

## ВПЛИВ ДЕЯКИХ ЧИННИКІВ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ЛАКТОБАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ

І. Страшнова, Г. Ямборко\*, Н. Васильєва

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна  
e-mail: jamborkoann@ukr.net

Метою роботи було дослідити стійкість бактерій роду *Lactobacillus* до деяких агресивних чинників шлунково-кишкового тракту. Використання лактобацил як пробіотичних штамів висуває низку вимог до цієї групи мікроорганізмів, зокрема, пов'язаних із їхньою здатністю виживати в умовах підвищеної кислотності й наявності ферментів шлунково-кишкового тракту. У роботі використано 13 штамів лактобацил, виділених із різних джерел – із фекалій дітей молодшого віку, зі самоквасних овочів і з м'ясної сировини. Стійкість до секретів макроорганізму, що впливають на лактобацили під час їхнього транзиту через шлунково-кишковий тракт, досліджували *in vitro*, використовуючи різні значення рН (3,0–8,0) і травні ферменти пепсин та трипсин. Експериментально встановлено і статистично підтверджено, що досліджені штами лактобацил проявили варіабельну реакцію на дію різних значень рН і травних ферментів залежно від конкретного штаму та діючого чинника. Виявлено, що штами, ізольовані з м'ясної сировини, виявили найвищий рівень резистентності до різних значень рН, а штами, ізольовані з автоферментованих овочів, виявилися стійкішими до дії травних ферментів. Було показано, що незважаючи на вказану залежність, усередині кожної вибірки є неоднорідність відгуку штамів на дію чинника, що підтверджує варіабельність штамів молочнокислих бактерій. Проведеним математичним аналізом встановлено, що досліджені лактобацили залежно від ознак, які вивчали, утворюють кілька кластерів і підкластерів. Було показано, що первинне джерело виділення впливало на формування стійкості штамів лактобактерій до зміни рН середовища, однак не впливало на формування стійкості до дії ферментів шлунково-кишкового тракту. Отримані результати свідчать про доцільність подальших досліджень, необхідних, щоби відбирати штами лактобацил для отримання пробіотичних препаратів, і сприяють створенню раціональнішого підходу до пошуку потенційних пробіотичних штамів із наперед заданими властивостями.

*Ключові слова:* лактобацили, пробіотичні властивості, рН, пепсин, трипсин

Основою великої кількості пробіотичних препаратів є молочнокислі бактерії, зокрема, представники роду *Lactobacillus*. Проте, незважаючи на давність і тривалість застосування, масштабність вивчення лактобацил, пошук і виділення нових пробіотично перспективних штамів триває [2]. Причин цього багато, але основними є створення нових препаратів і продуктів із поліпшеними властивостями, зокрема, й із різними смако-ароматичними відтінками. Окрім цього, не рідкісними є випадки, коли промислові пробіотичні штами зменшують або втрачають активність, а інколи – навіть життєздатність [1].

Завдяки поширеності у довкіллі виділити молочнокислі бактерії можна із різних джерел [9]. Перед конструюванням біопрепаратів нові штами обов'язково перевіряють на відповідність критеріям (вимогам) до бактерій-пробіотиків [7]. Для отримання повноцінного ефекту бактерії, що є у складі пробіотиків, повинні, зокрема, бути стійкими

до низького рН шлункового соку і травних ферментів та зберігати життєздатність під час проходження через шлунково-кишковий тракт.

Метою роботи було дослідити *in vitro* стійкість нових ізолятів лактобацил, виділених із різних екологічних ніш, до деяких чинників шлунково-кишкового тракту.

#### Матеріали та методи

У дослідженнях використано штами бактерій роду *Lactobacillus*, ізольовані із різних джерел. Штами *Lactobacillus* sp. Б1, Б3, Б4, Б5, Б6, О1 виділено із автоферментованих овочів, *Lactobacillus* sp. М1, М2, М3, М6 – зі сирової м'ясної сировини, *Lactobacillus* sp. 146, 275, 175 – із фекалій дітей молодшого віку.

Досліджували стійкість штамів лактобацил до різних значень рН (3,0–8,0), а також до дії травних ферментів – пепсину (16 Од/мг) і трипсину (39 Од/мг) *in vitro*.

Рідке середовище MRS із різними значеннями рН у діапазоні від 3,0 до 8,0 готували, використовуючи HCl (0,1 М) або NaOH (20 %) для досягнення відповідного значення кислотності середовища.

Розчини ферментів готували у таких буферних сумішах:

кристалічний пепсин – у соляно-гліциновому буфері з рН 2,0–2,2, трипсин – у фосфатному буфері з рН 8,0–8,5.

Кінцеві концентрації ферментів становили 0,1 мг/мл.

Добові культури лактобацил, вирощених у рідкому поживному середовищі MRS, вносили у пробірки з відповідними варіантами експериментальних середовищ. Контролем були посіви добових культур лактобацил у рідке середовище MRS. Інкубували протягом 24 год за температури 37 °С. Життєздатність досліджених штамів оцінювали, вимірюючи оптичну густину суспензії бактерій у контрольних і експериментальних пробірках через 24 год культивування. Вимірювання проводили фотометричним методом за  $\lambda=600$  нм на спектрофотометрі (SmartSpec™ Plus Spectrophotometr, серія – 273 BR 05027) [3].

Усі експерименти проведено у трьох повторах. Порівняльний аналіз результатів досліджень проводили, використовуючи критерії Вілкоксона та Краскела-Волліса [5]. Статистичне опрацювання результатів здійснювали, застосовуючи програму Calck та R 3.6.0 [4].

#### Результати і їхнє обговорення

Пробіотичні бактерії можуть чинити позитивний вплив на макроорганізм тільки за умови виживання під час транзиту у шлунково-кишковому тракті [8]. Для того, щоб простежити залежність пробіотичних властивостей молочнокислих бактерій від джерела виділення, усі досліджені штами розглядали як сукупність із трьох незалежних вибірок. До першої вибірки було віднесено штами, ізольовані з овочів, до другої – штами з м'ясної сировини, до третьої – штами, ізольовані з фекалій дітей. За дослідження *in vitro* стійкості 13 штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із різноманітних джерел, до різних значень рН, пепсину і трипсину виявлено, що ця ознака варіабельна і залежить від штаму та діючого чинника.

Відомо, що лактобацили, які входять до складу пробіотичних препаратів і продуктів функціонального харчування, в організмі людини зазнають короткочасного впливу різних значень рН. Оскільки секреція шлункової кислоти є основним захисним механізмом проти більшості мікроорганізмів, доцільно було перевірити ступінь стійкості досліджених штамів до кислотності середовища. Перевірка здатності лактобацил рости у середовищах з різним початковим значенням рН показала, що найнегативнішими є умови, коли значення рН середовища менше 5,0 (рис. 1).

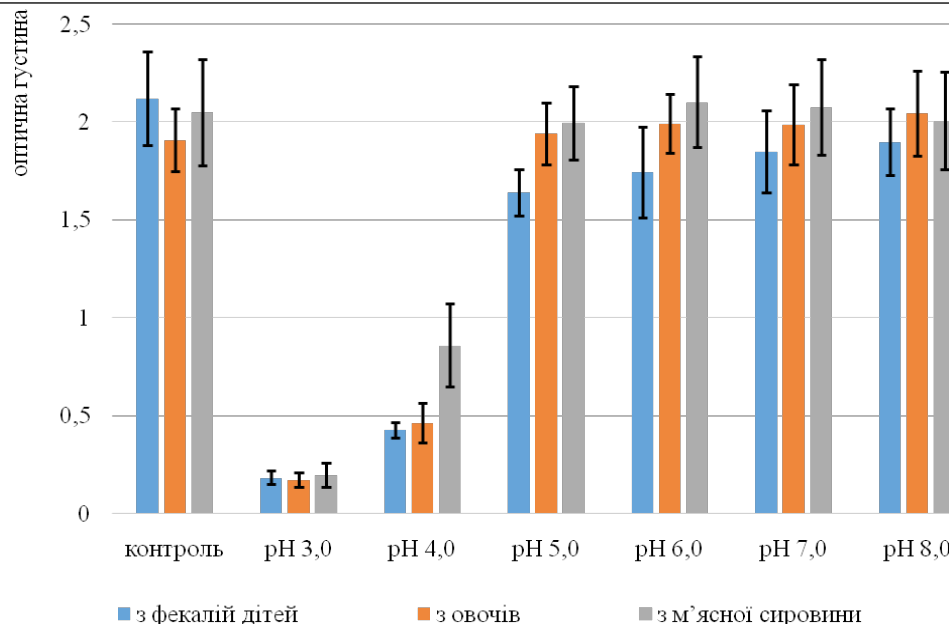


Рис. 1. Усереднені показники оптичної густини досліджених штамів лактобацил під час росту в середовищах із різними початковими значеннями рН залежно від первинного джерела виділення

У діапазонах рН від 5,0 до 8,0 коливання показника оптичної густини досліджених штамів були незначними.

Визначено, що стійкість до коливань рН середовища залежить від досліджуваного штаму. Збереження лактобацилами життєздатності під час росту в середовищах зі зниженим рН зумовлено, на нашу думку, здатністю молочнокислих бактерій підтримувати постійне значення рН усередині клітин. Аналогічні дані показано в роботі J. Schroeter і T. Klaenhammer (2009), які довели, що здатність до збереження гомеостазу усередині клітин молочнокислих бактерій є одним із найважливіших параметрів, характерних для цих мікроорганізмів [10]. Вони встановили, що регуляція внутрішньоклітинного і цитоплазматичного рН у молочнокислих бактерій здійснюється за участю АТФ-ази і що активність цього процесу зростає в міру зниження рН. Так, за рН 3,0 максимальні показники оптичної густини реєстрували для штамів *Lactobacillus* sp. 146, B4, M1 і M3; за рН 4,0 – для штамів *Lactobacillus* sp. 175, M1, M2 і M6.

У разі кислотності рН від 5,0 до 8,0 в більшості випадків максимальні показники оптичної густини були зареєстровані для штамів *Lactobacillus* sp. B6, M1 і M2. Тобто отримані дані підтверджують, що здатність зростати за різних показників кислотності середовища залежить від індивідуальних властивостей штаму.

Однак після проведення статистичного аналізу отриманих результатів було показано, що джерело виділення впливає на формування штампспецифічної стійкості до кислотності середовища. Так, найбільш однотипною за показником Краскела-Волліса (KW) була реакція на зміну рН у штамів, ізолюваних із фекалій дітей (табл. 1).

Штами, ізолювані з м'ясної сировини, навпаки, демонстрували неоднорідний відгук, а ростовий показник штамів (за показником оптичної густини), ізолюваних зі самоквасних овочів, є неоднорідним за показників рН від 3,0 до 6,0.

Таблиця 1

Порівняння усереднених показників стійкості досліджених штамів лактобацил до різних концентрацій рН за критерієм (p≤0,05)

Кислотність середовища	Критерій Краскела-Волліса для штамів лактобацил		
	зі самоквасних овочів	із м'ясої сировини	із фекалій дітей
pH 3,0	KW =18,46, p=0,0024	KW =10,650, p=0,0138	KW =2,80, p=0,2457
pH 4,3	KW =11,37, p=0,04450	KW =10,455, p=0,0150	KW =2,80, p=0,2457
pH 5,0	KW =11,37, p=0,04450	KW =9,580, p=0,02240	KW =2,34, p=0,3094
pH 6,0	KW =11,20, p=0,04750	KW =10,380, p=0,0155	KW =1,86, p=0,3941
pH 7,0	KW =9,98, p=0,0750	KW =9,580, p=0,0224	KW =1,42, p=0,4909
pH 8,0	KW =9,94, p=0,0760	KW =8,420, p=0,0379	KW =2,09, p=0,3510

Результати кластерного аналізу за показником стійкості досліджених штамів до рН у межах від 3,0 до 5,0 підтверджують висловлене припущення, що джерело виділення бактерій може впливати на формування штамспецифічної стійкості до кислотності середовища (рис. 2).

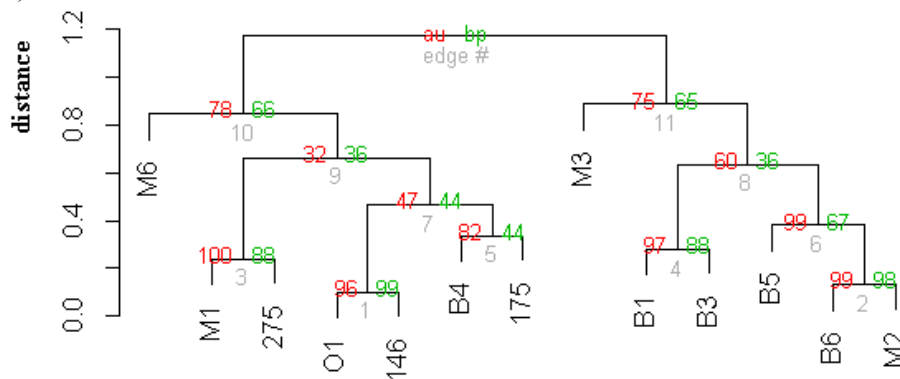


Рис. 2. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до рН у межах від 3,0 до 5,0 (кластеризація даних із використанням функції pvclust за pboot = 1000; матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

За показником, який перевіряли, до одного кластеру входять штами лактобактерій з автоферментованих овочів (*Lactobacillus* sp. B1, B3, B5, B6) та м'ясої сировини (*Lactobacillus* sp. M3 і M2). Показники оптичної густини саме для цих штамів були на рівні середнього арифметичного для цієї підгрупи даних, тобто ці штами демонстрували однотипність біологічного відгуку на низькі значення рН середовища.

Найрізноманітнішим за своїм складом був інший підкластер, до якого входили штами, виділені з різних еконіш. В окремий кластер винесено штам *Lactobacillus* sp. M6, який характеризувався високим рівнем резистентності до високих значень рН. При цьому слід відмітити, що показник вірогідності формування внутрішнього вузла був досить високим для штамів із різних джерел первинного виділення.

Аналіз результатів кластеризації показників стійкості штамів лактобацил до значень рН у межах від 6,0 до 8,0 показав, що кластери формують штами, які були ізольовані з різних первинних джерел (рис. 3).

Так, до меншого кластеру входять штами *Lactobacillus* sp. B1, B3, B5 (зі самоквасних овочів), *Lactobacillus* sp. M2 (із м'ясої сировини) і *Lactobacillus* sp. 146 (із фекалій дітей). До більшого зі сформованих кластерів входять усі інші штами. В окремий кластер винесено штам *Lactobacillus* sp. B6, який характеризувався високим рівнем резистентності до високих значень рН.

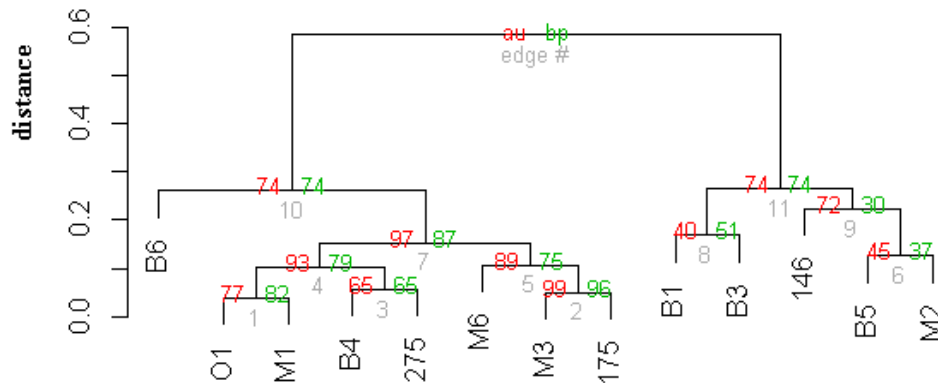


Рис. 3. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до рН у межах від 6,0 до 8,0 (кластеризація даних з використанням функції *pvclust* за *nboot* = 1000; матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

Також вважали за доцільне перевірити виживання досліджених штамів лактобацил в умовах, що виникають під час проходження через травний тракт. Перевірка потенційних пробіотиків на стійкість стосовно ферментів шлунково-кишкового тракту необхідна, оскільки разом із дією інших чинників мікроорганізми будуть перебувати під впливом їхньої потужної протеолітичної дії. Пепсин (фермент шлунку) і трипсин (фермент підшлункової залози) є гідролітичними агентами для білків, дія яких суворо специфічна.

Під впливом кислого середовища у шлунку пепсиноген переходить в активний пепсин, який характеризується сильною антимікробною дією, що запобігає розвитку гнильних і бродильних процесів і перешкоджає проникненню патогенних бактерій у кишечник [6].

Наведені на рис. 4 графічні показники середніх значень оптичної густини досліджених штамів під дією пепсину порівняно з контролем свідчать, що всі протестовані штами демонстрували виживання практично на одному рівні, незалежно від первинного джерела виділення.

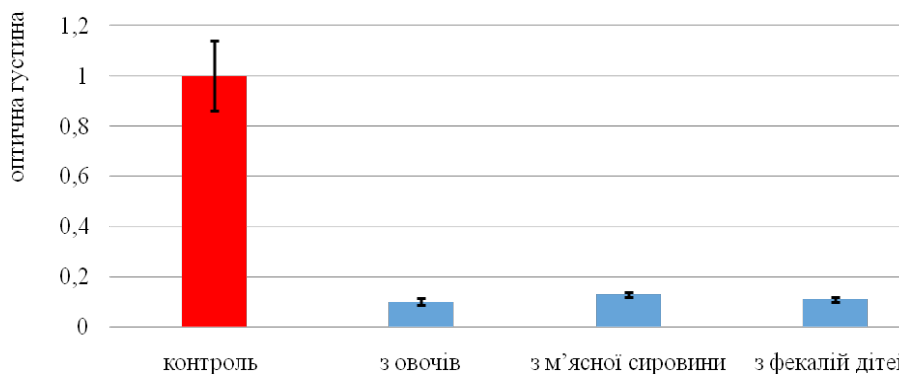


Рис. 4. Усереднені показники оптичної густини досліджених штамів лактобацил до дії пепсину залежно від первинного джерела виділення

Отримані дані підтверджені розрахованими значеннями критерію Вілкоксона між усередненими значеннями стійкості штамів за наявності пепсину залежно від джерела виділення (табл. 2).

Таблиця 2

Значення критерію Вілкоксона між усередненими показниками стійкості досліджених штамів лактобацил до пепсину залежно від джерела виділення

Джерело виділення лактобацил	Критерій Вілкоксона за вибірками		
Самоквасні овочі	W=0,0, p-value=0,100	W=14,0, p-value=0,746	W=7,0, p-value=0,694
М'ясна сировина	W=14,0, p-value=0,746	W=0,0, p-value=0,100	W=2,0, p-value=0,280
Фекалії дітей	W=7,0, p-value=0,694	W=2,5, p-value=0,280	W=0,0, p-value=0,100

Трипсиноген є ферментом підшлункової залози. Саме він під впливом ентерокинази кишкового соку перетворюється на активний протеолітичний фермент – трипсин. Оптимальне значення рН для трипсину становить 7,8 і відповідає значенню рН соку підшлункової залози та кишкового соку. У кишечнику під впливом трипсину розщеплюються білки і високомолекулярні поліпептиди, в результаті чого утворюються низькомолекулярні поліпептиди й амінокислоти.

За результатами досліджень, трипсин, на відміну від пепсину, майже не чинив негативного впливу на показники життєздатності досліджених штамів лактобацил (рис. 5).

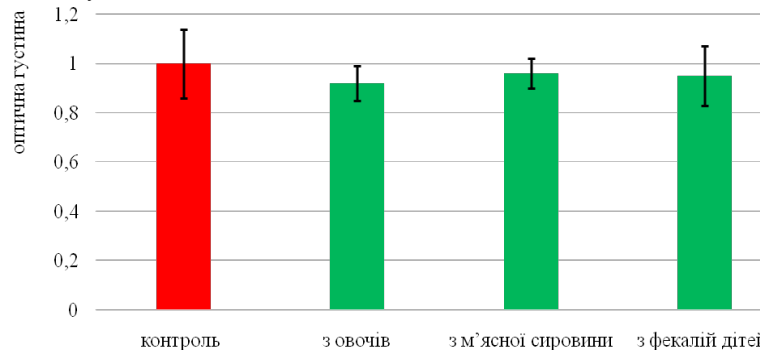


Рис. 5. Усереднені показники оптичної густини штамів лактобацил до дії трипсину залежно від первинного джерела виділення

Як і у попередньому досліді, було показано, що первинне джерело виділення не впливало на формування стійкості досліджених штамів до трипсину, й усі досліджені штами реагували на дію чинника майже ідентично. Достовірність прийняття нульової гіпотези підтверджено показниками критерію Вілкоксона, наведеними у табл. 3.

Таблиця 3

Показники критерію Вілкоксона між усередненими показниками стійкості досліджених штамів лактобацил до трипсину залежно від джерела виділення

Джерело виділення лактобацил	Критерій Вілкоксона за вибірками		
Самоквасні овочі	W=0,0 p-value=0,100	W=10,5, p-value=0,829	W=7,0, p-value=0,696
М'ясна сировина	W=10,5, p-value=0,829	W=0,0, p-value=0,100	W=5,0, p-value=0,857
Фекалії дітей	W=7,0, p-value=0,696	W=5,0, p-value=0,857	W=0,0, p-value=0,100

Найстійкішими до дії пепсину виявилися штами *Lactobacillus* sp. 175, O1, B5, M1, M2, M3. Найменш стійкими – *Lactobacillus* sp. 146 та B6 (рис. 6).

Максимально стійкими до дії трипсину виявилися штами *Lactobacillus* sp. 275, B5 і M2, найменш стійкими – штами *Lactobacillus* sp. M3 і 146. Слід відмітити, що штами *Lactobacillus* sp. B5 і *Lactobacillus* sp. M2 виявилися стійкими до впливу обох ферментів, а штам *Lactobacillus* sp. 146, навпаки, виявився найбільш чутливим до їхньої дії.

Наведені на рис. 7 і 8 дендрограми, отримані за результатами кластерного аналізу, наявно демонструють, що реакція лактобацил на дію ферментів шлунково-кишкового

тракту є штамспецифічною і залежить від біологічних властивостей штаму, а місце первинного виділення не впливає на формування стійкості до дії ферментів.

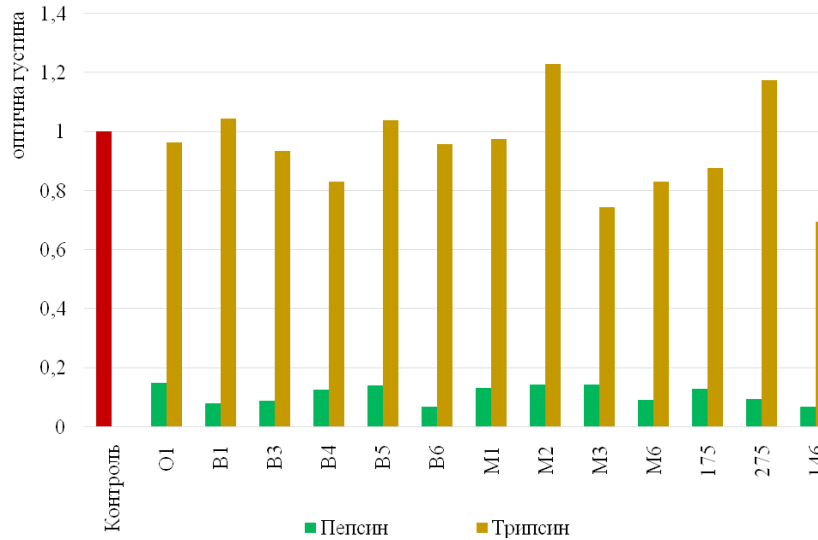


Рис. 6. Зміна показників оптичної густини досліджених штамів *Lactobacillus* sp. під дію пепсину і трипсину

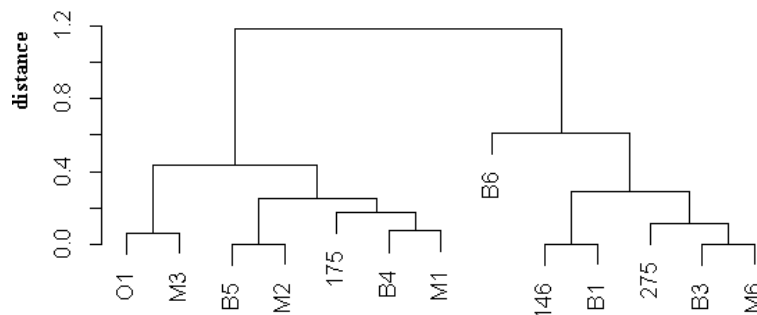


Рис. 7. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до дії пепсину (матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

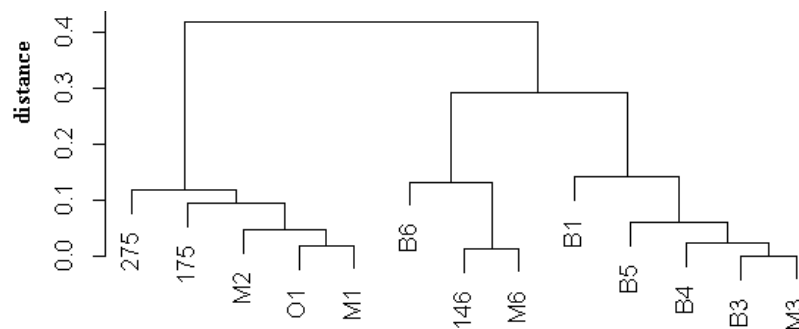


Рис. 8. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до дії трипсину (матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

Отже, експериментально встановлено і статистично підтверджено, що досліджені штами лактобацил проявили варіабельну реакцію на дію різних значень рН і травних ферментів, яка залежить від біологічних властивостей штаму та діючого чинника. Було показано, що первинне джерело виділення може частково впливати на формування стійкості штамів молочнокислих бактерій до зміни рН середовища, однак не впливає на формування стійкості до дії ферментів шлунково-кишкового тракту.

Показано, що штами, ізольовані з м'ясної сировини, характеризувалися найвищим рівнем резистентності до різних значень рН, а штами, ізольовані з автоферментованих овочів, виявилися стійкішими до дії травних ферментів. Однак, незважаючи на вказану залежність, усередині кожної вибірки є неоднорідність реакції штамів на дію чинника, що свідчить про варіабельність штамів молочнокислих бактерій.

Отримані дані дають змогу припустити, що досліджені штами лактобактерій, пройшовши через верхні відділи шлунково-кишкового тракту, будуть потрапляти у кишечник в активному стані. Тому вони можуть бути рекомендовані для подальших досліджень інших пробіотичних властивостей, необхідних для відбору найперспективніших штамів для конструювання пробіотиків.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дехтяренко Н. В., Шинкаренко Л. М., Дуган О. М. Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів // Наукові записки. Біологія та екологія. 2007. Т. 67. С. 30–36.
2. Калініченко С. В., Коротких С. В., Тищенко І.Ю. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків // Укр. біофарм. журнал. 2016. № 1 (42). С. 4–9.
3. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии: уч. пособ. для студ. высш. учеб. заведений. М.: Академия, 2005. С. 467–478.
4. Ромакін В. В. Комп'ютерний аналіз даних. К.: МДГУ ім. Петра Могили, 2006. 150 с.
5. Сиделев С. И. Математические методы в биологии и экологии: введение в элементарную биометрию: уч. пособ. Ярославль: ЯрГУ, 2012. 140 с.
6. Fernández C., Sánchez-Seiquer P., Sánchez A. Use of a total mixed ration with three sources of protein as an alternative feeding for dairy goats on Southeast of Spain // Pakistan J. Nutr. 2003. Vol. 2 (1). P. 18–24.
7. Ljungh A., Wadström T. *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. UK: Caister Academic Press. 2009. 206 p.
8. Ohland C. L., MacNaughton W. K. Probiotic bacteria and pontestinal epithelial barrier function // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2010. Vol. 6 (298). P. 807–819.
9. Pidgorskyi V. S., Kovalenko N. K., Garmasheva I. L. Taxonomic research, biological properties and biosynthetic activity of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from various natural ecological niches // Mikrobiolohichniy Zhurnal. 2016. Vol. 78 (6). P. 8–18.
10. Schroeter J., Klaenhammer T. Genomics of lactic acid bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 2009. Vol. 292 (1). P. 1–6.

Стаття надійшла до редакції 16.10.19

доопрацьована 22.11.19

прийнята до друку 28.11.19



**THE INFLUENCE OF SOME FACTORS OF THE DIGESTIVE TRACT ON THE  
LACTOBACILLI LIVES FROM DIFFERENT ENVIRONMENTAL NICHES****I. Strashnova, G. Yamborko, N. Vasylieva***Odessa I.I. Mechnikov National University  
2, Dvoryanska St., Odesa 65082, Ukraine  
e-mail: jamborkoann@ukr.net*

The aim of our work was to study the resistance of lactobacilli strains to some aggressive factors of gastrointestinal tract. The use of lactobacilli as a probiotic submits a number of requirements to this group of microorganisms associated with their ability to survive in conditions of high acidity and in the presence of enzymes of the gastrointestinal tract. 13 lactobacilli strains isolated from different sources (auto-fermenting vegetables, children feces and raw meat material) were used in this work. Resistance to secretions of the macroorganism affecting to lactobacilli during their transit through the gastrointestinal tract was investigated *in vitro* using different pH values (3,0–8,0) and digestive enzymes – pepsin and trypsin. It has been experimentally established and statistically confirmed that the tested lactobacilli strains showed a variable response to the action of different pH values and digestive enzymes, which was determined between a certain strain and the active factor. It was found that strains isolated from raw meat had the highest levels of resistance to different pH values, and strains isolated from auto-fermented vegetables were more resistant to digestive enzymes. It was shown that despite this dependence, there was a heterogeneous response of the strains to each aggressive factor, confirming the variability of the lactic acid bacteria strains. The mathematical analysis showed that the tested studied lactobacilli form several clusters and subclusters depending on the studied features. It has been shown that the primary source of lactobacilli isolation partially influences the formation of resistance of lactic acid bacteria to aggressive factors of the gastrointestinal tract. The obtained results indicate the feasibility of further studies that required for the selection of lactobacillus strains to produce probiotic preparations, and contribute to a more rational approach to the search for potential probiotic strains with predetermined properties.

*Keywords:* lactobacilli, probiotic properties, pH, pepsin, trypsin