

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ НЕТРАДИЦИОННОГО СЫРЬЯ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА РОСТ ЛАКТОБАКТЕРИЙ *IN VIVO* И *IN VITRO**

Аннотация: Выявлен высокий стимулирующий эффект новых ферментативных гидролизатов из тибетского молочного гриба, каллизии душистой и молок лососевых рыб на рост лактобактерий, как *in vivo*, так и *in vitro*.

Ключевые слова: гидролизат, лактобактерии, стимулятор роста, тибетский молочный гриб, каллизия душистая, молоки лососевых рыб, питательная среда.

Лактобактерии являются представителями нормальной микрофлоры человека и животных. Исследования взаимоотношений макроорганизма и его нормофлоры показали, что они оказывают влияние на морфогенез и функции различных систем организма-хозяина. Лактобактерии способны продуцировать кислые продукты обмена, они не только участвуют в поддержании кислой среды биотопов, но и принимают активное участие в расщеплении непереваренных остатков пищи, способствуя более полному всасыванию питательных веществ, оптимизируя процесс пищеварения [2]. Замечена их роль и в снижении уровня холестерина в крови, в предупреждении продукции канцерогенов и в разрушении щавелевой кислоты, что препятствует образованию в организме оксалатов [2]. Также доказана роль лактобактерий в поддержании микробного баланса благодаря продукции молочной кислоты и специфической адгезии к эпителию толстой кишки [5]. Молочнокислые бактерии являются одной из индикаторных систем кишечной микрофлоры, быстро реагирующей на различные воздействия, и в том числе на антибактериальные препараты [1].

Нарушение суммарного содержания лактобактерий в содержимом кишечника является важнейшим критерием развития дисбактериоза и требует изыскания новых методов коррекции микробиоценоза, в том числе, направленных на повышение содержания лактобактерий.

Лактобактерии характеризуются высокой требовательностью к качеству питательных субстратов, являющихся источником энергии и веществ, необходимых им для построения клетки [14]. Они нуждаются в полном наборе готовых аминокислот, водорастворимых витаминов группы В, азотистых основаниях, минеральных элементах, углеводах, неорганических соединениях и т.д. Этим можно объяснить относительно многокомпонентный состав питательных сред, которые традиционно используют для культивирования молочнокислых бактерий [4, 6].

Поскольку правильный подбор питательной среды в значительной степени определяет качество и успех эксперимента, исследования в данном направлении продолжают. Разрабатываются новые питательные среды, модифицируются уже известные и широко применяемые: молочно-дрожжевая среда (МДС), модифицированная гидролизатно-молочная среда (ГМС) и т.д. [9].

Для культивирования лактобактерий наиболее широко используемой является классическая МРС-среда, предложенная Де-Меном и другими соавторами в 1960 году, а также ее различные модификации: среда MRS, среда РС для выделения лактобацилл и лактококков, среда с Твин-80 [9]. Однако, по сообщению Е.И. Ткаченко и Ю.П. Успенс-

* © Тимченко Л.Д., Пенькова Н.И.

кого, базовая МРС-среда, широко используемая на практике для культивирования молочнокислых бактерий, не всегда оптимальна в отношении органического азота, углерода, источников марганца, магния, фосфора [16].

Сравнительный анализ известных питательных сред, на которых можно осуществлять культивирование лактобактерий показывает, что успешность зависит не только от качества, но и от состава среды, а именно от специфических стимулирующих компонентов. Для выращивания молочнокислых бактерий хорошо зарекомендовали себя сложные среды, содержащие растительные отвары, мясные и дрожжевые экстракты, белковые гидролизаты [14]. Введение в состав дрожжевых аутолизатов и экстрактов оказывает выраженное стимулирующее действие на молочнокислые бактерии [8, 15].

Все вышеизложенное требует внимательного и целенаправленного подхода к выбору специфических стимулирующих компонентов для культивирования лактобактерий, как *in vivo*, так и *in vitro*.

На наш взгляд наиболее подходящими для этих целей являются гидролизаты, широко используемые в микробиологии в качестве основ питательных сред и стимуляторов роста микроорганизмов, а также в медицинской практике, как ценные лечебные препараты и биологически активные добавки к пище.

В качестве основы для приготовления гидролизатов мы использовали экологически чистое сырье богатое комплексом питательных веществ, необходимых для роста и развития лактобактерий - тибетский молочный гриб (ТМГ), каллизия душистая и молоки лососевых рыб.

Тибетский молочный гриб является сложной биологической субстанцией - симбионтом, обладающим мощными факторами роста, состоящим из нескольких бактериальных компонентов, молочных и дрожжеподобных микроорганизмов. Установлено, что в настое ТМГ обнаружены: лизин солянокислый, пролин, валин, треонин, фенилаланин и другие неразделенные аминокислоты, которые являются факторами роста молочнокислых бактерий. Не менее важным при определении качества и полезности пищевого продукта является содержание в нем определенных витаминов: В₁, В₂, В₁₂, РР, В₅, А и D [3, 15]. Также в составе молочного настоя этого гриба обнаружены кальций, железо, йод, цинк, фолиевая кислота, ферменты, кислоты, легко усвояемые белки и полисахариды [7, 11].

Каллизия является, одним из немногих комнатных растений, позволяющих рассчитывать на универсальность продукта ее гидролиза (гидролизата), за счет содержания многочисленных уникальных элементов, необходимых для роста и развития лактобактерий. Она имеет следующий биохимический состав: каротиноиды, аскорбиновая кислота, флавоноиды, пектины, дубильные вещества, катехины. В каллизии также есть витамины С, В₂, В₁₅, РР, микро- и макроэлементы: калий, кальций, железо, марганец, ванадий, никель, медь, цинк, галлий, бром, стронций, рубидий, цирконий, свинец, уран, торий [10].

Важной составной частью молок лососевых рыб являются белки – высокомолекулярные азотистые органические вещества, расщепляющиеся в процессе гидролиза на низкомолекулярные вещества, которые необходимы для роста молочнокислых бактерий. На поздних стадиях сперматогенеза у лососевых и родственных им рыб в ядрах клеток семенников появляется протамины – спермаспецифические белки с низким молекулярным весом и с большим содержанием аргинина. Из спермы рыб можно выделить большое количество протаминов - сальмин, клупеин, штуран [13].

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования явилось изучение влияния новых ферментативных гидролизатов из нетрадиционного сырья природного происхождения на рост лактобактерий *in vivo* и *in vitro*.

На первом этапе исследования нами было изучено влияние гидролизатов из ТМГ, каллизии душистой и молок лососевых рыб на лактофлору белых лабораторных крыс ли-

нии Вистар (n=30), массой 180-220 г. Все животные содержались в одинаковых условиях вивария, с одинаковым пищевым рационом. Из них были сформированы три группы, по 10 крыс в каждой.

Перед началом исследования у всех крыс был произведен забор биологического материала (фекалий) в количестве одного грамма. Определение лактофлоры производили путем гомогенизации биоматериала в 9 мл физиологического раствора, с последующими разведениями физраствором до 10^{10} - 10^{11} . Полученные разведения высевали на полужидкую среду МРС - агар. Подсчет суммарного количества лактобактерий проводился по общепринятой методике, без идентификации рода и вида [12].

В дальнейшем ежедневно в течение 10 дней крыс первой группы выпаивали гидролизатом из тибетского молочного гриба, второй - из каллизии душистой и третьей - из молок лососевых рыб в дозировке 1 мл на особь. Затем производили микробиологический контроль содержимого кишечника каждой крысы.

Результаты исследований приведены в таблицах 1, 2, 3.

Таблица 1

Суммарное содержание лактобактерий белых лабораторных крыс до и после выпаивания гидролизата из тибетского молочного гриба

| № животного по порядку | Количество лактобактерий до выпаивания (КОЕ) | Количество лактобактерий после выпаивания (КОЕ) |
|------------------------|--|---|
| Крыса 1 | 10^3 | 10^4 |
| Крыса 2 | 10^3 | 10^4 |
| Крыса 3 | 10^4 | 10^5 |
| Крыса 4 | 10^3 | 10^4 |
| Крыса 5 | 10^4 | 10^4 |
| Крыса 6 | 10^4 | 10^5 |
| Крыса 7 | 10^3 | 10^4 |
| Крыса 8 | 10^3 | 10^4 |
| Крыса 9 | 10^3 | 10^4 |
| Крыса 10 | 10^4 | 10^4 |

Из результатов, представленных в таблице 1 видно, что до выпаивания гидролизата из ТМГ суммарное содержание лактобактерий, составило 10^3 - 10^4 КОЕ. После выпаивания гидролизата количество этих микроорганизмов увеличилось до 10^4 - 10^5 КОЕ. При этом у восьми крыс после выпаивания наблюдалось повышение количества лактобактерий на один порядок и только у двух – оставалось неизменным.

Таблица 2

Суммарное содержание лактобактерий белых лабораторных крыс до и после выпаивания гидролизата из каллизии душистой

| № животного по порядку | Количество лактобактерий до выпаивания (КОЕ) | Количество лактобактерий после выпаивания (КОЕ) |
|------------------------|--|---|
| Крыса 1 | 10^4 | 10^6 |
| Крыса 2 | 10^5 | 10^6 |
| Крыса 3 | 10^4 | 10^5 |
| Крыса 4 | 10^4 | 10^6 |
| Крыса 5 | 10^4 | 10^5 |
| Крыса 6 | 10^3 | 10^6 |
| Крыса 7 | 10^3 | 10^5 |
| Крыса 8 | 10^3 | 10^5 |
| Крыса 9 | 10^3 | 10^6 |
| Крыса 10 | 10^4 | 10^6 |

Результаты исследований, приведенные в таблице 2, доказывают высокое лактостимулирующее влияние гидролизата из каллизии душистой на микрофлору кишечника крыс. Повышение суммарного содержания лактобактерий отмечено у всех подопытных животных. Так например, у трех крыс после выпаивания наблюдалось увеличение суммарного количества лактобактерий на один порядок, у пяти - на два порядка и у двух - на три порядка.

Таблица 3

Суммарное содержание лактобактерий белых лабораторных крыс до и после выпаивания гидролизата из молок лососевых рыб

| № животного по порядку | Количество лактобактерий до выпаивания (КОЕ) | Количество лактобактерий после выпаивания (КОЕ) |
|------------------------|--|---|
| Крыса 1 | 10^5 | 10^4 |
| Крыса 2 | 10^5 | 10^5 |
| Крыса 3 | 10^4 | 10^5 |
| Крыса 4 | 10^4 | 10^4 |
| Крыса 5 | 10^4 | 10^4 |
| Крыса 6 | 10^4 | 10^5 |
| Крыса 7 | 10^5 | 10^6 |
| Крыса 8 | 10^5 | 10^5 |
| Крыса 9 | 10^4 | 10^6 |
| Крыса 10 | 10^4 | 10^5 |

Полученные результаты, представленные в таблице 3 свидетельствуют о некотором лактостимулирующем эффекте гидролизата из молок лососевых рыб, что подтверждено увеличением суммарного содержания лактобактерий у 50% экспериментальных животных. Из числа этих крыс, у одной крысы наблюдалось увеличение суммарного содержания лактобактерий на два порядка, а у четырех - на один. У остальных крыс при применении этого гидролизата суммарные показатели лактофлоры стабильны и только у одной крысы наблюдалось снижение на порядок.

Таким образом, выявлен лактостимулирующий эффект всех ферментативных гидролизатов, наиболее выраженный при использовании гидролизатов из ТМГ и каллизии душистой. Несмотря на это, следует отметить, что результаты, полученные при выпаивании гидролизата молок лососевых рыб, не исключают более выраженного влияния его на других представителей микробиоценоза кишечника, что, безусловно, требует дополнительных исследований.

Полученные результаты открывают перспективы использования данных гидролизатов в питательных средах в качестве стимуляторов роста лактобактерий. В связи с этим на втором этапе исследования нами изучено влияние ферментативных гидролизатов из ТМГ и каллизии душистой на ростовые качества питательной среды при культивировании лактобактерий.

Гидролизаты использовали в качестве стимуляторов роста, в тех концентрациях, которые являются наиболее употребляемыми в микробиологической практике для питательных добавок при выращивании микроорганизмов, т.е. в дозах 0,5; 1; 1,5; 2% от объема питательной среды. Культуры лактобактерий выращивали на чашках Петри на плотной МРС-среде с гидролизатом и без него (контроль). Испытывали тест-штаммы *L. plantarum* 8P-A3 и *L. acidophilus* EP 317-402. Взятые сухие культуры по оптическому стандарту мутности ОСО, ГИСК им. Л.А. Тарасевича серийными десятикратными разведениями в физиологическом растворе в объеме 4,5 мл довели до содержания в 1 мл 100 микробных клеток. Из каждого разведения высевали стерильной пипеткой по 0,1 мл

(10 микробных клеток) на три чашки Петри. Культивирование лактобактерий осуществлялось в термостате при 37°C. Полученные данные приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4

Ростовые качества питательной среды с добавлением ферментативного гидролизата из тибетского молочного гриба

| Концентрация гидролизата в % к объему МРС-среды | Количество и диаметр колоний через 48 часов после культивирования | |
|---|---|---------------------------|
| | L. plantarum 8P-A3 | L. acidophilus EP 317-402 |
| 0,5 | 19 колоний, D = 0,8 мм | 12 колоний, D = 0,7 мм |
| 1 | 19 колоний, D = 1,8 мм | 16 колоний, D = 1,5 мм |
| 1,5 | 20 колоний, D = 2,0 мм | 18 колоний, D = 1,8 мм |
| 2 | 24 колония, D = 2,3 мм | Сплошной рост |
| КОНТРОЛЬ | 17 колоний, D = 1,0 мм | 15 колоний, D = 1,0 мм |

Из таблицы 4 видно, что использование даже в минимальных концентрациях (0,5%) ферментативного гидролизата из ТМГ, оказало ростостимулирующий эффект на *L. plantarum* 8P-A3 по сравнению с контролем, заключающийся в увеличении числа колоний.

При культивировании *L. acidophilus* EP 317-402 эффект стимуляции хорошо выражен при добавлении 2% ТМГ к объему МРС-среды. Установлено, что чем больше концентрация гидролизата, тем он наиболее эффективен, что открывает перспективы его дальнейшего использования в качестве основы питательной среды.

Таблица 5

Ростовые качества питательной среды с добавлением ферментативного гидролизата из каллизии душистой

| Концентрация гидролизата в % к объему МРС-среды | Количество и диаметр колоний через 48 часов после культивирования | |
|---|---|---------------------------|
| | L. plantarum 8P-A3 | L. acidophilus EP 317-402 |
| 0,5 | 18 колоний, D = 0,7 мм | 16 колоний, D = 0,7 мм |
| 1 | 28 колоний, D = 1,0 мм | 20 колоний, D = 1,0 мм |
| 1,5 | 12 колоний, мелкие | 11 колоний, мелкие |
| 2 | 3 колонии, мелкие | 10 колоний, мелкие |
| КОНТРОЛЬ | 17 колоний, D = 1,0 мм | 15 колоний, D = 1,0 мм |

Результаты, отраженные в таблице 5 свидетельствуют, что гидролизат из каллизии душистой в минимальных концентрациях (0,5-1%) является наиболее эффективным. Это особенно выражено в процессе культивирования *L. plantarum* 8P-A3 и *L. acidophilus* EP 317-402 при добавлении 1% ферментативного гидролизата к общему объему питательной среды. Выявлено, что повышение концентрации гидролизата приводит к уменьшению количества и размера колоний, что обуславливает целесообразность его применения в качестве стимулятора роста лактобактерий.

Полученные данные указывают на целесообразность широкой апробации новых гидролизатов из тибетского молочного гриба, каллизии душистой и молок лососевых рыб в качестве составного компонента питательных сред, пребиотической основы для биологически активных препаратов, и на необходимость дальнейшего изучения возможности расширения сферы их применения в медицинской и ветеринарной практике. С учетом сравнительно низкой себестоимости гидролизатов, открываются широкие перспективы для их промышленного применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Амирова, В.Р. Характеристика микрофлоры и антибиотикорезистентность микроорганизмов у новорожденных из групп высокого риска по внутриутробному инфицированию / В.Р. Амирова, Э.Н. Ахмадеева, З.Г. Габидуллин и др. // Педиатрия. – 2000. - №3. – С. 14-17.
2. Анкирская, А.С. Видовой состав и некоторые биологические свойства лактобацилл при различных состояниях микроэкологии влагалища / А.С. Анкирская, В.В. Муравьева // Акушерство и гинекология – 2000. - №3. - С. 26-28.
3. Афанасьева, О.В. Лечение молочным грибом / О.В. Афанасьева. – СПб.: «Астрель», 2007. – 45 с.
4. Баснакьян, И.А. Голодание бактерий. Стресс, обусловленный лимитом субстрата/ И.А. Баснакьян, В.А. Мельникова // Микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2001. - №1. – С. 99-103.
5. Борелло, С.П. Микрофлора, секреторная и моторная деятельность желудочно-кишечного тракта / С.П. Борелло - М.: Медицина. 1989. - С. 482-492.
6. Бургасова, П.Н. Руководство по вакцинному и сывороточному делу / П.Н. Бургасова. - М.: Медицина, 1978. – С. 45-153.
7. Буторина, О. Чайный гриб и Тибетский молочный гриб / О. Буторина. - Ростов-на-Дону: «Феникс», 2006. – 84 с.
8. Воронина, М.Н. Лактобациллы микрофлоры желудка человека. Автореф. дисс...канд. мед. наук. – Тарту, 1968.- 28 с.
9. Дзержинская, И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов / И.С. Дзержинская. Астрахан. гос. техн. ун-т. - Астрахань: АГТУ, 2008. – С. 230-236. Кедрова, М.Н. Золотой ус / М.Н. Кедрова, СПб.: Питер. – 2006. - С. 7-80.
10. Корзунова А. Секреты народов Тибета. Тибетский молочный гриб - эликсир жизни / А. Корзунова. – М.: «Эксмо», 2005. – 78 с.
11. Кузько, Н.В., Дисбактериоз кишечника: показания к исследованию испражнений для его диагностики и оценки полученных результатов / Н.В. Кузько, А.В. Максимова, Л.К. Гриневич, А.М. Крейдич, В.З.Редька // Киев – 1996. – С. 7.
12. Лавровская, Н.Ф. Современные исследования по биохимии рыб / Лавровская Н.Ф., 1973. – С. 6.
13. Несчислаев, В.А. Унификация технологии получения и контроля препаратов для бактериотерапии с использованием питательных сред из непившего сырья: Дисс... канд. мед. наук / В.А. Несчислаев – 1989. – 147 с.
14. Романова, О.В. Лечебные грибы для вашего здоровья / О.В. Романова. – СПб.: «Невский проспект», 2006. – 36 с.
15. Тимербаева, Р.Х. Усовершенствование технологии производства лактобактерина / Р.Х. Тимербаева, Н.Н. Ворошилова, Т.А. Баталова, Н.В. Загидуллин // Актуальные вопросы разработки производства и применения иммунобиологических препаратов: Труды Всерос. конф.- Уфа, 2000. – С. 193-198.
16. Ткаченко, Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко, Ю.П. Успенский. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 316 с.

L. Timchenko, N. Penkova

INFLUENCE NEW FERMENTATIVE HYDROLYZATES FROM NONCONVENTIONAL RAW MATERIAL OF THE NATURAL ORIGIN ON GROWTH LACTOBACTERIUM IN VIVO AND IN VITRO

Abstract: The high stimulating effect new fermentative hydrolyzates from the Tibetan dairy mushroom, *Callisia fragrans* and milt salmon fishes on growth lactobacterium, both in vivo, and in vitro is revealed.

Key words: hydrolyzate, lactobacterium, milt salmon fishes, Tibetan dairy mushroom, *Callisia fragrans*, growth stimulator, medium.