

Т.А. Лисогор, канд. техн. наук, доц. (ОНАХТ, Одеса)

М.Г. Ліганенко, асп. (ОНАХТ, Одеса)

ВОЛОКНОПОДІБНІ НЕПЕРЕТРАВНІ ОЛІГОСАХАРИДИ – ПЕРСПЕКТИВНИЙ КЛАС ПРЕБІОТИКІВ

*Підтверджено біфідогенний ефект галактуронових олігосахаридів. Проведені дослідження дають змогу зробити висновок, що галактуронові олігосахариди в концентрації 1% позитивно впливають на ріст біомаси *Bifidobacterium siccum*.*

*Подтвержден бифидогенный эффект галактуроновых олигосахаридов. Проведенные исследования дают возможность сделать вывод о том, что галактуроновые олигосахариды в концентрации 1% положительно влияют на рост биомассы *Bifidobacterium siccum*.*

*This article focuses on the confirmation bifidogenic effect of galacturonic oligosaccharides. The studies make it possible to conclude that the galacturonic oligosaccharides in a concentration of 1% have a positive effect on the growth of biomass *Bifidobacterium siccum*.*

Постановка проблеми у загальному вигляді. Сучасні методи лікування або профілактики шлунково-кишкових захворювань базуються на застосуванні олігосахаридів. Волокноподібні неперетравні олігосахариди (ВНО) – природні компоненти багатьох харчових продуктів. Це клас вуглеводів зі ступенем полімеризації 2-10, які не гідролізуються і не всмоктуються в тонкому кишечнику внаслідок відсутності в організмі людини специфічних ферментів (гідролаз). ВНО досягають товстої кишки в незміненому вигляді, де гідролізуються до CO₂ та органічних кислот. Зниження рН середовища кишечника, що виникає при цьому, перешкоджає проліферації патогенних мікроорганізмів, які не мають відповідних ферментів для розщеплення олігосахаридів [1; 2]. Тому головним завданням ВНО є створення необхідного біологічного середовища, яке сприяє адгезії та колонізації на епітелії кишки нормальної мікрофлори і одночасно утворює несприятливі умови для життєдіяльності патогенних мікроорганізмів, що у свою чергу сприяє нормальній роботі кишечника. Такі властивості названі пребіотичними, а самі ВНО – пребіотиками. Важливе значення має і той факт, що ВНО нетоксичні для людини, не викликають жодних сторонніх ефектів в організмі. Добова потреба дорослої людини в олігосахаридах становить 7-11 г [3].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Найважливішим джерелом олігосахаридів є продукти часткового гідролізу полісахаридів, що полягає в розщеплюванні полісахаридів на олігомерні фрагменти. Окрім кислотного гідролізу для виробництва ВНО використовують ферментативне розщеплювання за допомогою ферментів ендopeктолітичної дії. Принциповою перевагою ферментативного гідролізу перед кислотним є його специфічність. Олігосахариди в природі піддаються розщеплюванню за допомогою ферментів глікозидаз, які каталізують розщеплювання глікозидних зв'язків. Ці ферменти зазвичай індуються, тобто їх вироблення стимулюється додаванням субстрату до ферментів. Мікроорганізми кишечника утилізують олігосахариди за допомогою глікозидаз, і введення олігосахаридів приводить до посилення активності цих ферментів. Для багатьох глікозидаз характерна також і трансферазна дія, вони здатні каталізувати не лише гідроліз глікозидного зв'язку, але і перенесення моносахаридного залишку з утворенням нового олігосахариду. Порівняльне вивчення олігосахаридів як пребіотиків показало, що чим коротший ланцюг полісахариду, тим менша специфічність ферментації певними мікроорганізмами кишечника [4-7]. Пребіотики застосовують для збагачення харчових продуктів, особливо в молочній, кондитерській, консервній промисловості. Сьогодні швидко розвивається промислове виробництво олігосахаридів, але досить не налагоджене виробництво пектинових олігосахаридів (галактуронових олігосахаридів).

Галактуроноолігосахариди отримують ферментативним гідролізом пектиновмісної сировини. Відомий спосіб виробництва пектинових олігосахаридів детально описаний у працях E. Olan-Martin, K.C. Mountzouris, G.R. Gibson, R.A. Rastall, в якому використовують високоочищені низько- та високоетерифіковані пектини, процес гідролізу проводять у ферментативному мембранному реакторі [3]. Попередньо в лабораторних умовах нами були встановлені оптимальні умови та параметри проведення ферментативного гідролізу рослинних полісахаридів, безпосередньо з яблучних вичавок, та розроблена технологія виробництва низькомолекулярних олігосахаридів із пектиновмісної сировини. У результаті реакції, отримано речовини молекулярною масою 3,5 кДа [8].

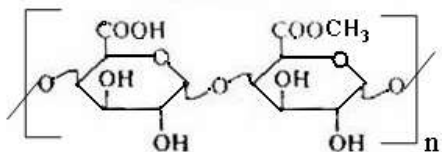


Рисунок 1 – Хімічна формула галактуранових олігосахаридів,
де $n = 18$

На теперішній час все більше привертає увагу розробка синбіотичних препаратів, які є сумішшю пробіотиків та пребіотиків. Вони сприяють збільшенню кількості корисних для людини мікроорганізмів, стимулюють ріст і функціональну активність пребіотиків, як тих, що надходять з продуктами, так і власних, що населяють організм. Синбіотичні препарати сприяють проявленню імуногенних властивостей корисних мікроорганізмів за рахунок збільшення продукування ними бактеріальних метаболітів з імуномодельючими властивостями (пептидоглікани, ліпополісахариди, тейхоєві кислоти), а також стимулюванню нормальної мікрофлори, яка посилює клітинний імунітет [9; 10].

Мета та завдання статті. Таким чином, аналіз літературних даних показує, що необхідно поглибити дослідження впливу пребіотиків на прояв біологічної активності корисних мікроорганізмів. На підставі висунутої гіпотези сформульована основна мета роботи – підтвердження біфідогенного ефекту отриманих галактуранових олігосахаридів.

Виклад основного матеріалу дослідження. На першій стадії досліджень був вивчений вплив додавання розчину галактуранових олігосахаридів на ріст біфідобактерій, на другій – додавання отриманого пребіотика до молока з утворенням нового синбіотичного продукту.

Матеріали та умови проведення експерименту.

Культивування біфідобактерій: перша стадія досліджень: $\text{opt } t = 37^\circ \text{C}$, тривалість 24 год, анаеробні умови; друга стадія досліджень: $\text{opt } t = 37^\circ \text{C}$, тривалість – визначалась експериментально, стерильні умови.

Матеріали:

– пробіотик: згідно з 9-м виданням “Керівництва по визначенню бактерій” Бергі, майже третина видів роду *Bifidobacterium* наявна в шлунково-кишковому тракті людини, причому найчастіше зустрічаються *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. breve*.

Тому, на нашу думку, цікавим було б поглибити дослідження менш відомого представника роду *Bifidobacterium* – *Bifidobacterium siccum*;

– середовище: аналіз літератури показує, що в даний час у світі найбільш відомими середовищами для культивування біфідобактерій є триптиказо-фітон-дріжджове середовище (ТРУ), середовище MRS, середовище Блаурока, печінково-кров'яний агар (BL) [10]. Ми пропонуємо дослідити ріст біфідобактерій на менш популярному тіогліколевому середовищі;

– пребіотик: 2% розчин лактулози, виробник Duphalac “Solway Pharmaceuticaes B.V.” The Netherlands; 2% розчин галактуронових олігосахаридів, додавали у кількості 1%. Оскільки у харчовій промисловості для приготування продуктів із лактулозою, як вже відомого пребіотика, використовують концентрацію даної речовини 2%, досліджували вплив меншої концентрації пребіотика на ріст біфідобактерій. Необхідне значення рН розчину створювали за допомогою 1М NaOH.

Додатковий матеріал: молоко ТМ “Селянське”, рН = 6,77, кислотність – 20° Т

Експериментальна частина.

Для засіву робили суміш культури та розчину галактуронових олігосахаридів: у розчин вносили суспензію клітин *Bifidobacterium siccum* у концентрації 10^6 клітин в 1 см^3 на стандарт мутності Мак-Фарланда та обережно перемішували. Далі проводили дванадцять десятикратних розведень і 1 см^3 10-го, 11-го, 12-го розведення засівали в тіогліколіве середовище і культивували в анаеробних умовах при 37° С, протягом 24 год. Досліджуваний штам проявляв активний ріст, навіть у 12 розведенні концентрація бактеріальних клітин після 24 год культивування складала 5 КУО в 1 см^3 середовища. Це є, на наш погляд, дуже важливим, тому що, незважаючи на більш складну хімічну структуру галактуронових олігосахаридів, досліджуваний *Bifidobacterium siccum* здатен активно засвоювати цей пребіотик.

Біфідобактерії – хемоорганотетеротрофи. Авторами V. Scardovi, W. Vries зі співавторами було показано, що ця група бактерій активно зброджує вуглеводи за фрукто-6-фосфатним шунтом. У результаті метаболізму олігосахаридів біфідобактеріями утворюються здебільшого оцтова і молочна кислоти (молярному співвідношенні 3:2), а також спирти. Масляну і пропіонову кислоти *Bifidobacterium siccum* не утворюють. Методом вискоєфективної газової хроматографії встановили вміст спиртів після зброджування пектинових олігосахаридів *Bifidobacterium siccum*.

Таблиця 1– Вміст основних спиртів після збродження

Речовина	Кількість мг/100мл (вміст спирту 0,5% на 200 мл розчину)
1. Ацетальдегід	16,07±0,001
2. Етилформіат	1,59±0,006
3. Ацеталь + етилацетат	94,12±0,005
4. Метанол	61,67±0,008
5. Пропанол-1	25,38±0,002
6. Ізобутанол-1	59,23±0,009
7. Етиллактат	28,94±0,009
8. Гексанол-1	1,51±0,008
9. Етилкаприлат	4,11±0,004
10. Етилкапрілат	4,11±0,004
11. Диетилсукцинат	1,77±0,004

Таблиця 2 – Зведення отриманих результатів з покращеним інтегруванням

Речовина	Кількість мг/100мл (вміст спирту 0,5% на 200 мл розчину)
1. Альдегіди	16,44±0,005
2. Складні ефіри	128,26±0,004
3. Метанол	61,67±0,008
4. Вищі спирти	273,66±0,007
5. Енантові ефіри	8,043±0,002

У результаті бродіння значення рН знизилось до 4,0...4,2, що сприяє запобіганню розвитку небажаної патогенної мікрофлори.

Друга стадія досліджень включала додавання отриманих галактуронових олігосахаридів пребіотика до молока, в яке попередньо вносили *Bifidobacterium siccum*. Контролем було додавання до молока лактулози і того ж *Bifidobacterium siccum*. Умови сквашування: температура 37° С, рН = 6,77 та кислотність молока – 20° Т, суспензія клітин *Bifidobacterium siccum* у кількості 5%, олігосахариди – 1%, лактулоза – 2%.

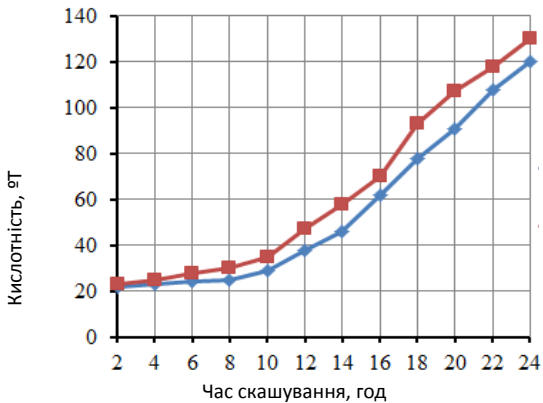


Рисунок 2 – Залежність показника кислотності від тривалості сквашування: ◆ – галактуронові олігосахариди; ■ – лактулоза

Експериментальні дані, які зображені на рис. 2, вказують, що галактуронові олігосахариди значною мірою впливають на процес сквашування. Порівняно з контролем згусток утворювався дещо повільніше, на 12 год сквашування. У підсумку досліджуваний штам *Bifidobacterium siccum* проявляв активний ріст – концентрація бактеріальних клітин після 24 год культивування для зразків з лактозою складала 18×10^{10} КУО в 1 см^3 середовища, для галактуронових олігосахаридів – 3×10^{10} КУО в 1 см^3 середовища.

На ранніх стадіях розвитку *Bifidobacterium siccum* являють собою прямі палички, які розташовуються поодинокі або парами, при подальшому культивуванні виникають розгалужені ланцюги біфідобактерій.



а



б

Рисунок 3 – *Bifidobacterium siccum*: а – з додаванням галактуронових олігосахаридів; б – з додаванням лактулози

Таким чином, у ході роботи було встановлено, що стимуляція росту культур *Bifidobacterium siccum* пребіотиками залежить від природи самого пребіотика, від його концентрації, від значення рН у середовищі. Проведенні дослідження дозволили виявити ріст біомаси за наявності 2% лактулози (рН середовища 7,7) і 1% галактуронових олігосахаридів (рН середовища 6,6).

Висновки. Галактуронові олігосахариди в концентрації 1% позитивно впливають на ріст біомаси *Bifidobacterium siccum*. Це дає можливість запропонувати пектинові олігосахариди, в якості пребіотиків, для отримання біологічно активних добавок із живими культурами біфідобактерій.

Список літератури

1. Самылина В. А. Влияние пищевых продуктов, обогащенных про- и пребиотиками, на микробиологический статус человека / В. А. Самылина // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80, № 2.
2. Степаненко Б. Н. Химия и биохимия углеводов (полисахариды) : учеб. пособие для вузов / Б. Н. Степаненко. – М. : Высш. школа, 1978. – 256 с.
3. Continuous production of pectic oligosaccharides in an enzyme membrane reactor / E. Olano-Martin [et al.] // Food Sci. – 2001. – Vol. 66, № 7. – С. 966–971.
4. Лазарева Е. Б. Опыт и перспективы использования пектинов в лечебной практике / Е. Б. Лазарева, Д. Меньшиков // НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского.
5. Отт В. Д. Сучасні дані про роль пребіотиків в дитячому харчуванні / В. Д. Отт, О. М. Муквіч // Інститут педіатрії, акушерства та гінекології АМН України.
6. Olano-Martin E. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides / E. Olano-Martin, G. R. Gibson and R. A. Rastall // School of Food Bioscience, The University of Reading, Whiteknights, Reading, UK, Journal of Applied Microbiology. – 2002. – № 93. – P. 505–511.
7. Бутова С. Н. Новая технология получения олигосахаридов пектина с повышенной биологической активностью / С. Н. Бутова, С. Ю. Солдатова // Вестник Российской академии естественных наук. – 2011. – № 2.
8. Безусов А. Т. Технологія виробництва галактуронових олігосахаридів із пектиновмісної сировини / А. Т. Безусов, М. Г. Малькова // Харчова наука і технологія – 2010. – № 1 (10).
9. Степаненко П. П. Микробиология молока и молочных продуктов / учеб. пособие / П. П. Степаненко. – М. : Лира, 2002. – 413 с.
10. Полтавська О. А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.07 / Полтавська О. А. – 2006. – 133 с.

Отримано 30.10.2012. ХДУХТ, Харків.
© Т.А. Лисогор, М.Г. Ліганенко, 2012.