

ИЗУЧЕНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЗАМЕНИТЕЛЯ САХАРА ИЗОМАЛЬТУЛОЗЫ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Божко О.Ю., Шуваева Г.П., Корнеева О.С.

ФГБОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия», Воронеж, Россия e-mail:
olga_bojko2005@mail.ru

Проведен анализ результатов эксперимента по исследованию пребиотической активности природного заменителя сахара, полученного с применением фермента иммобилизованных клеток бактерий *Erwinia rhapontici*. На основании разработанной ранее биотехнологии получен натуральный сахарозаменитель изомальтулоза и исследованы его пребиотические свойства в условиях *in vitro*. Изучена динамика роста пробиотической культуры *Bifidobacterium bifidum* на средах с различными источниками углерода – изомальтулозой, инулином, лактозой, трегалозой, фруктозой. Исследован процесс накопления биомассы бифидобактерий на различных средах по количеству клеток на фиксированных мазках, а также определена интенсивность метаболических процессов бифидокультуры. Установлен характер симбиотических отношений представителя полезной микрофлоры кишечника *B. bifidum* с условно-патогенным микроорганизмом *Escherichia coli* (кишечной палочкой). На основании результатов исследований доказана пребиотическая активность изомальтулозы в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: изомальтулоза, изомальтулозосинтаза, пребиотическое действие, бактерии *Erwinia rhapontici*, бифидобактерии, культивирование.

STUDYING OF THE ISOMALTULOSE SUGAR SUBSTITUTE PREBIOTIC PROPERTIES IN THE *IN VITRO* CONDITIONS

Bozhko O.Y., Shuvaeva G.P., Korneeva O.S.

Voronezh State Technological Academy, Voronezh, Russia, e-mail:olga_bojko2005@mail.ru

The analysis of results prebiotic activity natural sugarsubstitute, received with application of immobilization bacteria cells *Erwinia rhapontici* is conducted. On the basis of developed before biotechnology it is received isomaltulose is natural sugarsubstitute and are investigated it prebiotic properties *in vitro* conditions. Dynamics of growth of *Bifidobacterium bifidum* on medium with various sources of carbon is studied, for example isomaltulose, inulin, lactose, trehalose, fructose. Calculation of cages bifidobacteria on different medium on fixed dabs is spent and intensity of bifidocultures metabolic processes is investigated. Results of research of symbiotic relations of representative useful microflora in intestines – *B. bifidum* with an is conditional-pathogenic microorganism – *Escherichia coli* are analysed. On the basis of researches results it is proved isomaltulose prebiotic activity *in vitro* conditions.

Key words: isomaltulose, isomaltulosesynthase, prebiotic action, bacteria *Erwinia rhapontici*, bifidobacteria, cultivation.

Создание заменителей сахара нового поколения, обладающих не только чистым сладким вкусом, безопасностью и высокими технологическими характеристиками, но и способных проявлять функциональные свойства, оказывая положительное регулирующее воздействие на организм в целом, либо на его отдельные органы и системы, одна из основных задач, стоящих перед учёными в области функционального питания [1].

Предметом пристального изучения, после открытия их специфического биологического действия, стали некоторые сахарозаменители (неусваиваемые), имеющие особую ценность для здоровья человека. Было установлено, что они являются пребиотиками – веществами, которые не гидролизуются и не всасываются в верхней части желудочно-кишечного тракта, а поступают в нижние его отделы и способствуют развитию полезных бактерий, обитающих в толстом кишечнике. Как все пребиотики, эти вещества регулируют

кишечную микрофлору, индуцируют полезные эффекты как на уровне желудочно-кишечного тракта, так и организма в целом, способствуя поддержанию иммунной системы человека [4,8].

Одно из таких веществ – изомальтулоза (6-О- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза), известная как натуральный заменитель сахара, присутствующий в меде, соке сахарного тростника. За рубежом этот углевод рекомендуют использовать в рационе питания людей, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, ожирением, атеросклерозом, а также при диабете.

Сотрудниками кафедры микробиологии и биохимии ФГБОУВПО «ВГТА» была разработана биотехнология изомальтулозы с применением иммобилизованных высокоактивных бактерий *Erwinia rhapontici*, основанная на реакции биотрансформации сахарозы в изомальтулозу, катализируемой ферментом этого продуцента – изомальтулозосинтазой [6].

В литературе отсутствуют конкретные данные о способности бифидобактерий развиваться на средах с изомальтулозой, однако имеются сведения о ее пребиотических свойствах.

Как известно, бифидобактерии относятся к наиболее значимым представителям нормобиоценоза [3], поэтому в качестве объекта исследования был использован типовой вид рода – *Bifidobacterium bifidum*: анаэробные микроорганизмы, морфологически представляющие собой крупные грамположительные неспорообразующие палочки с раздвоенными концами, способные к полиморфизму. Среди неусваиваемых углеводов инулин и трегалоза являются известными пребиотиками.

Цель настоящего исследования состояла в изучении роста и развития бифидобактерий на средах, содержащих изомальтулозу, полученную в результате биотрансформации сахарозы с применением иммобилизованных бактериальных клеток рода *Erwinia* в условиях *in vitro* и типа взаимодействия бифидобактерий с основным представителем микрофлоры желудочно-кишечного тракта – кишечной палочкой.

Материал и методы исследования

Объектом для иммобилизации служили факультативно-анаэробные бактерии *Erwinia rhapontici* штамм В-9292 (ВКПМ, г. Москва). Для поддержания и выращивания *E. rhapontici* использовали мясо-пептонный агар. Культивирование бактерий проводили на среде следующего состава (г/дм³): пептон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10; сахароза – 40. Культуру выращивали в периодических условиях в течение 3 суток при температуре 28-30 °С при рН_{исх} 7,0 \pm 0,1. Клетки осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 15 минут, промывали трис-НСl буфером 0,05 М, рН 6,0. Об активности фермента судили по изменению концентрации изомальтулозы, полученной в результате трансформации сахарозы и выражали в Ед/см³. Количество изомальтулозы определяли по методу Сомоджи-Нельсона. Иммобилизацию живых бактериальных клеток проводили, как описано в [2]. Раствор, содержащий изомальтулозу, получали путем биотрансформации сахарозы с последующим концентрированием и выделением.

Для подтверждения пребиотических свойств изомальтулозы осуществляли культивирование бактерий *Bifidobacterium bifidum in vitro* на средах с различными источниками углерода. В опытах использовались бакпрепараты *B. bifidum*. Препарат «Бифидобактерин сухой» предварительно растворяли в питательной среде и активизировали при температуре 37 - 38 °С в течение 24 ч. Затем данный препарат вносили в подготовленные для культивирования питательные среды из расчета 5 доз на 1 л среды. Выращивание микроорганизмов проводили в анаэробных условиях на модифицированной среде Блаурокка. Для определения эффективности действия различных углеводов на рост микроорганизмов *B. bifidum* в питательную среду поочередно включали изомальтулозу, лактозу, инулин,

фруктозу, трегалозу. Углеводы вносили в количестве 10 % по углероду в среду следующего состава: пептон - 10; NaCl – 5; агар-агар – 0,75; цистеин солянокислый – 0,1; печеночный отвар, рН 7,5. Подсчет клеток бифидобактерий проводили на фиксированных окрашенных мазках по методу Виноградского-Шульгиной-Брига [7].

Микроскопирование культур проводили с помощью светового микроскопа Микмед – 1 (ОАО «Ломо» Россия). Фотографии получены с использованием цифровой камеры – окуляра DCM-130 (1300K pixels, USB 2) для микроскопа, программное обеспечение «ScorePhoto».

Опыты проводили в 3 кратной биологической повторности. В таблицах и на рисунках приведены данные типичных опытов, где каждое значение есть среднее арифметическое. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение влияния изомальтулозы на рост и развитие бифидобактерий в сравнении с другими углеводами.

Данные по динамике роста *B. bifidum* на различных источниках углерода показали, что микроорганизмы способны к росту на всех испытанных вариантах сред. Максимальное накопление биомассы наблюдалось к 48 ч процесса культивирования бактерий. Однако внесение того или иного источника углерода оказывало различное влияние на скорость и интенсивность роста бифидобактерий. Наибольшая физиологическая активность культуры проявлялась при внесении в среду изомальтулозы и лактозы (рис.1).

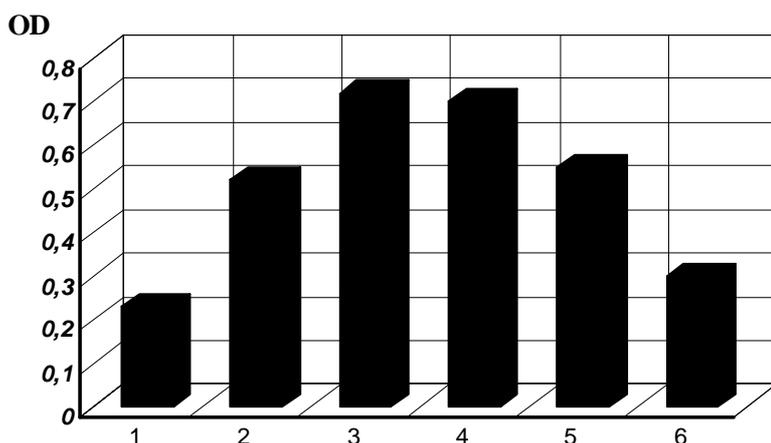


Рис. 1. Нефелометрическое определение биомассы *B. bifidum* на различных углеводных средах (24 ч). 1 – без углевода, 2 – инулин, 3 – изомальтулоза, 4 – лактоза, 5 – трегалоза, 6 – фруктоза. OD – показатель оптической плотности

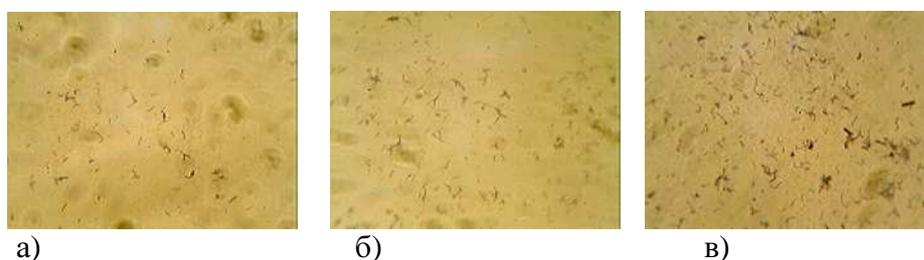
Так, к 24 ч культивирования микроорганизмов количество биомассы на среде с изомальтулозой было в 2 раза больше по сравнению с инулинсодержащей средой и в 3 раза больше по сравнению с биомассой в контроле (среда без углевода). Это не противоречит литературным данным, которые указывают, что бифидобактерии потребляют глюкозу, галактозу, большое число олигосахаридов, в том числе фруктоолигосахариды, а из полисахаридов только инулин [5]. Анализ результатов по подсчету клеток *B. bifidum* на фиксированных препаратах также указывал на интенсификацию роста и развития бифидокультуры на среде с содержанием изомальтулозы и лактозы (табл. 1).

Изменение биомассы бифидобактерий в зависимости от источника углерода
(по количеству клеток на фиксированных препаратах)

τ, ч	Вносимые углеводы					
	без углевода	изомальтулоза	лактоза	трегалоза	инулин	фруктоза
6	$2 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$
12	$8 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$6 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^7$
24	$2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^8$
36	$3 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^{11}$	$7 \cdot 10^{11}$	$8 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$
48	$7 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^{11}$	$9 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^{11}$	$8 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$

Как известно, бифидобактерии обладают способностью проявлять полиморфизм, при этом степень полиморфности зависит от условий выращивания культуры, в чистых культурах они более полиморфны. Так, в неблагоприятных условиях (неподходящая кислотность среды, недостаток питательных компонентов среды, присутствие кислорода) они способны образовывать разбухшие инволюционные, шаровидные формы. В связи с этим, представляло интерес изучить изменение морфологических признаков исследуемых бактерий при росте на средах с различными углеводами.

Как видно на рис. 2, *B. bifidum* представляют собой в динамике роста неспорообразующие палочки, зернистые, проявляющие тенденцию к образованию цепочек на всех средах. В контроле (а) появляется много гранулированных форм, которые можно принять за кокки. Шаровидные клетки, появляющиеся в результате отсутствия в среде компонентов, необходимых для нормального синтеза бактериальных клеточных стенок, не образуются, однако происходит ветвление, что свидетельствует о неполноценности состава питательной среды.



а)

б)

в)

Рис. 2. Интенсивность роста *B. bifidum* на средах с различными углеводами (увеличение 1350 раз);

а) среда без углевода; б) среда с инулином; в) среда с изомальтулозой

Наиболее интенсивное развитие типичных форм отмечено на среде с изомальтулозой (в). Установлено, что на средах с этими углеводами бактерии имели четкую форму палочек, соединенных в цепочки или палочек с раздвоением на концах. На среде, содержащей инулин, клетки микроорганизма имели форму палочек, соединенных в более длинные и тонкие цепочки.

Интенсивность метаболических процессов у бифидобактерий контролировали по изменению рН среды, что служит показателем трансформации сахаров в органические кислоты как конечные продукты метаболизма. Установлено, что изменение величины рН коррелирует с ростом и развитием культуры бактерий (рис. 3).

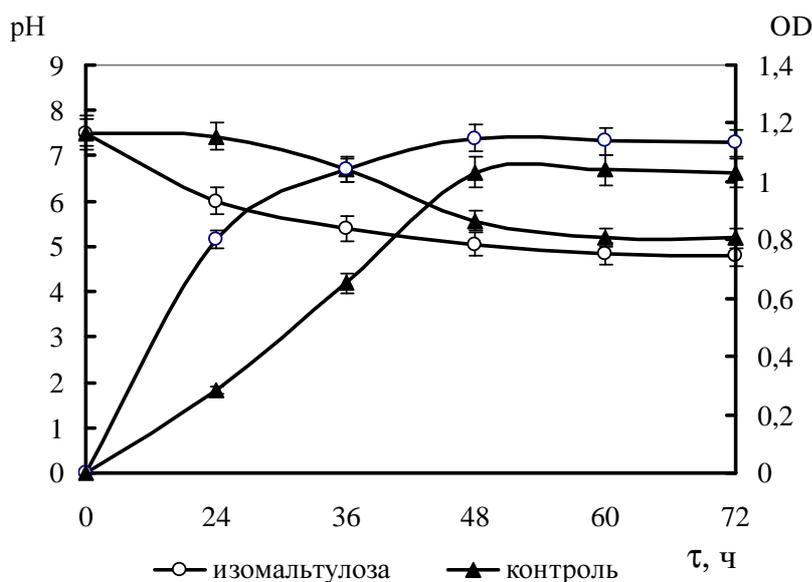


Рис. 3. Динамика изменения pH среды культивирования и интенсивности роста *B. bifidum* на среде с изомальтулозой. OD – показатель оптической плотности, τ – продолжительность процесса

Отмечено, что наиболее интенсивное снижение pH (до 6,0, 6,3 и 6,5) наблюдалось при сбраживании изомальтулозы, лактозы и трегалозы, соответственно, к 24 ч процесса культивирования. На среде с инулином, фруктозой и в контроле к этому времени значение pH изменилось незначительно. Максимальное снижение pH среды (4,8 - 5,8) наблюдалось на всех вариантах сред к 48 – 60 ч культивирования.

Изучение типа взаимодействий Bifidobacterium bifidum с Escherichia coli.

Как известно, микроорганизмы, составляющие основу микрофлоры толстого кишечника здорового человека, представлены полезными бифидобактериями и лактобактериями, а также условно-патогенными микробами – кишечной палочкой с нормальными ферментативными свойствами. Именно эти микроорганизмы обеспечивают устойчивость колонии и предотвращают заселение толстого кишечника посторонними микробами.

Однако вопрос о диагностической ценности исследований микрофлоры толстого кишечника в настоящее время широко дискутируется. В России большинство лабораторий при диагностике дисбактериоза руководствуется МР № 10-11/31 «Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» (Москва, 1986). Количество нормируемых групп микроорганизмов кишечника человека варьируется в разных документах от 10 до 22. Наибольшей детализации подвергается кишечная палочка – *Escherichia coli*. Рекомендуется определять общее количество эшерихий, с четко выраженной ферментативной активностью, со сниженной ферментативной активностью, лактозонегативные, гемолитические, неподвижные, индолнегативные, маннитнегативные и т.д. Согласно диагностическим критериям, приведенным в МР 10-11/31, содержание бифидобактерий в норме должно составлять 10^8 - 10^{10} кл/г, кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью 10^7 - 10^8 кл/г (табл. 2.4). Такой симбиоз микроорганизмов достаточно стабилен и не допускает развития в толстом кишечнике других микроорганизмов.

В связи с этим были проведены исследования по изучению симбиотических отношений следующих микроорганизмов: *B. bifidum* – основного представителя нормобиоценоза кишечника человека и *E. coli* – представителя условно-патогенной микрофлоры на средах с различными источниками углевода (изомальтулоза, глюкоза, фруктоза, трегалоза).

Углеводы вносили в полужидкую среду Блаурокка в качестве единственного источника углевода, в контрольной пробе углеводов отсутствовал. Среды инокулировали чистыми культурами *B. bifidum* и *E. coli* в количестве, соответствующем показателю нормы. Культивирование микроорганизмов проводили при 37 °С в течение 48-72 ч.

Как показали исследования, на средах с изомальтулозой и глюкозой обе культуры проявляли максимальную способность к росту (табл.2).

Таблица 2

Интенсивность роста *B. bifidum* и *E. coli* на средах с различными углеводами

τ, ч	Вносимые углеводы					
	изомальтулоза		глюкоза		фруктоза	
	<i>B. bifidum</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. coli</i>
6	$6 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$
12	$2 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^6$
24	$3 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$
36	$7 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^7$
48	$4 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^7$

Однако на средах с трегаллозой, фруктозой плотность популяций снижалась в процессе культивирования, что свидетельствует об ухудшении симбиотических взаимоотношений микроорганизмов в этих вариантах опыта.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что культивирование бифидобактерий *B. bifidum* в условиях *in vitro* на среде с содержанием изомальтулозы отличается высокой активностью их роста, уровнем накопления биомассы, продукцией органических кислот. Выявлено, что при совместном культивировании бифидобактерий *B. bifidum* и кишечной палочки *E. coli* соотношение микроорганизмов соответствует принятым нормам и является достаточно стабильным. Таким образом, изомальтулоза обладает пребиотическими свойствами, что косвенно позволяет рассматривать ее как потенциальный иммуномодулятор организма человека.

Работа выполнялась в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, государственный контракт № П1333 от 11.06.2010 г.

Список литературы

1. Богатырев А.Н. Качество пищи и культура питания // Пищевая промышленность. - 2006. - № 8. - С. 68-69.
2. Божко О.Ю. Влияние физико-химических параметров на процесс иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici* / О.Ю. Божко, О.С. Корнеева // Фундаментальные исследования. - № 1. - 2011. - С. 9-16.
3. Выделение, идентификация и некоторые биологические свойства бифидобактерий из кишечника человека / С.Г. Карпушина [и др.] // Биотехнология. - 1998. - № 2. - С. 28 - 36.
4. Капрельянц Л.В. Пребиотические пищевые ингредиенты. Современное состояние и перспективы // Продукты и ингредиенты. - 2005. - № 6. - С. 60 - 62.
5. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. - М.: Наука, 1975. - 384 с.
6. Корнеева, О. С. Применение изомальтулозосинтазы *Erwinia rhapontici* с целью трансформации сахарозы в изомальтулозу / О. С. Корнеева, О. Ю. Божко // Вестник ОГУ. - Оренбург, 2009. - № 4. С. 130-134.
7. Практикум по микробиологии : учебное пособие / [под ред. проф. Н.С. Егорова]. - М. : Изд-во Московск. ун-та, 1976. - С. 275-281.
8. Шендеров Б.А. Пробиотики, пребиотики и синбиотики // Пищевые ингредиенты, сырье и добавки. - 2005. - № 2. - С. 23-26.

Рецензенты:

Тертычная Т.Н., д.с.-х.н., профессор, профессор кафедры технологии переработки растениеводческой продукции, ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет» Министерства образования и науки РФ, г. Воронеж.

Грабович М.Ю., д.б.н., доцент, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет» Министерства образования и науки РФ, г. Воронеж.

Работа получена 11.11.2011.