

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ В КОМБИНАЦИИ С ОЦЕНКОЙ ВИТАМИН-В-ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИООБОГАЩЕННЫХ ПРОДУКТОВ

Н.Ю. Хромова, Ю.М. Епишкина, Н.В. Хабибулина, И.В. Шакир, В.И. Панфилов

ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва, Россия

Введение

Витамины группы В – важные микронутриенты, принимающие участие во множестве метаболических и регуляторных процессов, протекающих во всех формах клеточной жизни. Их дефицит может значительно влиять на метаболизм организма хозяина, приводя к различным нарушениям. Организм млекопитающих не способен синтезировать большинство витаминов группы В, от чего их поступление в значительной мере зависит от питательности рациона. Одним из недавно установленных источников витаминов группы В являются микроорганизмы, населяющие желудочно-кишечный тракт [1]. Важным преимуществом микробных витаминов перед пищевыми является их выработка и всасывание в толстом кишечнике, где они могут выполнять различные важные функции и действовать как питательные вещества для хозяина и микробиоты, регуляторы активности популяций иммунных клеток, медиаторы эффективности лекарственных средств, протекторы выживания или приспособленности определенных бактерий, супрессоры колонизации патогенными бактериями, модуляторы колита [2]. Использование же синтетических витаминов, например фолиевой кислоты, может иметь некоторые неблагоприятные последствия для здоровья человека, такие как маскировка симптомов дефицита витамина В₁₂ и, возможно, возникновение определенных видов рака [3]. Кроме того, синтетические витамины требуют больше времени для метаболизма человеком, чем витамины в их натуральной форме [4].

Естественными представителями микробиоты кишечника являются бактерии различных видов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, которые находят широкое применение в качестве пробиотиков. В настоящее время показано, что некоторые изолированные штаммы лакто- и бифидобактерий могут продуцировать семь из восьми витаминов группы В [2]. Штаммы, обладающие не только пробиотическими свойствами, но и витамин-синтезирующей способностью, имеют наибольший потенциал для применения в технологиях производства ферментированных биообогащенных продуктов и в качестве активного компонента пробиотических препаратов. Благодаря разумному выбору стартовых заквасочных культур, а также условий их культивирования возможно повышение концентрации витаминов группы В в ферментированных продуктах естественным образом без внесения химически синтезированных витаминов. При достижении толстого кишечника за счет устойчивости к стрессовым факторам желудочно-кишечного тракта и адгезивных свойств такие штаммы микроорганизмов смогут его колонизировать и продуцировать витамины группы В непосредственно *in situ*, что может повысить эффективность при лечении пациентов, страдающих широким спектром воспалительных заболеваний, и предотвратить нежелательные побочные эффекты [5]. Важность кишечных бактерий как источника витаминов также была продемонстрирована на крысах и цыплятах гнотобиотах, которым для нормального развития требовались диетические добавки различных витаминов, не требуемые обычным животным [6].

Таким образом цель работы заключалась в исследовании пробиотических адгезивных свойств (способности к автоагрегации) штаммов лакто- и бифидобактерий, характеризующих потенциальные колонизирующие свойства, в комбинации с анализом их витамин-В-продуцирующего потенциала при культивировании на стандартных питательных средах для отбора наиболее перспективных.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали штаммы лакто- и бифидобактерий, выделенные от человека (*L. acidophilus* В-6551 (фекалии новорожденного ребенка), *L. acidophilus* В-2213 (слюна человека), *L. casei* В-2873 (слюна человека), *L. acidophilus* В-6553 (фекалии взрослого человека), *L. ghamnosus* В-8238 (кишечник здорового ребенка первого года жизни), *L. rarasaei* В-11657 (желудочно-кишечный тракт человека), *B. adolescentis* АС-1662 (кишечник взрослого человека), *B. breve* АС-1911 (кишечник ребенка), *B. longum* АС-1665 (кишечник взрослого человека),

B. Bifidum AC-1779 (кишечник взрослого человека), *B. bifidum* AC-1666 (кишечник грудного ребенка)), предоставленные Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва, Россия). Для получения инокулята и исследования способности к синтезу витаминов группы В лактобактерии культивировали в питательной среде MRS при 37 °С в течение 24 ч, бифидобактерии – в бифидум-среде при 37 °С в течение 24 ч. Способность штаммов лакто- и бифидобактерий к автоагрегации определяли согласно методике описанной Collado, Meriluoto и Salminen [7] с выражением в процентах автоагрегации. Анализ свободных форм водорастворимых витаминов группы В и их количественное определение в культуральной жидкости пробиотических бактерий проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель – 105М» «Люмэкс» (Россия) согласно практическому руководству по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» [8] и методике М 04–72–2011 [9].

Результаты

Проценты автоагрегации протестированных культур лакто- и бифидобактерий в зависимости от времени инкубации, по которым можно судить об адгезивных свойствах бактерий, представлены в таблицах 1 и 2. Среди протестированных штаммов лактобактерий вида *L. acidophilus* наибольшая степень автоагрегации была характерна для В-6551 и В-2213, а наименьшая – для В-6553, что говорит о штамм-специфичности автоагрегационной способности.

Таблица 1. Процент автоагрегации штаммов лактобактерий в зависимости от продолжительности инкубирования при 37 °С

Штаммы лактобактерий	Время			
	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч
<i>L. acidophilus</i> В-6551	25	50	52	55
<i>L. acidophilus</i> В-2213	12	49	50	53
<i>L. casei</i> В-2873	6	13	12	32
<i>L. acidophilus</i> В-6553	5	8	8	25
<i>L. rhamnosus</i> В-8238	16	44	46	50

У бифидобактерий способность к автоагрегации также сильно варьировала между видами. Среди протестированных штаммов наибольшая степень автоагрегации наблюдалась у *B. adolescentis* AC-1662, а наименьшая – у *B. breve* AC-1911.

Таблица 2. Процент автоагрегации штаммов бифидобактерий в зависимости от продолжительности инкубирования при 37 °С

Штаммы бифидобактерий	Время			
	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч
<i>B. adolescentis</i> AC-1662	15	48	53	69
<i>B. breve</i> AC-1911	12	32	30	31
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> AC-1665	20	56	59	67
<i>B. bifidum</i> AC-1779	34	47	55	57
<i>B. bifidum</i> AC-1666	22	44	39	31

Результаты анализа культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий после культивирования на стандартных питательных средах на содержание водорастворимых витаминов группы В методом капиллярного электрофореза показаны в таблицах 3 и 4.

Накопление витаминов в ферментационной среде лактобактерий для каждого рассмотренного штамма было различным. Некоторые штаммы накапливали рибофлавин, пантотеновую кислоту и пиридоксин. Стоит отметить, что штаммы *L. acidophilus* В-6551 и *L. casei* В-2873 накапливали наибольшее количество пантотеновой кислоты 447,30 мг/л и 520,40 мг/л, соответственно.

В ферментационной среде бифидобактерий обнаруживались рибофлавин, никотинамид и пиридоксин, концентрации которых также варьировали. У штаммов *B. adolescentis* AC-1662 и *B. breve* AC-1911 после культивирования наблюдалось значительное увеличение концентрации никотинамида в среде.

Таблица 3. Концентрация витаминов группы В в культуральной жидкости лактобактерий, полученной после культивирования в стандартной среде MRS

Штаммы лактобактерий	Концентрация витаминов, мг/л			
	Рибофлавин (B2)	Пантотеновая кислота (B3)	Никотинамид (B5)	Пиридоксин (B6)
<i>L. acidophilus</i> B-6551	–*	447,30	11,61	–
<i>L. acidophilus</i> B-2213	–	–	10,21	1,37
<i>L. casei</i> B-2873	2,43	520,40	14,21	–
<i>L. acidophilus</i> B-6553	1,80	–	11,79	–
<i>L. rhamnosus</i> B-8238	–	–	10,30	–
Питательная среда до ферментации	0,59	–	11,37	0,95

Таблица 4. Концентрация витаминов группы В в культуральной жидкости бифидобактерий, полученной после культивирования в бифидум-среде

Штаммы бифидобактерий	Концентрация витаминов, мг/л		
	Рибофлавин (B2)	Никотинамид (B5)	Пиридоксин (B6)
<i>B. adolescentis</i> AC-1662	–*	14,09	–
<i>B. breve</i> AC-1911	0,50	48,07	0,89
<i>B. longum</i> AC-1665	–	–	–
<i>B. bifidum</i> AC-1779	–	–	0,49
<i>B. bifidum</i> AC-1666	–	2,11	0,57
Питательная среда до ферментации	0,34	0,04	–

Дискуссия

Наличие бактериальной агрегации у пробиотических штаммов часто связывают с потенциальной способностью к адгезии к кишечному эпителию и слизистым оболочкам [10]. В большинстве случаев бактериальная автоагрегация опосредована гомотипическими взаимодействиями между поверхностными белками [11]. Определение автоагрегационной способности бактерий методами *in vitro* для отбора потенциальных пробиотических штаммов является первым шагом перед экспериментами *in vivo* для установления возможной пользы пробиотиков для здоровья [12]. В нашем исследовании наибольший адгезивный потенциал был определен у штаммов лактобактерий *L. acidophilus* ВКПМ В-6551 и *L. acidophilus* ВКПМ В-2213 и бифидобактерий *B. adolescentis* ВКПМ АС-1662 и *B. longum* subsp. *longum* ВКПМ АС-1665. Оценка витамин-В-продуцирующего потенциала по накоплению водорастворимых витаминов группы В в ферментационной среде методом капиллярного электрофореза показала, что к их внеклеточному высвобождению способны многие протестированные штаммы лакто- и бифидобактерий. Наибольший интерес представляют штаммы *L. acidophilus* ВКПМ В-6551 и *L. casei* ВКПМ В-2873, а также *B. adolescentis* ВКПМ АС-1662 и *B. breve* ВКПМ АС-1911.

Заключение

В этом исследовании на основании оценки автоагрегационной способности и витамин-продуцирующего потенциала отобраны наиболее перспективные пробиотические штаммы, обладающие наилучшими характеристиками. В качестве потенциальных заквасок для биообогащения ферментированных продуктов пантотеновой кислотой можно использовать лактобактерии *L. acidophilus* ВКПМ В-6551 и *L. casei* ВКПМ В-2873, при наличии у последнего также способности накапливать рибофлавин. При этом штамм *L. acidophilus* ВКПМ В-6551 также характеризовался высоким процентом автоагрегации. В качестве потенциальных заквасок для биообогащения ферментированных продуктов никотинамидом можно использовать бифидобактерии *B. adolescentis* ВКПМ АС-1662 и *B. breve* ВКПМ АС-1911. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на определении влияния отдельных компонентов питательных сред на накопление витаминов группы В лакто- и бифидобактериями в ферментационной среде, а также при ферментации различных пищевых молочных и растительных матриц.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта Президента РФ на 2021–2022 гг. для молодых ученых – кандидатов наук, соглашение № 075–15–2021–459 (МК-1171.2021.5).

Литература

1. Peterson C.T. et al. B vitamins and their role in immune regulation and cancer // *Nutrients*. 2020. V. 12(11). P. 3380.
2. Uebanso T. et al. Functional roles of B-vitamins in the gut and gut microbiome // *Molecular nutrition & food research*. 2020. Vol. 64(18). P. 2000426.
3. Cavalcanti de Albuquerque M.A. et al. Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures // *International Journal of Food Microbiology*. 2016. Vol. 236. P. 26–32.
4. Cavalcanti de Albuquerque M.A., Moreno de LeBlanc A.D., LeBlanc J.G., & Bedani R. Lactic Acid Bacteria: A Functional Approach. 2020.
5. Leblanc J.G. et al. Application of vitamin-producing lactic acid bacteria to treat intestinal inflammatory diseases // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. Vol. 104. P. 3331–3337.
6. Coates M.E. Gnotobiotic animals in nutrition research // *Proceedings of the Nutrition Society*. 1973. Vol. 32(2). P. 53–58.
7. Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains // *European food research and technology*. 2008. Vol. 226(5). P. 1065–1073.
8. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» // СПб. ООО «Веда». 2006. Т. 212.
9. М 04–72–2011. Методика измерений содержания свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных концентратах, смесях и добавках, в том числе жидких, методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105/105М».
10. Del Re B. et al. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum* // *Letters in applied microbiology*. 2000. Vol. 31(6). P. 438–442.
11. Trunk T., Khalil H.S., Leo J.C. Bacterial autoaggregation // *AIMS microbiology*. 2018. Vol. 4(1). P. 140.
12. Pineiro M., Stanton C. Probiotic Bacteria: Legislative Framework – Requirements to Evidence Basis // *J. Nutr.* 2007. Vol. 137. P. 850S–853S.