

А.Э. ПЫЖ, Э.С. КАШИЦКИЙ

## РОЛЬ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК В РЕГУЛЯЦИИ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА

*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Изучено влияние искусственных пищевых добавок на микрофлору кишечника у разновозрастных крыс. Показано, что глутамат натрия в дозе 41,2 мг/сутки, тартразин в дозе 1,72 мг/сутки и бензоат натрия в дозе 2,56 мг/сутки при раздельном поступлении подавляли бифидобактерии у неполовозрелых крыс в пределах 11,65% – 37,50 % к уровню контроля. У взрослых крыс только глутамат натрия угнетал анаэробов на 18,67% и усиливал рост *E. coli* на 50,23%. Сочетанное поступление в организм неполовозрелых крыс глутамат натрия, тартразина и бензоат натрия вызывает рост *E. coli* от 34,09% до 44,55%, дрожжеподобных грибов в 1,23 раза в сравнении с контролем.

*Ключевые слова:* глутамат натрия, тартразин, бензоат натрия, микрофлора кишечника, бифидобактерии.

**Введение.** Основой жизнедеятельности любого организма является непрерывное поступление питательных веществ извне, обеспечивающих полноценный рост и развитие. Неоспоримым условием обеспечения физиологических процессов в норме выступают рациональное питание, сбалансированность рациона с преобладанием натуральных продуктов, включающих микро- и макроэлементы, незаменимые аминокислоты, биологически активные вещества, витамины. Промышленное производство продовольствия предполагает обилие химических пищевых добавок, призванных создавать утраченные при переработке цвета, ароматы свежих продуктов, вкусовые качества, а также увеличивать срок реализации, объемы продукции и прочее. Все разрешенные пищевые добавки признаются безопасными для здоровья человека, процессы производства продовольствия строго регламентированы, обеспечен надлежащий контроль.

Несмотря на это, вопросы безвредности тех или иных пищевых добавок являются предметом многолетних исследований, а покупатель вправе знать о влиянии на организм любой пищевой добавки, иметь представление какие последствия могут наступить в дальнейшем.

Наиболее известные классы пищевых добавок, способные оказывать влияние на организм при чрезмерном или сочетанном употреблении, – это усилители вкуса и аромата, красители и консерванты.

Например, усилитель вкуса и аромата – глутамат натрия (MSG, E-621) активирует рецепторы L-глутамата на языке, вызывая стойкое ощущение «мясного» вкуса, который необходим для оценки содержания белка в пище. Учитывая, что глутаминовая кислота является главным возбуждающим нейромедиатором нервной системы, полагаться на физиологическую инертность пищевого глутамата не приходится. Имеются сведения о его способности инициировать окислительный стресс в различных тканях, вызывать приступы агрессии, раздражительности, головокружение, головные боли, гепатотоксичность [1, 2]. Глутамат натрия влияет на репродуктивную систему, что проявляется нарушением биосинтеза половых гормонов, возрастанием уровней сывороточных эстрадиола, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) [3,5].

Другой широко применяемый класс пищевых добавок – красители, вносимые в рецептуры для придания необходимого цвета, окрашивания бесцветных продуктов. Здесь примечательны азокрасители – кармуазин (E 122), желтый «солнечный закат» (E110), тартразин (E102), понсо 4R (E124), имеющие одну или несколько азогрупп R–N=N–R, являются производными каменноугольной смолы, продуктами переработки нефти. Азогруппы разрушаются редуктазами кишечных бактерий, в меньшей степени лизосомальной фракцией печени. Обнаружены энтеробактерии (*E. coli*, *P. vulgaris*) и лактобациллы (*L. casei*), разлагающие тартразин с образованием канцерогенных ароматических аминов. Механизм бактериальной деградации азокрасителей доподлинно неизвестен, а специфические виды микроорганизмов кишечника, редуцирующие азогруппу, мало изучены [4].

Пиразолоновый желтый, тартразин (Е 102) используется для окраски желе, мороженого, безалкогольных напитков, кондитерских изделий. Тартразин с бензойной кислотой (Е 210) вызывает синдром повышенной раздражительности у детей, запрещен к применению в ряде стран [6].

Ранее показано спровоцированное пищевыми добавками подавление молочнокислых бактерий, зависимость эффектов от возраста [7]. С этих позиций представляется актуальным проведение углубленных исследований, нацеленных на выяснение влияния пищевых добавок на микрофлору кишечника. Итак, цель работы – установить влияние глутамата Na, бензоата Na и тартразина на кишечную микрофлору, как при раздельном, так и сочетанном поступлении в организм разновозрастных крыс.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись 100 белых самцов крыс линии Wistar, разделенных на две группы: неполовозрелые возрастом 1,5 месяца весом  $120,8 \pm 9,8$  г «молодые» и половозрелые особи 4,5 месяца весом  $276,7 \pm 3,9$  г «возрастные». По условию опыта каждая группа включала пять серий ( $n=10$  в каждой). Первая серия – контрольные крысы, стандартный рацион вивария; вторая серия на протяжении 30 суток получали водный раствор глутамата Na в дозе 41,2 мг/сутки; третья серия – бензоат Na в дозе 1,72 мг/сутки; четвертая серия – тартразин в дозе 2,56 мг/сутки. Крысы пятой серии потребляли раствор трех добавок в вышеуказанных дозах. Все эксперименты проведены в соответствии с правилами гуманного отношения к лабораторным животным, соблюдением биоэтических норм и требований Международного комитета по науке [13]. Расчет доз вводимых веществ осуществляли исходя из величин предельно допустимых суточных концентраций для каждой пищевой добавки в соответствии с указаниями [12].

В экспериментах использовали глутамат натрия (Е 621, «Sigma Chemical», США), бензоат натрия (Е 211, «Пять океанов», Беларусь), тартразин (Е 102, «Roha Dyechem», Индия), агар Эндо, энтерококкагар, стафилококкагар, агар Сабуро 4-% декстрозный, бифидум-среду (ФБУН ГНЦ Оболенск, РФ).

**Микробиологический анализ.** Образцы фекалий массой 0,2 г суспендировали в 10 мл 0,85% раствора NaCl до получения суспензии в разведении  $10^{-2}$ . Посев вели на микробиологических средах с количественным определением в образцах колониеобразующих единиц (КОЕ) бифидобактерий, эшерихий, стрептококков, стафилококков, грибов [14] в соответствии рекомендациям [8]. Концентрацию микроорганизмов в образцах представляли в Log КОЕ/г.

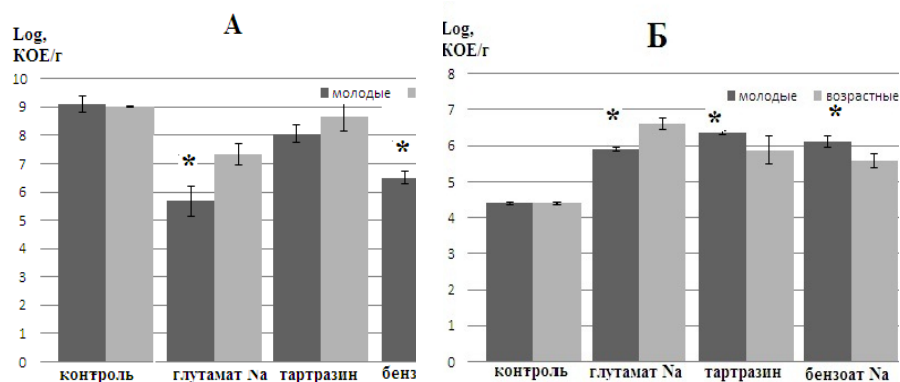
Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики программы Statistica 6.0. Нормальность распределения показателей проверяли тестом Шапиро–Уилка. Для межгруппового сравнения использовали тест Манна–Уитни. Данные представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ( $M \pm m$ ). Критический уровень значимости ( $p$ ) при проверке гипотез принимали равным 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что избранные вещества оказывают влияние на кишечные микроорганизмы. Все пищевые добавки подавляют в кишечнике неполовозрелых крыс бифидобактерии: глутамат Na – на 37,5% титр  $5,68 \pm 0,53$  Log КОЕ/г; тартразин снижает численность на 11,65% – до  $8,04 \pm 0,31$  Log КОЕ/г, консервант на 28,46 % – до  $6,51 \pm 0,23$  Log КОЕ/г, контроль –  $9,1 \pm 0,28$  Log КОЕ/г ( $p < 0,05$ ) (рис.1А «молодые»). Все изучаемые субстанции не затрагивали колониеобразующую способность молочнокислых энтерококков, стафилококков и грибов.

У взрослых крыс только глутамат угнетал бифидобактерии, поскольку титр снижался на 18,67% ( $p < 0,05$ ) до  $7,32 \pm 0,37$  Log КОЕ/г, контроль –  $9,0 \pm 0,02$  Log КОЕ/г (рис. 1А «возрастные»).

Показатели по стафилококкам, дрожжеподобным грибам, энтерококкам статистически значимых изменений не претерпевали.

Полученные данные не противоречат сведениям других источников. В работе [9] оценивали влияние пищевых красителей, в частности, тартразина на микрофлору ротовой полости. Выявлено угнетение микроорганизмов под влиянием пищевых красителей, что может приводить к развитию дисбактериоза полости рта.



**Рис. 1.** Влияние пищевых добавок на содержание бифидобактерий (А) и кишечной палочки (Б) у крыс в зависимости от их возраста. \* – достоверные различия с контролем,  $p < 0,05$

Культивирование бифидобактерий на средах с глутаматом натрия показало подавление роста и изменение морфологии клеток [10]. Последнее обстоятельство свидетельствует о вовлечении глутамата в процессы формирования клеточной стенки бактерий.

Обнаружена интенсификация роста кишечной палочки: глутамат Na вызвал прирост пула *E.coli* на 34,09% –  $5,9 \pm 0,06$  Log КОЕ/г; тартразин – на 44,55% титр  $6,36 \pm 0,07$  Log КОЕ/г, бензоат Na – на 39,09% титр  $6,12 \pm 0,16$  Log КОЕ/г), контроль –  $4,4 \pm 0,04$  Log КОЕ/г ( $p < 0,05$ ) (рис. 1Б «молодые»).

У взрослых крыс глутамат Na вызывал чрезмерный рост эшерихий на 50,23% –  $6,61 \pm 0,16$  Log КОЕ/г. Пищевой краситель тартразин, равно как и глутамат Na, оказывал стимулирующее действие на энтеробактерии, поскольку титр кишечных палочек увеличивается с  $4,4 \pm 0,03$  Log КОЕ/г до  $5,88 \pm 0,39$  Log КОЕ/г, что на 33,64% превышает контроль ( $p < 0,05$ ) (рис. 1Б «возрастные»).

Наблюдаемый эффект стимуляции энтеробактерий пищевыми добавками, не являющимися пребиотиками, весьма неоднозначен, не раскрыт механизм действия консерванта. По-видимому, размножение эшерихий может быть следствием угнетения анаэробной флоры, что способствует наращиванию численности аэробов в кишечнике.

На наш взгляд, чрезмерный рост эшерихий, инициируемый пищевыми добавками, можно расценивать как крайне нежелательный процесс в кишечнике. По сведениям источников литературы увеличение в кишечнике пула эшерихий, появление лактозонегативных кишечных палочек и других энтеробактерий со сниженной ферментативной активностью в отношении углеводов и многоатомных спиртов при резком уменьшении бифидобактерий, а особенно лактобактерий, ведет к защелачиванию кишечного содержимого. При щелочной реакции среды нарушается функциональная активность пептидаз, дисахаридаз и ряда других пищеварительных ферментов, что усугубляет нарушение обмена веществ [11].

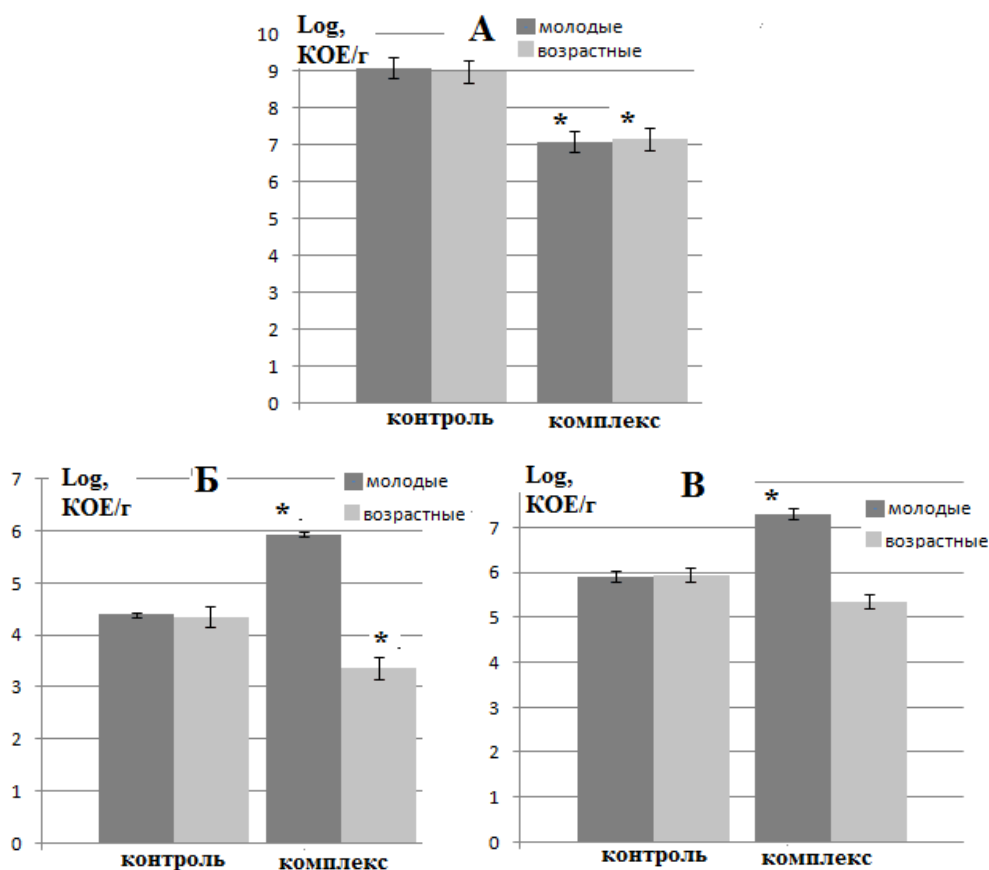
Учитывая, что пищевые добавки, как правило, входят в рецептуры продуктов комплексно, алиментарным путем вовлекаются в пищеварительные процессы, целесообразна оценка их сочетанного влияния на кишечную микрофлору. Выявлено, что одновременное поступление в пищеварительный тракт крыс усилителя вкуса, красителя и консерванта как и при раздельном приеме, негативно сказывается на кишечных микроорганизмах. Титр бифидобактерий у неполовозрелых крыс не превышает  $7,09 \pm 0,27$  Log КОЕ/г, что достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже контроля  $9,1 \pm 0,08$  Log КОЕ/г на 22,09% (рис.2А «молодые»).

Выявлен ожидаемый рост эшерихий в титре  $5,94 \pm 0,17$  Log КОЕ/г, что превосходит контроль  $4,4 \pm 0,04$  Log КОЕ/г в 1,35 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 2Б «молодые»). Кроме того, отмечена избыточность кандид: титр  $7,31 \pm 0,67$  Log КОЕ/г опережает контроль  $5,93 \pm 0,12$  Log КОЕ/г в 1,23 раза (рис. 2В «молодые»). Содержание на рационе с пищевыми добавками половозрелых крыс также отрицательно сказывалось на микроорганизмах. Бифидобактерии достоверно угнетались на 20,45% до  $7,16 \pm 0,34$  Log КОЕ/г ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем  $9,0 \pm 0,02$  Log КОЕ/г (рис.2А «возрастные»).

У взрослых крыс на рационе с комплексной добавкой подавлялись эшерихии на 23,4% ( $p < 0,05$ ), титр  $3,37 \pm 0,07$  Log КОЕ/г, контроль –  $4,4 \pm 0,03$  Log КОЕ/г (рис. 2Б «возрастные»).

Причины противоположных эффектов (стимуляция роста, подавления), оказываемых пищевыми добавками, в отношении одного вида бактерий неизвестны. Мы предполагаем, что разная чувствительность эшерихий к эффекторам может быть обусловлена как природой самих веществ, так и особенностями пищеварительных процессов в зависимости от возраста макроорганизма. Для

выяснения этих обстоятельств целесообразна оценка влияния пищевых добавок на колониеобразующую способность штаммов *E.coli*, выделенных от разновозрастных крыс.



**Рис. 2.** Комплексное влияние пищевых добавок на отдельных представителей микрофлоры кишечника: бифидобактерии (А), кишечная палочка (Б) и дрожжеподобные грибы (В) у крыс в зависимости от их возраста. \* – достоверные различия с контролем,  $p < 0,05$

Итак, усилитель вкуса и аромата, краситель и консервант в предельно допустимых суточных концентрациях оказывают негативное влияние на ряд микроорганизмов кишечника. Выявлена зависимость характера воздействия пищевых добавок на микрофлору от класса вещества и возраста животных.

Напомним, что на рационе с глутаматом Na у неполовозрелых крыс на 37,5% подавлялись бифидобактерии, бензоат натрия задерживал рост анаэробов на 28,46%. Тогда как, у «возрастных» крыс только усилитель вкуса достоверно угнетал бифидобактерии на 18,67%, тартразин и бензоат натрия не влияли.

Снижение физиологических процессов у бифидобактерий наблюдалось на фоне прироста кишечной палочки, наращивание бактериальных клеток регистрировали вне зависимости от возраста животных.

**Заключение.** Как при раздельном, так и сочетанном поступлении с пищей глутамата, бензоата натрия и тартразина наблюдаются количественные изменения пробиотических микроорганизмов. По общему правилу, наиболее выраженное действие на микрофлору кишечника оказывают пищевые добавки, поступающие в желудочно-кишечный тракт неполовозрелых крыс. Выявлена также зависимость характера воздействия от природы вещества.

Комплексное воздействие усилителя вкуса, красителя и консерванта на микрофлору кишечника выражается угнетением бифидобактерий, кишечных палочек на фоне чрезмерной колонизации дрожжеподобными грибами, что в совокупности отрицательно сказывается на структуре микробиоценоза биотопа, создает предпосылки к возникновению микрoэкологических нарушений. Эти обстоятельства диктуют целесообразность оценки влияния данных пищевых добавок на микрофлору кишечника, как неотъемлемую часть пищеварительной системы, и на культурах микроорганизмов *in vitro*.

Экспериментальные результаты, полученные в настоящем исследовании, освещают некоторые аспекты влияния качества пищи на функционирование желудочно-кишечного тракта, затрагивают вопросы регуляции метаболизма микроорганизмов, и могут быть востребованы исследователями в областях экспериментальной микробиологии, биохимии и физиологии питания.

#### Литература:

- [1]. Kawakita T. L-monosodium glutamate (MSG) // In.: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4<sup>th</sup> ed. Vol.2. Inter- Science. Wiley. 1992. P.571.
- [2]. Vitor-de-Lima S.M. et al. Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats // Nutritional Neuroscience. 2017. Vol.10. P. 1–9.
- [3]. Mondal M. et al. Monosodium glutamate suppresses the female reproductive function by impairing the functions of ovary and uterus in rat // Environmental Toxicology. 2018. Vol. 33. P. 198–208.
- [4]. Shrikant B.S., Girish P., Harshal P. Degradation of two food colorants tartrazine and carmoizine by intestinal microorganism // Int. J. Pharmacol. Bio. Sci. 2010. Vol. 4. P. 23–28.
- [5]. Axon A. et al. Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity // Toxicology. 2012. Vol. 298. P.40–51.
- [6]. Amchova P., Kotolova H., Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants // Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2015. Vol. 73. P. 914–22.
- [7]. Лукашенко Т.М. // Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций: Тез. XIV Съезда Белорусского общества физиологов. 2017. С. 67.
- [8]. МУ 1.2.2874-11 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза». М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010
- [9]. Коваленко Н.П., Полянская В.П. Пищевые красители как фактор влияния на микрофлору полости рта человека // Сборник Мат. научно-практ. конф. Полтава: ПГАА. 2014. 276с.
- [10]. Свидерская Д.С., Клочкова К.С. Влияние химических пищевых добавок на микрофлору кишечника человека // Вестник Иннов. Евраз. унив. 2014. №2. С.106–110.
- [11]. Данилевская Н.В., Субботин В.В. Лекарственные дисбактериозы: причины и последствия // Ветеринар. 2003, №1.
- [12]. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Вг. изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.
- [13]. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986.
- [14]. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Микрофлора человека и животных и ее функции. Т. 1. М.: Грантъ, 1998. с.288.

Поступила в редакцию: 02.05.2018 г.

A.E. PYZH, E.S. KASHITSKY

### THE ROLE OF FOOD ADDITIVES IN THE REGULATION OF MICROFLORA OF THE INTESTINE

*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

The effect of artificial food additives was studied on the intestinal microflora in rats of different age. It was shown that sodium glutamate at a dose of 41,2 mg / day, tartrazine at a dose of 1,72 mg / day, and sodium benzoate at a dose of 2,56 mg / day with separate intake suppressed bifidobacteria in immature rats in the range 11,65% –37, 5% to the level of control. Only glutamate sodium inhibited anaerobes by 18,67% and increased the growth of *E. coli* by 50,23% in adult rats. When combined intake of immature rats in the body of glutamate sodium, tartrazine and sodium benzoate cause the growth of *E. coli* from 34,09% to 44,55%, yeast-like fungi to 1.23 times in comparison with the control.

*Key words:* sodium glutamate, tartrazine, sodium benzoate, intestinal microflora, bifidobacteria.