

КОРМОВАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ – НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ

Н.А. Головнева, Н.Е. Рябая, А.А. Самарцев

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, biochem_lab@mbio.bas-net.by

Введение. В настоящее время установлено, что многие позитивные эффекты микробиоты кишечника человека и животных связаны с метаболитами или структурными компонентами микробных клеток, которые непосредственно или косвенно оказывают благотворное воздействие на организм хозяина [1, 2]. В 2019 году эксперты Международной научной ассоциации по пробиотикам и пребиотикам (ISAPP) определили «препарат из инактивированных микробных клеток или клеточных компонентов, с метаболитами или без них, который способствует наблюдаемой пользе для здоровья хозяина» как постбиотик [3].

Следует отметить, что продукты метаболизма, выделяемые пробиотическими бактериями или высвобождаемые после их лизиса, активно вступают в обменные процессы в макроорганизме [4, 5], доказаны их иммуномодулирующие, противоопухолевые, антиоксидантные, антимикробные и др. свойства [6-8].

Эффекты постбиотиков часто связаны с компонентами, не имеющими штаммоспецифических различий по биохимическим характеристикам. Например, короткоцепочечные жирные кислоты не только являются источником энергии для клеток эпителия кишечника, но и участвуют в поддержании метаболического гомеостаза, влияют на T-регуляторные клетки, оказывают противовоспалительные эффекты [9-13].

Продуцируемые пробиотическими бактериями органические кислоты и бактериоцины влияют на формирование кишечного микробиоценоза, сдерживают развитие условно-патогенных микроорганизмов [14]. Исследования *in vivo* показали ингибирующее действие препаратов на основе метаболитов *Lactiplantibacillus plantarum* на такие патогенные бактерии как *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, устойчивые к ванкомицину энтерококки [15-18].

В настоящее время постбиотики (или метабиотики), не содержащие живые клетки микроорганизмов, нашли применение в качестве кормовых добавок в животноводстве [19]. Доказано, что использование их в качестве кормовой добавки способствует росту и здоровью бройлеров, несушек, поросят [20], а также улучшает ферментацию в рубце жвачных животных [21]. Применение

таких препаратов позволяет компенсировать в рационах животных и птицы дефицит аминокислот, витаминов, микроэлементов, повысить усвояемость кормов, нормализовать микробиocenоз желудочно-кишечного тракта.

Однако в современных технологиях производства бактериальных препаратов целевым продуктом является биомасса микроорганизмов, а оставшаяся после ее отделения бесклеточная культуральная жидкость, содержащая биологически активные вещества, которые присутствуют в усвояемой форме и физиологически адекватном количестве, является побочным продуктом производства. В тоже время создание кормовой добавки на основе продуктов метаболизма пробиотических молочнокислых бактерий даёт возможность разработать новые стратегии для улучшения здоровья животных.

Цель работы – исследовать содержание метаболитов пробиотических бактерий в бесклеточной культуральной жидкости.

Материалы и методы. Бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* – компоненты препаратов пробиотиков, выращивали 20 ч в оптимизированных условиях на модифицированной среде MRS, клетки отделяли центрифугированием при 10 000 g, в супернатантах определяли показатели КОЕ, pH, титруемой кислотности, содержание молочной, уксусной кислот, этанола. Количество белков и экзополисахаридов (ЭПС) определяли по стандартным методикам, выражая в мкг/мл.

Результаты и обсуждение. Для стабилизации бесклеточной культуральной жидкости (БКЖ) применяли термоинактивацию. Показано, что после прогревания при 80 °С в течение 15-40 мин показатель жизнеспособности бактерий в БКЖ не превышает $3,4 \times 10^3 - 1,6 \times 10^4$ КОЕ/мл.

Активная кислотность (pH) культуральной жидкости у всех исследованных штаммов бифидобактерий находится в пределах 4,2-4,5, титруемая кислотность составляет 175-200⁰T (рисунок 1).

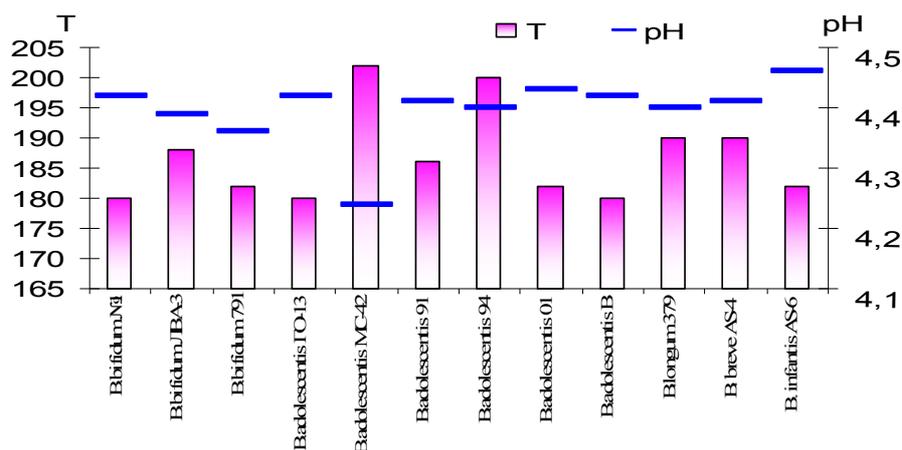


Рисунок 1. – Активная и титруемая кислотность в БКЖ бифидобактерий

Проведенный анализ концентрации органических кислот в БКЖ лактобактерий показал содержание молочной кислоты 3,5-4 г/л; уксусной – 1,6-3,0 г/л; этанола 1,84-2,30 г/л, а также ЭПС – от 120 до 160 мкг/мл (рисунок 2).

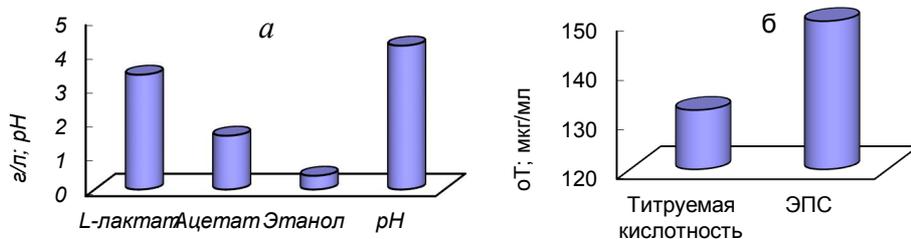


Рисунок 2. – Характеристика продуктов метаболизма на основе молочнокислых бактерий *Lactiplantibacillus sp.*

Содержание молочной кислоты в супернатантах культуральной жидкости бифидобактерий составляет 4 – 7,8 г/л (рисунок 3).

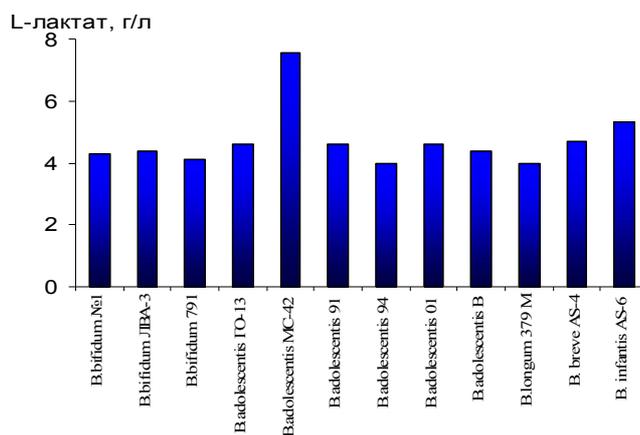


Рисунок 3. – Продукция молочной кислоты бифидобактериями

Антагонистическую активность БКЖ бифидобактерий оценивали методом лунок. Сравнение эффекта нативной и нейтрализованной (рН 6,8-7,0) культуральной жидкости бифидобактерий позволило дифференцировать действие органических кислот и других антибактериальных факторов.

Как видно из данных таблицы антибактериальное действие бесклеточного супернатанта бифидобактерий более выражено в присутствии диссоциированных органических кислот.

Таблица – Влияние на рост грамположительных и грамотрицательных бактерий препаратов бесклеточной культуральной жидкости *B. adolescentis*

| Индикаторные штаммы | Диаметр зон подавления роста индикаторных штаммов, мм* | |
|--------------------------------|--|-----|
| | 1 | 2 |
| <i>Ent. faecalis</i> | 10± | - |
| <i>E. coli</i> O-18 | 8±2 | 5±2 |
| <i>Salmonella sp.</i> | 6±2 | 4±2 |
| <i>P. mirabilis</i> | 4,5±2 | 3±1 |
| <i>Kl. pneumoniae</i> | 6±2 | 6±2 |
| <i>Enterobacter sp.</i> | 5±1,5 | - |
| <i>E. coli</i> H1 ₂ | 10±2,5 | - |
| <i>E. coli</i> j62 | 10±3 | - |
| <i>Micrococcus vapians</i> | 7±2 | - |
| <i>Pseudomonas putida</i> M | 12±2 | - |
| <i>Staphylococcus sp.</i> | 3±1 | 2±1 |
| <i>Staph. saprophyticus</i> | 7±1,5 | - |
| <i>Bacillus cereus</i> | 4±1 | - |
| <i>B. subtilis</i> 4k31 | 7±2 | - |
| <i>B. subtilis</i> 494 | 9±1 | - |
| <i>B. capsulatus</i> | 5±1 | - |
| <i>Pr. vulgaris</i> | 7±1,5 | - |
| <i>L. delbrueckii</i> | - | - |
| <i>L. brevis</i> | - | - |
| <i>L. rhamnosus</i> | - | - |
| <i>L. casei</i> | 1±0,5 | - |

Примечание – БКЖ рН 4,2

1. БКЖ рН 7 (после нейтрализации)

Нейтрализация кислых продуктов метаболизма приводит к существенному сокращению спектра и уменьшению выраженности антимикробной активности бесклеточной культуральной жидкости бифидобактерий. Наблюдаемый при этом эффект подавления роста отдельных штаммов *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* O-18 и *Klebsiella pneumoniae* свидетель-

ствуется о продукции, помимо органических кислот, антибактериальных метаболитов другой природы.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о высоком содержании биологически активных метаболитов в бесклеточной культуральной жидкости пробиотических бактерий, что позволяет рассматривать её как перспективную кормовую добавку для улучшения здоровья животных.

Список использованных источников

1. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микробиологических нарушений кишечника М.Д. Ардатская // Медицинский совет. – 2015. – № 13. – С.94-99.
2. Tsilingiri, K.; Rescigno, M. Postbiotics: What else? *Benef. Microbes* 2013. – Vol. 4. – P. 101-107.
3. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33948025/> *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021. – Sep;18(9). – P. 649-667. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6. Epub 2021 May 4.
4. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening / S. R. Konstantinov [et al.] // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2013. – Vol. 10. – P. 741-745.
5. Postbiotic activities of Lactobacilli-derived factors / A. Cicienia [et al.] // *J Clin Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 48. – P. 18–22.
6. Antihypertensive effects of probiotics / I. Robles-Vera [et al.] *Curr Hypertens Reports.* – 2017. – Vol. 19 P. 26-35.
7. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field / Aguilar-Toalá J. E. [et al.] // *Trends Food Sci Technol.* – 2018. – Vol. 75. – P. 105-114.
8. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products / C. P. Barros [et al.] // *Curr Opin Food Sci.* – 2020. – Vol. 32. – P. 1-8.
9. Thirabunyanon, M. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce anti proliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction / M Thirabunyanon, P. Hongwittayakorn // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2013. – Vol. 169. – P. 511-525.
10. Belury, MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid : potential mechanisms of action / M.A. Belury // *J Nutr.* – 2002. – Vol. 132. – P. 2995-2998.
11. Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells *in vitro* and *in vivo* / SM. Soel [et al.] // *J Nutr Biochem.* – 2007. – Vol. 18. – P. 650-657.
12. Probiotic conjugated linoleic acid mediated apoptosis in breast cancer cells by downregulation of NF- κ B. / R.H. Kadirareddy [et al.] // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2016. – Vol. 17. – P. 3395-3403.
13. Oleskin, A.V. Role of neuromediators in the functioning of the human microbiota : “Business Talks” among microorganisms and the microbiota-host dialogue / AV. Oleskin, G. I. El'-Registan, BA Shenderov // *Microbiology.* – 2016. – Vol. 85. – P. 1-22.
14. Aguilar-Toalá, J.; Garcia-Varela, R.; Garcia, H.; Mata-Haro, V.; González-Córdova, A.; Vallejo-Cordoba, B.; Hernández-Mendoza, A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Technol.* 2018. – Vol. 75. – P. 105-114.
15. Kareem, K.Y.; Ling, F.H.; Chwen, L.T.; Foong, O.M.; Asmara, S.A. Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut Pathog.* – 2014. – Vol. 6, P. 23.
16. Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods / D. M Linares [et al.] // *Front Microbiol.* – 2017. – P. 1-11.
17. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field / A. F. Córdova [et al.] // *Trends Food Sci Technol.* – 2018. – Vol. 75. – P. 105-114.
18. *Lactobacillus reuteri* and *Staphylococcus aureus* differentially influence the generation of monocyte-derived dendritic cells and subsequent autologous T cell responses / Y. Haileselassie [et al.] // *Immun. Inflamm. Dis.* – 2016. – № 4. – P. 315-326.
19. Thanh, N.T.; Loh, T.C.; Foo, H.L.; Hair-Bejo, M.; Azhar, B.K. Effects of feeding metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faecal microbial population, small intestine villus height and faecal volatile fatty acids in broilers. *Br. Poult. Sci.* 2009, 50, P. 298-306.
20. Loh, T.C.; Thu, T.V.; Foo, H.L.; Bejo, M.H. Effects of different levels of metabolite combination produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, diarrhoea, gut environment and digestibility of postweaning piglets. *J. Appl. Anim. Res.* 2013, 41, P. 200-207.

21. Izuddin, W.I.; Loh, T.C.; Samsudin, A.A.; Foo, H.L. In vitro study of postbiotics from *Lactobacillus plantarum* RG14 on rumen fermentation and microbial population. *Rev. Bras. Zootec.* 2018, P. 47.