

НОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫЕ ШТАММЫ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Яруллина Д.Р., Садыкова Л.Р., Салахутдинова А.И.

*ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18;*

e-mail: kasfes@gmail.com

поступила в редакцию 29 ноября 2013 года

Аннотация

С целью селекции новых штаммов микроорганизмов для использования в пробиотиках и продуктах функционального питания из фекалий детей и кисломолочных продуктов были изолированы 14 новых штаммов лактобацилл. В работе оценены их пробиотические свойства, а именно: устойчивость к факторам пищеварительного тракта, способность снижать рН и образовывать молочную кислоту, в результате чего семь штаммов были отобраны в качестве перспективной основы для пробиотических препаратов.

Ключевые слова: *лактобациллы, пробиотическая активность, закисление среды, образование лактата, устойчивость к желчи, устойчивость к соляной кислоте.*

Введение. Бактерии рода *Lactobacillus* в силу своих биологических особенностей чрезвычайно перспективны в фокусе научного и биотехнологического интереса. Они представляют собой важный компонент естественной микрофлоры кишечного и урогенитального трактов человека и животных, поэтому интенсивно используются в производстве пробиотических препаратов и продуктов функционального питания (йогуртов, бактериальных заквасок и т.п.). Также они широко применяются в пищевой промышленности, поскольку определяют направленность биотехнологических процессов в производстве многих кисломолочных продуктов [1]. Селекция новых производственно перспективных штаммов лактобацилл – важная и актуальная задача, поскольку влечет за собой увеличение разнообразия биотехнологической продукции.

Пробиотический потенциал штамма определяется целым рядом его свойств: доказанная клиническая эффективность и безопасность использования, устойчивость к инактивирующим факторам желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), антибиотикорезистентность, антагонистическая активность в отношении патогенных микроорганизмов, способность синтезировать антимикробные вещества, высокая адгезия к эпителиоцитам и др. [2].

Целью данной работы является скрининг новых штаммов лактобацилл, обладающих пробиотической активностью.

Материалы и методы исследования.

В работе выделили из кисломолочных продуктов и фекалий детей 14 новых штаммов лактобацилл и сравнили их пробиотические свойства с таковыми известных пробиотических штаммов, выделенных из пробиотических препаратов. Основные сведения о штаммах микроорганизмов, использованных в работе, представлены в таблице 1.

Для выделения, роста и хранения лактобацилл использовали питательную среду MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) [3]. Определение принадлежности выделенных бактерий к роду *Lactobacillus* проводили по ГОСТ 10444.11-89: по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию спорообразования и каталазы. О закислении среды в процессе роста на ней лактобацилл судили по значению Δ pH, которое рассчитывали как разность значений кислотности среды до засева бактерий и pH среды после культивирования в ней бактерий в течение 48 ч при 37°C. Представленные в работе данные являются отношением Δ pH к оптическому поглощению при 590 нм (OD_{590}) 48-ми часовой культуры лактобацилл. Количество молочной кислоты определяли в культуральной жидкости 48-ми часовой

культуры лактобацилл методом газожидкостной хроматографии, используя газовый хроматограф Clarus 580 Perkin Elmer (США) с пламенно-ионизационным детектором. На хроматографической колонке неподвижной фазой служил 20М полиэтиленгликоль [4]. Представленные в работе данные являются отношением количества молочной кислоты (мг/мл) к OD_{590} культуры. Для определения чувствительности лактобацилл к желчи и соляной кислоте выращенные в течение 24 ч клетки лактобацилл суспендировали в 2%-ом растворе желчи, либо в растворе соляной кислоты (рН 2,0) и инкубировали 6 ч при 37°C на качалке (180 об./мин). Контрольные образцы инкубировали в 0,9% растворе NaCl. По истечении времени инкубации готовили разведения в стерильной водопроводной воде и высевали глубинно на чашки Петри с агаризованной средой MRS. Через 48 ч инкубирования при 37°C подсчитывали число колоний, выросших на чашках. Статистическую обработку результатов проводили в программе «Microsoft Excel».

Таблица 1. – Штаммы микроорганизмов, используемые в работе.

№	Штамм	Источник/коллекция
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> N.V. EP 317/402 (3-1)	Препарат «Наринэ», ОАО «Нарэкс» Республика Армения, г.Бюрегаван
2	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 51 (3-2)	Препарат «Гастрофарм» завод «BioVet» АО «Софарма», Болгария
3	<i>Lactobacillus</i> sp. 1-1	Катык «Вамин», филиал ОАО «Вамин Татарстан» «Казанский молочный комбинат», г. Казань
4	<i>Lactobacillus</i> sp. 1-2	Ряженка «Вамин», филиал ОАО «Вамин Татарстан» «Казанский молочный комбинат», г. Казань
5	<i>Lactobacillus</i> sp. 1-3	Йогурт «Био Баланс», ОАО «Компания Юнимилк», г. Москва
6	<i>Lactobacillus</i> sp. 1-4	Кефир «Віомах», филиал ОАО «Вимм Билль Данн», г. Москва
7	<i>Lactobacillus</i> sp. 1-5	Творог «Тёма», филиал ОАО «Компания Юнимилк», «Молочный комбинат Петмол», г. Санкт – Петербург
8	<i>Lactobacillus</i> sp. 1-6	Простокваша «Мечниковская», филиал ОАО «Вамин РТ» «Казанский молочный комбинат», г. Казань
9	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-1	Фекалии детей, ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора (КНИИЭМ), г. Казань
10	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-2	
11	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-3	
12	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-4	
13	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-5	
14	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-6	
15	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-7	
16	<i>Lactobacillus</i> sp. 4-8	

Результаты и их обсуждение.

Образование органических кислот, в том числе молочной, рассматривают как один из факторов их пробиотической активности, поскольку оно ведет к снижению рН среды до значений, не совместимых с жизнедеятельностью многих групп гнилостных, патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [2]. Поэтому мы оценили закисление среды (рисунок 1) и продукцию лактата (рисунок 2) у выделенных нами штаммов лактобацилл. У шести штаммов (*Lactobacillus* sp. 1-1, 1-4, 3-1, 4-2, 4-4, 4-7) обнаружили высокую степень закисления среды: значения Δ рН на 48 ч роста составляют $(2,0 \pm 0,13)$ - $(2,6 \pm 0,06)$. Лидером по данному показателю является штамм *Lactobacillus* sp. 4-4 (Δ рН = $2,6 \pm 0,06$), что позволяет

ожидать у данного штамма высокую антагонистическую активность. Количество молочной кислоты, продуцируемой штаммами *Lactobacillus sp.* 1-3, 1-5, 4-1 и 4-6 превышает количество лактата, образованного штаммами, изолированными из пробиотических препаратов, следовательно, эти штаммы можно считать перспективными в качестве пробиотических. В культуральной жидкости ряда лактобацилл *Lactobacillus sp.* 1-1, 1-2, 1-4, 4-2, 4-5 обнаружена относительно низкая концентрация молочной кислоты ($\sim 30 \pm 3,4$ мг/мл), однако эти штаммы демонстрировали высокую степень закисления среды. По-видимому, эти штаммы являются гетероферментативными, и при сбраживании глюкозы помимо лактата, образуют уксусную и муравьиную кислоты, в результате чего и происходит существенное снижение pH среды. В связи с этим данные 5 штаммов, а также 3 штамма *Lactobacillus sp.* 1-6, 4-3, 4-4, продуцирующие относительно небольшие количества молочной кислоты ($39,0 \pm 8,3$)-(46,5 $\pm 7,2$) мг/мл, признаны нами как не являющиеся пробиотическими.

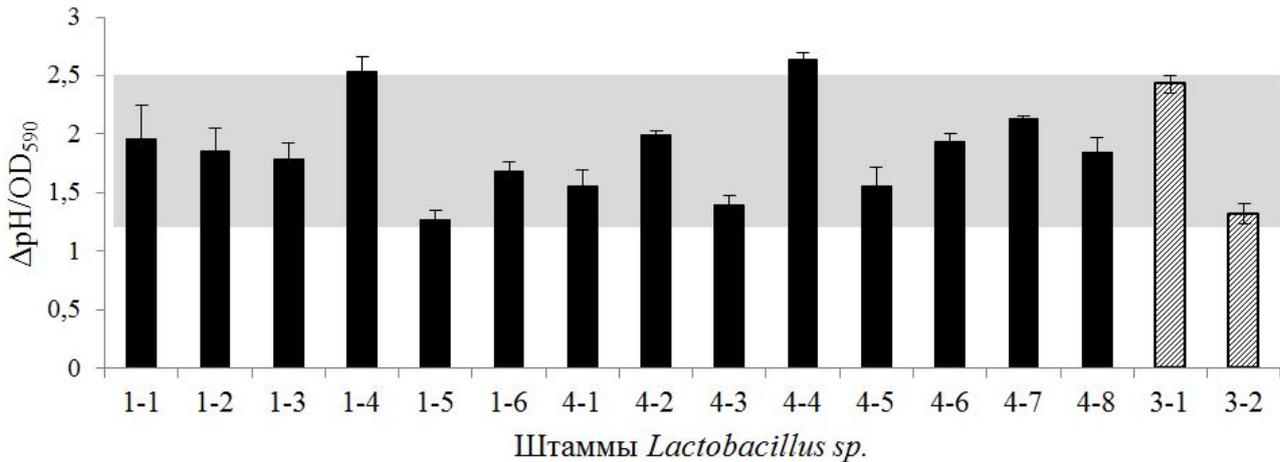


Рисунок 1. – Закисление среды в процессе роста на ней лактобацилл. ΔpH – разность значений pH среды до засева бактерий и после культивирования в ней лактобацилл в течение 48 ч. Представленные данные являются отношением ΔpH к OD₅₉₀.

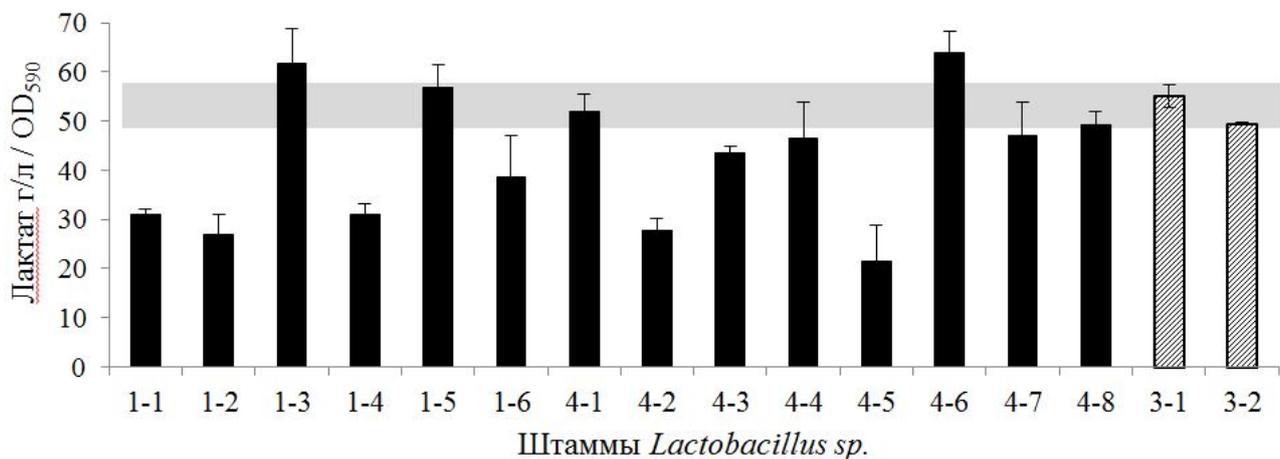


Рисунок 2. – Образование молочной кислоты. Представленные данные являются отношением количества лактата (г/л) в культуральной жидкости лактобацилл на 48 ч культивирования к OD₅₉₀.

Способность лактобацилл, используемых в пробиотиках и продуктах функционального питания, выживать в ЖКТ является важной характеристикой их пробиотического потенциала [2]. Поэтому следующим этапом настоящей работы стало исследование чувствительности лактобацилл к соляной кислоте и желчи (рисунок 3). Мы показали, что большинство исследуемых лактобацилл устойчивы к воздействию 2%-ого раствора желчи. Только у *Lactobacillus sp.* 1-1 и 1-3 обнаружено незначительное снижение жизнеспособности на (7 $\pm 4,0$) и (9 $\pm 6,5$) %, соответственно (рисунок 3а). При воздействии соляной кислоты (pH 2,0) выживаемость большинства лактобацилл сохраняется высокой (75-90%), кроме штаммов

Lactobacillus sp. 1-1, 1-4, 4-2, 4-3, выживаемость которых составила $64 \pm 6,7$, $63 \pm 3,2$, $70 \pm 2,3$ и $71 \pm 6,4\%$, соответственно (рисунок 3б). Указанные лактобациллы демонстрировали относительно высокую степень закисления среды (рисунок 1), однако, у них идентифицирована низкая способность к биосинтезу молочной кислоты ($31,0 \pm 2,1$) – ($43,4 \pm 1,5$) мг/мл (рисунок 2), поэтому по совокупности проанализированных свойств эти штаммы признаны нами не эффективными в качестве пробиотических.

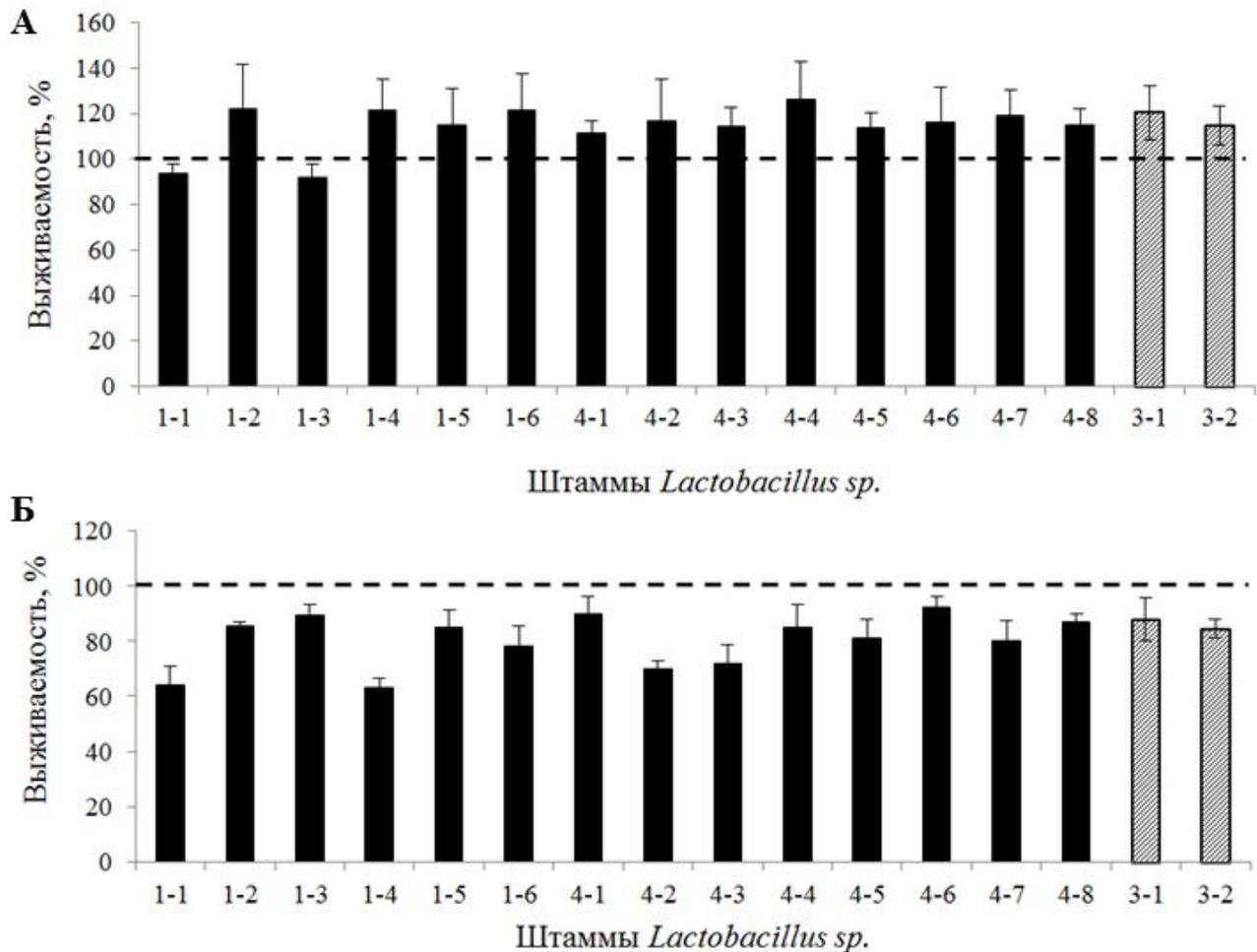


Рисунок 3. – Влияние 2%-го раствора желчи (А) и соляной кислоты (рН 2,0) (Б) на выживаемость лактобацилл. За 100% принята жизнеспособность лактобацилл после инкубации 6 ч в 0,9% растворе NaCl.

Заключение. Таким образом, нами получены чистые культуры 14 штаммов и установлена их принадлежность к роду *Lactobacillus*, а также охарактеризованы культуральные, морфологические, физиолого-биохимические. У семи штаммов идентифицирована низкая способность к биосинтезу молочной кислоты, следовательно, они не являются пробиотическими. Показали, что при 6-ти часовом воздействии соляной кислоты (рН 2,0) выживаемость лактобацилл сохраняется высокой и составляет 60-90%, а воздействие 2% желчи существенно не снижает жизнеспособность лактобацилл. На основании проведенных исследований штаммы *Lactobacillus sp.* 4-1, 4-4, 4-6, 4-7 и 4-8, выделенные из фекалий детей, и штаммы *Lactobacillus sp.* 1-3 и 1-5, выделенные из кисломолочных продуктов, отобраны в качестве перспективной основы для пробиотических препаратов и будут подвержены дальнейшему анализу на соответствие требованиям, предъявляемым к пробиотическим культурам.

Благодарности. Авторы благодарны ФБУН КНИИЭМ и лично Куликову С.Н. за предоставленный материал для исследований; научному сотруднику кафедры микробиологии КФУ Гарусову А.В. за выполнение хроматографии. Работа поддержана

грантом КФУ для выполнения научно-исследовательских работ студенческими научными коллективами в 2013 году.

Список литературы

- 1) Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology // *Res Microbiol.* 2010. V.161, N6. P.480-487.
- 2) Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties // *J. Biotechnol.* 2000. V.84, N.3. P.197-215.
- 3) De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.T. A medium for the cultivation of lactobacilli // *J. Appl. Bacteriol.* 1960. V.23. P.130-135.
- 4) Колпаков А.И., Юнусов Д.В., Гарусов А.В., Куприянова-Ашина Ф.Г. Применение экзогенной рибонуклеазы для улучшения биологических свойств лактобацилл // *Антибиотики и химиотерапия.* 1998. №9. С.5-8.