

УДК 579.864.1:616.331

Г. В. Ямборко¹, канд. техн. наук, доц., В. І. Маленкова¹, студ.,
А. П. Петросьянц², асп.

¹ Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65 026, Україна
e-mail: ivanitsa@yandex.ru

² Одеська національна академія харчових технологій,
кафедра біохімії і мікробіології,
вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна

ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS* ВИЛУЧАТИ ХОЛЕСТЕРИН ІЗ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА

Вивчено здатність деяких промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* зменшувати рівень холестерину у живильному середовищі. Встановлено, що найбільшою здатністю поглинати холестерин з рідкого середовища МРС володів штам *Lactobacillus acidophilus* OL4. З'ясовано, що вилучення холестерину з культурального середовища відбувається інтенсивніше при низькому значенні рН (4,2—4,5).

Ключові слова: лактобацили, холестерин.

Багаточисельними дослідженнями вітчизняних та зарубіжних авторів доведено, що підвищення загального змісту холестерину в крові людини збільшує ризик виникнення коронарних серцевих захворювань. За даними Академії медичних наук України від 75 до 80 % населення нашої країни страждає на захворювання серцево-судинної системи. Лікувальні засоби, які пропонуються, не завжди є ефективними.

У останні десятиріччя в науковій літературі з'явилися повідомлення, що вживання певних кисломолочних продуктів, які створені на основі бактерій роду *Lactobacillus*, приводить до зниження рівня холестерину в організмі людини і тварин [1—4].

Існує дуже мало інформації про дію лактобацил на холестерин та інші стероїдні речовини. Вважаємо, що вивчення заквасочних штамів лактобактерій з погляду використання їх як стартерних культур при виробництві продуктів функціонального харчування, що контролюють рівень холестерину в організмі і тим самим знижують ризик коронарних захворювань серця, є актуальним.

Тому метою даної роботи було визначення здатності деяких промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* зменшувати рівень холестерину у живильному середовищі.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були штами бактерій роду *Lactobacillus*, що використовуються у якості стартерних культур для одержання комерційних препаратів і продуктів лікувально-профілактичного призначення: *L. acidophilus* 317/402 (кисломолочний продукт "Нарине", Україна), *L. johnsonii* La1 (пробіотичний йогурт "Nestle-Mis-Lc1", Швейцарія), *L. plantarum* 8P-A3 ("Лактобактерін" сухий, Росія), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2 (йогурт виробництва "Фармасайнс Інк", Канада), а також штама *L. acidophilus* OL4, виділений з некомерційного ферментованого продукту, виготовленого у Одеському регіоні.

Для визначення стійкості до жовчі досліджувані штами вирощували у рідкому середовищі МРС за наявності 0,3 % бичачої жовчі і без неї. В усіх варіантах експерименту 0,1 мл добової культури лактобацил (10^8 КУО/мл) вносили у 5 мл середовища МРС (рН 6,0) і інкубували при температурі 37 °С протягом 18 годин. Число КУО в 1 мл середовища визначали шляхом висіву 0,1 мл культури з розведень 10^{-7} і 10^{-8} на щільне середовище МРС через 3, 6, 9 і 18 годин культивування.

Для визначення інтенсивності впливу бактерій на вміст у середовищі холестерину добову культуру лактобацил інокулювали у МРС бульйону з додаванням бичачої жовчі, тіоглікохолату натрію і свіжовиготовленого розчину холестерину [5]. Пробірки з інокульованим живильним середовищем вирощували у стандартних умовах без контролю рН середовища і з постійним його значенням (рН 6,0) для середовища МРС. Усі інокульовані культури вирощували анаеробно при 37 °С на водяній бані. Проби відбирали в асептичних умовах через 0, 16, 18, 20 і 22 години культивування.

Клітини вилучали з бульйону центрифугуванням протягом 10 хвилин при 12000 об/хв і температурі 1 °С. Для визначення холестерину у середовищі МРС використовували метод, описаний L. Rudel [6] і модифікований співробітниками відділу біотехнології Технологічного інституту молока і м'яса УААН. Паралельно з досліджуваними пробами визначали вміст холестерину в неінокульованому стерильному бульйоні, а також у стандартній пробі, що містить 0,1 мг холестерину.

Вміст холестерину (мг/мл) обчислювали за формулою:
$$\frac{1 \text{ мг} / \text{мл} \times E_{\text{проби}}}{E_{\text{стандарту}}}$$

де E — оптична щільність розчинів.

Кількість холестерину, поглинену і вилучену з бульйону, визначали вирахуванням кількості холестерину, що міститься у пробі, від кількості холестерину у неінокульованому контрольному бульйоні МРС [5, 6].

Усі експериментальні дані, отримані за проведення досліджень, обробляли математично за програмою STATISTICA ©5.XX for Windows (StatSoft Inc., USA).

Результати досліджень

Згідно з даними К. Hutkins [7] поглинання холестерину бактеріями спостерігається тільки у випадку анаеробного вирощування культури лактобацил у присутності жовчі. Тому було доцільно провести тестування досліджуваних культур на їх резистентність до жовчі. Кількість жовчі, необхідної для того, щоб культура бактерій впливала на вміст холестерину в ростовому середовищі, не повинна перевищувати нормального її рівня у шлунково-кишковому тракті [8]. Тому експериментальна концентрація жовчі в живильному середовищі складала 0,3 %.

Відомо, що активність процесу ферментування субстрату залежить від того, наскільки швидко мікроорганізми проходять lag-фазу і наскільки стрімко піднімається логарифмічна частина кривої росту. В результаті досліджень встановлено, що найкращі результати отримані при культивуванні штаму *L. acidophilus* OL4 (табл. 1). Інтенсивність його росту (штам характеризувався найменшою lag-фазою) і, відповідно, кількість колонієутворюючих одиниць при рості даного штаму в рідкому середовищі МРС були достовірно вищими, ніж у інших досліджуваних штамів лактобацил ($p \leq 0,05$).

При порівнянні культур по їх резистентності до жовчі, було встановлено, що штами *L. acidophilus* OL4 і *L. acidophilus* 317/402 виявилися найбільш стійкими до жовчі у концентрації 0,3 %. Піст штамів *L. plantarum* 8P-A3, *L. johnsonii* La1 і *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* N2 характеризувався збільшенням lag-фази і зниженням кількості життєздатної біомаси.

За вивчення стійкості досліджуваних штамів лактобацилл до жовчі підтвердилися дані, отримані S. E. Gilliland [2], який виявив, що штами бактерій роду *Lactobacillus*, що повільно ростуть у контрольному бульйоні, являються менш жовчетолерантними.

Для визначення здатності досліджуваних штамів лактобацил впливати на рівень холестерину у середовищі пробірки з живильним середовищем МРС, засіяним тест-культурами лактобацил, вирощували без одночасного контролю рН і з постійним його значенням (рН = 6,0).

Значення рН ростового середовища, що на початку експерименту дорівнювало 6,0 для усіх тестованих штамів лактобацил, знизилося до значення 4,2 після 16 і 18 годин росту для *L. acidophilus* OL4 і *L. acidophilus* 317/402 відповідно і залишалось незмінним до кінця дослідження.

рН середовища, у якому культивували штами *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* N2 і *L. johnsonii* La1, понизилася до значень 4,3, 4,2 і 4,5 відповідно після 22 годин інокуляції. рН зразків, вирощених у середовищі з контрольованою кислотністю, спочатку дорівнювала 6,0, але знижувалася до 5,8 із-за продукції органічних кислот. Після цього рН підтримували на рівні 5,8 протягом усього експерименту.

Таблиця 1

Інтенсивність росту досліджуваних штамів лактобацил на середовищі МРС з добавкою жовчі

Досліджуваний штам	Кількість клітин (lg КУО у 1 см ³)							
	через 3 години росту		через 6 годин росту		через 9 годин росту		через 18 годин росту	
	контроль	МРС+жовч	контроль	МРС+жовч	контроль	МРС+жовч	контроль	МРС+жовч
<i>L. acidophilus</i> OL4	7,4 ± 0,2	6,6 ± 0,2	8,6 ± 0,1	6,8 ± 0,4	8,8 ± 0,6	7,4 ± 0,1	8,6 ± 0,2	7,1 ± 0,3
<i>L. acidophilus</i> 317/402	7,1 ± 0,1	6,3 ± 0,5	8,4 ± 0,9	6,5 ± 0,5	8,5 ± 0,3	7,1 ± 0,5	8,5 ± 0,6	6,6 ± 0,5
<i>L. johnsonii</i> La1	7,1 ± 0,5	5,7 ± 0,1	7,7 ± 0,2	5,9 ± 0,2	8,1 ± 0,1	6,2 ± 0,1	8,0 ± 0,1	6,1 ± 0,2
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	6,7 ± 0,3	6,1 ± 0,2	7,8 ± 0,1	6,3 ± 0,1	8,1 ± 0,6	6,6 ± 0,3	8,0 ± 0,2	6,2 ± 0,3
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> N2	6,9 ± 0,6	5,4 ± 0,4	8,2 ± 0,9	5,6 ± 0,6	8,2 ± 0,3	5,9 ± 0,3	8,2 ± 0,2	5,6 ± 0,5

Кількість холестерину, вилученого з рідкого середовища МРС, було різним для досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus*. Достовірних розходжень у кількості холестерину, поглиненого штамом *L. acidophilus* 317/402 із МРС бульйону в умовах контрольованого і неконтрольованого значення рН, не виявлено в жодному з досліджуваних зразків (рис. 1).

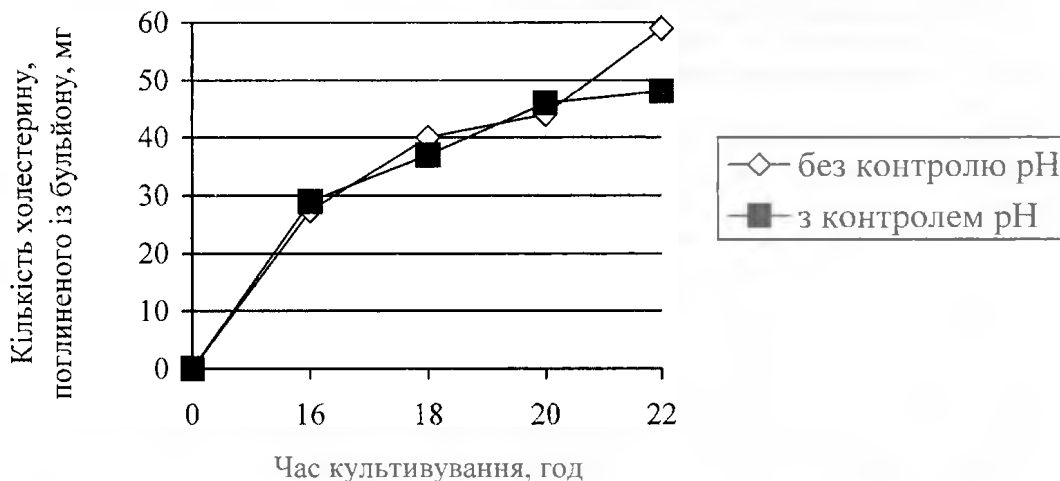


Рис. 1. Вплив *Lactobacillus acidophilus* 317/402 на вміст холестерину в МРС бульйоні в умовах контрольованого і неконтрольованого значення рН.

Для штаму *L. acidophilus* OL4 кількість холестерину, вилученого з МРС середовища з рН 5,8, була значно нижчою, ніж з бульйону без фіксованого значення рН при аналізі зразків після 16, 18 і 20 годин інкубації (рис. 2). Однак, у пробі, відібраній після 22 годин культивування штаму, різниця у кількості поглиненого холестерину була незначною (59,7 і 64,2 мг відповідно).

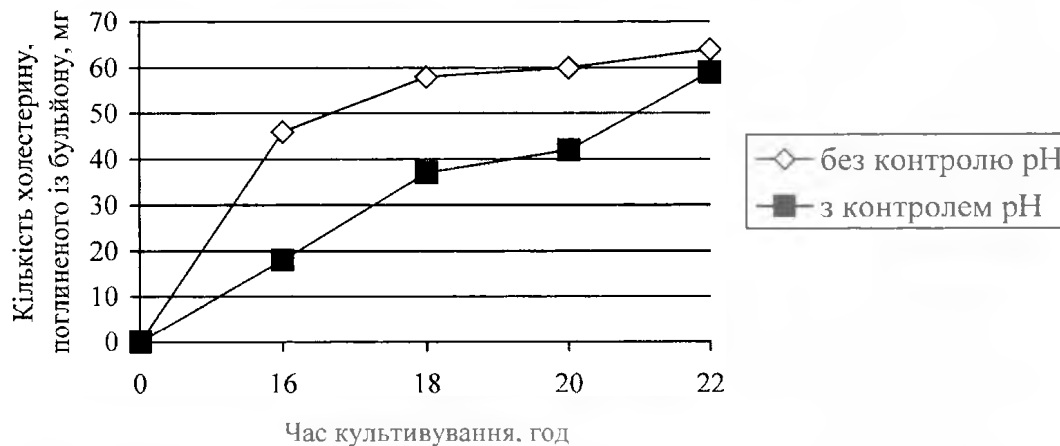


Рис. 2. Вплив *Lactobacillus acidophilus* OL4 на вміст холестерину в МРС бульйоні в умовах контрольованого і неконтрольованого значення рН.

Кількість поглиненого холестерину, виявлена за культивуванням штамів *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2 і *L. johnsonii La1* у середовищі MPC із додаванням 0,3 % бичачої жовчі, 2 % тіоглікохолату натрію і 10 % розчину холестерину, була достовірно нижчою ($p \leq 0,05$), ніж для штамів виду *L. acidophilus*. У той же час штам *L. plantarum* 8P-A3 достатньо активно зростає на середовищі у присутності жовчі (табл. 1). Таким чином, підтвердилися дані, отримані J. Rasic (1992) про те, що толерантні до жовчі штами лактобацил не обов'язково мають здатність поглинати холестерин [9].

Штам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2, вирощений в умовах постійного значення рН середовища і без контролю кислотності середовища, вилучав відповідно 7 і 47 мг холестерину з бульйону.

Ці результати дають підстави для припущення, що вилучення холестерину з культурального середовища відбувається інтенсивніше за низького значення рН (4,2—4,5). Аналогічні дані отримані в дослідженнях К. Hutkins і S. Lin et al. [6, 8].

Ряд дослідників [2, 8, 10, 11] вважають, що вилучення холестерину з живильного середовища відбувається завдяки руйнуванню холестерину й осадженню його з декон'югованими жовчними кислотами — холевою і дезоксіхолевою. Ці кислоти у організмі легко з'єднуються у печінці з гліцином і таурином, утворюючи кон'югати: глікохолеву і таурохолеву кислоти. Деякі штами бактерій роду *Lactobacillus* декон'югують жовчні кислоти під час росту завдяки присутності ферментів естераз, дія яких підсилюється у кислому середовищі. Холева кислота стає менш розчинною за зниження рН середовища, особливо при $pH < 5$ [10, 11]. Оскільки рН середовища зменшується в результаті утворення органічних кислот лактобацилами, холева кислота осаджується з бульйону і може викликати осадження холестерину.

Як показали проведені дослідження, найбільшою здатністю вилучати холестерин з рідкого середовища MPC володіє штам *Lactobacillus acidophilus* OL4, що був ізольований з некомерційного кисломолочного продукту, виготовленого в Одеському регіоні. Відмінності між штамами бактерій роду *Lactobacillus* щодо їх здатності впливати на рівень холестерину у середовищі, вказує на необхідність та доцільність провадити селекцію серед штамів лактобактерій, ізольованих із різних екологічних ніш.

Висновки

1. Штами *L. acidophilus* OL4 і *L. acidophilus* 317/402 є найбільш стійкими до жовчі в концентрації 0,3 %.
2. Штами бактерій роду *Lactobacillus*, що повільно ростуть у контрольному бульйоні MPC без додавання жовчі, є менш жовчотолерантними.
3. Найбільшою здатністю вилучати холестерин з рідкого середовища MPC володіє штам *Lactobacillus acidophilus* OL4.

4. Вилучення холестерину з культурального середовища відбувається інтенсивніше при низькому значенні рН (4,2—4,5).

Література

1. *Buck L. M., Gilliland S. E.* Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth // *J. Dairy Sci.* — 1994. — 77. — P. 2925—2933.
2. *Gilliand, S. E., Speck M. L.* Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1997. — № 15. — P. 35.
3. *Gilliand, S. E., Nelson C. R., Maxwell C.* Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1995. — № 14. — P. 87—88.
4. *Harrison, V. C., Peat G.* Serum cholesterol and bowel flora in the newborn // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1995. — № 28. P. 1351.
5. *Holt R.* The roles of bile acids during the process of normal fat and cholesterol absorption // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1972. — № 25. — P. 45—46.
6. *Huthins K.* pH homeostasis in lactic acid bacteria // *J. Dairy Sci.* — 1991. — 74, № 1. — P. 110.
7. *Klaver F. A., Van der Meer R.* The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile saltdeconjugating activities // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — № 34. — P. 67—69.
8. *Lin S.Y., Ayres W., Winkler W., Sandine W. E.* *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results // *J. Appl. Bacteriol.* — 1989. — № 26. — P. 35—37.
9. *Rasic J. Lj., Vulic M.* Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria // *Biotechnol. Lett.* — 1992. — 14, № 1. — P. 39—44.
10. *Razin S., Kutner S., Efrati H., Rotten S.* Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes // *Biochim. Biophys.* — 1980. — № 35. — P. 57—60.
11. *Rudel L. L., Morris M. D.* Determination of cholesterol using *s*-phtalaldehyde. // *L. Clin. Res.* — 1973. — № 34. — P. 78—80.

А. В. Ямборко, В. И. Маленкова, А. П. Петросьянц

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, каф. микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

Одесская национальная академия пищевых технологий, каф. биохимии и микробиологии,
ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина

СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* ПОГЛОЩАТЬ ХОЛЕСТЕРИН ИЗ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Резюме

Изучена способность некоторых промышленных штаммов бактерий рода *Lactobacillus* снижать уровень холестерина в питательной среде. Установлено, что наибольшей способностью поглощать холестерин из жидкой среды МРС обладал штамм *Lactobacillus acidophilus* OL4. Показано, что удаление холестерина из культуральной среды происходит интенсивнее при низком значении рН (4,2—4,5).

Ключевые слова: лактобациллы, холестерин.

G. V. Yamborko, V. I. Malenkova, A. P. Petrosyants

I. I. Mechnikov Odessa National University,
Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

Odessa National Academy of Food Technologies,
Department of Biochemistry and Microbiology,
Kanatnaya St., 112, Odessa. 65039, Ukraine

THE ABILITY OF LACTOBACILLI TO REMOVE CHOLESTEROL FROM NUTRIENT MEDIUM

Summary

The ability of some commercial *Lactobacillus* strains to decrease the cholesterol level in nutrient medium was studied. It has been shown that the strain *Lactobacillus acidophilus* OL4 can remove the cholesterol from MRS broth more intensive. It was found out that all the tested *Lactobacillus* strains removed cholesterol from the broth during growth without pH control (pH 4,2—4,5) more intensive.

Keywords: lactobacilli, cholesterol.