

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 664.29-027.242:604.4:579.87

БІФІДОГЕННА ДІЯ ПРОДУКТІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ КОНВЕРСІЇ ПЕКТИНУ

Л. Пилипенко, І. Пилипенко, М. Ліганенко*

*Одеська національна академія харчових технологій
вул. Канатна, 112, Одеса 65039, Україна
e-mail: margie_svet@mail.ru*

Отримані кінетичні залежності накопичення *B. bifidum* від складу середовища культивування, тривалості процесу ферментації, джерел карбону. Визначено склад побічних продуктів біфідобродіння. Встановлена біфідогенна дія олігосахаридів, отриманих шляхом біотехнологічної конверсії пектину.

Ключові слова: пектин, біотехнологічна конверсія, пребіотики, олігосахариди, біфідобактерії.

Для профілактики виникнення дисбактеріозу, збільшення опору організму до несприятливих факторів зовнішнього середовища створено дієтичні добавки, продукти функціонального харчування, пробіотики, пребіотики, синбіотики, бактеріофаги і біотерапевтичні агенти, асортимент молочнокислих продуктів. Однак мікроорганізми, що містяться в цих продуктах, як правило, є транзитними і не колонізують кишечник [1, 12].

Найважливішими симбіонтами шлунково-кишкового тракту людини є біфідобактерії. За сучасними даними, рід *Bifidobacterium* включає 32 види [2]. Біфідобактерії мають морфокінетичні властивості, продукують біологічно активні сполуки, зокрема, вітаміни групи В, виконують імуногенну й антимурагенну функції, а також беруть участь у детоксикації екзо- та ендогенних токсичних агентів [9–10, 15, 23, 19, 20, 25]. Антагоністична активність біфідобактерій пов'язана з продукцією органічних кислот (ацетату і лактату), бактерицидна – з широким спектром антимікробної дії (інгібування росту кишкових паличок, клостридій, сальмонел, шигел, лістерій, вібріонів та ін.) і блокуванням рецепторів на слизовій кишечника, що запобігає фіксації на ній потенційно патогенних мікроорганізмів. Усі ці позитивні ефекти дали змогу розглядати біфідобактерії як одну з основних складових функціонального харчування [15, 23, 25].

Поліпшення сучасного стану здоров'я населення України можливе шляхом удосконалення функціонального харчування за рахунок зменшення дефіциту біфідофлори та визначення оптимальних умов для її розвитку і розмноження.

Сьогодні швидко розвивається промислове виробництво олігосахаридів, але досі не налагоджено виробництво пектинових олігосахаридів. Наявні технології не знайшли промислового впровадження, адже мають низку недоліків. Поряд із цим відчувається недостатність експериментальних даних щодо *in vitro* досліджень пектинових олігосахаридів [1, 3, 24], а відомості про *in vivo* дослідження майже відсутні. Таким чином, аналіз літературних даних показує, що необхідно поглибити дослідження впливу пектинових олігосахаридів на прояв біологічної активності корисних мікроорганізмів [17–18].

Саме з цих позицій визначали вплив продуктів біотехнологічної конверсії пектину на кількісний і якісний склад облігатних представників біоценозу людини.

Матеріали та методи

Раніше в лабораторних умовах нами було встановлено оптимальні умови та параметри проведення біокаталізу рослинних полісахаридів яблучних вичавок і розроблено технологію отримання низькомолекулярних олігосахаридів із пектиновмісної сировини. У результаті регульованого біокаталізу отримано речовини з молекулярною масою 3,5 кДа [7].

Майже третина видів роду *Bifidobacterium* є мешканцями шлунково-кишкового тракту людини [14]. Однак у процесі життєдіяльності макроорганізму відбуваються суттєві зміни популяцій. Тому, на нашу думку, цікавим було би поглибити дослідження щодо впливу пектинових олігосахаридів на ріст біомаси *B. bifidum* як одного з важливих представників популяцій біфідобактерій людини.

Для експериментів було використано фармацевтичний препарат «*Bifidobacterium siccum*» (фірма «Біолік», Україна). Досліджуваний штам *B. bifidum 1* являє собою грампозитивні поліморфні палички з біфуркацією або потовщенням на 1–2-х кінцях, схильні до утворення скупчень, розміром $(0,5-1,3) \times (1,5-8)$ мкм. Форма клітин варіює від прямих паличок у вигляді ком із булавовидними потовщеннями на кінці, іноді розгалужені (В-, Т-форми), зернисті; в чистих культурах вони більш поліморфні. Іноді трапляються роздуті клітини кокоподібної форми. *B. bifidum* активно розмножується на середовищах різного складу. Це облигатний анаероб. *B. bifidum* не синтезує каталазу, ферментує лактозу з утворенням оцтової та L-молочної кислоти без утворення газу, закислює середовище вирощування до рН 3,9–4,1. Манозу, целобіозу, ксилозу, маніт, сорбіт, саліцин, інулін, арабінозу не ферментує.

У світі найбільш відомими середовищами для культивування біфідобактерій є триптиказо-фітон-дріжджове середовище (TPY), середовище MRS, середовище Блаурока, печінково-кров'яний агар (BL) [11]. Нами запропоновано дослідити ріст біфідобактерій на менш популярному тіогліколевому середовищі [11]. Також у дослідженнях використовували кукурудзяно-лактозне середовище і молоко ТМ «Селянське», рН 6,77, кислотність 20°Т.

Для стимулювання росту біфідобактерій використовували розчин лактулози концентрацією 2% (виробник Duphalac «Solvay Pharmaceuticals B.V.», The Netherlands). Розчин пектину після біоконверсії, який містить олігосахариди, додавали у кількості 1%. Оскільки у харчовій промисловості для приготування продуктів із лактулозою як вже відомого пребіотика використовують концентрацію даної речовини 2% [11, 22, 26], досліджували вплив нижчої концентрації пребіотика на ріст біфідобактерій. Необхідне значення рН 7,2–7,4 розчину створювали за допомогою 1М NaOH.

На першій стадії досліджень було вивчено вплив додавання розчину пектинових олігосахаридів на ріст біфідобактерій, на другій – додавання отриманого пребіотика до молока з утворенням нового синбіотичного продукту [4–6].

Оптимальна температура культивування біфідобактерій на першій стадії досліджень становила 37°С (тривалість 24 год), на другій – також 37°С, а тривалість визначали експериментально за кількістю накопичених клітин шляхом підрахунку колоній, що виростили з десятичних розведень.

Для засіву робили суміш культури та розчину пектинових олігосахаридів: у розчин вносили суспензію клітин *B. bifidum* у концентрації 10 клітин в 1 см³ за стандартом мутності Мак-Фарланда й обережно перемішували. Після культивування облік накопичених клітин проводили на тіогліколевому середовищі. Для контролю вирощували досліджуваний штам *B. bifidum* на тіогліколевому середовищі без додавання олігосахаридів.

Результати і їхнє обговорення

Досліджуваний штам на середовищах з додаванням пектинових олігосахаридів проявляв активний ріст: навіть у 1:10¹² розведенні концентрація бактеріальних клітин становив

ла 5 КУО в 1 см³ середовища. Це є, на наш погляд, дуже важливим, тому що, незважаючи на більш складну хімічну будову пектинових олігосахаридів, досліджуваний штам *B. bifidum* здатен активно засвоювати ці низькомолекулярні сполуки.

Біфідобактерії – хемоорганогетеротрофи. Показано [11], що ця група бактерій активно зброджує вуглеводи за фруктозо-6-фосфатним шунтом. У результаті метаболізму олігосахаридів біфідобактеріями утворюються в основному оцтова і молочна кислоти (у молярному співвідношенні 3:2), а також спирти. Масляну і пропіонову кислоти *B. bifidum* не утворюють.

Нами було встановлено хімічний склад побічних продуктів після зброджування пектинових олігосахаридів *B. bifidum* методом високоефективної газової хроматографії на хроматографі HP 6850 series II.

Таблиця 1

Хімічний склад побічних продуктів біфідобродіння пектинових олігосахаридів

Назва хімічної речовини	Кількість, мг/100 см ³
Альдегіди	16,440±0,005
Складні ефіри	128,260±0,004
в тому числі енантові ефіри	8,043±0,002
Метанол	61,670±0,008
Вищі спирти	273,660±0,007

У результаті біфідобродіння утворюється комплекс метаболічних продуктів, в тому числі органічні кислоти, які знижують значення рН культуральної рідини до 4,0–4,2, що сприяє запобіганню розвитку небажаної патогенної мікробіоти. Отримані результати дали змогу продовжити дослідження пектинових олігосахаридів на прояв їх біфідогенного ефекту.

У сучасних наукових дослідженнях збільшена увага до розробки синбіотичних препаратів, які являють собою суміш пробіотиків і пребіотиків. Вони сприяють прояву імуногенних властивостей корисних мікроорганізмів за рахунок збільшення продукування ними бактеріальних метаболітів з імуномодуючими властивостями (пептидоглікани, ліпополісахариди, тейхоеві кислоти), а також стимулювання нормальної мікробіоти, яка посилює клітинний імунітет [11, 13, 16]. Прикладом синбіотичного продукту може бути молоко, збагачене пребіотиками (пектиновими олігосахаридами, лактулозою) і мікроорганізмами.

Друга стадія досліджень включала додавання пектинових олігосахаридів як пребіотика до молока, в яке вносили суспензію клітин *B. bifidum*. Контролем було молоко з додаванням лактулози і культури *B. bifidum* (рис. 1). Умови сквашування: температура 37°C, рН 6,8, кислотність молока 20°Т, суспензія клітин *B. bifidum* у кількості 5%, пектинові олігосахариди – 1%, лактулоза – 2%.

Результати експерименту вказують на те, що пектинові олігосахариди значною мірою впливають на процес сквашування. Порівняно з контролем згусток утворювався дещо повільніше – на дванадцятій годині сквашування (в контролі – на десятій). Під час ферментації також спостерігали за зміною концентрації живих клітин *B. bifidum*, яка відображена на рис. 2.

Встановлено, що накопичення біомаси *B. bifidum* відбувається поступово. При цьому лактулоза засвоюється біфідобактеріями дещо швидше, а максимальне накопичення біомаси на середовищі з додаванням пектинових олігосахаридів відзначено лише через 24 год при тому, що їх було внесено вдвічі менше. Отже, пектинові олігосахариди будуть довше зберігатись у кишечнику і тим самим надаватимуть біфідобактеріям переваги в конкуренції за джерела харчування. Лаг-фаза, під час якої клітини адаптуються до нових умов

культивування, закінчується приблизно через 6 год для зразків із лактулозою і через 10 год для пектинових олігосахаридів. Інтенсивний ріст (лог-фаза) триває до 18 год для зразків із лактулозою і до 22 год із пектиновими олігосахаридами. На цей час концентрація бактеріальних клітин у зразках із лактулозою становила 8×10^9 КУО в 1 см^3 середовища, для пектинових олігосахаридів – 2×10^{10} КУО в 1 см^3 середовища.

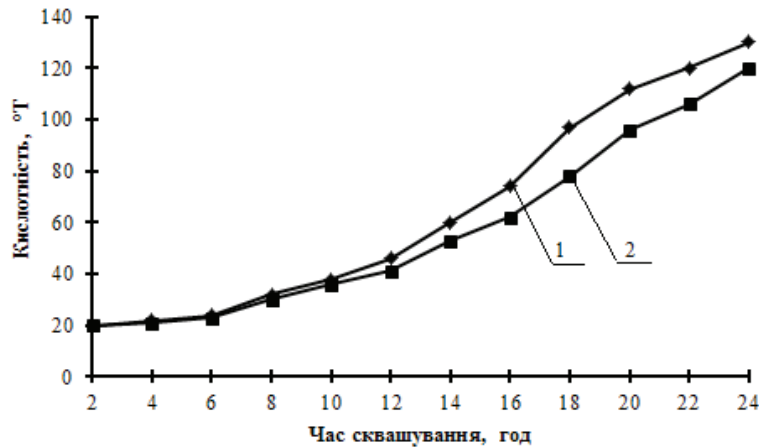


Рис. 1. Залежність титрованої кислотності від тривалості сквашування: 1 – лактулоза; 2 – пектинові олігосахариди.

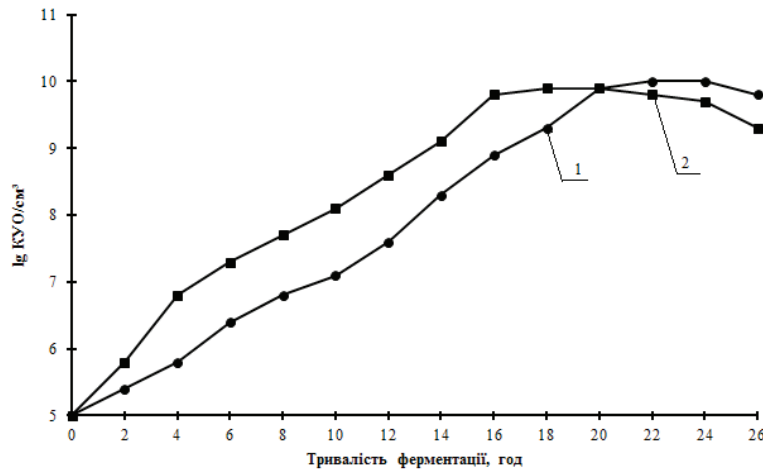


Рис. 2. Кінетика накопичення біомаси *B. bifidum* в молоці з додаванням пектинових олігосахаридів (1) і лактулози (2).

До сьогодні вважалося, що *B. bifidum* ферментує пектинові речовини до олігосахаридів, але не ферментує пектинові олігосахариди до мономерних форм [21]. Проведені нами дослідження встановили, що пектинові олігосахариди, отримані за технологією біокаталізу, добре ферментуються біфідобактеріями. Цими дослідженнями було підтверджено, що на швидкість росту біфідобактерій істотно впливає природа пребіотики.

У подальших дослідженнях ми зупинилися на підборі оптимального поживного середовища для вирощування *B. bifidum*, тому що саме повноцінне поживне середовище забезпечує успіх у культивуванні мікроорганізмів.

Для розробки повноцінного поживного середовища для вирощування *B. bifidum* обрала кукурудзяно-лактозне поживне середовище як найдешевше серед усіх на українському ринку. Встановлення оптимальної концентрації пектинових олігосахаридів як джерела карбону в поживному середовищі для вирощування *B. bifidum* проводили в декілька етапів. На першому етапі готували стандартне кукурудзяно-лактозне середовище № 1 за методикою [8], що рекомендує на 1 дм³ середовища вносити 10,0 г лактози. Далі готували середовища № 2, № 3, № 4, замінюючи лактозу на такі концентрації розчинів пектинових олігосахаридів: середовище № 2 – 0,5%; № 3 – 1%; № 4 – 2%.

Аптечний препарат біфідобактерій активізували за температури 37°C протягом 24 год на кукурудзяно-лактозному середовищі. Потім добову суспензію вносили в підготовлені для культивування поживні середовища № 1–4 з розрахунку одна доза на 1 дм³ середовища. Вирощування мікроорганізмів проводили за названих вище умов. Напіврідке середовище зі вмістом агар-агару 1% забезпечувало необхідні анаеробні умови. Підрахунок результатів проводили за [8] висіванням із десятичних розведень у тіогліколеве середовище. Вони підтвердили, що обраний штам *B. bifidum* здатний до росту на всіх середовищах. Проте вміст того чи іншого джерела карбону впливає на інтенсивність росту біфідобактерій (табл. 2).

Таблиця 2

Нагромадження біомаси *B. bifidum* залежно від джерела карбону, КУО в 1 см³ середовища

Тривалість культивування, год	Джерело карбону, %			
	лактоза	пектинові олігосахариди		
		1,0	0,5	1,0
6	2·10 ⁸	7·10 ⁶	4·10 ⁷	8·10 ⁷
12	3·10 ⁹	1·10 ⁷	6·10 ⁸	2·10 ⁹
24	2·10 ¹⁰	3·10 ⁸	6·10 ¹⁰	4·10 ¹⁰

Наведені матеріали демонструють певне зниження інтенсивності росту біфідобактерій на експериментальному субстраті під час лог-фази. Але після досягнення стаціонарної фази рівень накопиченої з пектиновими олігосахаридами біомаси стає однаковим і навіть перевищує контрольні значення.

Результати досліджень, наведені в табл. 2, свідчать також про те, що збільшення концентрації пектинових олігосахаридів не веде до значного приросту біомаси клітин. Найвищі значення одержані при внесенні до середовища 1% досліджених речовин. Це робить недоцільним збільшення їх концентрації в культуральному середовищі.

Як відомо, біфідобактерії мають здатність до поліморфізму, що залежить від умов вирощування культури. Так, за несприятливих умов *B. bifidum* здатен утворювати набряклі інволюційні, кулясті форми. На середовищах № 2 і № 4 клітини *B. bifidum* мали форму паличок, з'єднаних у довгі й тонкі ланцюжки, які не є типовими для *B. bifidum*. Найбільш інтенсивний розвиток типових форм відзначено на дослідному середовищі № 3.

Отже, пектинові олігосахариди позитивно впливають на ріст і розвиток біомаси *B. bifidum*, так само, як і вже відомі пребіотики лактулоза і лактоза. Тому вони є перспективним об'єктом для дослідження можливості їх використання в біотехнологічних процесах, пов'язаних із вирощуванням біфідобактерій, зокрема *B. bifidum*, а також можуть бути рекомендовані для розробки лікувально-профілактичних харчових продуктів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутова С. Н., Солдатова С. Ю. Новая технология получения олигосахаридов пектина с повышенной биологической активностью // МГУПП, Вестн. Рос. академии естеств. наук. 2011. № 2. С. 32–34.

2. *Жиленкова О. Г.* Селекция производственно перспективных штаммов бифидобактерий, выделенных от детей: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06. М., 2011. 154 с.
3. *Лазарева Е. Б., Меньшиков Д. Д.* Опыт и перспективы использования пектинов в лечебной практике // Антибиотики и химиотерапия. 1999. № 2. С. 37–40.
4. *Ліганенко М. Г.* Пребиотический эффект галактуроновых олигосахаридов // Розвиток наукових досліджень 2012: Матеріали 8-ї міжнар. наук.-практ. конф. Полтава, 2012. Т. 5. С. 11–13.
5. *Ліганенко М. Г.* Біфідогенний ефект галактуронових олигосахаридів // Зб. наук. праць молодих учених, аспірантів та студентів. Одеса, 2012. Т. 2. С. 92–93.
6. *Лисогор Т. А., Ліганенко М. Г.* Волокноподібні неперетравні олигосахариди – перспективний клас пребіотиків // Зб. наук. праць ХДУХТ. Харків. 2012. Вип. 2 (16). С. 341–347.
7. *Малькова М. Г.* Технологія виробництва галактуронових олигосахаридів із пектиновмісної сировини // Харчова наука і технологія. Одеса: ОНАХТ. 2010. № 1 (10). С. 58–61.
8. Методичні вказівки 10.10.2.2. Визначення кількості бифидобактерій у кисломолочних продуктах. 2005. 119 с.
9. *Новик Г. И., Астапович Н. И., Кадникова Н. Г.* Сохранение жизнеспособности и физиологических свойств бифидобактерий при криоконсервации и лиофилизации // Микробиология. 1998. Т. 67. № 5. С. 637–642.
10. *Новик Г. И.* Исследование структурно-функциональной организации бифидобактерий // Микробиология. 1998. Т. 67. № 3. С. 376–383.
11. *Полтавська О. А.* Біологічні властивості бифидобактерій, ізольованих з різних природних джерел: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07. К., 2006. 133 с.
12. *Спасов А. А., Ивахненко И. В.* Эубиотики. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://proctology.narod.ru/Eubiotiki.pdf>.
13. *Степаненко П. П.* Микробиология молока и молочных продуктов: учебн. пособие. М.: Лира, 2002. 413 с.
14. *Холт Д., Круг Н., Снит П.* Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. 800 с.
15. *Biavati B., Vescovo M., Torriani S. et al.* Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications // Am. Microbiol. 2000. Vol. 50. P. 117–131.
16. FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2001.
17. *Fanaro S, Jelinek J, Stahl B. et al.* Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2005. Vol. 41. N 2. P. 186–190.
18. *Gibson G. R, Roberfroid M. B.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // J. Nutr. 1995. Vol. 125. N 6. P. 1401–1412.
19. *Ishibashi N., Yaeshima T., Hayasawa H.* Bifidobacteria: their significance in human intestinal health // Mal J. Nutr. 1997. Vol. 3. P. 149–159.
20. *Mitsuoka T.* Bifidobacteria and their role in human health // J. Indust. Microbiol. 1990. Vol. 6. P. 263–268.
21. *Olano-Martin E., Gibson G. R., Rastall R. A.* Comparison of the in vitro bifidogenetic properties of pectins and pectic-oligosaccharides // J. Appl. Microbiol. 2002. Vol. 93. P. 505–511.
22. *Reid G.* Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics // FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. P. 1–34.

23. Reid G., Jass J., Sebalski M. T. Potential uses of probiotics in clinical practice // Clin. Microbiol. Rev. 2003. Vol. 16. N 4. P. 658–672.
24. Roberfroid M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? // Am. J. Clin. Nutr. 2000. Vol. 71. N 6. P. 1682–1687.
25. Simone C. D., Ciardi A., Grassi A. et al. Effect of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes // Immunopharmacol. 1992. Vol. 14. P. 333–340.
26. Yoshita M., Fujita K., Sakata H. et al. Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in Infants and children // Bifidobacteria Microflora. 1991. Vol. 10. P. 11–27.

Стаття: надійшла до редакції 15.07.13

доопрацьована 30.01.14

прийнята до друку 14.03.14

BIFIDOGENIC EFFECT OF PECTIN BIOTECHNOLOGICAL CONVERSION PRODUCTS

L. Pylypenko, I. Pylypenko, M. Liganenko

*Odessa National Academy of Food Technologies
112, Kanatna St., Odessa 65039, Ukraine
e-mail: margie_svet@mail.ru*

The kinetic data of *B. bifidum* growth depending on the composition of culture medium, duration of the fermentation process, carbon sources were obtained. The composition of the fermented byproducts was also determined. It was established bifidogenic effect of oligosaccharides obtained by the biotechnological conversion of pectin.

Keywords: pectin, biotechnological conversion, prebiotics, oligosaccharides, bifidobacteria.

БИФИДОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КОНВЕРСИИ ПЕКТИНА

Л. Пилипенко, И. Пилипенко, М. Лиганенко

*Одесская национальная академия пищевых технологий
ул. Канатная, 112, Одесса 65039, Украина
e-mail: margie_svet@mail.ru*

Получены кинетические зависимости накопления *B. bifidum* от состава среды культивирования, продолжительности процесса ферментации, источников углерода. Определен состав побочных продуктов бифидоброжения. Установлено бифидогенное действие олигосахаридов, полученных путем биотехнологической конверсии пектина.

Ключевые слова: пектин, биотехнологическая конверсия, пребиотики, олигосахариды, бифидобактерии.