УДК 579.66

М.А. Головин, В.И. Ганина

НОВЫЙ ШТАММ БИФИДОБАКТЕРИЙ КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Выделен новый природный пробиотический штамм бифидобактерий GG-72 с потенциалом к применению для повышения биобезопасности пищевых продуктов питания. Штамм GG-72 проявил относительно высокие показатели по антагонистическим свойствам в отношении к представителям патогенной и гнилостной микрофлоры. Проведена генетическая идентификация, испытание на безопасность, изучена динамика роста и изменения pH среды, определены технологические свойства и косвенные показатели, характеризующие выживаемость штамма в желудочно-кишечном тракте. Характеристики нового штамма сравнивали со штаммом *Bifidobacterium* 771, а также с хорошо изученным коллекционным штаммом *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 (ВКПМ-АС-1742).

Пробиотические культуры микроорганизмов, бифидобактерии, биологические и технологические свойства, генетическая идентификация.

Введение

В настоящее время не теряет актуальности вопрос о снижении риска распространения различных инфекций через продукты питания. Повышение биобезопасности продуктов питания и по сей день остается сложной задачей, одним из путей решения которой является создание в продуктах конкурентной микробиологической среды, препятствующей развитию болезнетворной и гнилостной микрофлоры. Вносимая в продукт полезная микрофлора способна не только снизить риск развития патогенных и гнилостных микроорганизмов, но и привнести функциональные характеристики [1–4].

Одной из важнейших групп симбионтной микрофлоры человека является род *Bifidobacterium*. Впервые бифидобактерии были выделены и охарактеризованы в 1900 г. учеником И.И. Мечникова, французским ученым Henry Tissier. Бифидобактерии были описаны как ветвеобразные, как правило, не образующие газ анаэробные микроорганизмы с бифуркациями на концах, присутствующие в фецес грудных детей. Изначально микроорганизм получил обозначение *Bacillus bifidus* и был отнесен к роду *Lactobacillus*, но в 1960 г. был отнесен в самостоятельный род *Bifidobacterium* [2, 3, 5].

Представители рода *Bifidobacterium* являются естественными обитателям толстого кишечника детей и взрослых людей, при этом множество видов обладает немалым количеством позитивных эффектов на организм хозяина [5]. Бифидобактерии, постоянно присутствующие в желудочно-кишечном тракте и на лизистых человека и животных, принимают участие в морфогенезе и функциях различных систем организма-хозяина – пищеварительной, иммунной, сердечно-сосудистой, эндокринной и др. Это происходит за счет участия бифидобактерий в обмене белков, липидов, углеводов, а также благодаря большому количеству продуцируемых биологически активных веществ: ферментов, экстрацеллюлярных белков, полисахаридов [2, 3, 4]. Антагонистическая активность бифидобактерий связана с продукцией органических кислот (ацетата и лактата), бактериоцинов, а также с блокированием сайтов адгезии на слизистой кишечника, что предотвращает фиксацию на них потенциально патогенных микроорганизмов и обусловливает важнейшую роль бифидобактерий в колонизационной резистентности [2, 4, 5].

Благодаря продуктам антагонистической активности в отношении патогенной и гнилостной микрофлоры бифидобактерии представляют собой значительный интерес как защитный агент продуктов питания [1, 3, 5]. Особенно важна антагонистическая активность штаммов бифидобактерий в отношении *Staph. aureus, E. Coli, Salmonella, Bacillus cereus, Pseudomonas, Yersinia, Listeria*, поскольку эти микроорганизмы даже в малых количествах в пищевых продуктах представляют значительную угрозу безопасности пищи, а значит, и здоровью населения [3, 5].

В данной работе описывается ряд исследований, направленных на получение ценного штамма бифидобактерий и изучение его биологических и технологических характеристик.

Условия эксперимента

Используемый в исследовании штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 (ВКПМ-АС-1884) был выделен из фецес здорового человека и хранится в коллекции промышленных штаммов микроорганизмов кафедры «Технология молока и молочных продуктов» ГОУ ВПО МГУПП, а также во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика.

Объектом сравнения биологических и технологических свойств служили новый неидентифицированный штамм *Bifidobacterium* 771 и *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 (ВКПМ-АС-1742). Штамм BGV-11 обладает выраженными антагонистическими свойствами против широкого спектра патогенных и гнилостных микроорганизмов, успешно прошел полный цикл клинических испытаний и рекомендован для использования в пищевой и фармацевтической промышленности [6].

Очистка от посторонней микрофлоры. Очистку проводили рассеиванием исследуемого материала

на селективные питательные среды с добавлением антибиотика диклоксацилина (Sigma-Aldrich, Германия) [3].

Условия культивирования. Штамм GG-72 культивировали анаэробно при (37,5±1) °С на поверхности плотной питательной среды или в высоком столбике полужидкой питательной среды. Были использованы следующие питательные среды: MRS-агар (HiMedia, Индия) с добавлением 0,05 % L-цистеин-гидрохлорида (Serva, Германия); полужидкая тиогликолевая питательная среда (Центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск), ГМК-1, ГМК-2 (БиоКомпас-С, г. Углич). Анаэробные условия создавали с помощью анаэростата AnaeroPack (Mitsubishi Gas Chemical Company, Япония), газогенераторов GENbox anaer (bioMérieux, Франция). Наличие анаэробных условий контролировали индикаторами анаэробности (Oxoid, Англия) [3, 7, 8].

Перед каждым экспериментом готовили свежую 17-часовую культуру не менее 3-й генерации. При этом в стерильную питательную среду засевали 0,1 % культуры бифидобактерий предыдущей генерации.

Генетическая идентификация. При генетической идентификации проводили рассев культуры до отдельной колонии и получали биомассу для анализа 16S рРНК. Выделение ДНК, подбор праймеров и режимов ПЦР осуществляли по соответствующим методикам [8–10]. Консервативные праймеры для наработки гена, кодирующего 16S рРНК: 8f – aga gtt tga tcc tgg ctc ag; 926r – ccg tca att cct ttr agt tt; 1492r – ggt tac cct tgt tac gac tt. Режимы реакции: 1 – 95 °С – 3 мин; 2 – 35 циклов: а) 95 °С – 30 с; б) 57 °С – 30 с; в) 72 °С – 1 мин 30 с; г) 72 °С – 5 мин.

Секвенирование последовательности гена, кодирующего 16S рРНК, проведено на автоматическом секвенаторе AE3000. Далее полученные секвенсы сравнивали и строили деревья родства. Для анализа секвенсов и построения филогенетических деревьев родства были использованы базы данных GenBank и Ribosomal Database Project-II (RDP-II) [12].

Стабильность воспроизведения результатов обеспечена проведением не менее трех повторностей ПЦР.

Условия электрофореза продуктов ПЦР исследуемых образцов были следующими: 1,0 % агарозный гель, электрофорез при напряженности электрического поля 5 В/см [9].

Видовая идентификация штамма проведена на базе ФГУП ГосНИИгенетика – ВКПМ, г. Москва.

Подтверждение безопасности. Штамм GG-72 проверяли на безвредность и нетоксичность. Исследование проводили на лабораторной линии стерильных белых мышей.

Изучение динамики роста. Динамика роста штамма GG-72 была изучена в промежутке от 0 до 24 часов. Исследования вели в сравнении с референс-штаммом BGV-11 (ВКПМ-АС-1742). В ходе эксперимента оценивали изменение количества клеток, оптической плотности и кислотности культуральной жидкости.

Оптическую плотность измеряли на фотометре КФК-3-01-ЗОМЗ, кислотность измеряли с помощью pH-метра pH-150МИ с электродом ЭСК-10605/7.

Экспериментальные образцы готовили через ряд последовательных десятикратных разведений, добиваясь в результате количества клеток близкого к lg 5 КОЕ/см^3. Количество клеток подтверждали микробиологическими посевами образцов инокулята и культуры в 0 часов роста на плотные питательные среды.

Результаты исследования динамики роста учитывали через 72 часа культивирования при (37,5±1) °С; исследование изменений кислотности культуральной жидкости вели непосредственно в ходе эксперимента.

Антагонистическая активность. Антагонистическую активность бифидобактерий определяли методом развивающихся смешанных популяций в сравнении с ростом патогенных тест-культур в монокультуре. В качестве представителей патогенных микроорганизмов использовали штаммы *E. coli* O157 и *Staph. aureus* 209-P, полученные из коллекции ФГУН «ГИСК им. Л.А. Тарасевича». Оценку антагонистических свойств проводили в сравнении со штаммами бифидобактерий BGV-11 и 771. Культуры тест-микроорганизмов готовили на скошенном мясо-пептонном агаре. Совместное культивирование проводили на тиогликолевой питательной среде (Центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск).

Эксперимент проводили по соответствующим методикам, описанным в литературе [1, 3, 8, 13].

Исследование с патогенными микроорганизмами проводили на базе испытательного центра «Биотест» при ГОУ ВПО МГУПБ.

Определение технологических свойств и показателей, косвенно характеризующих выживаемость в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Эксперимент со штаммом GG-72 по оценке технологических свойств и выживаемости в ЖКТ проводили путем культивирования в высоком столбике тиогликолевой питательной среды, которая для создания специфических условий роста бифидобактерий была модифицирована путем внесения специфических добавок для создания следующих характеристик:

– NaCl: 2 %, 4 %, 6,5 %;
– фенол: 0,4 %;
– желчь: 20 %, 40 %;
– pH: 5,5; 7,2; 8,3.

Была использована желчь крупного рогатого скота. Значение pH питательной среды устанавливали с помощью стерильных растворов соляной кислоты и гидроксида натрия. После внесения добавок среды стерилизовали. После стерилизации pH среды дополнительно контролировали.

Модифицированные питательные среды засевали культурой в объемном соотношении 6 %, ресуспендировали, исключая дополнительную аэрацию. Опытные и контрольный образцы инкубировали при температуре (37,5±1) °С в течение (36±1) ч.

Рост и развитие штамма GG-72 при разных условиях культивирования оценивали визуально в сравнении с контрольными культурами [1].

Результаты и их обсуждение

Новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 был выделен из фецес здорового человека, поэтому он изначально носит природный характер и имеет осно-

вание к обладанию статусом GRAS (Generally recognized as safe) в рамках рода *Bifidobacterium*.

Произведена очистка штамма от посторонней микрофлоры с применением антибиотика диклоксациллина, а также первичная идентификация по фенотипическим культурально-морфологическим признакам.

Полученный штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 обладает основными характерными для своего рода культурально-морфологическими и тинкториальными характеристиками (рис. 1).

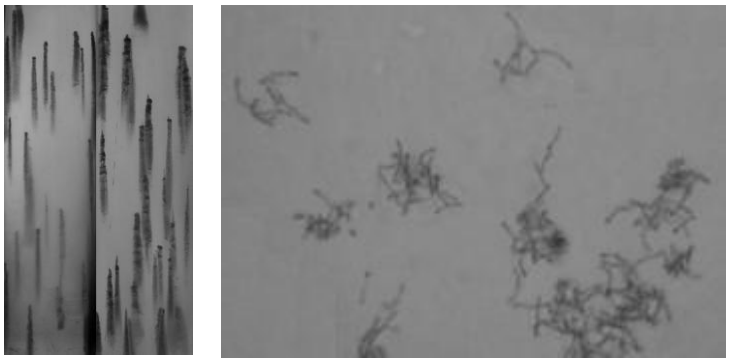

Рис. 1. Колонии штамма GG-72 в полужидкой питательной среде.
Клетки штамма GG-72

Полученные данные позволяют заключить, что штамм GG-72 обладает типичными для рода *Bifidobacterium* признаками и представляет собой грамположительные клетки с бифуркациями, располагающиеся одиночно или в группах, клеточная стенка с неравномерными утолщениями. На поверхности плотной питательной среды образует мелкие и точечные колонии (1 мм и менее 1 мм) молочного цвета полужидкой, слегка тянущейся консистенции с характерным уксусно-кисломолочным запахом.

Штамм GG-72 способен давать рост на типичных для рода *Bifidobacterium* питательных средах: тиогликолевая, ГМК-1, ГМК-2, МРС с добавлением 0,05 % L-цистеингидрохлорида.

Генетическая идентификация. Проведена амплификация последовательности гена, кодирующего 16S рРНК с помощью консервативных праймеров в ходе ПЦР. Вариабельные участки гена 16S рРНК секвенированы, получена их нуклеотидная последовательность.

Первичный скрининг по базе данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам: домен *Bacteria;* отдел *Firmicutes;* тип *Actinobacteria;* класс *Actinobacteria;* подкласс *Actinobacteridae;* порядок *Bifidobacteriales;* семейство *Bifidobacteriaceae;* род *Bifidobacterium.* Установлено, что гомология с видом рода *Bifidobacterium bifidum* составляет 98 %.

Результаты обработки секвенсов при помощи компьютерной программы, находящейся на сайте RDB II (Ribosomal Database Project II), предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев, представлены на рис. 2 в графическом виде. Идентифицируемый штамм обозначен как «uknown» [11, 12].

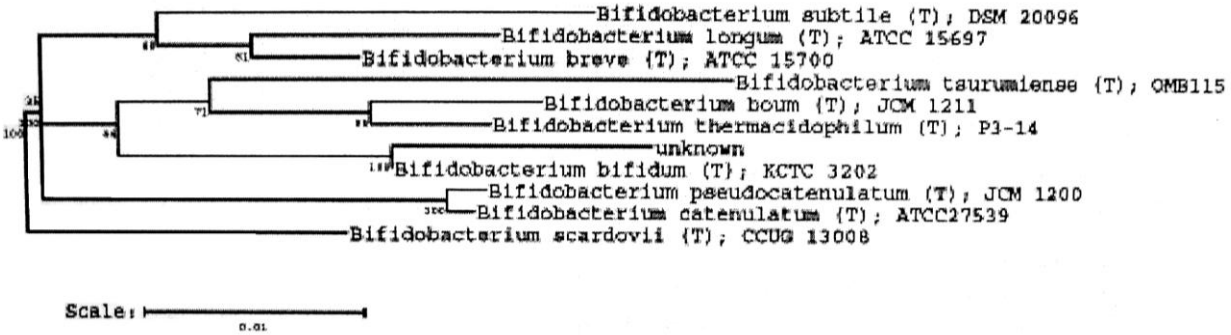

Рис. 2. Филогенетическое древо штамма GG-72 (обозначен как «uknown»)
с гомологичными штаммами бифидобактерий

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97 %. По данному критерию исследуемый штамм можно отнести к виду *Bifidobacterium bifidum*. Отнесение штамма GG-72 к виду *B. bifidum* носит позитивный характер. Это обосновано принадлежностью вида к неофициальной группе бифидобактерий истинно «человеческого» происхождения и содержания этого вида до 51,9 % от общего объема микрофлоры ЖКТ у детей на грудном вскармливании [2, 14]. Вид *B. bifidum* способен при определенных условиях развиваться в молочном сырье, что позволяет его рекомендовать для применения в технологии молочных продуктов [2, 3, 15]. Эти факты усиливают нашу уве-

ренность в выборе штамма для применения с позиции функционального компонента.

Подтверждение непатогенности. Проверка на отсутствие патогенных свойств GG-72 проведена на лабораторных стерильных белых мышах, которым вводили культуру GG-72. На протяжении стандартного периода времени испытаний не было выявлено никаких изменений как в поведении, так и в структуре внутренних органов мышей.

По результатам оценки динамики роста и изменения pH среды были построены графики, представленные на рис. 3 и 4.

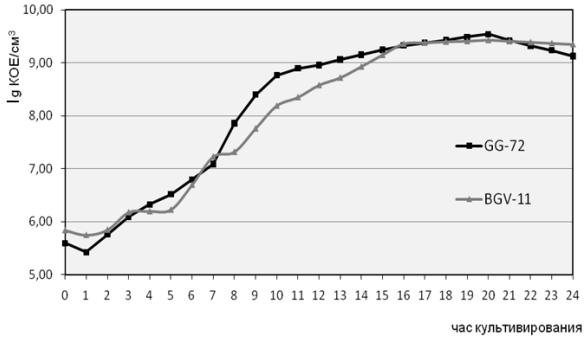

Рис. 3. Динамика изменения количества клеток GG-72, BGV-11

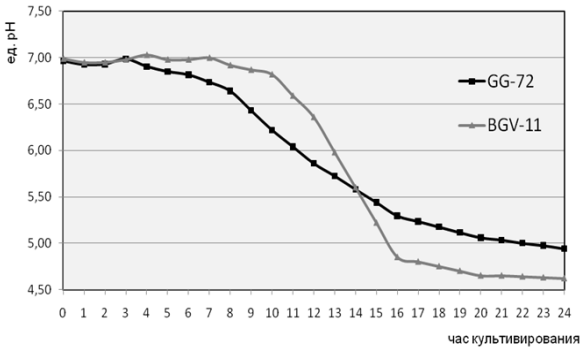

Рис. 4. Динамика изменения активной кислотности среды культивирования

Анализ полученных результатов показал, что штамм GG-72 способен активно накапливать биомассу. Менее чем за 12 часов роста количество клеток штамма достигало порядка lg 9 КОЕ/см^3, что превышает нормируемые количества бифидобактерий lg 6 КОЕ/см^3 в функциональных кисломолочных продуктах.

По изменению кислотности среды (рис. 4) можно говорить, что штамм GG-72 обладает типичной для бифидобактерий динамикой понижения кислотности среды.

Количество клеток бифидобактерий в среде на уровне lg 9 КОЕ/см^3 и понижение pH среды ниже 5 ед. способно обеспечить повышение безопасности продуктов питания. Полученные данные динамики роста расширяют понимание процесса культивирования изучаемого штамма бифидобактерий. Такая информация ценна для более качественного наращивания биомассы изучаемого штамма как в лабораторных, так и в промышленных масштабах.

Антагонистическая активность. Результаты исследований, представленные на рис. 5, свидетельствуют о проявлении выраженной антагонистической активности изученных штаммов по отношению к тест-культуре *E. coli* O157. Следует отметить, что новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 обладает таким же выраженным действием на *E. coli* O157, как и штамм *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11, эффективность которого подтверждена клиническими испытаниями на животных и людях.

Результаты совместного культивирования патогенной тест-культуры *Staph. aureus* 209-P с моноштаммами бифидобактерий GG-72, 771, BGV-11 представлены на рис. 6. В данном случае можно говорить о более выраженной антагонистической активности штамма GG-72: наблюдали снижение количества *Staph. aureus* 209-P более чем на 4 порядка, в то время как штаммы 771, BGV-11 снижали количество патогенного тест-микроорганизма более чем на 3 порядка.

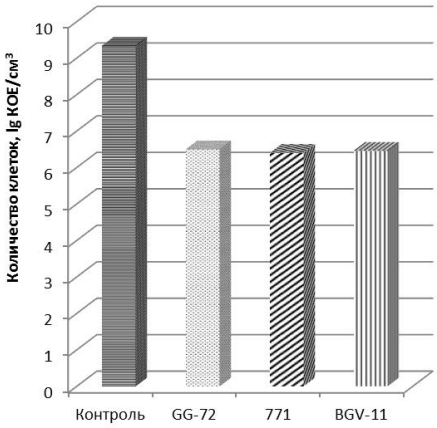

Рис. 5. Снижение роста *E. coli* O157 штаммами GG-72, 771, BGV-11

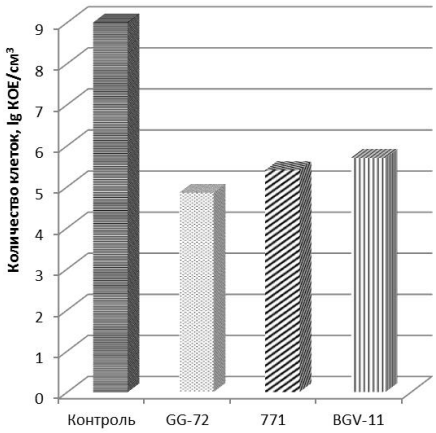

Рис. 6. Снижение роста *Staph. aureus* 209-P штаммами GG-72, 771, BGV-11

Таким образом, анализ результатов выполненных исследований показал, что новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 обладает антагонистической активностью по отношению к патогенным тест-культурам *E. coli* O157 и *Staph. aureus* 209-P, а следовательно, способен проявлять функциональные свойства.

Определение технологических свойств и показателей, косвенно характеризующих выживаемость клеток изучаемого штамма в желудочно-кишечном тракте. Результаты оценки технологических свойств штамма GG-72 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Рост штамма GG-72
в различных технологических условиях

Условия / Штамм	NaCl, %			Фенол, %	Желчь, %		pH		
	2	4	6,5	0,4	20	40	5,5	7,2	8,3
GG-72	+	–	–	±	±	–	+	+	+
771	±	–	–	±	±	–	±	+	+
BGV-11	+	±	–	±	±	±	±	+	+

Анализ полученных данных показал, что штамм GG-72 хорошо выдерживает изменение pH среды от 5,5 до 8,3 единиц; устойчив в питательной среде с добавлением поваренной соли в концентрации 2 %; некоторые клетки популяции штамма способны выживать в питательной среде с добавлением 0,4 % фенола и 20 % желчи. Результаты исследований нового штамма *Bifidobacterium bifidum* GG-72 позволяют сделать заключение о проявлении штаммом достаточно высокой способности к действию неблагоприятных факторов, которые возникают в желудочно-кишечном тракте организма человека.

Выводы

1. Получен и идентифицирован новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72.
2. Штамм GG-72 можно характеризовать как природный, безопасный, проявляющий антагонистическую активность по отношению к патогенным микроорганизмам.
3. Экспериментально показана косвенная способность штамма GG-72 выживать в условиях желудочно-кишечного тракта человека.
4. *Bifidobacterium bifidum* GG-72 принят на национальное патентное депонирование во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов с присвоением номера АС-1884.
5. Сходство показателей штамма GG-72 со штаммом BGV-11 дает предпосылки к рассмотрению нового штамма GG-72 в качестве перспективного биологического агента, способного повышать биобезопасность продуктов питания и привносить иные ценные пробиотические свойства в продукты питания.

Список литературы

1. Феклисова, Л.В. Новый микробный препарат «Бифацид» при лечении детей с острыми кишечными заболеваниями / Л.В. Феклисова, В.И. Ганина, В.Ф. Иноземцева, Л.В. Титова, О.Ю. Леонтьева // Российский вестник перенатологии и педиатрии. – 1995. – № 7. – С. 21–26.
2. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3 т. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание / Б.А. Шендеров. – М.: Грантъ, 2001. – С. 40–46.
3. Biavati, B. The Family Bifidobacteriaceae // The Prokaryotes. Third Edition: a hadbook on the Biology of Bacteria: Synbiotic Association, Biotechnology, Applied Microbiology / B. Biavati, P. Mattarelli. – Singapore: Springer Science, 2006. – Vol. 3. – P. 322–382.
4. Piksasova, O.V. Methods of Molecular Identification as Important Tools for Control and Certification in Microbiology / O.V. Piksasova, M.A. Kornienko, Yu.D. Tsygankov, A.I. Netrusov // Electronic Journal of Natural Sciences. – 2009. – Vol. 1. – P. 35–49.
5. Cheikhyoussef, A. Antimicrobial proteinaceous compaunds obtained from bifidobacteria: froom production to theiru application / A. Cheikhyouseff, N. Pogori, H. Zhang // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – Vol. 125. – P. 215–222.
6. Ганина, В.И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии: монография / В.И. Ганина. – М.: МГУПБ, 2001. – 69 с.
7. Биологические и микробиологические факторы. Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах: МУК 4.2.999-00: утв. Главным гос. сан. врачом РФ, первым заместителем министра здравоохранения, 08.11.2000: ввод в действие с 08.02.2001.
8. United States. The United States pharmacopeia. Pharmacopeial Convention. 31st ed., Amended chapters 61, 62, 111. 2007. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
9. Innis, M.A. Optimization of PCR Protocol. Guide to methods and application / M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.P. Sninsky. – New York: Academic Press, 1990. – P. 14–15.
10. Fermentas. Molecular biology: Catalogue & Application Guide, 1998/1999 / Lithuania. – Vilnius.: Fermentas UAB, 1997. – 152 p.
11. Pavlicek, A.S. Free-tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus Frenkelia / A.S. Pavlicek, Hrda and J. Flegr // Folia Biol. (Praha). – 1999. – Vol. 45. – P. 97–99.
12. Ribosomal Database Project II (http://www.cme.msu.edu).

13. Vanderzant, C. Compendium of methods for the microbiological examination of foods / C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser // American Public Health Association (Washington). – 1992. – Vol. 3.

14. Fellis, G.E. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria / G.E. Fellis, F. Dellagio // Curr. Issues Intest Microbiol. – 2007. – Vol. 8. – P. 44–61.

15. Salof-Coste, C.J. Bifidobacteria. Danone World Newsletter / C.J. Salof-Coste // American Public Health Association, Washington, D.C. – 1997. – Vol. 16. – P. 1–12.

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет
пищевых производств»,
109316, Россия, г. Москва, ул. Талалихина, 33.
Тел./факс: 8(495) 677-07-23
8(495) 677-03-90
e-mail: techmol@inbox.ru

SUMMARY

M.A. Golovin, V.I. Ganina

A NEW BIFIDUS BACTERIA STRAIN AS A FACTOR OF INCREASING BIOSAFETY OF FOODS

A new natural probiotic strain of bifidus bacteria has been singled out in order to increase the biosafety of food products. The GG-72 strain has shown relatively high results of antagonistic characteristics concerning the representatives of pathogenic and saprogenic microflora. Genetic identification and safety trials have been run; the growth dynamics, and the dynamics of pH reduction have been studied; and the technoligical features and indirect characteristics describing the strain's ability to survive in alimentary canal have been defined. The characteristics of a new strain were compared with *Bifidobacterium* 771 strain as well as with the already quite investigated *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 (VKPM-AS-1742) strain.

Probiotic cultures, bifidus bacteria, biological and technological features, genetic identification.

Moscow State University of Food Production
33, Talalikhina street, Moscow, 109316, Russia
Phone/Fax: +7(495) 677-07-23
+7(495) 677-03-90
e-mail: techmol@inbox.ru