



Серия «Биология. Экология»
2019. Т. 28. С. 56–62
Онлайн-доступ к журналу:
<http://izvestiabiio.isu.ru/ru>

ИЗВЕСТИЯ
Иркутского
государственного
университета

УДК 579.24+579.61
DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.28.56>

Оценка биологического действия фармакологических форм шиитаке (*Lentinus edodes*) на лактобактерии

М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов

Ивановская государственная медицинская академия, г. Иваново, Россия
E-mail: smarina23@mail.ru

Аннотация. Изучено биологическое действие двух фармакологических форм (сок из свежих и порошок высушенных плодовых тел) высшего съедобного гриба шиитаке *Lentinus edodes* на развитие лактобактерий. Установлена стимуляция роста лактобактерий, содержащихся в коммерческом пробиотическом препарате «Лактобактерин», при внесении в среду сока и порошка шиитаке. Установлена способность сока гриба стимулировать адаптивную способность и активизировать рост лактобактерий, входящих в состав аутопробиотического комплекса человека. Отмечены перспективы использования лекарственных производных шиитаке для разработки пробиотических препаратов коррекции дисбактериозов кишечника или создания продуктов функционального питания.

Ключевые слова: микробиология, лактобактерии, гриб шиитаке, сок, порошок, аутопробиотический комплекс.

Для цитирования: Кириленко М. А., Кузнецов О. Ю. Оценка биологического действия производных шиитаке (*Lentinus edodes*) на лактобактерии // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2019. Т. 28. С. 56–62. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.28.56>

Введение

Высший съедобный гриб шиитаке (*Lentinus edodes*) известен более тысячи лет и ныне широко используется в кулинарии, косметологии и медицине [Hobbs, 2000]. Благодаря уникальному химическому составу шиитаке благотворно влияет на состояние многих систем в организме и помогает значительно улучшить самочувствие [Биология *Lentinus* ..., 1999]. Препараты на основе гриба проявляют иммуномодулирующие свойства, способные активировать клетки неспецифического иммунитета, что даёт возможность эффективно бороться, например, с раковыми заболеваниями [Способ получения ..., 2014]. Экстракт сока грибов обладает превосходными антимикробными и антигрибковыми свойствами, при этом не нарушая жизнедеятельность нормальной микрофлоры кишечника человека [Применение грибов ..., 2006; Антимикробная активность ..., 2010]. Поддержание квазистатического состояния основных групп представителей нормальной микрофлоры (кишечной палочки, бифидо- и лактобактерии) является весьма перспективной задачей обеспечения необходимых физиологических процессов организма.

Качественное и количественное нарушение в составе нормальной микрофлоры кишечника относится к дисбактериозам. Лактобактерии вместе с

другими молочнокислыми микробами имеют большое значение для поддержания состояния здоровья. Недостаток лактобактерий в кишечном тракте человека может привести к серьёзным нарушениям в его работе. Препарат «Лактобактерин», в состав которого входят штаммы *Lactobacillus acidophilus*, является одним из самых применяемых и доступных для восстановления нормальной микрофлоры кишечника. Использование подобного иммуномодулятора усиливает, укрепляет и поддерживает иммунитет, снижает реактивность и чувствительность организма к разнообразным неблагоприятным агрессивным факторам внешней среды [Sia, Candlish, 1999; Sano, Yoshino, Matsuzawa, 2002; Stamets, 2003; Lelley, Vetter, 2004].

Целью настоящей работы является исследование биологического действия фармакологических форм шиитаке на развитие лактобактерий.

Материалы и методы

В исследовании использовали лактобактерии *Lactobacillus acidophilus* из состава лиофильно высушенного препарата «Лактобактерин» («Биом», Россия) и аутопробиотические комплексы, содержащие живые лактобактерии, полученные от конкретных людей [Ингибирующее действие ..., 2000]. Для оценки развития популяций клеток лактобактерий в работе использовали нефелометрический метод исследования и метод прямого подсчёта количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашках с плотной агаризованной питательной средой (лактобакагар). Все эксперименты выполнены в тройной повторности.

В качестве стимулятора роста лактобактерий применяли фармакологические формы гриба шиитаке (*Lentinus edodes*): стерильный натуральный сок или порошок. Сок получали путём выжимания механически измельчённых свежих плодовых тел гриба, далее сок подвергался стерилизации путём ультрафильтрации с использованием каолиновых свечей Шамберлана с размером пор 0,12 мкм. Порошок гриба получали путём высушивания свежих плодовых тел при температуре 70 °С до влажности 10–12 % и размалывали до размера частиц 0,2–1,0 мм, а далее стерилизовали вместе с питательной средой лактобакагар (ГНЦ ПМБ, Россия) в автоклаве при температуре 121±1 °С в течение 15 мин.

В нефелометрических экспериментах использовали фотокориметр КФК-2 (ЗОМЗ, Россия), предназначенный для измерения коэффициентов пропускания и оптической плотности жидкостных растворов. Измерения оптической плотности выросшей культуры клеток лактобактерий на жидкой питательной среде (MRS agar (HiMedia, Индия)) с добавлением стимулятора роста органической природы (сок шиитаке) выполняли при длине волны 540 нм, объёме кюветы 3,05 см³.

Оптическую плотность определяли по формуле

$$D = -\lg \frac{F_{\lambda}}{F_{0\lambda}},$$

где D – оптическая плотность, $F_{0\lambda}$ – полный световой поток, F_{λ} – световой поток, прошедший через исследуемую среду.

В опытах использовали только сок гриба в объеме 2,5 %, поскольку порошок привносил неравномерную взвесь по исследуемому в кювете прибора объему раствора, что приводило к искажению получаемых результатов. В ходе выполнения экспериментов 0,25 мл культуры АПК лактобактерий по оптической плотности 10 ед. добавляли в питательную среду с необходимой добавкой и контролем. Результаты фиксировали через 24 ч после термостатного культивирования при температуре 37 °С.

Была проведена также оценка колониеобразующей способности лактобактерий *L. acidophilus* из состава препарата «Лактобактерин» при посеве на питательную среду лактобакагар с добавлением стерильного сока или порошка шиитаке. Биомассу лактобактерий высевали на питательную среду из разведения препарата на физиологическом растворе 10^3 . В опыте в питательную среду вносили стерильный сок или порошок гриба в объеме 2,5 % от объема среды; в качестве контроля использовались разведения среды без внесения стимулятора.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением программного пакета Statistica v.13.1. Для анализа использовали значение *t*-критерия Стьюдента. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В оценке адаптивных способностей популяций лактобактерий прямой подсчет числа жизнеспособных клеток является, к сожалению, довольно затратным методом. Однако именно он способен охарактеризовать с достаточной степенью точности воздействие привносимого в питательную среду эффекторного вещества. При добавлении различных фармакологических форм шиитаке (сок, порошок) достоверно увеличивается число колониеобразующих единиц лактобактерий с $5,24 \pm 0,49$ КОЕ · 10^3 /мл ($p < 0,05$) в контроле до $7,32 \pm 0,47$ КОЕ · 10^3 /мл в опытах с соком, а с порошком – до $7,66 \pm 0,42$ КОЕ · 10^3 /мл ($p < 0,05$) (табл. 1). Рост показателя количества микроорганизмов в опытах с добавлением сока по сравнению с контролем составил 39,7 %; с добавлением порошка – 46,2 %.

Таблица 1

Оценка влияния фармакологических форм шиитаке на развитие пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus*

Статистические параметры	Число колоний на чашке (КОЕ/мл)		
	Лекарственная форма		Контроль
	сок	порошок	
$M \pm m$ (КОЕ · 10^3)	$7,32 \pm 0,47$	$7,66 \pm 0,42$	$5,24 \pm 0,49$
Стандартное отклонение	$1,05 \cdot 10^3$	$0,93 \cdot 10^3$	$1,09 \cdot 10^3$
n (число экспериментов)	5	5	5
Процент стимуляции роста	39,7	46,2	–
Значение <i>t</i> -критерия Стьюдента	3,06	3,75	–
Уровень значимости <i>p</i> относительно контроля	$< 0,05$	$< 0,05$	–
Различия статистически значимы. Значение <i>t</i> -критерия Стьюдента – 0,54 <i>p</i> сок / <i>p</i> порошок $> 0,05$. Различия статистически незначимы			

Установлено, что при внесении сока или порошка в среду в меньшей (менее 2,5 % от объёма защитной среды) концентрации их стимулирующий эффект на рост лактобактерий был выражен незначительно. При увеличении концентрации производных гриба более 2,5 % стимулирующий эффект не изменялся, судя по числу КОЕ/мл лактобактерий. В связи с этим мы сочли нецелесообразным увеличивать дозу стимулятора и приняли его вышеуказанную концентрацию в качестве оптимальной.

Полученные результаты дают основание считать, что добавление сока или порошка гриба шиитаке значительно повышает терапевтическое действие любого пробиотического препарата за счёт повышения регенераторной способности лактобактерий после лиофилизации.

Обнаруженные положительные результаты по стимуляции развития клеток лактобактерий из состава «Лактобактерин» были получены для одного штамма *L. acidophilus*. Возникает вопрос, будет ли сохраняться стимулирующая активность производных шиитаке для смеси культур лактобактерий, не подвергнутых предварительному лиофильному высушиванию и последующему длительному хранению, например живых культур лактобактерий аутопробиотического комплекса (АПК), находящихся в жидкой питательной среде. Опираясь на полученные данные (см. табл. 1), логично предположить возможность положительного эффекта воздействия на штаммы лактобактерий, входящих в состав АПК, за счёт наличия в фармакологических формах гриба стимулирующих компонентов, ускоряющих процессы роста, развития и межвидового взаимодействия бактерий.

Был выполнен эксперимент с использованием популяции выделенного нами от конкретного индивидуума [Ингибирующее действие ..., 2000] АПК, состоящего из нескольких видов лактобактерий. Для оценки развития этой популяции использовали нефелометрический метод, позволяющий быстро оценить развитие микробной популяции и охарактеризовать направленность адаптивного процесса изучаемого комплекса лактобактерий. Полученные данные развития лактобактерий АПК (контроль) и эксперимента с добавлением сока шиитаке представлены в табл. 2.

Таблица 2

Оценка влияния сока шиитаке на развитие лактобактерий АПК нефелометрическим методом

	Коэффициент пропускания				Чистая MRS	Настройка прибора по H ₂ O дист.
	АПК					
	экспериментальные повторности			(M±m)		
	1	2	3			
Контроль	24	23	25	0,62±0,02	81	100
Опыт	3	4	4	1,52±0,04		

В ходе эксперимента зарегистрировали увеличение оптической плотности в опыте относительно контроля в 2,5 раза. Вместе с тем оптическая плотность развивающихся бактериальных культур имеет характер не прямой зависимости между количеством клеток и временными отрезками измерений эксперимента, однако именно данный факт косвенно свидетельствует о стимуляции развития микробной популяции лактобактерий АПК под влиянием веществ сока шиитаке.

Заключение

В ходе исследований доказано стимулирующее действие фармакологических форм шиитаке на развитие лактобактерий, высеянных из лиофилизированного пробиотического препарата «Лактобактерин», а также живых лактобактерий из состава аутопробиотического комплекса человека.

Фармакологические формы шиитаке могут быть использованы в качестве природного стимулятора развития лактобактерий. Их применение рекомендуется при перспективной разработке новых пробиотических препаратов для коррекции дисбактериозов кишечника или создания продуктов функционального питания.

Результаты изучения стимулирующего действия производных гриба шиитаке (сок, порошок) на штаммы лактобактерий стали основой патента РФ на изобретение [Кириленко, Кузнецов, 2018], полученного авторами настоящей работы.

Список литературы

Антимикробная активность и стабильность сока гриба Шиитаке (*Lentinus edodes*) при длительном хранении / О. Ю. Кузнецов, Е. В. Милькова, А. Е. Соснина, Е. В. Баланцева // Вестн. Иванов. мед. акад. 2010. Т. 15, № 3. С. 19–23.

Биология *Lentinus edodes* / Л. В. Гарипова, Л. А. Завьялова, Е. А. Александрова, В. Е. Никитина // Микология и фитопатология. 1999. Т. 33. Вып. 2. С. 107–110.

Ингибирующее действие сока гриба Шиитаке на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы / О. Ю. Кузнецов, Н. Ю. Сотникова, А. А. Мартенова, Е. В. Куликова // Актуальные проблемы здоровья семьи. Иваново, 2000. С. 193.

Кириленко М. А., Кузнецов О. Ю. Способ получения препарата эубиотика Лактобактерин. Патент 2661737 РФ. МПК51 А61К 35/74. Патентообладатель Ивановская государственная академия Минздрава России; заявл. 17.07.2017; опубл. 19.07.2018. Бюл. № 20. 4 с.

Применение грибов *Lentinus edodes* (Шиитаке) в комплексном лечении запущенных форм рака ободочной и прямой кишки / В. В. Яновой, А. С. Мартынов, А. Н. Разин, И. Ф. Филиппова // Колопроктология. 2006. № 1 (15). С. 32–34.

Способ получения аутопробиотика, содержащего живые лактобактерии и бифидобактерии / О. Ю. Кузнецов, Л. А. Кузнецова, А. О. Кузнецов, Е. М. Борисова, М. А. Сафонова. Патент 2505304 РФ; МПК51 А61К 35/74, А23С 9/127. Патентообладатель Кузнецов Олег Ювенальевич; заявл. 22.06.2010; опубл. 27.01.2014. Бюл. № 3. 7 с.

Hobbs C. Medicinal Value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A Literature Review // Int. J. Med. Mushr. 2000. Vol. 2, N 4. P. 287–302. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v2.i4.90>

Lelley J. I., Vetter J. Orthomolecular medicine and mushroom consumption: An attractive aspect for promoting production // Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi / Romaine, Keil, Rinker, Royse (eds.). Pennsylvania St. Univ., 2004. P. 637–643.

Sano M., Yoshino K., Matsuzawa T. Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushroom extracts on mouse type IV allergy // Int. J. Med. Mushr. 2002. Vol. 4, N 1. P. 37–41. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v4.i1.40>

Sia G. M., Candlish J. K. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) extract on human neutrophils and the monocytic cell line // Phytotherapy Research. 1999. Vol.13, No. (2). P. 133–137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199903\)13:2<133::AID-PTR398>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199903)13:2<133::AID-PTR398>3.0.CO;2-O)

Stamets P. Potentiation of cell-mediated host defense using fruitbodies and mycelia of medicinal mushrooms // Int. J. Med. Mushr. 2003. Vol. 5, N 2. P. 179–192. <https://doi.org/10.1615/InterJMedMush.v5.i2.70>

Assessment of Biological Effects of Pharmacological Forms of Shiitake (*Lentinus edodes*) on Lactobacilli

M. A. Kirilenko, O. Yu. Kuznetsov

Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russian Federation

Abstract. Due to the unique chemical composition, the consumption of the highest edible shiitake mushroom has a beneficial effect on the state of many systems of the body and helps to significantly improve human health. Various pharmacological forms of the fungus have excellent antimicrobial properties at the same time, without disturbing the life of microorganisms from the normal human microflora. Mushroom juice extract has excellent antimicrobial and antifungal properties, while not disrupting the life of the normal intestinal microflora of humans. Maintaining the quasi-static state of the main groups of representatives of normal microflora (*E. coli*, bifidobacteria and lactobacilli) is a very promising task to ensure the necessary physiological processes of the body. The study used *Lactobacillus acidophilus* from lyophilized preparation "Lactobacterin" and lactobacterial complex autoprobiotics received from specific people. As a growth stimulant of lactobacilli, the juice or powder of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) was used in an amount of 2.5 % of the nutrient medium. To assess the development of populations of cells of lactobacilli we used nephelometric method of the study and the method of direct count of colony forming units (CFU) on plates with agar nutrient dense environment (*Lactobacillus*). As a result of this work, the stimulation of lactobacilli contained in the drug "lactobacilli" was established. The greatest effect was obtained when adding Shiitake mushroom powder to a dense medium—an increase in CFU by 46.2% relative to the control was found. Another drug—juice of Shiitake mushroom promotes active growth of lactobacilli complex autoprobiotics, judging by the increase in optical density 2.5 times as nephelometric valuation method. During the work it was proved a stimulating effect of pharmacological forms of Shiitake on the development of *Lactobacillus*, the probiotic preparation "Lactobacterin", and also because of autoprobiotics people. The results suggest that the addition of shiitake mushroom juice or powder significantly increases the therapeutic effect of any probiotic drug by increasing the viability of lactobacilli. Shiitake mushroom derivatives (*Lentinus edodes*) can be used as natural stimulants for the development of lactobacilli to develop new probiotic drugs to correct intestinal dysbiosis or create functional foods.

Key words: microbiology, *Lactobacillus*, Shiitake mushroom, juice, powder, complex autoprobiotics.

For citation: Kirilenko M.A., Kuznetsov O. Yu. Assessment of Biological Effects of Pharmacological Forms of Shiitake (*Lentinus edodes*) on Lactobacilli. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2019, vol. 28, pp. 56–62. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.28.56> (in Russian)

References

- Kuznetsov O.Yu., Mil'kova E.V., Sosnina A.E., Balantseva E.V. Antimikrobnaya aktivnost' i stabil'nost' soka griba Shiitake (*Lentinus edodes*) pri dlitel'nom khraneni [Antimicrobial activity and stability of Shiitake (*Lentinus edodes*) juice during continuous storage]. *Vestnik Ivanovskoi meditsinskoi akademii* [Bul. Ivanovo Med. Acad.], 2010, vol. 15, no. 3, pp. 19-23.
- Garibova L.B., Zav'yalova L.A., Aleksandrova E.A., Nikitina V.E. Biologiya *Lentinus edodes* [Biology of Shiitake *Lentinus edodes*]. *Mikologiya i fitopatologiya*, 1999, vol. 33, no. 2, pp. 107-110.
- Kuznetsov O.Yu., Sotnikova N.Yu., Martenova A.A., Kulikova E.V. Ingibiruyushchee deistvie soka griba Shiitake na patogennye i uslovno-patogennye mikroorganizmy [Inhibitory effect of Shiitake juice on opportunistic and pathogenic microorganisms]. *Aktualnye problemy zdorov'ya sem'i* [Actual problems of family health]. Ivanovo, 2000, p. 193.

Kirilenko M.A., Kuznetsov O.Yu. Sposob polucheniya preparata eubiotika Laktobakterin [Method for producing of eubiotic prepare Laktobakterin]. Rus. Fed. Pat. 2661737 RF. MPK51 A61K 35/74. Publ. 19.07.2018. *Bul. no. 20, 4 p.*

Yanovoi V.V., Martynov A.S., Razin A.N., Filippova I.F. Primenenie gribov Lentinus edodes (Shiitake) v kompleksnom lechenii zapushchennykh form raka obodochnoi i pryamoi kishki [Use of Shiitake in complex treatment of terminal colorectal cancer]. *Koloproktologiya*, 2006, no. 1 (15), pp. 32-34.

Kuznetsov O.Yu., Kuznetsova L.A., Kuznetsov A.O., Borisova E.M., Safonova M.A. Sposob polucheniya autoprotiotika, sodержashchego zhivye laktobakterii i bifidobakterii [Method for producing of probiotic contained live lactic acid bacteria and bifidobacteria]. Rus. Fed. Pat. 2505304 RF; MPK51 A61K 35/74, A23C 9/127. Publ. 27.01.2014. *Bul. no. 3, 7 p.*

Hobbs C. Medicinal Value of Lentinus edodes (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A Literature Review. *Int. J. Med. Mushr.*, 2000, vol.2, no. 4, pp. 287-302. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v2.i4.90>

Lelley J.I., Vetter J. Orthomolecular medicine and mushroom consumption: An attractive aspect for promoting production. *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Romaine, Keil, Rinker, Roys (Eds.). Pennsylvania St. Univ., 2004, pp. 637-643.

Sano M., Yoshino K., Matsuzawa T. Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushroom extracts on mouse type IV allergy. *Int. J. Med. Mushr.*, 2002, vol. 4, no. 1, pp. 37-41. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v4.i1.40>

Sia G.M., Candlish J.K. Effect of shiitake (Lentinus edodes) extract on human neutrophils and the monocytic cell line. *Phytotherapy Research*, 1999, vol.13, no. (2), pp. 133-137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199903\)13:2<133::AID-PTR398>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199903)13:2<133::AID-PTR398>3.0.CO;2-O)

Stamets P. Potentiation of cell-mediated host defense using fruitbodies and mycelia of medicinal mushrooms. *Int. J. Med. Mushr.*, 2003, vol. 5, no. 2, pp. 179-192. <https://doi.org/10.1615/InterJMedicMush.v5.i2.70>

Кириленко Марина Александровна
старший преподаватель
Ивановская государственная медицинская
академия
Россия, 153012, г. Иваново,
Шереметевский проспект, 8.
e-mail: smarina23@mail.ru

Kirilenko Marina Aleksandrovna
Senior Lecturer
Ivanovo State Medical Academy
8, Sheremetevski Av., Ivanovo, 153012,
Russian Federation
e-mail: smarina23@mail.ru

Кузнецов Олег Ювенальевич
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой
Ивановская государственная медицинская
академия
Россия, 153012, г. Иваново,
Шереметевский проспект, 8.
e-mail: olegkuz58@ya.ru

Kuznetsov Oleg Yuvenal'evich
Doctor of Sciences (Biology), Professor,
Head of Chair
Ivanovo State Medical Academy
8, Sheremetevski Av., Ivanovo,
153012, Russian Federation
e-mail: olegkuz58@ya.ru

Дата поступления: 27.02.2019

Received: February, 27, 2019