БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 579.864.1:615.331

С.О. Старовойтова [1,2]

[1]Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601
[2]Інститут мікробіології і вірусології
імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143

ХОЛЕСТЕРАЗНА АКТИВНІСТЬ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ IN VITRO ТА IN VIVO

Холестеразна активність, гіперхолестеринемія, молочнокислі бактерії, пробіотичні мікроорганізми, пробіотики.

В сучасній клінічній практиці основними способами корекції підвищеного рівня сироваткового холестерину (гіперхолестеринемії, холестеринозу) є препарати, що блокують активність ферменту гідроксиметилглутарацил-СоА-редуктази (ГМГ-СоА-редуктази) – статини (симвастатин, ловастатин, флувастатин, аторвастатин, розувастатин тощо), або препарати, що пригнічують абсорбцію холестерину та стеролів у кишечнику (ензетиміб) [1, 2]. На жаль, усі гіпохолестеринемічні препарати є вартісними та мають ряд побічних проявів, на першому місці є гепатотоксичність. Під час моно- та комбінованої терапії інгібіторами ГМГ-СоА-редуктази та ензетимібом виявлені випадки підвищення активності аланінової та аспаргінової трансаміназ (біохімічний показник цитолітичного синдрому), розлади травної та дихальної систем, розлади центральної та периферійної нервової систем, порушення органів відчуття, збільшення маси тіла тощо [1-5].

В останні роки в науковій літературі все частіше з’являються повідомлення про здатність молочнокислих бактерій знижувати рівень сироваткового холестерину. Здатність окремих штамів представників нормальної мікрофлори асимілювати та преципітувати декон’юговані жовчні кислоти, так само як руйнувати, зв’язувати та асимілювати холестерин, лежить в основі їх гіпохолестеринемічної активності (здатності знижувати рівень сироваткового холестерину) [6-10]. Високий рівень холестерину, як загального у складі сироватки крові, так і у складі ліпопротеїдів низької густини є одним з головних факторів ризику появи ішемічної хвороби серця та атеросклерозу, а також цереброваскулярного атеросклерозу, гіпертонії, пухлин травного тракту тощо [1, 2].

Отже, метою дослідження було встановлення холестеразної активності *in vitro* та *in vivo,* відібраних раніше високопробіотичних штамів молочнокислих бактерій.

Матеріали і методика досліджень.

Об'єктами дослідження були високопробіотичні штами лакто- та біфідобактерій, виділені з асоціативної культури під час лабораторних досліджень ферментованого біологічного матеріалу: *Bifidobacterium bifidum* VK-1, *B. longum* VK-2, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280, *L. bulgaricus* IMB B-7281.

Дослідження холестеразної активності молочнокислих бактерій in vitro проводили таким чином: 24-годинні культури лакто- та біфідобактерій культивували на рідкому середовищі MPC з додаванням натрію тіогліколяту (Sigma), жовчі (Difco laboratories) та свіжоприготованого розчину холестерину (Sigma) [11]. Вплив бактерій на концентрацію холестерину у рідкому середовищі MPC визначали за методом Л.Л. Руделя [12] через 18 та 24 години культивування.

Дослідження холестеразної активності молочнокислих бактерій in vivo проводили на білих лабораторних мишах масою 16–18 г та 18–20 г, самцях мишей лінії *Balb* віком 2,5 місяці та самках мишей лінії *Balb* віком 3 місяці. Моделювання експериментальної гіперхолестеринемії у мишей проводили розробленим нами методом [13].

В роботі відпрацьовані дві схеми введення пробіотичних штамів та їх комбінацій – профілактична та лікувальна. Профілактична схема полягала у введенні *per os* упродовж 4 діб мишам по 0,3 мл свіжоприготованих суспензій ліофілізованих пробіотичних культур та їх комбінацій в концентрації $3*10^8$ кл/мл та комбікорм. З п'ятої доби мишей переводили на висококалорійну дієту та продовжували вводити пробіотичні культури кожен день до закінчення дієти (7 діб). На 1-шу, 3-тю та 7-му добу з початку висококалорійної дієти визначали вміст загального холестерину у сироватці крові тварин за методом Н. Станкевичене [14].

Лікувальна схема полягала у паралельному введенні до раціону тварин висококалорійної дієти та пробіотичних культур у дозах, що і для профілактичної схеми. Забір крові тварин для аналізу на рівень загального холестерину проводили аналогічно на 1-шу, 3-тю та 7-му добу експерименту.

Усі досліди проводили не менш трьох разів із використанням відповідних контролів. Цифрові дані, одержані в результаті досліджень, обробляли статистичними методами з використанням t-критерію Ст'юдента [15]. Різницю вважали достовірною при значенні $P < 0,05$ [16].

Результати досліджень та їх обговорення.

В попередніх дослідах встановлено, що усі взяті до експерименту штами молочнокислих бактерій є високопробіотичними з високою резистентністю до агресивних умов шлунково-кишкового тракту та сучасних хіміотерапевтичних засобів [17].

Спочатку було досліджено холестеразну активність відібраних пробіотичних штамів та їх композицій в дослідах *in vitro*. Всі досліджені штами проявили високі значення холестеразної активності (7,64–62,37 %), що дозволило розташувати їх за проявами гіпохолестеринемічної активності у культуральному середовищі у такий ряд: *L. casei* IMB B-7280 > *L. bulgaricus* IMB B-7281 > *L. acidophilus* IMB B-7279 > *B. longum* VK-2 > *B. bifidum* VK-1 (рис. 1).

В багатьох наукових роботах експериментально доведено, що різні штами лакто- та біфідобактерій здатні підсилювати свої позитивні властивості під час їх комбінування один з одним у різних співвідношеннях [18]. Тому було проведено дослідження холестеразної активності композицій досліджуваних штамів результати якого наведені в табл. 1.

Таблиця 1.

Холестеразна активність молочнокислих бактерій *in vitro*

Композиція	**Співвідношення штамів**	**Час[1], год**	**ХА[2], %**
L. casei IMB B-7280:*L. bulgaricus* IMB B-7281:*L. acidophilus* IMB B-7279:*B. longum* VK-2:*B. bifidum* VK-1	1:1:1:1	18 24	28,17±0,01* 38,03±0,02*
L. casei IMB B-7280:*L. bulgaricus* IMB B-7281	1:1	18 24	33,80±0,03 73,24±0,37
B. longum VK-2:*B. bifidum* VK-1	1:1	18 24	54,23±0,28* 68,87±0,36*
L. casei IMB B-7280:*B. bifidum* VK-1	1:1	18 24	49,30±0,21* 52,82±0,23*
L. bulgaricus IMB B-7281:*B. longum* VK-2	1:1	18 24	14,79±0,21* 23,15±0,03*
L. casei IMB B-7280: *B. longum* VK-2	1:1	18 24	43,94±0,08* 57,75±0,18*
L. acidophilus IMB B-7279:*L. casei* IMB B-7280	1:1	18 24	32,88±0,19* 64,92±0,07*
L. acidophilus IMB B-7279:*L. bulgaricus* IMB B-7281	1:1	18 24	20,15±0,11* 26,78±0,26*
L. acidophilus IMB B-7279:*B. longum* VK-2	1:1	18 24	18,92±0,25* 20,11±0,15*
L. acidophilus IMB B-7279:*B. bifidum* VK-1	1:1	18 24	12,07±0,08* 16,16±0,22*
L. bulgaricus IMB B-7281:*B. bifidum* VK-1	1:1	18 24	0 0

*Примітка: [1] – час культивування годин;[2] ХА – холестеразна активність; * – P < 0,05 по відношенню до L. casei IMB B-7280: L. bulgaricus IMB B-7281.*

Отримані експериментальні дані свідчать про те, що всі досліджені композиції пробіотичних штамів, окрім *L. bulgaricus* IMB B-7281:*B. bifidum* VK-1, проявляють холестеразну активність, що варіює у межах 12,07–54,23 % на 18 годину культивування та 16,16–73,24 – на 24 годину.

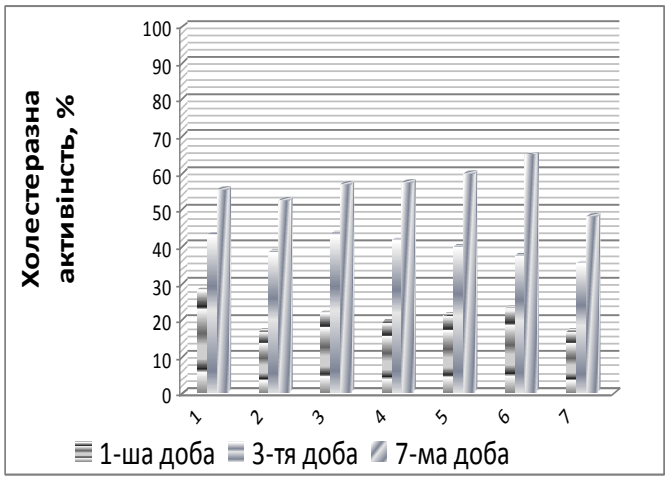
Довівши гіпохолестеринемічну активність молочнокислих бактерій та їх композицій *in vitro*, цікавим було перевірити їх здатність знижувати концентрацію сироваткового холестерин на моделі експериментальної гіперхолестеринемії у мишей [13].

Як видно з усіх діаграм (рис.1) незалежно від породи, віку, статі, маси тіла мишей та схеми введення пробіотичних культур їх холестеразна активність підвищується до 7-ої доби спостереження. Варто зазначити, що для профілактичної схеми введення пробіотичних культур спостерігаються більш вищі значення холестеразної активності бактерій, ніж для лікувальної схеми. Це свідчить про те, що краще лікування – це профілактика.

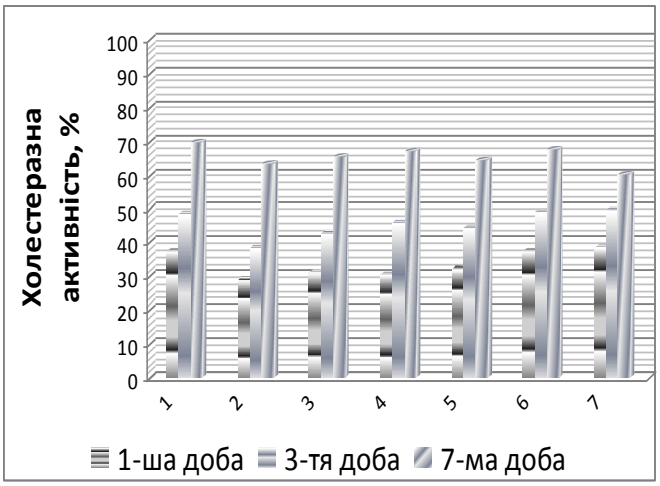
Найефективнішими, з досліджених хворих на гіперхолестеринемію у мишей виявилися культури: *L. acidophilus* IMB B-7279 та *B. bifidum* VK-1, а також композиція *B. longum* VK-2:*B. bifidum* VK-1. Але холестеразна активність інших вивчених штамів

була не нижчою, а в деяких випадках і вищою, ніж у більшості сучасних лікарських засобів, що застосовуються у практиці лікування холестеринозу [1, 2].

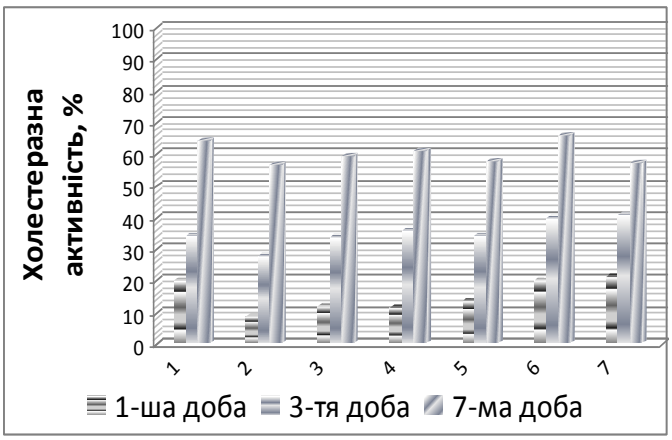
Гіпохолестеринемічна активність досліджених штамів та їх композицій, в умовах експерименту, коливалася у межах 40–78 %. У подальшому планується збільшити цей відсоток шляхом детальнішого відпрацювання схем, доз введення культур, а також підбору їх комбінацій та співвідношення штамів в цих комбінаціях.



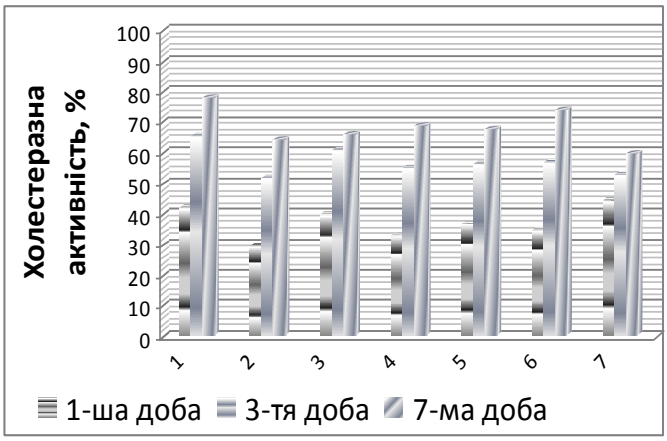
А



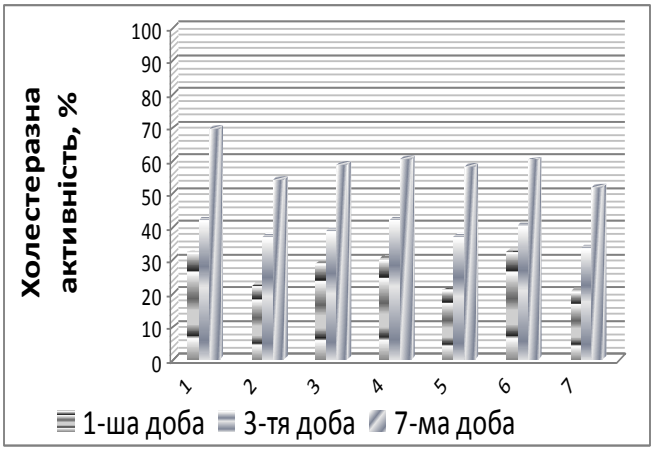
Б



В



Г



Д

Рис.1. Залежність холестеразної активності молочнокислих бактерій та їх композицій від доби спостереження ($P < 0,05$) А) для мишей масою 18–20 г під час лікувальної схеми введення пробіотичних культур; Б) для мишей масою 16-18 г – лікувальна схема; В) для самців лінії *Balb* віком 2,5 місяці – профілактична схема; Г) для самців лінії *Balb* віком 2,5 місяці – лікувальна схема; Д) для самок мишей лінії *Balb* віком 3 місяці – профілактична схема.

Примітка: 1 – L. acidophilus IMB B-7279; 2 – L. casei IMB B-7280; 3 – L. acidophilus IMB B-7279+L. casei IMB B-7280; 4 – B. bifidum VK-1; 5 – B. longum VK-2; 6 – B. bifidum VK-1+B. longum VK-2; 7 – L. casei IMB B-7280+L. bulgaricus IMB B-7281.

Висновки

Досліджені культури молочнокислих бактерій, а також їх композиції можуть бути використані як основа пробіотиків з гіпохолестеринемічною активністю. Бактеріотерапевтичні препарати на основі холестерин-асимілюючих штамів молочнокислих бактерій можуть раціонально доповнити комплексну терапію хворих на серцево-судинні, онкологічні та інші захворювання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. № 2388479 РФ, МПК[5] A61K35/74, A61P3/06. Способ коррекции гиперхолестеринемиии // М.Р. Исаев, Г.Н. Тукумбетова, В.А. Баталин, В.И.

Никитенко, А.М. Чевычалов, Ю.В. Горячая, А.В. Андреев, О.А. Каширская, М.В. Баталина, С.Б. Борисюк – Опубл. 10.05.2010.
2. Мосійчук С.М. Пробіотики: можливість застосування при гіперхолестеринемії / С.М. Мосійчук, М.Б. Хоменко, Т.С. Михайлова та ін. // Український медичний часопис. – 2006. – №2 (52). – С. 10–23.
3. Liong M.T. Roles of probiotics and prebiotics on cholesterol: The hypothesized mechanisms / M.T. Liong, N.P. Shah // Nutrafoods. – 2005. – Vol.4. – P. 45–57.
4. Chralampopoulos D., Rastall R.A. Prebotics and Probiotics Science and Technology./ Chralampopoulos D. // –UK.: Springer, 2009. – 1265 p.
5. Nguyen T.D. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects / T.D. Nguyen., J.H. Kang, M.S. Lee // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol.113. – P. 358–361.
6. Ямборка Г.В. Здатність бактерій роду *Lactobacillus* вилучати холестерин із живильного середовища / Г.В.Ямборка, В.І. Малюнкова, А.П. Петросьянц //Вісник Одеського Національного Університету. – 2004. – Т.9. – Вип.1. – С. 249–256.
7. Кігель Н.Ф. Дослідження *in vitro* холестеразної активності лакто- і біфідобактерій як критерій відбору пробіотичних штамів / Н.Ф. Кігель, О.М. Романовська, О.В. Науменко // Вісник аграрної науки. – 2002. – №8. – С.59–62.
8. Коваленко Н.К. Скрининг штаммов молочнокислых бактерий, обладающих гипохолестеринемической активностью, и их практическое использование / Н.К. Коваленко, С.А. Касумова, Ф.В. Мучник // Микробиологический журнал. – 2004. – Т.66. – №3. – С. 33–42.
9. Старовойтова С.О. Гіпохолестеринемічна та протеолітична активність лактобактерій *in vitro* / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська, В.Ю. Горчаков // Довкілля та здоров'я. – 2007. – №4 (43). – С. 68–71.
10. Starovoitova S. Cholesteraze activity of new lacto- and bifidobacteria strains *in vitro* / S. Starovoitova, K. Kishko, L. Lazarenko et al. // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2010. – Вип.27. – С. 1–4.
11. Buck M.L. Comparison of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human origin for ability to assimilate cholesterol during growth / M.L. Buck, S.E. Gilliland // J. Dairy Sci. – 1994. – Vol.77. – №10. – P. 2925–2933.
12. Rudel L.L. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde / L.L. Rudel, M.D. Morris // Journal of Lipid Research. – 1973. – Vol.14. – P. 364–366.
13. Пат. № 61954 України, МКІ A61K39/02. Спосіб моделювання гіперхолестеринемії у мишей // М.Я. Співак М.Я., С.О. Старовойтова. – Опубл. 10.08.2011, Бюл. № 15.
14. Клиническая биохимия: [пособие для врачей лаборантов] / Колб В.Г., Камышников В.С. – Минск:, «Беларусь», 1976. – 311 с.
15. Бейли Н. Статистические методы в биологии / Норман Бейли. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 260 с.
16. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Евгений Викторович Гублер. – М.: Медицина, 1978. – 294 с.
17. Старовойтова С.А. Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* перспективных для создания пробиотиков // С.А. Старовойтова, Л.Н. Лазаренко, Л.В. Авдеева и др. // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2009. – Вип.26. – С. 216–219.
18. Старовойтова С.О. Розробка композиції поліштамового пробіотику на основі бактерій роду *Lactobacillus*: Автореф. дис…канд. біол. наук: 03.00.20 / //НАН України; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – К., 2008. – 21с.

С.А. Старовотова

ХОЛЕСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ IN VIVO И IN VITRO

Исследована холестеразная активность бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и их композиций в культуральной среде – *in vitro* и на экспериментальной модели гиперхолестеринемии у мышей – *in vivo*. Показано, что все исследованные штаммы обладают высокой холестеразной активностью *in vitro* в пределах 7,64–62,37 %. Изучение холестеразной активности *in vivo* показало, что все исследованные культуры молочнокислых бактерий, а также их композиции, кроме *L. bulgaricus* IMB B-7281:*B. bifidum* VK-1, проявляют гипохестеринемическую активность в среднем на уровне 14–63 %, что в большинстве случаев, выше чем для современных гипохолестеринемических препаратов.

S.A. Starovoitova

CHOLESTERAZE ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA IN VITRO AND IN VIVO

Cholesteraze activity of probiotic bacteria of genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and their compositions in the cultural medium – *in vitro* and on the experimental model of hypercholesterolemia in mice – *in vivo* was studied. It was shown, that all of the studied strains had high cholesteraze activity *in vitro* and ranged between 7.64–62.37 %. Study of cholesteraze activity *in vivo* was shown, that all of the studied lactic acid bacteria and their compositions, except *L. bulgaricus* IMB B-7281:*B. bifidum* VK-1, had hypocholesterolemic activity on average level 14–63 %, that in some cases higher than for modern hypocholesterolemic drugs.

Надійшла 11.01.2012 р.

УДК 579.67

І.В. Вітковський, Н.М. Грегірчак

Національний університет харчових технологій
вул. Володимирська 68, м. Київ, 01601

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ НА МІКРОФЛОРУ КОНДИТЕРСЬКИХ КРЕМІВ В ПРОЦЕСІ ЇХ ЗБЕРІГАННЯ

Кондитерські креми, сорбінова кислота, кількість мезофільних аеробних факультативно анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ), бактерії групи кишкової палички (БГКП).

Здоров’я нації є пріоритетним напрямком розвитку кожної держави. Харчові продукти, які споживають громадяни, безпосередньо чи опосередковано впливають на їх самопочуття та здоров’я[2].