчасової адаптації та звикання до певного стресу, можуть певною мірою збігатися, але вони не є повністю ідентичними. Альтернативно, клітини тимчасово адаптуються до стресу, і летальний виклик виконується з іншим стресом. Це лікування часто призводить до збільшення виживаності, явище, відоме як перехресний захист. Точна комбінація двох стресів, яка призводить до перехресного захисту, залежить від виду або навіть підвиду. Перехресний захист припускає індукцію молекулярних механізмів під час впливу першого стресора, який захищає клітини від подальшого летального виклику, і це може бути особливо важливим для МКБ, оскільки вони часто піддаються послідовному впливу різноманітних стресів.

Існують також фенотипи, що демонструють узагальнену стійкість до багатьох стресів одночасно. Один такий фенотип спостерігається, коли клітини переходять у стаціонарну фазу. Перехід від експоненціальної до стаціонарної фази супроводжується індукцією множинних регулонів, що призводить до здатності справлятися з низкою різних стресів. Цей фенотип підвищує ймовірність виживання, доки не відновляться умови росту, і це особливо важливо для LAB, які, на відміну від кількох інших грампозитивних бактерій, не здатні утворювати спори [4].

Існує багато екологічних або технологічних факторів стресу, з якими може зіткнутися МКБ, що впливають безпосередньо на її клітинну оболонку. Ось чому дуже важко прийти до чіткого визначення стресу клітинної оболонки, оскільки системи регуляторів, які реагують на стреси, що діють на клітинну оболонку або відчуються на ній, часто також відіграють певну роль у нормальній фізіології клітини.

Осмотичний тиск. Однією з основних захисних функцій клітинної стінки МКБ є підтримання форми клітини та протидія високому внутрішньому осмотичному тиску, який у Gr⁺ бактерій може досягати до 2000 кПа. Клітинна оболонка відіграє ключову роль у регуляції осмотичного стресу, оскільки вона добре проникна для води, тоді як цитоплазматична мембрана діє як бар'єр для більшості розчинених речовин. Основною реакцією МКБ на осмотичний стрес є внутрішньоклітинне накопичення осмопротекторів, з яких найбільш поширеними є гліцинбетаїн, холін, карнітин і диметилсульфоніоацетат. Через їх знижені біосинтетичні можливості, МКБ повинні імпортувати ці сполуки зі свого (природного) середовища, такого як молоко.

Іншим механізмом, за допомогою якого МКБ справляється з осмотичним стресом, є регуляція внутрішньоклітинних концентрацій певних амінокислот.

Також коли МКБ стикаються з раптовим падінням зовнішнього осмотичного тиску, вони використовують механочутливі канали, щоб

протидіяти ефектам. Вони діють як клапани екстреного випуску, дозволяючи виштовхувати осмоліти та воду [4].

Температура. Зазвичай пробіотики вирощують у великих кількостях перед процесом сушіння для отримання сухого порошку з високою щільністю клітин. Напруги, які виникають під час цієї обробки, включають екстремальні температури, від дуже високих (до 200°C) під час сушіння розпиленням до дуже низьких (до -196°C) під час сушіння сублімацією та зберігання. Такі екстремальні температури можуть вплинути на текучість мембран і поставити під загрозу цілісність клітини та основні клітинні процеси, такі як функція рибосом, згортання білка та ферментативна активність.

Бактерії мають два основних шляхи відчуття раптової зміни температури та передачі інформації. По-перше, це еволюційно збережена реакція на спричинене теплом накопичення денатурованих білків, а по-друге, це пряме сприйняття змін температури через первинні термосенсорні структури, такі як ДНК, РНК, білки або ліпіди, які або мають прямий вплив, або призводять до активзації шляхів передачі сигналу.

Область термосенсора є висококонсервативною тетрагліциновою петлею в домені крилатої спіралі-повороту-спіралі. Ця консервативна область, яка має високу конформаційну ентропію і, отже, демонструє знижену термостабільність, відчуває специфічні температурні зрушення та регулює активність генів [4].

pH. Основні стреси, з якими стикаються пробіотичні бактерії під час проходження через шлунок і верхній відділ кишкового тракту, включають низький pH у шлунку, а також детергентні властивості жовчі в дванадцятипалій кишці. Вплив цих стресів викликає пошкодження клітинної оболонки, ДНК і білків. Виживання пробіотичних лактобактерій у середовищах з низьким pH може бути значно збільшено (на кілька порядків) у присутності метаболізованих цукрів, таких як глюкоза. Вважається, що глюкоза, надаючи АТФ F-АТФази, забезпечує виключення протонів і, отже, захист. Експозиція *L. delbrueckii* в кислих умовах, що переважають у ШКТ (pH 3,5 протягом 60 хв), як було показано, призводить до посилення експресії генів *clpP*, *clpE*, *clpI* і *clpX*. Шаперони Clp активно сприяють повторному згортанню або деградації пошкоджених білків [5].

Кислотний стрес також може викликати молекулярні зміни на поверхні клітини. Крім того, бактерії здатні змінювати ліпідний склад своєї мембрани у відповідь на зовнішні стреси. Склад цитоплазматичної мембрани може мати значний вплив на здатність пробіотичних бактерій вижити під час стресу, починаючи від тепла і закінчуючи низьким pH.

Жовчні солі. Також МКБ можуть відчувати та розвивати механізми резистентності до жовчних солей. Деякі штами можуть ефективно експресувати ряд гідролаз жовчних солей, які забезпечують захист від жовчі через декон'югацію жовчних солей. Добре задокументована реакція клітин на жовч пробіотика *Lb. rhamnosus* показав, що він також може реагувати, змінюючи функції клітинної оболонки, такі як зміна шляхів впливу на склад жирних кислот, заряд клітинної поверхні та товщину шару позаклітинної полімерної речовини (ППР). Виробництво зовнішніх шарів ППР може мати значний захисний ефект від жовчі та інших суворих умов навколишнього середовища.

Дійсно, штами, що продукують ППР, демонструють значно більший ріст у присутності 0,3% жовчі, ніж штами, які цього не роблять. Хоча внутрішня толерантність до жовчі, здається, залежить від штаму, МКБ можна змусити поступово адаптуватися до присутності жовчних солей шляхом субкультивуації в поступово зростаючих концентраціях жовчі [4].

Висновки

Отже, головними показниками здатності МКБ приживатися в організмі людини є їх стійкість до температури, жовчі, кухонної солі, а також лужної реакції середовища, що є ключовим фактором в подальших дослідженнях з метою створення високоактивних штамів, які володіють підвищеною стійкістю до стресових факторів.

Список літератури

1. Sanders J.W. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis* / Sanders J.W., Venema G., Kok J. // FEMS Microbiology Reviews. – 1999. – V. 23 – P. 483-501.
2. Van de Guchte M. Stress responses in lactic acid bacteria / Van de Guchte M., [et. al] // Antonie Leeuwenhoek. – 2002. – V82. – P. 187-216.
3. Биотехнология получения национальных кисломолочных продуктов на основе пробиотических микроорганизмов : дис. докт. филос. наук : 6D070100 - Биот / . – Алматы, Казахстан, 2014. – 132 с.
4. Stress physiology of lactic acid bacteria / Konstantinos Papadimitriou, Ángel Alegria, Peter A. Bron [et. al]. // Microbiology and molecular biology reviews. – 2016. – V80. – P. 837–890.
5. Increased expression of clp genes in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposed to acid stress and bile salts / Ferreira A.B., De Oliveira M.N., Freitas F.S. [et. al]. // Benef Microbes. – 2013. –P.367–374.