

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РОСТОВЫХ СВОЙСТВ, БИОЛОГИЧЕСКИХ И САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРЕПАРАТОВ BIFIDOBACTERIUM И LACTOBACILLUS, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОЛИЗАТОВ МОЛОЧНОГО И СОЕВОГО СЫРЬЯ

В работе приведены данные, демонстрирующие принципиальную возможность использования питательной среды на основе гидролизата сои для культивирования производственных штаммов молочнокислых бактерий при соответствии токсикологических и микробиологических параметров получаемых препаратов действующим гигиеническим нормативам. Выявлены также некоторые преимущества использования питательной среды на основе гидролизата сои, заключающиеся в более быстром выходе биомассы, повышении ее адгезивного потенциала и формировании более выраженных антагонистических свойств в отношении условно-патогенных микроорганизмов, что наиболее характерно для производственных штаммов микроорганизмов рода *Bifidobacterium*.

Микробиоценоз кишечника человека является сложной экологической системой, чрезвычайно чувствительной к неблагоприятным переменам в окружающей среде. К факторам, отрицательно влияющим на микроэкологию человека, относятся также частые физические и психические стрессы, применение антибиотиков, увеличение в рационе питания консервантов и продуктов с недостаточным содержанием балластных веществ и т. д. В условиях нарастания подобной антропогенной нагрузки качественный и количественный состав микробиоценоза претерпевает существенные изменения, часто результирующиеся в формировании состояния дисбактериоза.

Одним из традиционных подходов к решению проблемы профилактики и лечения дисбиотических состояний является использование в качестве пищевых добавок препаратов эубиотиков – живых апатогенных бесспорных анаэробов родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, составляющих основу микробиоценоза кишечника здорового человека [2, 5, 13]. При этом один из традиционных способов [7, 13] получения препаратов данных молочнокислых бактерий (МКБ) заключается в культивировании специально отобранных производственных штаммов лактобацилл и бифидобактерий на гидролизатно-молочной среде (ГМС), приготовляемой на панкреатическом гидролизате коровьего молока. В то же время существование определенной прослойки лиц, проявляющих непереносимость молока и молочных продуктов, в некоторых популяциях составляющих до 10% населения [1,8], значительно сужает сферу применения данных препаратов, что делает актуальным поиск альтернативных трофических субстратов для культивирования МКБ.

В этой связи целью настоящей работы явилось изучение возможности использования гид-

ролизатно-соевой среды (ГСС) в качестве основы для производства препаратов МКБ, а также сравнительный анализ ростовых свойств, биологических и санитарно-гигиенических характеристик препаратов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, полученных с использованием гидролизатов молочного и соевого сырья.

При проведении работы были использованы производственные штаммы *B.adolescentis* МС-42, *B.bifidum* 1, *B.longum* В-379, *L.acidophilus*, *L.delbrueckei* subsp. *bulgaricus* 8-79 и *L.plantarum* 8РА3. Данные микроорганизмы выращивались на ГМС и ГСС в течение 24-48 часов до достижения ими стационарной фазы роста, в процессе чего изучались их ростовые характеристики, описываемые параметрами продолжительности lag- и log-фаз, значениями удельной скорости роста (μ), временем достижения и значением М-коцентрации [4]. Полученные препараты МКБ исследовались также на наличие и выраженность ряда биологических характеристик, значимых для формирования их лечебно-профилактического действия [12]. В частности, тестировались адгезивная способность МКБ на модели адгезии к поверхности эритроцитов, характеризующая индексом адгезии (ИАЭ) – средним количеством бактериальных клеток, прикрепившихся к эритроциту; а также показателем активности эритроцитов (АЭ) – процентом красных кровяных клеток, осуществляющих процесс адгезии [1]. Выявленность ингибирующего действия экзопродуктов МКБ в отношении *Escherichia coli* K12 и *Staphylococcus aureus* 209Р оценивалась индексом бактерицидности – ИБЦ, определяемым как соотношение колониеобразующих единиц тест-штаммов в контроле и после сокультивирования с препаратами МКБ [11]. Содержание лизоцима в бесклеточных супернатантах препаратов изучалось с использованием в качестве субстрата для лизо-

цима ацетонированного порошка индикаторной культуры *Micrococcus luteus* var. *lysodeicticus* ССМ2665 [6]. Помимо этого полученные препараты исследовались согласно СанПиН 2.3.2.560-96 по совокупности органолептических и физико-химических свойств, в т. ч. на наличие тяжелых металлов, пестицидов и др. загрязнителей, а также по ряду микробиологических характеристик, включающих наличие/отсутствие представителей санитарно значимых групп микроорганизмов.

Анализ ростовых свойств использованных представителей МКБ позволил констатировать как существование достоверных различий при использовании питательных сред на основе ГМС и ГСС, так и определенную специфичность подобного «отклика» на изменение условий культивирования со стороны микроорганизмов рода *Bifidobacterium* по сравнению с представителями рода *Lactobacillus*. Во-первых, выявленные различия касались примерно двухкратного сокращения продолжительности lag-фазы, наиболее выраженного у *B.adolescentis* МС-42 ($2,56 \pm 0,30$ часа при использовании ГСС против $4,84 \pm 0,28$ часа при использовании ГМС; $P < 0,01$) и *B.bifidum* 1 (соответственно $2,00 \pm 0,11$ часа против $5,45$ часа; $P < 0,05$). Во-вторых при использовании питательной среды на основе гидролизата соевого сырья большинство бифидобактерий демонстрировало значительно более высокие темпы роста, характеризующиеся увеличением величины μ – с $0,19 \pm 0,03$ на ГМС до $0,12 \pm 0,02$ на ГСС ($P < 0,05$) у *B.longum* В-379; и с $0,26 \pm 0,04$ до $0,15 \pm 0,01$ ($P < 0,05$) у *B.bifidum* 1, что соответственно вело к общему укорочению продолжительности lag-фазы и времени достижения М-концентрации.

На этом фоне представители рода *Lactobacillus* хотя и демонстрировали ряд сходных тенденций, лишь в единичных случаях проявляли эти различия как достоверные. Так, было зарегистрировано укорочение lag-фазы у *L.plantarum* 8РА3 с $3,57 \pm 0,2$ часов при использовании ГМС до $1,95 \pm 0,7$ часов при использовании ГСС ($P < 0,05$), а также сокращение времени достижения М-концентрации *L.acidophilus* с $19,6 \pm 1,7$ часов до $15,0 \pm 1,9$ часов ($P < 0,05$). Таким образом, демонстрируя принципиальную возможность роста МКБ на питательных средах на основе как молочного, так и соевого сырья, полученные данные свидетельствуют в пользу более благоприятных ростовых характеристик среды ГСС для представителей рода *Bifidobacterium* по отношению к роду *Lactobacillus*, вероятным объяснением чего может являться присутствие в соевой среде осо-

рых бифидогенных факторов – олигосахаридов растительного происхождения [8, 9].

На втором этапе исследования при изучении биологических свойств препаратов МКБ, значимых для реализации их лечебно-профилактического действия, нами была изучена их адгезивность, в значительной степени определяющая способность микроорганизмов к закреплению в колонизируемой экологической нише. Результаты проведения подобной работы позволили констатировать, что при культивировании на ГМС все изученные производственные штаммы МКБ достоверно не различались по данному признаку и должны были оценены как низкоадгезивные (значения ИАЭ от $0,44 \pm 0,08$ до $0,71 \pm 0,23$; значения АЭ от $32,0 \pm 5,2\%$ до $47,2 \pm 9,0\%$). При культивировании же на ГСС на фоне некоторой разнонаправленности регистрируемых эффектов основной тенденцией было повышение адгезивной способности МКБ, наиболее выраженное у представителей рода *Bifidobacterium*: ИАЭ на ГСС составил $0,87 \pm 0,12$ против $0,59 \pm 0,06$ на ГМС ($P < 0,01$).

Ещё одним свойством, значимым для определения лечебно-профилактической ценности препаратов МКБ, является их антагонистическая активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов, наиболее типичными грамотрицательными и грамположительными представителями которых являются соответственно *E.coli* и *S.aureus*. При проведении данного этапа работы было установлено, что наибольшую антагонистическую активность в отношении *E.coli* К12 проявляли представители рода *Lactobacillus* (ИБЦ= $4,5 \pm 1,1$) с максимальной выраженностью у *L.plantarum* (ИБЦ= $6,8 \pm 2,5$) и минимальной у *L.delbrueckei* subsp. *bulgaricus* (ИБЦ= $2,9 \pm 0,6$). На этом фоне бифидобактерии проявляли значительно меньшую антагонистическую способность в целом характеризующуюся величиной ИБЦ= $1,5 \pm 0,16$.

Учитывая важное значение активности ионов водорода в развитии бактерицидного действия препаратов МКБ, провели сопоставление значений ИБЦ и итогового значения pH в культуральной жидкости. При этом была установлена достоверная положительная корреляционная зависимость между названными параметрами, характеризующаяся значением коэффициента корреляции $r=0,69$ и при пересчете через коэффициент детерминации свидетельствующая о том, что около 50% бактерицидного эффекта препаратов МКБ в отношении *E.coli* определяется их кислотностью.

При изучении антагонистической активности препаратов МКБ на ГМС в отношении *S.aureus* ряд

описанных выше зависимостей был воспроизведен. В частности, показана наибольшая бактерицидность препаратов лактобацилл (ИБЦ=159±95), приблизительно на два порядка превышающая таковую у бифидобактерий (ИБЦ=2,1±0,4) и возрастающая в ряду – *L.acidophilus* (8,8±3,6) → *L.delbrueckei* subsp. *bulgaricus* (57,6±30) → *L.plantarum* (410±241). При этом в формировании бактерицидности важная роль также принадлежала формирующейся в препарате рН, связанной с величинами ИБЦ положительной корреляционной связью ($r=0.4919$).

Анализ бактерицидности препаратов МКБ, выращенных на ГСС, позволил констатировать некоторый рост их бактерицидного эффекта в отношении *E.coli*, наиболее выраженный у бифидобактерий – в два раза по сравнению с препаратами, полученными с использованием ГМС (ИБЦ=3,1±0,5; $p<0,01$). Что же касается лактобацилл, влияние культивирования на ГСС для них было выражено меньше, что ни в одном случае не привело к достоверному изменению бактерицидности. При этом выявленные изменения бактерицидности вновь в значительной степени могли быть объяснены дальнейшим сдвигом рН в кислую сторону, достигающем на ГСС более низких значений (4,4±0,05 против 4,7±0,06 на ГМС), что подтверждается сохранением положительной корреляционной связи между значениями ИБЦ и рН ($r=0.4181$).

С другой стороны, использование ГСС вело к чрезвычайно высокому росту значений ИБЦ в отношении *S.aureus* у всех изученных нами препаратов МКБ, напрямую уже не связанному со сдвигами рН в культуральной жидкости. В целом подобный рост результативался в десятикратном увеличении ИБЦ (424±351 против аналогичного показателя на ГМС, равного 43,09±3,9; $p<0,001$), при этом расчетные значения коэффициента детерминации свидетельствовали о не более чем 10% вкладе активности ионов водорода в формирование бактерицидности МКБ на ГСС.

Для оценки причин различия уровней бактерицидности по отношению к *S.aureus* при использовании ГМС и ГСС нами было изучено присутствие данного фермента в бесклеточных супернатантах препаратов МКБ. При этом в случае культивирования на ГМС наибольшая выраженность лизоцимпродукции регистрировалась у представителей рода *Lactobacillus* (1,5±0,2 мкг/мл) с максимумом у *L.delbrueckei* subsp. *bulgaricus* (1,9±0,5 мкг/мл) и минимумом у *L.plantarum* (1,1±0,3 мкг/мл). Представители рода *Bifidobacterium* при культивировании на ГМС характеризовались меньшей вы-

раженностью данного признака с минимумом у *V.adolescentis* (0,6±0,2 мкг/мл) и максимумом у *V.bifidum* (1,3±0,7 мкг/мл). С другой стороны, при культивировании МКБ на ГСС для пяти из шести изученных штаммов было продемонстрировано снижение уровня лизоцимпродукции, наиболее выраженное у представителей рода *Lactobacillus* – в три раза (до уровня 0,5±0,07 мкг/мл; $P<0,001$), в результате чего различия по данному признаку между лактобациллами и бифидобактериями nivelировались.

Обсуждая полученные результаты, представляется необходимым отметить, что, несмотря на важное значение, традиционно придаваемое присутствию лизоцима в препаратах МКБ, его определённые концентрации оказывались достаточно низкими и в несколько раз уступали концентрации данного фермента в биологических жидкостях организма человека. В этой связи некая разнонаправленность эффектов при использовании ГСС, проявляющаяся в снижении концентрации свободного лизоцима в препаратах МКБ на фоне роста их бактерицидности, очевидно должна быть объяснена стимуляцией выработки отличных от лизоцима антибиотических субстанций, проявляющих свою активность преимущественно против грамположительных микроорганизмов.

На завершающем этапе работы нами была проведена санитарно-гигиеническая характеристика сравниваемых препаратов МКБ, включающая органолептический, химический и микробиологический анализы, оговоренные СанПиН 2.3.2.560-96 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов».

При органолептической характеристике препаратов МКБ было установлено, что они имели сходные показатели и представляли из себя однородную мутную жидкость коричневого (при использовании ГМС) или светло-коричневого (при использовании ГСС) цвета с видимым ростом бифидо- или лактобактерий, специфическим кисло-молочным запахом и вкусом. Титруемая кислотность препаратов характеризовалась величинами 70-150 Т, при этом лактобациллы приводили к более существенным сдвигам кислотности, чем бифидобактерии, а использование питательной среды на основе гидролизата соевого сырья устойчиво результативалось в формировании более низких итоговых значений данного параметра.

На этом фоне результаты анализа присутствия токсических элементов свидетельствовали о том, что использование как ГМС, так и ГСС позволяет

производить препараты МКБ, соответствующие действующим гигиеническим нормативам и по большинству параметров демонстрирующие отсутствие определяемых токсикантов. При этом содержание тяжелых металлов – свинца и кадмия – также было ниже оговоренных СанПиН 2.3.2.560-96 пороговых величин, однако использование ГСС позволяло на порядок снизить их содержание по сравнению с препаратами МКБ, полученными с использованием ГМС. Таким образом, использование ГСС позволяет получать препараты МКБ, по содержанию токсичных элементов, микотоксинов, пестицидов полностью соответствующие действующим санитарным правилам и нормам, а по некоторым параметрам даже превосходящие препараты МКБ, полученные с использованием ГМС.

При микроскопическом исследовании в препаратах лактобацилл обнаруживались крупные неспорообразующие грамположительные палочки с закругленными концами, по своим морфологическим и тинкториальным свойствам соответствующие роду *Lactobacillus*, а при изучении препаратов бифидобактерий микроскопическая картина была представлена расположенными одиночно, парами (в т. ч. V-образно) и иногда «палисадом» грамположительными неспорообразующими вариабельными по размерам булавовидными и разветвленными палочками, что является одним из характерных признаков представителей рода *Bifidobacterium* [10]. В нормируемых объемах препаратов МКБ все санитарно-значимые группы микроорганизмов отсутствовали.

Таким образом, вся совокупность приведенных выше данных сравнительного анализа ростовых свойств, биологических и санитарно-гигиенических характеристик препаратов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, полученных с использованием гидролизатов молочного и соевого сырья, позволяет констатировать не только принципиальную возможность использования питательной среды на основе ГСС для культивирования производственных штаммов МКБ при соответствии токсикологических и микробиологических параметров получаемых препаратов действующим гигиеническим нормативам, но и ряд очевидных преимуществ использования ГСС, заключающихся в более быстром выходе биомассы, повышении ее адгезивного потенциала и формировании более выраженных антагонистических свойств в отношении условно-патогенных микроорганизмов, что наиболее типично для производственных штаммов микроорганизмов рода *Bifidobacterium*.

На основе полученных данных специалистами ООО «Научно-производственная фирма «Экобиос» разработаны принципиально новые биологически активные добавки к пище – «Соя-бифидум», «Соя-лактум», на которые получены регистрационные удостоверения и необходимые согласования в НИИ питания при РАМН, ФЦГСЭН и Департаменте Министерства здравоохранения РФ, а приоритет самих способов получения подобных препаратов защищен рядом патентов Российской Федерации [14,15].

Список использованной литературы:

1. Барановский А.Ю., Кондрашина Э.А. // Дисбактериоз и дисбиоз кишечника. – Санкт-Петербург, 2000. – С. 77-97.
2. Бондаренко В.М., Учайкин В.Ф., Мурашова О.А., Абрамов Н.А. // Дисбиоз, современные возможности профилактики и лечения. – Москва, 1995. – С. 8–11, 16–17.
3. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. // Лабораторное дело. – 1986. – №4. – С. 210-212.
4. Герхард Ф. И др. // Методы общей бактериологии – Москва: «Мир» – С. 374–450.
5. Ильина Р.М., Молокеев А.В., Никулин Г.Л., Молокеева Н.В. // Гигиена питания – 2000. – №6 – С. 35-38.
6. Каграмова К.А., Ермольева З.В. // Антибиотики. – 1966. – Том 11, №10. – С. 917-919.
7. Казаков А.В. // Переработка пищевой продукции. – 2000. – №7/12. – С. 25-26.
8. Коваленко Н.К., Тиньянова Н.З., Качалай Д.П. и др. // Микробиол. журнал. – 1990. – С. 53-58.
9. Манвелова М.А., Чешева В.В., Плясунова Н.Г. // Медицинские аспекты микробной экологии: Сборник научных трудов МНИ-ИЭМ – Москва, 1991. – С. 18-26.
10. Новик Г.И. // Журнал микробиология. – 1998. – Том 67, №3, С.376-383.
11. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. / Под редакцией М.О. Биргера. – М., 1973. – С. 167-177.
12. Шендеров Б.А. // Медицинская микробная экология и функциональное питание. – Москва, 1998. –Том I. – С. 200 – 233.
13. Цинберг М.Б., Денисова И.В. //Среда обитания и здоровье населения: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Оренбург, 2001г. – С. 182-183.
14. Цинберг М.Б., Цинберг И.М., Денисова И.В. // Способ получения бактериальной закваски для кисломолочного продукта: Патент РФ на изобретение №2169472 – Российское агентство по патентам и товарным знакам – 2001.
15. Цинберг М.Б., Цинберг И.М., Денисова И.В. // Способ производства кисломолочного продукта: Патент РФ по заявке на изобретение №2000104406/13– Российское агентство по патентам и товарным знакам – 2001.