

УДК 579.67;579.22;579.25

## ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ *Lactobacillus helveticus*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЕФИРНОГО ГРИБКА И ФЕКАС *Homo sapiens*

© 2025 г. О. С. Савинова<sup>1</sup>, А. В. Шабаев<sup>1</sup>, Т. В. Федорова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</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 28.10.2024 г.

После доработки 25.11.2024 г.

Принята к публикации 05.12.2024 г.

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ пробиотических свойств изолятов *Lactobacillus helveticus*, выделенных из кефирного грибка – сложного консорциума бактерий и дрожжей, используемого при производстве кефира (штаммы KF4, KF5 и KF6) и фекал млекопитающих (KF7, NK1 и H9). На генетическом уровне все исследованные штаммы обладали потенциалом к образованию биологически активных пептидов, усваиванию различных сахаров и антимикробной активностью, что также было подтверждено в экспериментах *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Lactobacillus helveticus*, геном, биохимические свойства, антибиотикорезистентность, антимикробная активность, ферментация молока, антиоксидантная и гипотензивная активность, экзопротеом, биопептиды

**DOI:** 10.7868/S3035575X25040058

*Lactobacillus helveticus* – гомоферментативная термофильная бактерия, обычно используемая в молочной промышленности в качестве заквасочной культуры для производства определенных видов сыров, таких как твердые выдержанные швейцарские и итальянские сорта, а также ферментированных молочных напитков [1, 2]. *L. helveticus* имеет ряд характерных особенностей, которые отличают ее от обычно используемых заквасочных культур, включая способность метаболизировать галактозу, высокую скорость кислотообразования, высокую протеолитическую активность и способность продуцировать биологически активные пептиды. Использование штаммов *L. helveticus* в составе заквасок способствует улучшению вкуса, аромата и текстуры конечного продукта, а также усиливает их полезные свойства [3, 4].

В связи с неуклонным ростом интереса потребителей к здоровому образу жизни и потреблению функциональных продуктов питания использование лактобактерии вида *L. helveticus* перспективно для изготовления ферментированных молочных продуктов [2]. В ряде недавних исследований показано, что использование штаммов *L. helveticus* способствует получению молочных продуктов,

содержащих биологически активные соединения с антимикробной, антиоксидантной, антигипертензивной и антиканцерогенной активностью, а употребление таких продуктов не только улучшает работу кишечника, но и оказывает психобиотический и иммуностимулирующий эффекты [2, 5]. Однако важно отметить, что биотехнологический профиль и пробиотические особенности, демонстрируемые этой лактобактерией, зависят от конкретного изолята, географии и источника его происхождения [3, 6, 7]. В связи с этим, поиск новых перспективных пробиотических штаммов *L. helveticus*, а также комплексная характеристика их свойств, являются важной и актуальной задачей. При этом ключевыми свойствами новых штаммов при скрининге являются безопасность, ферментационная активность, наличие антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, а также способность продуцировать антимикробные соединения.

Целью работы являлось исследование технологических (протеолитическая активность, активность кислотообразования) и некоторых пробиотических свойства (антимикробная, анти-

оксидантная и гипотензивная активность) 6 новых штаммов *L. helveticus*, выделенных из разных источников, таких как фекасы млекопитающих (штаммы KF7, NK1 и H9) и кефирного грибка (штаммы KF4, KF5 и KF6) – сложного консорциума бактерий и дрожжей, используемый при производстве кефира.

## МЕТОДИКА

**Штаммы и условия культивирования.** В работе использовались 6 штаммов *L. helveticus*: два штамма H9 (MW558118) и NK1 (MT448799) из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Россия), выделенные в чистую культуру из фекасы *Homo sapiens*; 4 штамма были выделены в чистую культуру в настоящей работе, три из них KF4, KF5 и KF6 из кефирного грибка, и один штамм KF7 – из фекасы здорового младенца.

Для культивирования использовали стерильное восстановленное обезжиренное молоко (“Слуцкий сыродельный комбинат”, Беларусь), микробиологические среды MRS-бульон и MRS-агар (“HiMedia”, Индия). Штаммы культивировали в анаэробных условиях с использованием анаэротата (“Oxiod”, США) и газ-пакетов GasPak (“BD Biosciences”, США) при температуре 37°C.

Для выделения ДНК штаммы *L. helveticus* статически культивировали в 20 мл жидкой MRS среды при температуре (37 ± 1)°C до появления видимой опалесценции ( $D_{600} \approx 0.8-1.0$ ).

**Секвенирование, аннотирование геномов и биоинформационный анализ.** Выделение ДНК, секвенирование генома и аннотацию генома проводили, как описано в работе [8]. Тотальную ДНК экстрагировали из культур *L. helveticus* с помощью набора DNeasy mericon Food Kit (“Qiagen”, США), в соответствии с инструкцией производителя.

Подготовка ДНК библиотек для массового параллельного секвенирования осуществлялась с использованием наборов для подготовки библиотек Nextera XT DNA Library Preparation Kit (“Illumina”, США) и Ion AmpliSeq library kit 2.0 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Качество и количество полученных ДНК-библиотек проверяли с помощью Agilent Bioanalyzer 2100 (“Agilent Technologies”, США).

Секвенирование геномов (эквивалентно смешанных ДНК-библиотек) проводили с использованием приборов Illumina HiSeq 2500 с помощью набора HiSeq Rapid SBS Kit (“Illumina”, США) и Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (“Thermo Fisher Scientific”, США). Сборку полученных прочтений осуществляли с помощью программного пакета CLC Genomics Workbench 11.0 (“Qiagen”, США).

Полученные прочтения были обработаны и собраны с помощью CLC Genomics Workbench 11.0 (“Qiagen”). Аннотация геномов проводилась

с помощью программного пакета NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) [9]. Геномы были депонированы в базу данных GenBank: *L. helveticus* NK1 и H9 (BioProject: PRJNA736961); *L. helveticus* KF4, KF5, KF6 и KF7 (BioProject: PRJNA824719).

Поиск мобильных генетических элементов осуществлялся с помощью программы ISfinder [10], поиск последовательностей профагов осуществлялся с помощью программы PHASTER [11], поиск плазмид осуществлялся с помощью программы PlasmidFinder [12]. Поиск кластеров, отвечающих за синтез бактериоцинов, осуществляли с помощью программы BAGEL4 [13]. Для адресного поиска генов антибиотикорезистентности анализировали геномные последовательности исследуемых штаммов лактобактерий с помощью базы данных GenBank NCBI, используя инструмент поиска основного локального выравнивания BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Дополнительно поиск генов антибиотикорезистентности также осуществляли с использованием базы данных Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD3.0.8) (<https://card.mcmaster.ca/>).

**Антибиотикорезистентность.** Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков определяли методом E-теста (E-test). Для определения бактериальную суспензию ( $10^8$  КОЕ/мл) соответствующего штамма заседали на плотную питательную среду MRS-агар (“HiMedia”, Индия), после чего поверхности агара давали высохнуть в течение примерно 15 мин перед нанесением полосок E-test (“HiMedia”, Индия). Показания регистрировали через 24 ч анаэробной инкубации при 37°C. МИК исследованных бактерицидных антибиотиков (ампициллин, стрептомицин, гентамицин, канамицин хлорамфеникол и ванкомицин) принимали за первое значение на полосках E-test, при котором рост отсутствовал, в соответствии с рекомендациями производителя. Для бактериостатических антибиотиков (тетрациклин, эритромицин и клиндамицин) МИК принимали за точку, при которой рост значительно подавлялся (80%, по оценкам визуального осмотра).

**Антимикробная активность.** Для исследования антагонистической (противомикробной) активности штаммов *L. helveticus* использовали метод совместного культивирования. В качестве тест-культур использовали 24-часовые культуры *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, вторую генерацию на среде СПА (агар питательный сухой, “Биокомпас-С”, Россия). Для совместного культивирования в 20 мл стерильного обезжиренного молока вносили по 1 мл инокулятов исследуемых штаммов *L. helveticus* и суспензий штаммов *E. coli* и *S. aureus* ( $10^7-10^8$  КОЕ/мл) и инкубировали в течение 24 и 48 ч при температуре (37 ± 1)°C. Контролем являлись монокультуры тест-штаммов

*E. coli* и *S. aureus*, выращенные в тех же условиях. По окончании инкубирования проводили посев из ряда десятичных разведений на селективные среды – агар Эндо (“HiMedia”, Индия) для *E. coli* и Байрд-Паркер агар (“HiMedia”, Индия) для *S. aureus*. Подсчет клеток *S. aureus* и *E. coli*, выросших в монокультуре и при совместном культивировании с *L. helveticus* проводили через 24 ч.

**Углеводный и ферментативный профили.** Углеводный и ферментативный профили штаммов *L. helveticus* исследовали с использованием тест-систем API 50CHL и API ZYM соответственно (“Bio-Merieux”, Франция) согласно протоколам производителя.

**Ферментация коровьего молока.** Инокулят штаммов *L. helveticus* получали заквашиванием стерилизованного обезжиренного молока с последующим термостатированием при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  до образования сгустка ( $\text{pH } 4.8 \pm 0.1$ , КОЕ/мл –  $10^7$ – $10^8$ ). Для ферментации стерильного обезжиренного молока вносили 1% (об./об.) инокулята исследуемых штаммов *L. helveticus* и термостатировали 48 ч при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . В процессе ферментации молока проводили измерение pH, определяли количество жизнеспособных клеток (КОЕ), протеолитическую, антиоксидантную и АПФ-ингибирующую активности.

**Определение количества жизнеспособных клеток (КОЕ) *L. helveticus*.** Количество клеток лактобацилл определяли методом посева на питательную среду MRS-агар (“HiMedia”, Индия). Культивирование проводили в анаэробных условиях при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  с использованием анаэростана (“Oxiod”, США) и газ-пакетов GasPak (“BD Biosciences”, США), подсчитывались все выросшие на среде в течение 72 ч колонии.

**Получение белково-пептидных фракций.** Аликвоту (15 мл) образцов ферментированного молока центрифугировали при температуре  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин при 10000 g на центрифуге 5702R (“Eppendorf”, Германия), фильтровали надосадочную жидкость вместе с жировым слоем через складчатый бумажный фильтр (MN 640W, “Macherey-Nagel”, Германия) и затем через шприцевые фильтры с гидрофильной мембраной с диаметром пор 0.45 мкм (“Sartorius”, Германия). Полученные белково-пептидные фракции замораживали и хранили при температуре  $-73^\circ\text{C}$  до проведения анализа.

В полученных таким образом образцах белково-пептидных фракций ферментированного молока определяли протеолитическую и антиоксидантную активности, способность ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент (АПФ-ингибирующую (гипотензивную) активность), а также анализировали пептидный профиль казеиновых белков и секретируемые белки лактобактерий.

**Протеолитическая активность.** Протеолитическую активность определяли путем измерения количества высвобождаемых аминокрупп в исследуемых образцах ферментированного молока спектрофотометрическим методом с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS) [14]. 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 эквивалентах ммоль L-лейцина/л.

**Антиоксидантная и АПФ-ингибирующая активности.** Активности определяли в образцах ферментированного штаммами *L. helveticus* молока *in vitro* флуоресцентным методом ORAC (oxygen radical absorbance capacity) и по способности ингибировать АПФ – ключевое звено ренин-ангиотензиновой системы, участвующей в регуляции артериального давления, как описано в работе [15].

**Анализ белков и пептидов в ферментированном молоке.** Для идентификации и анализа секретируемых белков лактобактерий в процессе ферментации молока содержимое образцов сывороток (100 мкг общего белка) осаждали ледяным ацетоном, осадок растворяли в восстанавливающем буфере (50мМ Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 мМ EDTA, 8 М мочевины, 10 мМ дитиотреитол), инкубировали 45 мин при  $37^\circ\text{C}$  и алкилировали йодацетамидом (25 мМ), 45 мин при комнатной температуре в темноте. Затем добавляли 25 мМ аммоний-бикарбонатный буфер pH 8.0 до конечной концентрации мочевины 1 М и добавляли трипсин в соотношении белок/фермент – 50 : 1 и инкубировали в течение 16 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до конечной концентрации 0.1%. Полученную смесь пептидов очищали от реагентов на C18-картриджах для ТФЭ расшифровка (“Waters”, США).

Анализ пептидных фракций проводили в системе ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (“Thermo Fisher Scientific”, США), сопряженной с масс-спектрометром TIMS TOF Pro (“Bruker Daltonics”, США), используя метод сбора данных с параллельным накоплением и последовательной фрагментацией (PASEF) в режиме DDA (Data Dependent Data Acquisition). Настройки источника электрораспыления (ESI) были следующими: напряжение капилляра 4500 В, потенциал смещения концевой пластины 500 В, поток сухого газа 3.0 л/мин при 1800 С. Измерения проводили в диапазоне массы/заряда ( $m/z$ ) от 100 до 1700. Диапазон подвижности ионов включал значения от 0.60 до 1.60 В с/см<sup>2</sup> ( $1/k_0$ , где  $k_0$  – подвижность ионов). Общее время цикла было установлено на 1.16 с, количество сканирований PASEF MS/MS – 10.

Для ВЭЖХ объем загрузки образца составлял 1 мкл на инъекцию. Разделение ВЭЖХ проводилось с использованием эмиттерной колонки (C18, 25 см × 75 мкм 1.6 мкм) (“Ion Optics”, Австралия) методом градиентного элюирования. Подвижная фаза А содержала 0.1% муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В содержала 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Разделение достигалось при скорости потока 400 нл/мин с использованием 40-минутного градиента от 4 до 90% фазы В.

Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 11 (“BSI”, Канада) со следующими параметрами: погрешность измерения массы родительского иона – 20 ppm; погрешность измерения массы ионов фрагментов – 0.05 Да. Был проведен неспецифический по обоим концам поиск пептидов длиной от 6 до 45 аминокислот по базам данных UniProtKB *Bos taurus* и *Lactobacillus helveticus* с учетом карбамидометилирования (C), окисления (M) и фосфорилирования (S,T,Y) в качестве возможных модификаций. Для каждого пептида допускалось не более трех модификаций.

Концентрацию белка в препаратах определяли BCA-методом с использованием набора BCA assay kit (“ThermoFisher”, США).

**Статистическая обработка.** Обработку данных проводили с применением программ “Statistica 10” и “Microsoft Office Excel”. Статистически значимыми по двустороннему критерию Стьюдента считали отличия при  $p < 0.05$ . Все эксперименты проводились в трех биологических повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Биохимическая характеристика штаммов *L. helveticus*.** Характеристика штамма, проведенная с использованием коммерческого набора API 50 CHL, показала, что все изоляты утилизировали глюкозу, галактозу и лактозу (рис. 1). Что касается остальных углеводов, то способность к их утилизации у разных изолятов различалась. При этом кефирный изолят KF6 был способен сбрасывать в среднем в 2.8 раза больше различных сахаров, по сравнению с остальными (рис. 1). Действительно, известно, что геномы молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* spp. содержат большое количество генов, участвующих в транспорте и утилизации углеводов [16]. При этом существует высокая как межвидовая, так и внутривидовая вариабельность.

Оценка ферментативной активности штаммов *L. helveticus* с использованием коммерческого набора API ZYM показала, что изоляты обладали сходной ферментативной активностью (табл. 1). У всех штаммов была обнаружена высокая активность β-галактозиды и аминокептидазы, а также достаточно высокая активность кислой фосфатазы и нафтол-AS-VI-фосфогидролазы. У изолятов была выявлена умеренная активность эстеразы

(C4) и эстераз-липазы (C8), при этом липазная активность не детектировалась. Также отсутствовала активность протеиназ (трипсин и α-химотрипсин), α-глюкозидазы, β-глюкозидазы, α-фукозидазы, β-глюкоконидазы, α-маннозидазы и α-фукозидазы (табл. 1).

Ранее была отмечена важность наличия эстеразной активности, активности лейцин-ариламидазы, а также активностей кислой фосфатазы и нафтол-AS-VI-фосфогидролазы у пробиотических штаммов лактобактерий, поскольку они необходимы в процессе пищеварения, способствуют усвоению питательных веществ, поддерживая структуру кишечника [17, 18].

**Секвенирование, сборка и аннотирование геномов *L. helveticus*.** С помощью технологий Illumina и Ion Torrent черновые геномы *L. helveticus* были секвенированы с общим покрытием 100×, а количество собранных контигов варьировало от 298 до 430 (табл. 2). Окончательные размеры всех сборок составили 1.9–2.0 миллиона п.о. Проекты Whole Genome Shotgun были депонированы в DDBJ/ENA/GenBank под номерами GCA\_034045235, GCA\_035284085, GCA\_034045205, GCA\_034044615, GCA\_018967005 и GCA\_018967085 для штаммов *L. helveticus* KF4, KF5, KF6, KF7, H9 и NK1 соответственно. Версии, описанные в этой публикации, представляют собой версии GCA\_034045235.1, GCA\_035284085.1, GCA\_034045205.1, GCA\_034044615.1, GCA\_018967005.1 и GCA\_018967085.1. Все секвенированные геномы принадлежат двум BioProject – PRJNA824719 и PRJNA736961. В целом полученные сборки и аннотации сопоставимы по качеству с ранее опубликованными черновыми геномами других штаммов *L. helveticus* [19].

**Геномная стабильность.** Геномы исследуемых штаммов *L. helveticus* были проанализированы на наличие таких маркеров стабильности генома, как мобильные генетические элементы, последовательности профагов и плазмиды [20]. Информация представлена в табл. 3. В целом все шесть штаммов показали сходную стабильность геномов.

Всего в геномах исследуемых штаммов *L. helveticus* было установлено наличие от 266 до 384 инсерционных последовательностей (IS-элементов, Insertion Sequence) принадлежащих в основном к семействам: IS3, IS5, IS30, IS256, IS607, IS200/IS605, IS1182, IS982, ISL3, ISLre2 [21]. При этом наиболее распространенными в геномах всех 6 штаммов *L. helveticus* были такие ранее описанные IS-элементы, как ISLhe65 (53–83), ISLhe2 (35–69), IS1201 (19–44), ISLhe63 (15–32) и ISLh1 (16–22). В геномах кефирных изолятов KF4, KF5 и KF6 количество копий IS-элементов ISLhe1 (3) и ISLhe60 (5–6) было чуть меньше, по сравнению с изолятами из фекал – ISLhe1 (6–8) и ISLhe60 (9–18) соответственно. В тоже время количество

<i>L. helveticus</i>	Кефирный грибок			Фекал Homo sapiens		
	KF4	KF5	KF6	KF7	NK1	H9
■ Моносахариды (Пентозы)						
D-рибоза	●	●	●	●	●	●
D-ксилоза	●	●	●	●	●	●
■ Моносахариды (Гексозы)						
D-галактоза	●	●	●	●	●	●
D-глюкоза	●	●	●	●	●	●
D-фруктоза	●	●	●	●	●	●
D-манноза	●	●	●	●	●	●
D-тагатаза	●	●	●	●	●	●
N-ацетилглюкозамин	●	●	●	●	●	●
■ Арил-моносахариды						
Арбутин	●	●	●	●	●	●
Эскулин, цитрат железа	●	●	●	●	●	●
Салицин	●	●	●	●	●	●
■ Арил-дисахариды						
Амигдалин	●	●	●	●	●	●
■ Дисахариды						
D-целлобиоза	●	●	●	●	●	●
D-мальтоза	●	●	●	●	●	●
D-лактоза	●	●	●	●	●	●
D-мелибиоза	●	●	●	●	●	●
D-сахароза	●	●	●	●	●	●
D-трегалоза	●	●	●	●	●	●
Гентиобиоза	●	●	●	●	●	●
D-тураноза	●	●	●	●	●	●
■ Трисахариды						
D-меллицитоза	●	●	●	●	●	●
■ Полисахариды						
Крахмал	●	●	●	●	●	●
■ Сахарные спирты						
D-маннитол	●	●	●	●	●	●
■ Другие						
Глюконат калия	●	●	●	●	●	●
2-кетоглюконат калия	●	●	●	●	●	●
Глицерин	●	●	●	●	●	●

Рис. 1. Углеводный профиль изолятов *L. helveticus* с использованием коммерческого набора API 50 CHL; зеленым обозначено присутствие, красным – отсутствие.

копий ISLhe66 (9–13), ISLhe61 (11–12) и ISL2 (8–9), напротив, было несколько выше, чем в геномах штаммов KF7, NK1 и H9 из фекал – ISLhe66 (1–3), ISLhe61 (7–10) и ISL2 (2–4). Количество копий таких IS-элементов, как ISLhe4, ISLhe5, ISLhe6, ISLhe7, ISLhe10, ISLhe11, ISLhe13, ISLhe30 и ISL2A варьировало в геномах разных штаммов

*L. helveticus* в диапазоне от 1 до 18. Действительно, распространенность в пределах вида *L. helveticus* некоторых IS-элементов (IS1201, ISL2, ISLh1, ISLhe2, ISLhe63 и ISLhe65) выше, в то время как других (например, ISLhe4, ISLhe7, ISLhe30 и др.) ниже [22]. Также в геномах всех штаммов были обнаружены элементы, ранее описанные в *Lac-*

Таблица 1. Ферментативный профиль изолятов *L. helveticus*

Фермент	Активность, нмоль гидролизованного субстрата					
	KF4	KF5	KF6	KF7	NK1	H9
Щелочная фосфатаза	0	0	0	0	0	0
Эстераза (C4)	5–10	5–10	5–10	5–10	5	5
Эстераза-липаза (C8)	5	5	5	5	5	5
Липаза (C14)	0	0	0	0	0	0
Лейцин ариламидаза	20–30	20–30	20–30	20–30	20–30	20–30
Валин ариламидаза	10–20	10–20	10–20	10–20	10–20	10–20
Цистин ариламидаза	10–20	10–20	10–20	10–20	10–20	10–20
Трипсин	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	0	0	0
Кислая фосфатаза	20–30	20–30	20–30	20–30	20–30	20–30
Нафтол-AS-VI-фосфогидролаза	20–30	20–30	20–30	20–30	20–30	20–30
$\alpha$ -галактозидаза	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -галактозидаза	>40	>40	>40	40	40	40
$\beta$ -глюкозидаза	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -глюкозидаза	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -глюкозидаза	0	0	0	0	0	0
N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидаза	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -маннозидаза	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -фукозидаза	0	0	0	0	0	0

*tobacillus delbrueckii* (ISLde1 и ISL5), *Lactobacillus johnsonii* (ISLjo1 и ISLjo5) и *Leuconostoc mesenteroides* IS1165 (IS1165). Интересно, что в геномах изолятов из фекал KF7, NK1 и H9 дополнительно были обнаружены IS-элементы ISLke1 ранее описанные у *Lactobacillus kefiranofaciens*, а в геномах кефирных изолятов KF4, KF5 и KF6 – Tn3 *Salmonella enterica* и TnAs3 *Aeromonas salmonicida*.

Наличие большого числа мобильных элементов IS в геномах различных изолятов *L. helveticus* было показано ранее. Так в геномах штаммов *L. helveticus* FAM8105, FAM22155 и FAM8627, выделенных из молочных продуктов в Швейцарии, было обнаружено 203, 195 и 127 IS-элемента соответственно [23, 24]. Геномы изолятов *L. helveticus* DPC 4571 и KLDS1.8701 содержали соответственно 223 и 122 IS-элемента [25]. Однако также описаны изоляты *L. helveticus*, в геномах которых либо вообще отсутствовали IS-элементы – штаммы UC1035, UC1266, UC1267, UC1275, UC1285 и UC3147, выделенные из молочных сывороток в Италии [26], либо их количество было существенно ниже – по 73 в геномах штаммов D1, D2 и 72 в геноме D3, выделенных из кисломолочных продуктов в Китае и Африке соответственно [19]. Значительная разница в ко-

личестве IS-элементов в геномах *L. helveticus* из различных географических зон и экологических ниш может указывать на возможное влияние среды обитания на их экспансию. Была также обнаружена корреляция между типами IS-элементов, которые предположительно недавно участвовали в горизонтальном переносе генов, и числом их копий в геномах *L. helveticus*. Хотя точная роль IS-элементов в эволюции бактериальных геномов до сих пор дискутируется, их общее влияние на архитектуру микробных геномов неоспоримо [27].

Поиск профагосодержащих регионов показал (табл. 3), что геномы штаммов *L. helveticus* KF4, KF5 и KF6 имеют только один общий профаговый участок – PHAGE\_Lactob\_phig1e\_NC\_004305(11); геном *L. helveticus* NK1 содержит профаговый участок – PHAGE\_Lactob\_phiadh\_NC\_000896(19). При этом в геномах данных штаммов профаговые участки интактны, то есть содержат все необходимые для нормального функционирования профага гены, а в геномах штаммов *L. helveticus* KF7 и H9 профаговые области не обнаружены. Высокая устойчивость штаммов *L. helveticus* KF7 и H9 к включению бактериофагов согласуется с большим количеством обнаруженных CRISPR локусов в их

Таблица 2. Данные по секвенированию и аннотированию геномов штаммов *L. helveticus*

Параметр	KF4	KF5	KF6	KF7	H9	NK1
Общая информация						
Источник	Кефирный гриб	Кефирный гриб	Кефирный гриб	Фекас <i>H. sapiens</i>	Фекас <i>H. sapiens</i>	Фекас <i>H. sapiens</i>
BioSample	SAMN38411843	SAMN38411844	SAMN38411845	SAMN38411846	SAMN19670533	SAMN19670532
BioProject	PRJNA824719	PRJNA824719	PRJNA824719	PRJNA824719	PRJNA736961	PRJNA736961
GenBank сборка	GCA_034045235.1	GCA_035284085.1	GCA_034045205.1	GCA_034044615.1	GCA_018967005.1	GCA_018967085.1
Секвенирование						
Платформа	Illumina HiSeq	Illumina HiSeq	Illumina HiSeq	Illumina HiSeq	IonTorrent	IonTorrent
Число прочтений	3411265	3356925	3289986	3215456	3359720	3693879
Сборка						
Размер сборки, Мб	2.0	2.0	2.0	1.9	1.9	1.9
Среднее покрытие	100.0×	100.0×	100.0×	100.0×	100.0×	100.0×
Число контигов	380	391	388	423	403	298
Самый длинный контиг, по	83739	83739	83739	62594	56894	90820
N50, кб	21.7	21.6	21.6	18.1	16.5	19.5
Средний размер контига, по	5282	5147	5181	4595	4784	6469
Структурная аннотация						
Гены (всего):	2316	2304	2309	2292	2254	2214
Кодирующие белки	1983	1969	1973	1932	1811	1771
Кодирующие РНК	74	77	75	76	73	69
Псевдогены	259	258	261	284	370	374
CRISPR–регион	1	1	1	3	4	2

**Таблица 3.** Маркеры геномной стабильности *L. helveticus*

Штамм	Число мобильных элементов IS, шт	Число профагов, шт			Плазмиды, шт
		полные	под вопросом	неполные	
KF4	315	1	0	0	0
KF5	301	1	0	0	0
KF6	308	1	0	0	0
KF7	346	0	0	0	0
NK1	266	1	0	0	0
H9	384	0	0	0	0

геномах – четыре и три соответственно (табл. 2). Геном *L. helveticus* NK1 содержал два CRISPR локуса, а геномы штаммов *L. helveticus* KF4, KF5 и KF6 содержали по одному. Что касается внехромосомной ДНК, то геномы всех исследованных штаммов *L. helveticus* плазмид не содержали.

**Антибиотикорезистентность.** Различные виды лактобацилл широко используются в качестве заквасок или пробиотиков и, как правило, признаны безопасными (имеют статус GRAS). Однако недавние исследования показали, что некоторые штаммы устойчивы к антибиотикам и несут гены антибиотикорезистентности (АР). Некоторые гены АР могут передаваться посредством гори-

зонтального переноса другим бактериям, включая патогенные, тем самым угрожая здоровью человека. Для фенотипической характеристики профиля антибиотикорезистентности (АР) изучаемых штаммов *L. helveticus*, было проведено определение МИК основных классов антибиотиков с помощью Е-стрипов (Е-тест, табл. 4). Сравнение полученных значений МИК с эпидемиологическими точками отсечения для вида *L. helveticus*, показало, что исследуемые в данной работе штаммы характеризовались как чувствительные ко всем группам протестированных антибиотиков, за исключением канамицина из группы аминогликозидов, к которому были устойчивы все три кефирных изолята

**Таблица 4.** Устойчивость штаммов *L. helveticus* к антибактериальным препаратам

Антибиотик	Мишень действия в клетке	МИК, мг/л						Эпидемиологическая точка отсечения EFSA, мкг/мл [28]
		KF4	KF5	KF6	KF7	NK1	H9	
<b>β-лактамы:</b>								
Ампициллин (АМР)	Клеточная стенка	0.064	0.128	0.128	0.032	0.064	0.064	1.0
<b>Аминогликозиды 1 поколения:</b>								
Стрептомицин (S)	Биосинтез белка	1.0	1.0	1.0	0.1	0.01	0.1	16.0
Канамицин (К)		120	120	120	30	30	3	16.0
<b>Аминогликозиды 2 поколения:</b>								
Гентамицин (GEN)	Биосинтез белка	10	10	10	5	1	<0.01	16.0
<b>Макролиды:</b>								
Эритромицин (Е)	Биосинтез белка	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1.0
<b>Линкозамиды:</b>								
Клиндамицин (CD)	Биосинтез белка	0.1	0.5	0.5	0.5	0.08	0.5	1.0
<b>Гликопептиды:</b>								
Ванкомицин (VA)	Клеточная стенка	0.064	0.128	<0.016	0.032	0.064	<0.016	2.0
<b>Тетрациклины:</b>								
Тетрациклин (ТЕ)	Биосинтез белка	0.2	0.5	2.0	0.5	0.1	2.0	4.0
<b>Амфениколы:</b>								
Хлорамфеникол (С)	Биосинтез белка	4.0	1.0	4.0	5.0	0.5	5.0	4.0

со значениями МИК 120 мкг/мл и два изолята из фекал человека (KF7 и NK1) со значениями МИК 30 мкг/мл [28]. Штаммы KF4, KF6, KF7 и H9 также показали устойчивость к хлорамфениколу из группы амфениколов со значениями МИК 4–5 мкг/мл. Показано, что большинство штаммов *L. helveticus* из кисломолочных продуктов обнаруживали устойчивость к ванкомицину, ципрофлоксацину и триметоприму [29]. При этом из 11 штаммов *L. helveticus*, выделенных из ферментированного молока из разных районов Китая, восемь оказались устойчивыми к канамицину и пять к хлорамфениколу, со значениями МИК от 64 до 128 мкг/мл и от 8 до 32 мкг/мл соответственно [29].

Основным механизмом устойчивости МКБ к аминогликозидам является модификация молекулы антибиотика (ферментативная инактивация) бактериальными аминогликозид-модифицирующими ферментами (АМФ) [30]. Известны три группы АМФ: ацетилтрансферазы (ААС), присоединяющие молекулу уксусной кислоты; фосфотрансферазы (АРН), присоединяющие молекулу фосфорной кислоты; нуклеотидил- или аденилилтрансферазы (АНТ), присоединяющие молекулу нуклеотида аденина. Два гена устойчивости к канамицину, *aph(3')*, кодирующие аминогликозид-3'-фосфотрансферазу (АРН, КФ: 2.7.1.95) были обнаружены в геномах только кефирных изолятов *L. helveticus* (KF4, KF5 и KF6), тогда как ген устойчивости к аминогликозидным антибиотикам, кодирующий аминогликозид-N(3')-ацетилтрансферазу (ААС, КФ: 2.3.1.81) присутствовал в геномах всех штаммов (табл. 5).

Устойчивость к амфениколам обусловлена наличием в бактериальных геномах гена *cat*, кодирующего хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (САТ, КФ: 2.3.1.28). Фермент катализирует присоединение ацетильной группы ацетил-КоА к 3-гидроксильной группе хлорамфеникола, препятствуя тем самым связыванию молекулы антибиотика с рибосомами [31].

Ген *cat* был обнаружен в геномах только двух кефирных штаммов KF4 и KF6 (табл. 5) со значениями МИК для хлорамфеникола 4 мкг/мл (табл. 4). Однако в геномах штаммов из фекал NK1 и H9 данный ген обнаружен не был, между тем как оба штамма были устойчивы к хлорамфениколу со значениями МИК 5 мкг/мл (табл. 4). По всей видимости, резистентность данных штаммов может быть обусловлена другим механизмом АР.

*In silico* анализ генов АР с помощью сервера CARD и KEGG-аннотации показал наличие в геномах *L. helveticus* также возможных детерминант антибиотикорезистентности к β-лактамам (табл. 5). В геномах всех штаммов *L. helveticus* были обнаружены гены, которые были распознаны как β-лактамазы классов А (PenP) и С (AmpC), являющиеся сериновыми гидролазами.

Однако к ампициллину все штаммы показали чувствительный фенотип, только у двух штаммов KF5 и KF6 значение МИК было несколько выше, чем у остальных — 0.128 мкг/мл против 0.032–0.064 мкг/мл (табл. 4). Интересно, что геномы именно этих штаммов содержали ген β-лактамазы PenP (TEM-116), отсутствовавший в геномах остальных изолятов *L. helveticus*. Также в геномах *L. helveticus* были обнаружены гены *mdtG*, *merA* и *sugE*, кодирующие эффлюкс насосы (оттока) семейств MFS (Major Facilitator Superfamily), MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion) и SMR (Small Multi-drug Resistance) соответственно (табл. 5), которые являются универсальным инструментом, защищающим бактериальную клетку от негативного воздействия множества самых разнообразных антибиотиков [32]. Так MerA подобно другим транспортерам MATE экспортирует множество соединений, которые структурно разнообразны, но имеют общие характеристики. Обычно субстратами MerA являются гидрофобные, ароматические, имеющие положительный заряд соединения. MerA, как было обнаружено, сверхэкспрессируется в штаммах *Staphylococcus aureus* с повышенной устойчивостью к различным антибиотикам [33]. Насос оттока SugE подсемейства SMR ответственен за устойчивость к дезинфицирующим средствам, в частности к четвертичным аммониевым соединениям [34].

Таким образом, наличие генов АР в геномах *L. helveticus* не обязательно гарантирует устойчивость, и наоборот, как было показано ранее в ряде исследований [35], где авторы отмечают широкую вариабельность среди штаммов лактобактерий и наличие противоречия между генотипом и фенотипической устойчивостью.

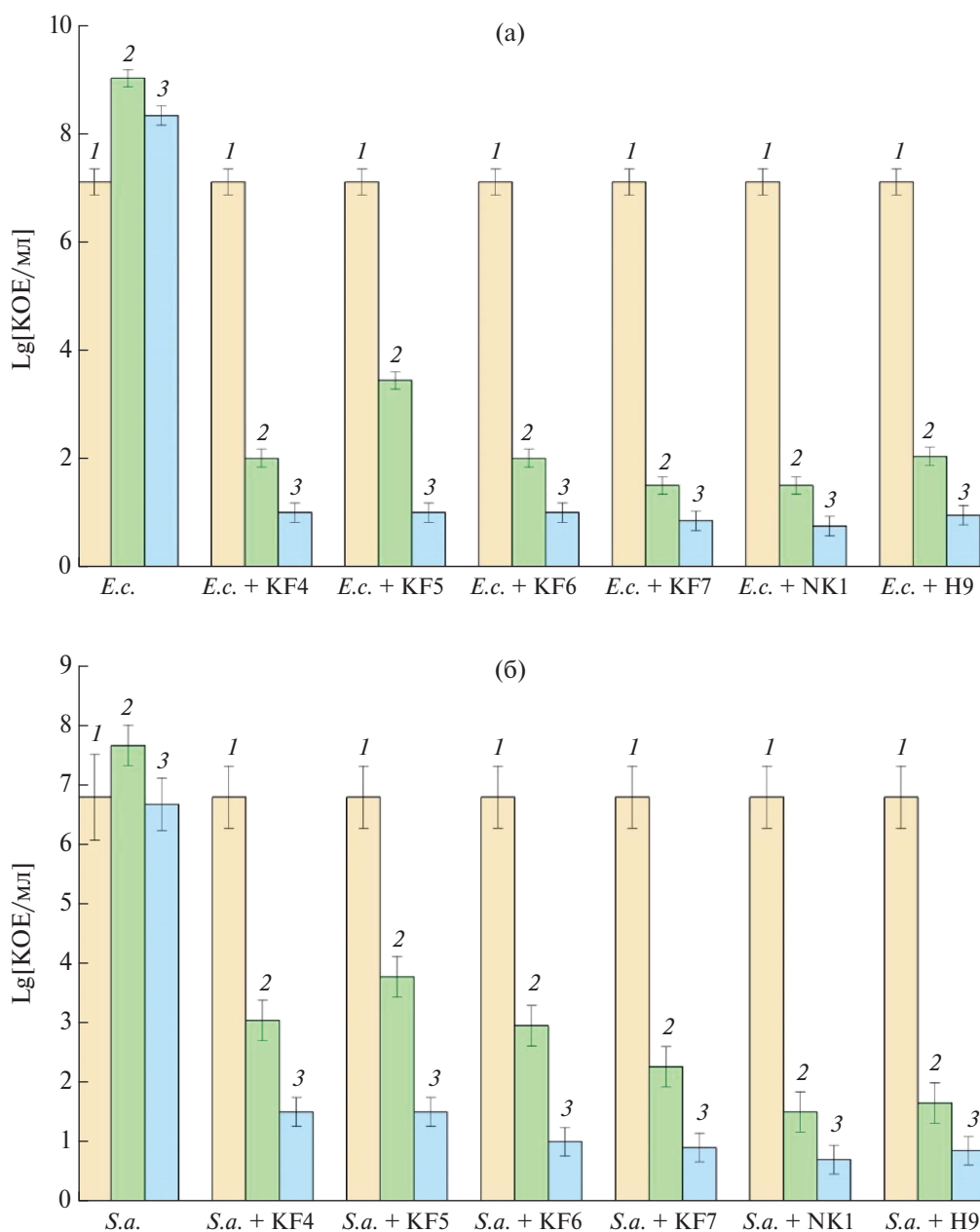
**Антимикробная активность.** Была исследована антагонистическая активность штаммов *L. helveticus* в отношении тест-культур *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 методом совместного культивирования (рис. 2). Все штаммы *L. helveticus* показали схожее ингибирование роста *E. coli*: через 48 ч со-культивирования количество клеток снижалось на 90% по сравнению с ростом в монокультуре (рис. 2а). В отношении *S. aureus* изоляты из фекал человека (KF7, NK1 и H9) проявляли чуть более выраженный антагонистический эффект, чем кефирные изоляты (KF4, KF5 и KF6) — соответственно 80 и 90% ингибирования роста через 48 ч со-культивирования (рис. 2б).

Известно, что лактобактерии могут продуцировать бактериоцины — семейство рибосомально-синтезируемых и секретируемых пептидов, обладающих антимикробной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, включая такие как *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*,

Таблица 5. *In silico* анализ генов антибиотикорезистентности (резистомы) штаммов *L. helveticus*

Белок	Ген	KF4	KF5	KF6	KF7	NK1	H9
Ферментативная модификация β-лактамов							
β-лактамаза AmpC	<i>pbpX1</i>	MDY0991265	MEB2873771	MDY1001930	MDY0875122	MBU5981399	MBU6034126
β-лактамаза PenP	ни*	MDY0991289	MEB2873809	MDY1001968	MDY0875181	MBU5980953	MBU6034182
β-лактамаза AmpC	<i>pbpX2</i>	MDY0991532	MEB2874053	MDY1002212	но	MBU5980822	но
β-лактамаза AmpC	ни	MDY0991601	MEB2874122	MDY1002281	MDY0875460	MBU5980507	MBU6034433
β-лактамаза AmpC	<i>ampC</i>	MDY0991717	MEB2874253	MDY1002416	MDY0874617	но	но
β-лактамаза AmpC	<i>flp</i>	MDY0991919	MEB2874440	MDY1002607	MDY0875219	но	MBU6034207
β-лактамаза AmpC	<i>pbpX1</i>	MDY0991979	MEB2874498	MDY1002660	MDY0875609	MBU5981530	MBU6034533
β-лактамаза PenP (TEM-116)	ни	но**	MEB2874843	MDY1002969	но	но	но
Ферментативная модификация аминокликозидов							
Аминогликозид 3'-фосфотрансфераза APH	<i>aph(3')</i>	MDY0992368	MEB2874883	MDY1003094	но	но	но
Аминогликозид 3'-фосфотрансфераза APH	<i>aph(3')</i>	MDY0992349	MEB2874892	MDY1003033	но	но	но
Аминогликозид-N(3')-ацетилтрансфераза AAC(3)	<i>yokD</i>	MDY0992320	MEB2874836	MDY1003001	MDY0876261	MBU5981591	MBU6035252
Ферментативная модификация амфениколов							
Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза CAT	<i>cat</i>	MDY0992398	но	MDY1003053	но	но	но
Модификация пептидогликана (мишень гликопептидных антибиотиков)							
Белок семейства VanZ	<i>vanZ</i>	MDY0992114	MEB2874632.1	MDY1002795	но	MBU5980650	MBU6033883
Эффлюксные насосы (отток антибиотиков и лекарственных средств из клетки)							
MFS транспортер MdtG	<i>mdtG</i>	MDY0991338	MEB2873858	MDY1002017	MDY0875438	но	MBU6034399
MATE транспортер MepA	<i>mepA</i>	MDY0991597	MEB2874118	MDY1002277	MDY0875464	MBU5980503	MBU6034430
SMR транспортер	<i>sugE</i>	MDY0991253	MEB2873783	MDY1001942	MDY0875109	но	MBU6034115

\* ни – ген не известен; \*\* но – ген не обнаружен.



**Рис. 2.** Изменение количества клеток *E. coli* ATCC 25922 (а) и *S. aureus* ATCC 6538 (б) в монокультурах (*E. coli* и *S. aureus*) и при со-культивировании со штаммами *L. helveticus* KF4, KF5, KF6, KF7, NK1 и H9: 1, 2 и 3 – 0, 24 и 48 ч культивирования соответственно.

*Listeria innocua* и др. [36–38]. Проведенный с использованием веб-сервера BAGEL v.4.0 *in silico* анализ показал наличие в геномах *L. helveticus* нескольких генных кластеров бактериоцинов (BGCs, *англ.* Bacteriocin Gene Clusters) (табл. 6), которые были аннотированы как: (1) кластер генов, участвующих в биосинтезе бактериоцина класса III – энтеролизина А (Ent\_A); (2) кластеры генов, кодирующие бактериоцин класса III – гельветицин J (Hel\_J). Класс III бактериоцинов – эндолизины, включает термолабильные высокомолекулярные белки ( $M_r \geq 30$  кДа), обладающие лизоцим-подоб-

ной активностью в отношении клеточных стенок бактерий [39]. Показано, что геномы различных изолятов *L. helveticus* содержали преимущественно кластеры эндолизинов класса III [40].

**Гены протеолитической системы.** Протеолитические ферменты, продуцируемые молочнокислыми бактериями, представляют особый интерес, поскольку обуславливают не только органолептические и структурно-механические характеристики ферментированных продуктов, но также оказывают влияние на их функциональные свойства и биологическую ценность [41, 42].

**Таблица 6.** *In silico* анализ генных кластеров бактериоцинов (BGC) в геномах *L. helveticus* с использованием веб-сервера BAGEL v.4.0

BGC	Бактериоцин	Класс	Наличие в геноме <i>L. helveticus</i>					
			KF4	KF5	KF6	KF7	NK1	H9
Ent_A	Энтеролизин А	III	+	+	+	+	+	+
Hel_J	Гельветицин J	III	+	+	+	+++*	+	++

\* Наличие 2 кластеров бактериоцинов.

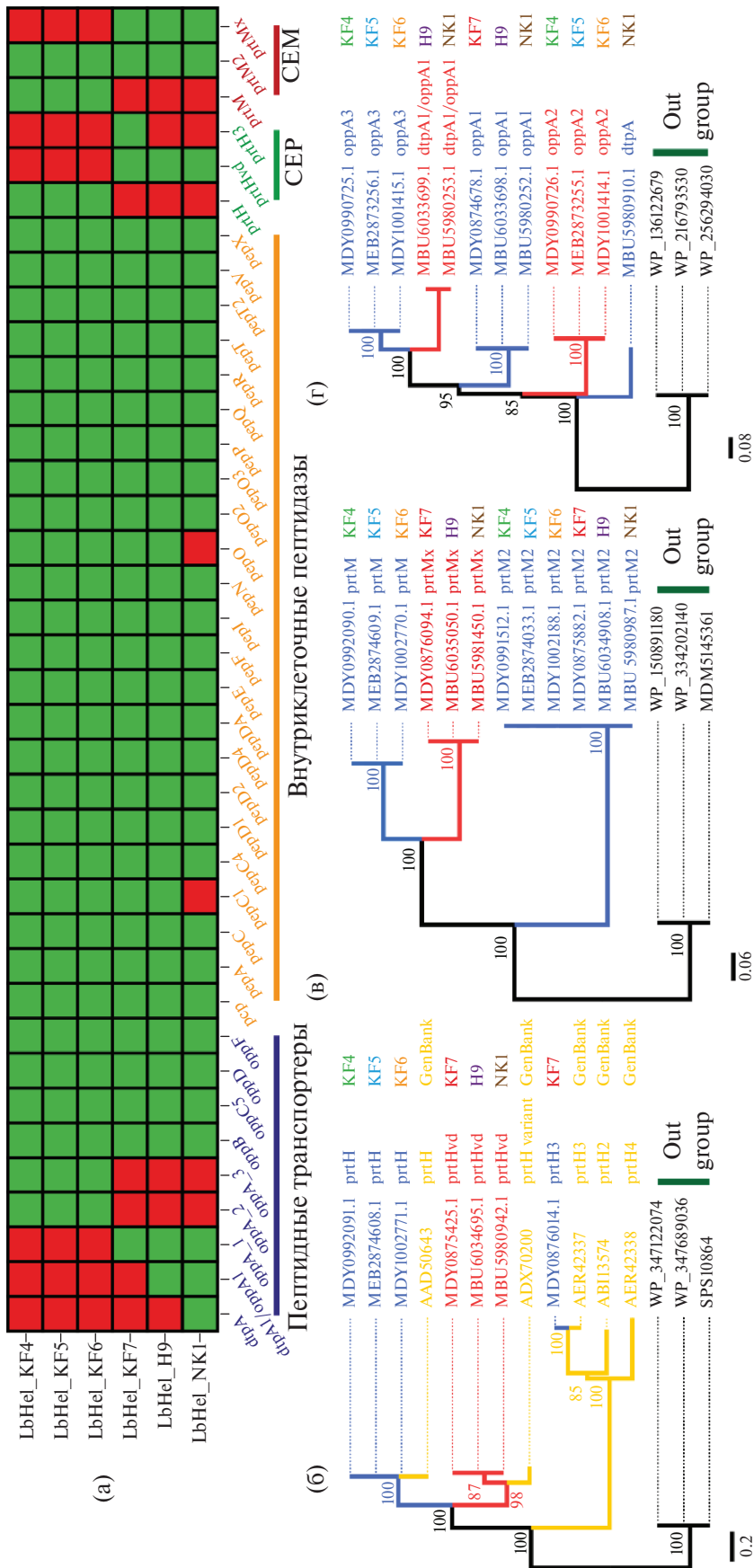
*L. helveticus*, как и большинство молочнокислых бактерий, являются ауксотрофными микроорганизмами, которые не могут самостоятельно синтезировать полный набор из 20 протеиногенных аминокислот. Для своего роста и развития недостающие аминокислоты лактобактерии должны получать из естественной среды обитания, где доступное содержание аминокислот обычно невелико. Для снабжения клеток аминокислотами лактобактерии синтезируют широкий спектр протеолитических ферментов, которые осуществляют гидролиз белков до соединений, поглощаемых бактериальной клеткой. *L. helveticus* обладают хорошо развитой протеолитической системой, которая включает: (1) связанные с клеточной стенкой сериновые протеиназы семейства S8 (СЕР – Cell Envelope Proteinase), которые являются мономерными белками с молекулярной массой 180–190 кДа и гидролизуют молочные белки до олигопептидов и пептидов вне клетки; (2) специфические транспортные системы для переноса олигопептидов и пептидов через цитоплазматическую мембрану; (3) внутриклеточные пептидазы, которые далее расщепляют поступившие в клетку олигопептиды и пептиды до свободных аминокислот [43–45].

Сравнительный анализ генов, кодирующих белки протеолитической системы штаммов *L. helveticus* KF4, KF5, KF6, KF7, NK1 и H9, имеющих разные источники происхождения, показал наибольшую изменчивость в генах, кодирующих СЕР и системы транспорта олигопептидов. Набор генов, кодирующих внутриклеточные пептидазы, был практически идентичен – изоляты содержали 23 гена, за исключением штамма NK1, в геноме которого отсутствовали два гена внутриклеточных пептидаз *perC1* и *perO* (рис. 3а).

В настоящее время у *L. helveticus* можно выделить 5 генотипов СЕР – PrtH, PrtHv, PrtH2, PrtH3 и PrtH4. Филогенетическое дерево, основанное на аминокислотных последовательностях известных вариантов СЕР, а также обнаруженных в геномах,

исследуемых в настоящей работе штаммов *L. helveticus*, представлено на рис. 3б. Геномы кефирных изолятов *L. helveticus* KF4, KF5 и KF6 содержали гены, кодирующие классический тип СЕР – PrtH. Это первая, обнаруженная сериновая протеиназа *L. helveticus*, и долгое время PrtH считался наиболее распространенным типом СЕР у этого вида лактобактерий. Позднее был обнаружен новый подтип СЕР *L. helveticus*, который считался аллельным вариантом PrtH2, и протеиназа PrtH2 была объявлена наиболее распространенным паралогом СЕР вместо PrtH [46]. Однако спустя некоторое время было доказано, что недавно обнаруженная СЕР не аллельный вариант PrtH2, а новый паралог СЕР – PrtH3 [47]. В настоящем исследовании ни в одном из геномов *L. helveticus* не был обнаружен ген, кодирующий PrtH2, и только один штамм KF7 содержал паралог PrtH3. Примечательно, что геномы штаммов *L. helveticus* KF7, NK1 и H9, выделенных из фекал, содержали новый обнаруженный в этом исследовании тип СЕР – PrtHvd (рис. 3а, 3б). Ранее в нескольких исследованиях сообщалось об обнаружении паралога PrtHv (PrtH variant) – типа СЕР *L. helveticus*, который на филогенетическом дереве образовывал сестринскую с PrtH кладу [48–50]. Интересно, что PrtHv оказался преобладающим паралогом СЕР в штаммах *L. helveticus*, выделенных из традиционных ферментированных молочных продуктов Монголии, Китая и Тибета, что предполагает наличие географических закономерностей в распределении различных типов СЕР у вида *L. helveticus* [49]. Протеиназа СЕР, обнаруженная в работе и обозначенная как PrtHvd (PrtHv deletion), схожа с PrtHv (рис. 3б). Основное различие между ними заключалось в наличии разрыва примерно в 250 аминокислот – с Asp1590 по Val1816. Отсутствующий фрагмент аминокислотной последовательности у паралога PrtHvd представлял собой гипотетический домен Н (helix domain), состоящий из 9  $\alpha$ -спиралей [50]. Предположительно домен Н может служить спейсером, облегчающим

**Рис. 3.** Белки протеолитической системы штаммов *L. helveticus* KF4 (LbHel\_KF4), KF5 (LbHel\_KF5), KF6 (LbHel\_KF6), KF7 (LbHel\_KF7), NK1 (LbHel\_NK1) и H9 (LbHel\_H9) (а, зеленым обозначено присутствие, красным – отсутствие). Филогенетические деревья связанных с клеточной стенкой сериновых протеиназ семейства S8 (б), белков созревания (в) и субстратсвязывающих белков транспортных систем олигопептидов (г) штаммов *L. helveticus*; СЕР – связанные с клеточной стенкой сериновые протеиназы семейства S8; СЕМ – белки созревания, ассоциированные с клеточной стенкой.



позиционирование СЕР на поверхности клеточной стенки [51].

Помимо СЕР, каждый штамм *L. helveticus* сохранил также по два гена, кодирующих белки созревания, ассоциированных с клеточной стенкой (СЕМ, cell envelope-associated maturation protein). Последние являются внеклеточными шаперонами, которые активируют СЕР отщеплением N-концевой части молекулы. В геномах штаммов *L. helveticus*, изученных в данном исследовании были обнаружены три различных типа СЕМ — PrtM, PrtM2 и PrtMx. В то время как PrtM и PrtM2 ранее были описаны в других штаммах *L. helveticus* [47], PrtMx является новым, идентифицированным в этом исследовании, типом СЕМ. Ранее предполагалось, что белок PrtM необходим для активации PrtH, тогда как паралог СЕР, активируемый PrtM2, остается неизвестным [48]. Полученные результаты также предполагают, что PrtM активирует паралог PrtH, поскольку присутствует только в штаммах, содержащих PrtH (рис. 3а, 3в). Аналогично белок PrtMx может быть необходим для активации паралога PrtHvd. Интересно, что гены PrtMx образуют сестринскую кладу с генами, кодирующими PrtM (рис. 3в). Возможно, что пара PrtMx–PrtHvd одновременно произошла из пары PrtM–PrtH. Ген, кодирующий PrtM2, был обнаружен в геномах всех исследованных штаммов, но активируемый им тип СЕР остается неясным.

Что касается систем транспорта олигопептидов у *L. helveticus*, то все штаммовые отличия касались генов *oppA*, кодирующих пептид-связывающие белки. В геномах *L. helveticus* было обнаружено пять различных паралогов *oppA* (рис. 3а, 3г). В то время как гены *oppB* и *oppC*, кодирующие трансмембранные домены АВС-транспортера, а также *oppD* и *oppF*, кодирующие АТФ-связывающие домены транспортной системы, были представлены одной копией у всех исследованных штаммов. Сравнение генов, аннотированных с помощью EggNOG как гены типа *oppA*, с существующими опубликованными аннотациями позволило более точно идентифицировать два гена — *dtpA* и *dtpA1/oppA1* [52]. Ранее было показано, что ген *dtpA1/oppA1* индуцировался во время роста *L. helveticus* CNRZ32 в бульоне MRS, в то время как *dtpA* не был дифференциально экспрессирован во время роста этого штамма на молоке или MRS среде [52]. К сожалению, не удалось найти опубликованной информации о других генах типа *oppA*, хотя хорошо известно, что белки, связывающие олигопептиды, служат шлюзом для поглощения пептидов. В то же время ни их специфичность и аффинность связывания, ни паттерны экспрессии в настоящее время не изучены достаточно хорошо. Учитывая разнообразие генов типа *oppA* в штаммах *L. helveticus*, дальнейшие функциональные исследования этих генов и их белковых продуктов могут стать новым шагом на пути способности

контролировать состав пептидов, продуцируемых протеолитической системой *L. helveticus*.

**Ферментация молока штаммами *L. helveticus*.** Штаммы *L. helveticus* в течение 12 ч культивирования закисляли молоко до значений pH 4.0–4.5 (рис. 4а), что вызывало коагуляцию казеина и образование сгустка. При этом значения КОЕ достигали  $(3.0–5.0) \times 10^8$  (рис. 4б), исключением был штамм NK1, у которого максимум роста биомассы наблюдался через 24 ч культивирования —  $4.0 \times 10^8$  КОЕ/мл. Из всех штаммов наименее активным ростом на молоке характеризовался кефирный изолят KF6 —  $(3.0–5.0) \times 10^7$  КОЕ/мл. При этом два других кефирных изолята *L. helveticus* (штаммы KF4 и KF5) характеризовались активным ростом и устойчивостью к низким значениям pH, по сравнению с остальными изолятами. Так после 12 ч культивирования штаммов KF4 и KF5 значение КОЕ, достигнув максимума, не падало, при этом кислотность продолжала нарастать до значений pH 3.2–3.5 к концу культивирования (рис. 4а, 4б). Наименьшую кислотоустойчивость продемонстрировал штамм NK1.

Самые высокие значения протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активности через 24 ч ферментации молока были продемонстрированы для изолятов из фекал NK1 и KF7 — 15–16 ммоль эквивалентов L-лейцина/л, 1280–1380 мкмоль эквивалентов тролокса/л и  $IC_{50}$  в диапазоне 40–80 мг/л соответственно (рис. 4в, табл. 7). Все три кефирных изолята KF4, KF5 и KF6 имели сопоставимые протеолитическую, антиоксидантную и АПФ-ингибирующую активности — около 10 ммоль эквивалентов L-лейцина/л, 800 мкмоль эквивалентов тролокса/л и  $IC_{50}$  примерно 100 мг/л соответственно. Штамм H9 имел схожую с кефирными изолятами протеолитическую и антиоксидантную активности, однако АПФ-ингибирующая была заметно выше —  $IC_{50}$  примерно 60 мг/л (рис. 4в, табл. 7).

Ранее было показано, что при ферментации коровьего молока [53] и злаковых суспензий [54] различными видами лактобактерий значения антиоксидантной активности в общем коррелировали со степенью протеолиза, в то время как АПФ-ингибирующая активность нет. Так наиболее высокие значения АПФ-ингибирующей активности показали изоляты из фекал — штаммы KF7, H9 и NK1, имеющие паралог СЕР prtHvd. В то же время из этих трех штаммов самой высокой гипотензивной активностью ( $IC_{50}$  43 мг/л) обладал изолят KF7, имеющий дополнительно паралог СЕР prtH3 (рис. 3а, 3в). Предположительно штаммы *L. helveticus*, экспрессирующие несколько СЕР, демонстрируют большую степень гидролиза казеина, чем те, которые экспрессируют один паралог [55]. Действительно штамм KF7, имеющий в геноме 2 гена, кодирующих СЕР — *prtHvd* и *prtH3*,

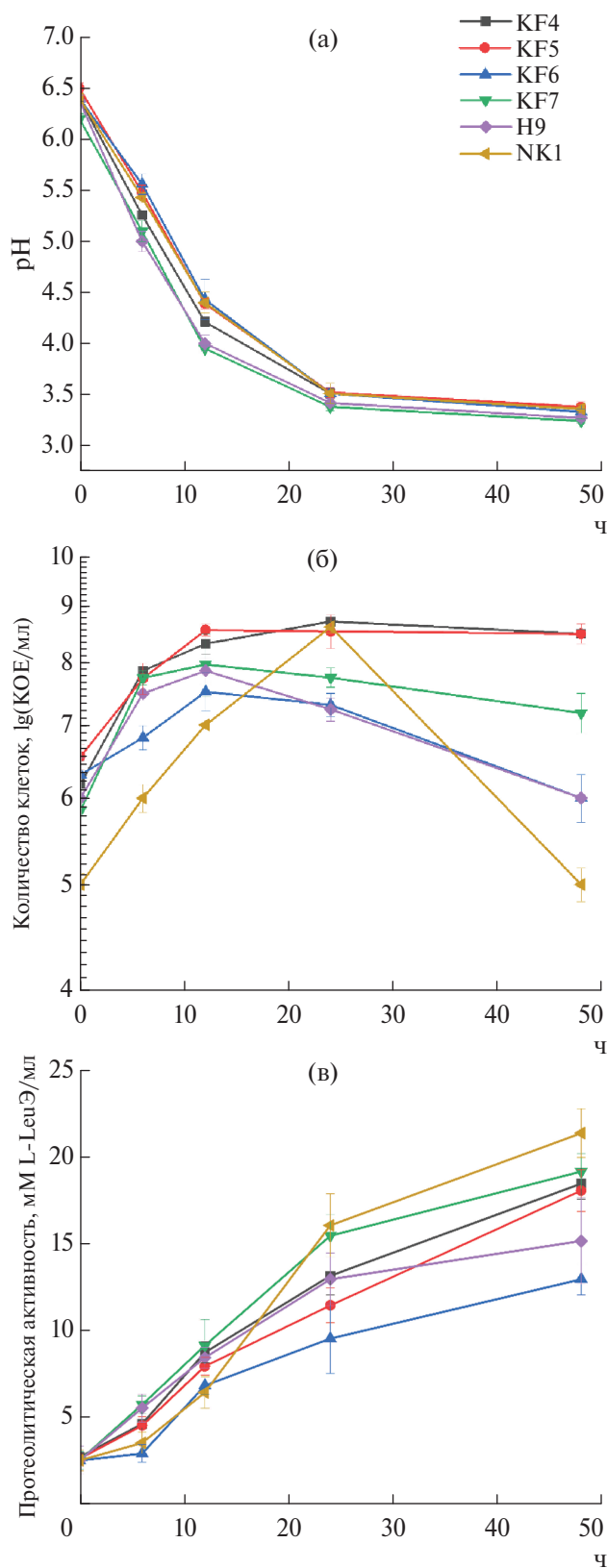


Рис. 4. Динамика pH (а), кривые роста (б) и изменение степени протеолиза (в) при ферментации коровьего молока штаммами *L. helveticus*.

имел более высокую протеолитическую активность (рис. 4в), по сравнению с остальными штаммами, имеющими 1 ген СЕР (рис. 3б). Только штамм NK1 через 24 ч ферментации молока имел сопоставимую с KF7 протеолитическую активность (табл. 7), однако количество клеток NK1 при этом было на порядок выше –  $4.0 \times 10^8$  КОЕ/мл, по сравнению с KF7 –  $2.0 \times 10^7$  КОЕ/мл (рис. 4б).

**Анализ белков *L. helveticus* в ферментированном молоке.** Поскольку штаммы KF4, KF5 и KF6, выделенные из кефирного грибка, имели идентичный состав генов, кодирующих белки протеолитической системы *L. helveticus* (рис. 3), то для проведения протеомного и пептидного анализа ферментированного молока был выбран штамм KF5. Протеомный анализ показал, что в процессе ферментации молока штаммами *L. helveticus* KF5, KF7, NK1 и H9 секретируются все сериновые протеазы (СЕР) и белки созревания (СЕМ), гены которых были обнаружены в геномах данных изолятов: prtH, prtM и prtM2 в образцах ферментированных KF5; prtHvd, prtH3, prtM2 и prtMx в образцах KF7; prtHvd, prtM2 и prtMx в образцах NK1 и H9. Что касается белков транспортных систем, то в анализируемых образцах молока, ферментированного *L. helveticus* KF5 была идентифицирована субстратсвязывающая субъединица оррА3 (рис. 3а, 3г) АВС-транспортера олигопептидов. В случае остальных штаммов (KF7, NK1 и H9) был обнаружен субстратсвязывающий белок оррА1 АВС-транспортера олигопептидов (рис. 3а, 3г).

В образцах молока ферментированного штаммами KF5, KF7 и H9 также был идентифицирован субстратсвязывающий компонент PstS комплекса pstSCAB – транспортера АВС-типа, участвующего в импорте фосфата ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) [56]. Действительно все штаммы *L. helveticus* при биохимическом скрининге показали высокую активность внеклеточной кислой фосфатазы и нафтол-AS-VI-фосфогидролазы (табл. 1), способствующие высвобождению фосфорилированных групп. Бактерии транспортируют неорганический фосфат с помощью высокоаффинной системы транспорта PstSCAB, состоящей из четырех белковых компонентов PstS, PstC, PstA и PstB. PstS, специфически связывают фосфат. PstC и PstA являются трансмембранными доменами, образующими мембранный канал, а PstB – нуклеотидсвязывающим и гидролизующим АТФ доменом (АТФаза), активизирующим транспорт фосфатов внутрь клетки. В геномах всех 6 штаммов *L. helveticus* идентифицирован оперон pstSCAB, аналогично *Bacillus subtilis* имеет две копии PstB (PstB1 и PstB2) [57]. В образцах штаммов KF7, NK1 и H9 был также идентифицирован связывающий фосфат белок PhnD высокоаффинной транспортной системы PhnDCE [56]. Геномы всех 6 штаммов *L. helveticus* содержат кластер *phnDCE*, кодирующий дополнительный АВС-транспортер фосфата, состоящий из трех структурных белков.

**Таблица 7.** Степень протеолиза, антиоксидантная и АПФ-ингибирующая активности штаммов *L. helveticus* через 24 ч ферментации молока

Штамм	Степень протеолиза, ммоль L-лейцина/л	Активность	
		антиоксидантная, ТЕАС, ммоль тролокса/л	АПФ-ингибирующая, IC <sub>50</sub> , мг белка/л
KF4	13.1 ± 1.1	788.6 ± 38.9	103.58 ± 5.58
KF5	11.4 ± 1.0	812.7 ± 45.6	110.61 ± 12.15
KF6	7.5 ± 2.0	795.4 ± 43.3	113.66 ± 10.63
KF7	<b>15.4 ± 1.2</b>	<b>1380.5 ± 39.2</b>	<b>42.75 ± 4.9</b>
H9	12.9 ± 1.5	805.7 ± 37.1	61.57 ± 16.8
NK1	<b>16.0 ± 1.8</b>	<b>1283.7 ± 48.5</b>	83.45 ± 14.27

В образцах молока ферментированного штаммами KF5, KF7 и H9 был идентифицирован субстратсвязывающий белок глицерол-3-фосфатного (глицерол-3-Р, **G3P**) ABC-транспортера. G3P образуется в результате гидролиза фосфодиэстеразами эфирной связи фосфолипидов [58]. Фосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозитол) являются компонентами молочного жира. В геномах штаммов KF5, NK1 и H92 обнаружено по 2 гена, кодирующих глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразы (КФ: 3.1.4.46, **GDPD**, glycerophosphodiester phosphodiesterase), которые гидролизуют глицерофосфодиэфиры — промежуточные продукты катаболизма фосфолипидов, до G3P и соответствующего спирта [58]. В геномах штаммов KF4, KF6 и KF7 присутствует по 4 гена **GDPD**.

В супернатантах ферментированного молока были обнаружены ферменты гликолитического пути (Эмбдена–Мейергофа–Парнаса), такие как глюкозо-6-фосфат изомераза GPI (все штаммы), фруктозо-1,6-бисфосфата альдолаза Fba2 (все штаммы), триозофосфатизомераза Tri (только штамм KF7), фосфоглицераткиназа Pck (штаммы KF7 и H9) и енолаза Eno (все штаммы). Также в образцах ферментированного молока были идентифицированы рибосомные белки и ко-шаперон GroES (штаммы KF7 и H9). В работе [59] показано, что при росте *L. helveticus* CICC22171 на средах с молочным казеином в качестве источника азота происходит значительная стимуляция экспрессии систем транскрипции и трансляции белков, а также ферментов гликолиза. Между тем различные ферменты углеводного обмена, рибосомные белки и шапероны, обнаруживаются, как в белковом профиле S-слоя (сурфактомах), так и в экзопротеомах лактобактерий [52, 60, 61], являясь белками с “мунлайтинг” функциями [62]. Кроме того, среди идентифицированных белков штамма *L. helveticus* KF7 были обнаружены глюкозамин-6-фосфатдеаминаза (КФ:3.5.99.6; NagB; MDY0875526), аспартат/метионин/тирозиламинотрансфераза

(AspC; MDY0874743) и L-лактатдегидрогеназа (КФ:1.1.1.27; Ldh; MDY0874914). В работе [63] показано, что высоко адгезивный штамм *Lactiplantibacillus pentosus* из ферментированных зеленых оливок, содержит на поверхности клеток более высокий уровень NagB, по сравнению с менее адгезивными штаммами, выделенными из того же источника [63].

В ферментированном молоке обнаружены белки поверхностного слоя (S-слоя) *L. helveticus* — SlpA (все 4 штамма) и SlpX (только KF5), а также фолдаза PrsA — мембранно-связанный липопротеин, который играет ключевую роль в посттрансляционном фолдинге секретируемых белков [64]. Следует отметить, что ген *slpX* обнаружен в геномах только кефирных изолятов *L. helveticus* — KF4, KF5 и KF6. Белки S-слоя защищают клетки лактобактерий от неблагоприятных условий внешней среды, а также играют ключевую роль в молекулярных механизмах, ответственных за их пробиотические свойства. Так белки S-слоя *L. helveticus* участвуют в ко-агрегации клеток с патогенами и другими молочнокислыми бактериями. Удаление S-слоя снижало ко-агрегацию штамма *L. helveticus* 34.9 со всеми протестированными бактериальными культурами — *Lactiplantibacillus plantarum* BR9, *Lactococcus lactis* 19.3, *Lactobacillus acidophilus* IBB801, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911-1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Bacillus cereus* СВAB, *Bacillus subtilis* В17 и *E. coli* ATCC 25922), а также уменьшало адгезию к клеткам млекопитающих [65]. Кроме того, белки поверхностного слоя *Lactobacillus* spp. стимулировали экспрессию антимикробных пептидов β-дефензинов в эпителиальных клетках толстой кишки человека Caco-2 [66] и защищали клетки организма-хозяина от вирусной инфекции [67]. Белки S-слоя лактобактерий кефира обладают противовоспалительными свойствами и снижают ожирение, вызванное диетой с высоким содержанием жиров [68].

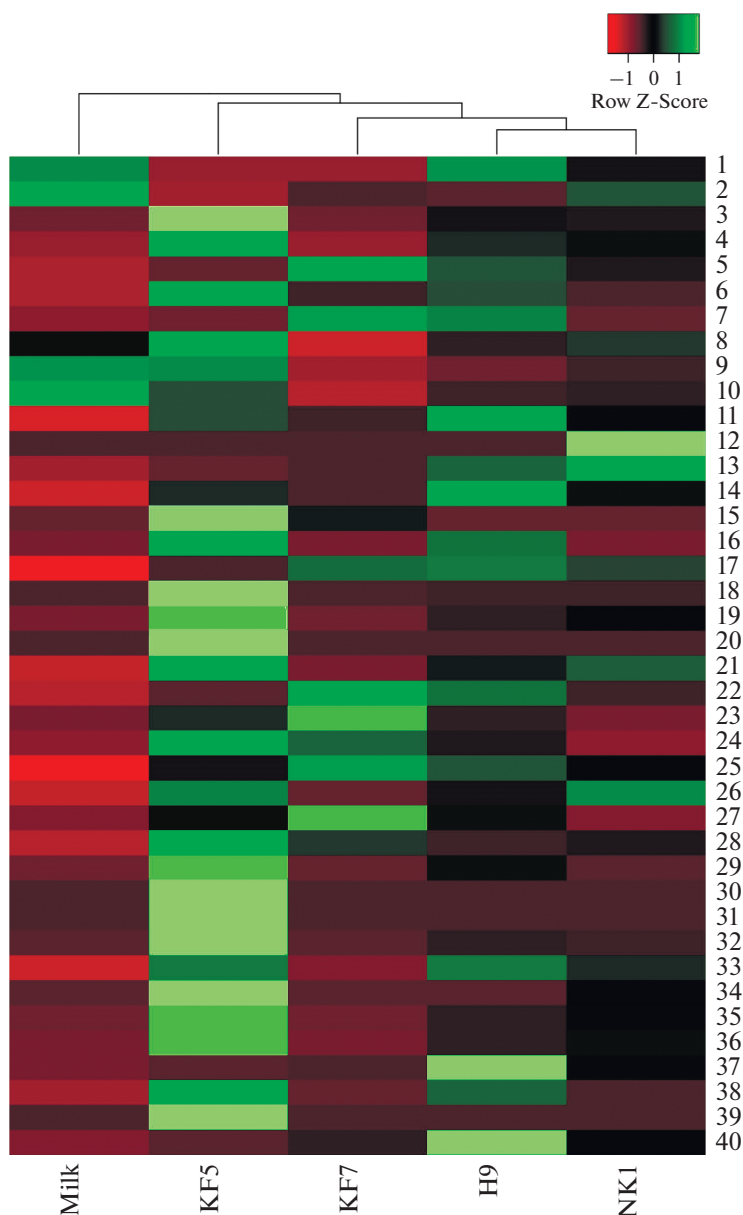
Показано, что белки S-слоя лактобактерий обладают эндопептидазной и гидролазной актив-

ностью [69, 70]. Действительно среди идентифицированных белков *L. helveticus* присутствовали гликозид-гидролазы семейства GH25 CAZy, обладающие активностью подобной лизоциму, а также эндопептидазы С40 семейства (NlpC/P6 пептидогликангидролазы), участвующие в биогенезе и ремоделировании клеточных стенок [71].

**Анализ биопептидов ферментированного молока.** В результате секвенирования геномов в исследовании были обнаружены штаммы *L. helveticus* с различными генотипами протеолитической системы ферментов. Более того, были обнаружены необычные штаммы KF7, NK1 и H9, выделенные

из фекал человека, которые содержали паралоги СЕР (PrtHvd) и СЕМ (PrtMx), о которых ранее не сообщалось. Генетическое биоразнообразие паралогов СЕР внутри вида *L. helveticus* может влиять на скорость роста, протеолитическую активность и производство биоактивных пептидов [72]. Следующим этапом исследования был анализ наличия взаимосвязи между генотипом протеолитических систем штаммов *L. helveticus* KF5, KF7, H9 и NK1, профилем образующихся биопептидов и биологической активностью ферментированного молока.

На рис. 5 представлена цветовая дендрограмма (“heatmap”) известных биопептидов, иденти-



**Рис. 5.** Цветовая дендрограмма “Heatmap” и иерархический кластерный анализ биопептидов, дифференциально представленных в образцах молока ферментированного штаммами *L. helveticus* KF5, KF7, H9 и NK1 ( $p < 0.05$ ). Нумерация пептидов на диаграмме соответствует табл. 8.

**Таблица 8.** Биопептиды, идентифицированные в составе ферментированного штаммами *L. helveticus* молока

№ п/п	Пептид	Белок/интервал	Длина	Активность*	Ссылка
1	FFVAPFPEVFG	$\alpha$ S1-CN(23-33)	11	1	[75]
2	FFVAPFPEVFGK	$\alpha$ S1-CN(23-34)	11	1	[75]
3	RFFVAPFPEVFGK	$\alpha$ S1-CN(22-34)	13	1	[75]
4	VAPFPEVFGKE	$\alpha$ S1-CN(25-35)	11	1	[76]
5	YKVPQLE	$\alpha$ S1-CN(104-110)	7	1	[75]
6	LYQGPIVLNPWDQVK	$\alpha$ S2-CN(99-114)	15	1	[77]
7	DELQDKIHPF	$\beta$ -CN(43-52)	10	2, 4	[78]
8	SLVYFPFGPIPN	$\beta$ -CN(57-68)	12	1	[76]
9	VYFPFGPIPN	$\beta$ -CN(59-68)	10	1, 2	[77]
10	LVYFPFGPIPN	$\beta$ -CN(58-68)	11	1	[79]
11	NIPPLTQTPVVPPFLQPE	$\beta$ -CN(58-76)	19	2, 5	[73]
12	SLPQNIPPLTQTPVVPPFLQPEV	$\beta$ -CN(69-92)	24	1, 2, 5	[73, 76]
13	SLPQNIPPLTQTPVVPPFLQPEVM	$\beta$ -CN(69-93)	25	1, 2	[73, 76]
14	SLPQNIPPLTQTPVVPPFLQPE	$\beta$ -CN(69-91)	23	1, 2	[73, 76]
15	LPQNIPLTQTPVVPPFLQPEVM	$\beta$ -CN(70-93)	24	1, 2	[73, 76]
16	VKEAMAPK	$\beta$ -CN(98-105)	8	1	[76]
17	EMFPKYPVEPF	$\beta$ -CN(108-119)	12	1	[76]
18	LHLPLLLQS	$\beta$ -CN(133-142)	10	1	[76]
19	LHLPLLLQ	$\beta$ -CN(133-141)	9	1	[76]
20	HLPLLLQS	$\beta$ -CN(134-142)	9	1	[76]
21	NLHLPLLLQ	$\beta$ -CN(132-141)	10	1	[76]
22	SWMHQPHQPLPPT	$\beta$ -CN(142-154)	13	2	[80]
23	WMHQPHQPLPPT	$\beta$ -CN(143-154)	12	1, 3	[80]
24	HQPHQPLPPT	$\beta$ -CN(145-154)	10	1, 3	[80]
25	MHQPHQPLPPT	$\beta$ -CN(144-154)	11	1	[80]
26	HQPHQPLPPTVMFPPQ	$\beta$ -CN(145-160)	16	1, 3	[80]
27	HQPHQPLPPTVMFPPQS	$\beta$ -CN(145-161)	17	1	[80]
28	MHQPHQPLPPTVMFPPQ	$\beta$ -CN(144-160)	17	1	[80]
29	WMHQPHQPLPPTVMFPPQ	$\beta$ -CN(143-160)	18	1	[80]
30	SLSQSKVLPVPQ	$\beta$ -CN(164-175)	12	2	[76]
31	SLSQSKVLPVPQK	$\beta$ -CN(164-176)	13	2	[76]
32	KVLPVP	$\beta$ -CN(169-174)	6	1	[80]
33	VLPVPQKAVPYRQ	$\beta$ -CN(170-182)	13	2	[76]
34	RDMPIQAFL	$\beta$ -CN(183-191)	9	1	[81]
35	RDMPIQAFL	$\beta$ -CN(183-192)	10	1	[81]
36	RDMPIQAFLLY	$\beta$ -CN(183-193)	11	1	[75]
37	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	$\beta$ -CN(191-209)	19	1, 3, 4, 6	[82, 83]
38	LYQEPVLGPVR	$\beta$ -CN(192-202)	11	1,3	[80, 84]
39	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	$\beta$ -CN(192-209)	18	1,6	[82, 83]
40	YQEPVLGPVR	$\beta$ -CN(193-202)	10	1, 2, 3, 4	[80]

Примечание. \* 1 – АПФ-ингибирующая активность; 2 – антиоксидантная активность; 3 – иммуномодулирующая активность; 4 – анти-микробная активность; 5 – противотромботическая активность; 6 – гипохолестеринемическая активность.

фицированных в образцах ферментированного молока (табл. 8). Профиль биопептидов, в значительной степени зависел от используемого штамма *L. helveticus* и генотипа его протеолитической системы (рис. 3 и 5). Наибольшее количество и содержание известных биопептидов обнаружено при ферментации молока штаммом KF5. При этом пептидный профиль KF5 максимально отличался от трех других штаммов, что соответствовало присутствию другого ортолога СЕР (prtH) и субстратсвязывающего белка ABC-транспортера олигопептидов (oprA3). У штаммов H9 и NK1 обнаружено наибольшее содержание биопептидов из таких областей  $\beta$ -казеина, как  $\beta$ -CN(58-93), у KF7 –  $\beta$ -CN(142-161), а у KF5 –  $\beta$ -CN(132-160),  $\beta$ -CN(164-176) и  $\beta$ -CN(183-193). Пептиды из области  $\beta$ -CN(58-93) при дальнейшем моделировании *in vitro* желудочно-кишечного пищеварения расщеплялись с образованием линейки пептидов с более высоким уровнем биологической активности, таких как YQEPVLGPV, YQEPVLGPVR, YQEPVLGVRGPFPI, EPVLGPV, LGPVRGPFPI, GPVRGPF, GPVRGPFPI, RGPFPPIV, GPFPI, LPQNIPPLTQT, NIPPL, NIPPLT, NIPPLTQT, NIPPLTQTP, NIPPLTQTPV, NIPPLTQTPVVVP, NIPPLTQTPVVVPPF, PVVVP и PVVVP [73]. Штамм H9 также имел высокое содержание биопептидов из области  $\beta$ -CN(191-209). Показано, что фракции, обогащенные пептидами из этой области  $\beta$ -казеина, демонстрировали высокие значения АПФ-ингибирующей активности [74]. Интересно, что, не смотря на самое большое количество обнаруженных биопептидов, АПФ-ингибирующая активность у KF5 была несколько ниже, чем у 3 других штаммов *L. helveticus* (табл. 7). Возможно, это связано с тем, что S8 протеиназа prtH – более распространенный паралог СЕР среди известных на настоящий момент изолятов *L. helveticus*, поэтому биопептиды, образующиеся при гидролизе казеинов молока данным типом СЕР лучше изучены.

Таким образом, различия в генах СЕР повлияли на паттерны протеолиза казеинов коровьего молока штаммами *L. helveticus*, что отразилось на длине и количестве пептидных фрагментов, но не на области аминокислотной последовательности белков из которой данные пептиды высвобождаются в результате протеолиза. Аналогичные результаты были показаны в недавней работе [55], где пептидные профили ферментированного штаммами *L. helveticus* ATCC15009, DQHYN-Q32M42 и DYNDL36-6 молока различались, однако пептиды происходили из одних и тех же областей аминокислотных последовательностей казеинов. На крысах со спонтанной гипертензией (SHR) значительный антигипертензивный эффект был показан для молока, ферментированного штаммом *L. helveticus* DQHYN-Q32M42, имеющим в геноме три паралога СЕР – PrtH2, PrtH3 и PrtH4. В настоящем исследовании штамм *L. helveticus* KF7, продуци-

рующий при ферментации молока две протеазы СЕР (PrtHvd и PrtH3) также показал самые высокие значения АПФ-ингибирующей активности (табл. 7).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РФФ 22-16-00108.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oberg T.S., McMahon D.J., Culumber M.D., McAuliffe O., Oberg C.J. // J. Dairy Sci. 2022. V. 105. № 4. P. 2750–2770. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21138>
2. Chelladhurai K., Ayyash M., Turner M.S., Kamal-El-din A. // Trends Food Sci. Technol. 2023. V. 136. P. 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.013>
3. Skrzypczak K., Gustaw W., Wasko A., Banach T. // J. Agric. Sci. Technol. A. 2020. V. 22. № 3. P. 693–707.
4. Sıçramaz H., Güven O.T., Can A., Ayar A., Gül Y. // Curr. Res. Food Sci. 2022. V. 5. P. 1009–1016. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.05.017>
5. Bahrudin M.F., Rani R.A., Tamil A.M., Mokhtar N.M., Raja Ali R.A. // Dig. Dis. Sci. 2020. V. 65. № 2. P. 541–549. <https://doi.org/10.1007/S10620-019-05695-3/FIGURES/5>
6. Kido Y., Maeno S., Tanno H., Kichise Y., Shiwa Y., Endo A. // Microb. Genom. 2021. V. 7. № 4. Article № 000560. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000560>
7. Schuster J.A., Vogel R.F., Ehrmann M.A. // FEMS Microbiol. Lett. 2020. V. 367. № 8. P. 58. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNAA058>
8. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Begunova A.V., Rozhkova I.V., Fedorova T.V. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 20. Article № 10999. <https://doi.org/10.3390/ijms222010999>
9. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L. et al. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 14. P. 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
10. Siguier P. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. Article № 90001. P. D32–D36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>

11. *Arndt D., Grant J.R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y. et al.* // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № W1. P. W16–W21.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
12. *Carattoli A., Zankari E., García-Fernández A., Larsen V.M., Lund O., Villa L. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 7. P. 3895–3903.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
13. *van Heel A.J., de Jong A., Song C., Viel J.H., Kok J., Kuipers O.P.* // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № W1. P. W278–W281.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky383>
14. *Adler-Nissen J.* // *J. Agric. Food Chem.* 1979. V. 27. № 6. P. 1256–1262.
15. *Begunova A.V., Savinova O.S., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Rozhkova I.V., Fedorova T.V.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. № 4. P. 458–467.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683821040037>
16. *De Angelis M., Calasso M., Cavallo N.M., Di Cagno R., Gobbetti M.* // *Proteomics.* 2016. V. 16. № 6. P. 946–962.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.201500117>
17. *Zhang Y., Liang X.F., He S., Feng H., Li L.* // *Aquaculture.* 2022. V. 547 Article № 737405.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737405>
18. *Jawan R., Abbasiliasi S., Mustafa S., Kapri M.R., Halim M., Ariff A.B.* // *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2021. V. 13. № 2. P. 422–440.  
<https://doi.org/10.1007/s12602-020-09690-3>
19. *Ly R., You L., Chen X.* // *Food Biosci.* 2024. V. 62. Article № 105268.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105268>
20. *Darmon E., Leach D.R.F.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014. V. 78. № 1. P. 1–39.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-13>
21. *Siguiet P., Gourbeyre E., Varani A., Ton-Hoang B., Chandler M.* // *Microbiol. Spectr.* 2015. V. 3. № 2.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014>
22. *Kaleta P., O'Callaghan J., Fitzgerald G.F., Beresford T.P., Ross R.P.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 1. P. 212–220.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01845-09>
23. *Callanan M., Kaleta P., O'Callaghan J., O'Sullivan O., Jordan K., McAuliffe O. et al.* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 2. P. 727–735.  
<https://doi.org/10.1128/JB.01295-07>
24. *Schmid M., Muri J., Melidis D., Varadarajan A.R., Somerville V., Wicki A. et al.* // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Article № 63.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00063>
25. *Li B., D. Jin, Evivie S.E., Li N., Yan F., Zhao L., Liu F., Huo G.* // *Toxins.* 2017. V. 9. № 10. Article № 301.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9100301>
26. *Fontana A., Falasconi I., Molinari P., Treu L., Basile A., Vezzi A., Campanaro S., Morelli L.* // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Article № 1380.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01380>
27. *Vandecraen J., Chandler M., Aertsen A., Van Houdt R.* // *Crit. Rev. Microbiol.* 2017. V. 43. № 6. P. 709–730.  
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661>
28. *Guidance on the Assessment of Bacterial Susceptibility to Antimicrobials of Human and Veterinary Importance.* EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). // *EFSA Journal.* 2012. V. 10. № 6. Article № 2740.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>
29. *Guo H., Pan L., Li L., Lu J., Kwok L., Menghe B., Zhang H., Zhang W.* // *J. Food Sci.* 2017. V. 82. № 3.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13645>
30. *Ammor M.S., Belén Flórez A., Mayo B.* // *Food Microbiol.* 2007. V. 24. № 6. P. 559–570.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001>
31. *Егоров А.М., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю.* // *Acta Naturae.* 2018. Т. 10. № 4 (39). С. 33–48.
32. *Назаров П.А., Кузнецова А.М., Каракозова М.В.* // *Вестник Московского Ун-та. Сер. 16. Биология.* 2022. Т. 77. № 4. С. 215–223.  
<https://doi.org/10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-215-223>
33. *Kaatz G.W., McAleese F., Seo S.M.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. P. 1857–1864.
34. *Hrovat K., Zupančič J.Č., Seme K., Avguštin J.A.* // *Trop. Med. Infect. Dis.* 2023. V. 8. № 5. Article № 273.  
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050273>
35. *Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Fedorova T.V.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2024. V. 60. № 6. P. 1223–1229.
36. *Zhang T., Pan Y., Li B., Ou J., Zhang J., Chen Y. et al.* // *Food Control.* 2013. V. 31. № 2. P. 499–507.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.015>
37. *Saltaji S., Rué O., Sopena V., Sablé S., Tambadou F., Didelot S., Chevrot R.* // *Foods.* 2020. V. 9. № 5. Article № 622.  
<https://doi.org/10.3390/foods9050622>
38. *Soltani S., Hammami R., Cotter P.D., Rebuffat S., Ben Said L., Gaudreau H. et al.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2021. V. 45. № 1.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
39. *Sun Z., Wang X., Zhang X., Wu H., Zou Y., Li P. et al.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 45. № 3. P. 213–227.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-018-2008-6>
40. *Gontijo M.T.P., de Sousa Silva J., Vidigal P.M.P., Martin J.G.P.* // *Int. Food Res.* 2020. V. 128. Article № 108783.  
<https://doi.org/doi:10.1016/j.foodres.2019.108783>
41. *Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 71. P. 394–406.
42. *Griffiths M.W., Tellez A.M.* // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. Article № 30.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00030>
43. *Kieliszek M., Pobiega K., Piwowarek K., Kot A.M.* // *Molecules.* 2021. V. 26. №7. Article № 1858.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26071858>

44. *Lim Y.H., Foo H.L., Loh T.C., Mohamad R., Abdullah N.* // J. Anim. Sci. Biotechnol. 2019. V. 10. Article № 15. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0323-z>
45. *Sun F., Hu Y., Yin X., Kong B., Qin L.* // Process Biochem. 2020. V. 89. P. 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.029>
46. *Genay M., Sadat L., Gagnaire V., Lortal S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 3238–3249.
47. *Broadbent J.R., Cai H., Larsen R.L., Hughes J.E., Welker D.L., De Carvalho V.G. et al.* // J. Dairy Sci. 2011. V. 94. № 9. P. 4313–4328. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4068>
48. *Zhao W., Chen Y., Sun Z., Wang J., Zhou Z., Sun T., Wang L., Chen W., Zhang H.* // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 2666–2667.
49. *Miyamoto M., Ueno H.M., Watanabe M., Tatsuma Y., Seto Y., Miyamoto T., Nakajima H.* // Int. J. Food Microbiol. 2015. V. 197. P. 65–71.
50. *Liu Q., Wang H., Zhu W., Peng S., Zou H., Zhang P. et al.* // Int. J. Biol. Macromol. 2024. V. 276. Part 2. Article № 133958. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133958>
51. *Siezen R.J.* // Anton. Leeuw. INT. J. G. 1999. V. 76. № 1–4. P. 139–155.
52. *Smeianov V.V., Wechter P., Broadbent J.R., Hughes J.E., Rodríguez B.T., Christensen T.K. et al.* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 8. <https://doi.org/10.1128/AEM.00005-07>
53. *Begunova A.V., Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Rozhkova I.V., Fedorova T.V.* // Foods. 2021. V. 10. № 1. Article № 17. <https://doi.org/10.3390/foods10010017>
54. *Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Fedorova T.V.* // Foods. 2024. V. 13. № 15. Article № 2414. <https://doi.org/10.3390/foods13152414>
55. *Gao S., Jiang Y., Zhang X., Cui S., Liu X., Zhao J. et al.* // Foods. 2022. V. 11. Article № 3885. <https://doi.org/10.3390/foods11233885>
56. *Martín J.F., Liras P.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 3. Article № 1129. <https://doi.org/10.3390/ijms22031129>
57. *Allenby N.E., O'Connor N., Pragai Z., Carter N.M., Miethke M., Engelmann S.* // Microbiology. 2004. V. 150. P. 2619–2628.
58. *Hejazian S.M., Pirmoradi S., Vahed S.Z., Roy R.K., Khatibi S.M.H.* // J. Protein Chem. 2024. V. 43. P. 187–199. <https://doi.org/10.1007/s10930-024-10190-4>
59. *Xu M., Hu S., Wang Y., Wang T., Dziugan P., Zhang B., Zhao H.* // Front. Microbiol. Sec. Food Microbiology. 2021. V. 12. Article № 635685. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635685>
60. *Celebioglu H.U., Svensson B.* // Proteomics. 2017. V. 17. № 11. Article № 1700019. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700112>
61. *Bagon B.B., Valeriano V.D.V., Oh J.K., Pajarillo E.A.B., Cho C.-S., Kang D.-K.* // LWT. 2018. V. 93. P. 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.069>
62. *Mazzeo M.F., Sorrentino A., Morandi S., Abouloifa H., Asehraou A., Brasca M., Siciliano R.A.* // Int. J. Food Microbiol. 2025. V. 426. Article № 110922. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110922>
63. *Pérez Montoro B., Benomar N., Caballero Gómez N., Ennahar S., Horvatovich P., Knapp C.W. et al.* // Food Res. Int. 2018. V. 111. P. 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.072>
64. *Lin M.-H., Liu C.-C., Lu C.-W., Shu J.-C.* // BMC Microbiology. 2024. V. 24. Article № 108. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03268-7>
65. *Angelescu I.-R., Zamfir M., Ionetic E.-C., Grosu-Tudor S.-S.* // Fermentation 2024. V. 10. Article № 150. <https://doi.org/10.3390/fermentation10030150>
66. *Kobatake E., Kabuki T.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Article № 2414. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02414>
67. *Prado Acosta M., Geoghegan E.M., Lepenies B., Ruzal S., Kielian M., Martínez M.G.* // Interaction. Front. Microbiol. 2019. V. 10. Article № 810. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00810>
68. *Kim E., Lee H.G., Han S., Seo K.-H., Kim H.* // J. Agric. Food Chem. 2021. V. 69. № 50. P. 15157–15164. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05037>
69. *Alp D., Kuleşan H., Korkut Altıntaş A.* // Mol. Biol. Rep. 2020. V. 47. P. 3449–3457. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05430-6>
70. *Acosta M.P., Palomino M.M., Allievi M.C., Rivas C.S., Ruzal S.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 7824–7827. <https://doi.org/10.1128/AEM.01712-08>
71. *Griffin M.E., Klupt S., Espinosa J., Hang H.C.* // Cell Chem. Biol. 2023. V. 30. № 5. P. 436–456. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.11.001>
72. *Genay M., Sadat L., Gagnaire V., Lortal S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 10. P. 3239–3249.
73. *Sah B.N.P., Vasiljevic T., McKechnie S., Donkor O.N.* // Int. Dairy J. 2016. V. 1. № 63. P. 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.003>
74. *Villegas J.M., Picariello G., Mamone G., Espeche Turbay M.B., Savoy de Giori G., Hebert E.M.* // Peptidomics. 2014. V. 1. P. 22–29. <https://doi.org/10.2478/ped-2014-0002>
75. *Wakai T., Yamamoto N.* // Biotechnology – Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life. /Ed. Reda Helmy Sammour. 2012. Published by InTech. Croatia. P. 159–172.
76. *Ali E., Nielsen S.D., Abd-El Aal S., El-Leboudy A., Saleh E., LaPointe G.* // Front. Nutr. Sec. Food Microbiology. 2019. V. 6. Article № 152. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00152>
77. *Nongonierma A.B., FitzGerald R.J.* // Trends Food Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 26–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.022>

78. Fan M., Guo T., Li W., Chen J., Li F., Wang C. et al. // Food Sci Hum Well. 2019. V. 8. № 2. P. 156–176.
79. Miguel M., Gómez-Ruiz J.Á., Recio I., Aleixandre A. // Mol. Nutr. Food Res. 2010. V. 54. № 10. P. 1422–1427. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900448>
80. Adams C., Sawh F., Green-Johnson J.M., Taggart H.J., Strap J.L. // J. Dairy Sci. 2020. V. 103. № 7. P. 5805–5815. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17976>
81. Yamamoto N., Akino A., Takano T. // J. Dairy Sci. 1994. V. 77. P. 917–922.
82. Miclo L., Roux E., Genay M., Brusseaux E., Poirson C., Jameh N. et al. // J. Agr. Food Chem. 2012. V. 60. P. 554–565. <https://doi.org/10.1021/jf202176d>
83. Mahdi C., Untari H., Padaga M.C., Raharjo S.J. // Int. Food Res. J. 2018. V. 25. № 1. P. 17–23.
84. Tellez A., Corredig M., Brovko L.Y., Griffiths M.W. // J. Dairy Res. 2010. V. 77. P. 129–136. <https://doi.org/10.1017/S002202990999046X>

## Probiotic Properties of *Lactobacillus helveticus* Isolated from Kefir Grains and Feces *Homo sapiens*

O. S. Savinova<sup>a</sup>, A. V. Shabaev<sup>a</sup>, and T. V. Fedorova<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: [fedorova\\_tv@mail.ru](mailto:fedorova_tv@mail.ru)

In the present study, a comparative analysis of the probiotic properties of *L. helveticus* isolates obtained from kefir grains, a complex consortium of bacteria and yeasts used in the production of kefir (strains KF4, KF5, and KF6), and mammalian feces (KF7, NK1, and H9) was performed. At the genetic level, all the studied strains had the potential to form biologically active peptides, assimilate various sugars, and exhibit antimicrobial activity, which was also confirmed *in vitro*.

**Keywords:** *Lactobacillus helveticus*, genome, biochemical properties, antibiotic resistance, antimicrobial activity, milk fermentation, antioxidant and hypotensive activity, exoproteome, biopeptides