

Ассистент Е.П. Анохина, профессор О.С. Корнеева,
аспирант П.В. Шуваев

(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра биохимии и биотехнологии, тел. (473) 255-55-57)

доцент И.В. Черемушкина

(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра теории экономики, товароведения и торговли

Исследование пребиотической активности гидролизатов маннана в условиях *in vitro*

Исследован процесс накопления биомассы пробиотической культуры *Bifidobacterium bifidum* на средах с различными источниками углерода – маннозосодержащими гидролизатами, маннозой, инулином. Определена интенсивность метаболических процессов *B. bifidum* при росте на разных средах. Установлено, что развитие бифидобактерий на среде с гидролизатом маннана характеризуется высоким уровнем накопления биомассы и продукцией органических кислот, что подтверждает пребиотические свойства манноолигосахаридов в условиях *in vitro*.

The process of biomass accumulation of the probiotic culture *Bifidobacterium bifidum* in medium with different carbon sources - mannan, mannan hydrolysates, inulin, mannose was investigated. The intensity of metabolic processes *B. bifidum* during growth on different medium was determined. It was defined that the development of bifidobacteria on the medium with mannan hydrolysates characterized by high levels of biomass accumulation and production of organic acids, which confirms the prebiotic properties of mannooligosaccharides in conditions *in vitro*.

Ключевые слова: манноолигосахариды, манноза, маннан, β -маннаназа, пребиотическое действие, бифидобактерии, культивирование.

В последние годы актуальным направлением является поиск и исследование веществ с пребиотической активностью.

Пребиотики 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, тем самым способствуя поддержанию иммунной системы человека [1, 2].

Наиболее распространенными бифидогенными факторами являются моно- и олигосахара, не расщепляемые собственными ферментами желудочно-кишечного тракта человека. К группе таких веществ относятся манноолигосахариды и манноза – продукты гидролиза маннана – полисахарида клеточных стенок растений.

Манноза участвует в синтезе гликопротеидов и гликолипидов, иммунных тел, входит в состав иммуноглобулинов, обладает иммуностимулирующими, радиопротекторными и пребиотическими свойствами, которые подтверждены в условиях *in vitro* и *in vivo* [3, 4].

Исследованию функциональных свойств маннозосодержащих олигосахаридов уделяется недостаточно внимания. Показано, что они обладают антиоксидантной активностью [5],

в литературе имеются немногочисленные сведения об их пребиотическом действии [6]. Однако отсутствуют конкретные данные о способности бифидобактерий развиваться на средах с гидролизатами маннана.

На кафедре биохимии и биотехнологии ВГУИТ была разработана биотехнология маннозосодержащих гидролизатов, основанная на деструкции маннанов растительного сырья с применением рекомбинантного фермента β -маннаназы [7].

Цель данной работы состояла в исследовании способности к росту и развитию бифидобактерий на средах с гидролизатами маннана, маннозой и коммерческим пребиотиком - инулином.

Объектом исследования служили маннозосодержащие олигосахариды (молекулярная масса 0,5-2 кДа), полученные путем ферментативного гидролиза маннана камеди рожкового дерева; манноза; инулин из плодов цикория *Raftiline* (900-1000 кДа).

Для подтверждения пребиотических свойств манноолигосахаридов осуществляли культивирование бактерий *Bifidobacterium bifidum in vitro* на средах с различными источниками углерода.

В опытах использовались коммерческие препараты *B. bifidum*. Препарат «Бифидобактерин сухой» предварительно растворяли в питательной среде и активизировали при температуре 37-38 °С в течение 24 ч, затем вноси-

ли 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 инулин, маннозу, маннозосодержащие гидролизаты.

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, pH 7,5.

Контролем служила стандартная среда Блаурокка, в которой источником углерода служила лактоза.

Накопление биомассы *B. bifidum* определяли нефелометрически, путем измерения оптической плотности клеточной суспензии бактерий при длине волны 560 нм [8].

Биохимическую активность бифидобактерий определяли по нарастанию активной кислотности среды [8].

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 «ScopePhoto».

Исследование влияния антибиотика на рост бифидобактерий проводили при его концентрации в среде, рассчитанной из рекомендаций по его применению.

Опыты проводили в 3 кратной повторности. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.

Пребиотические свойства исследуемых углеводов оценивали по накоплению органических кислот и биомассы бактерий *B. bifidum*.

Данные по динамике роста *B. bifidum* на средах с различными углеводами показали, что микроорганизмы способны к росту на всех испытанных вариантах сред. Максимальное накопление биомассы наблюдалось к 42 ч процесса культивирования бактерий (таблица 1).

К 24 ч культивирования манноолигосахариды стимулировали развитие *B. bifidum* лучше, чем манноза, и не уступали известному коммерческому пребиотическому препарату - инулину. Полученные результаты не противоречат литературным данным, согласно которым бифидобактерии потребляют глюкозу, галактозу, дисахариды, большое число олигосахаридов, полисахарид инулин [9].

Т а б л и ц а 1

Динамика накопления биомассы бифидобактерий на средах с различными углеводами

Время культивирования, ч	Оптическая плотность суспензии бактерий			
	Вносимые углеводы			
	контроль	гидролизат маннана	манноза	инулин
18	0,493	0,902	0,889	1,004
24	0,592	1,452	1,364	1,454
42	0,99	1,611	1,632	1,636

Введение в состав питательной среды маннозы и маннозосодержащих гидролизатов оказывало положительное влияние на морфологию вырастающих на ней бифидобактерий, что значительно облегчало их визуальную идентификацию при микроскопии. В опытных мазках у бактерий были значительно более отчетливо выражены такие ключевые признаки бифидобактерий, как утолщение и раздвоенность концов палочек, разветвленность (рисунк 1).

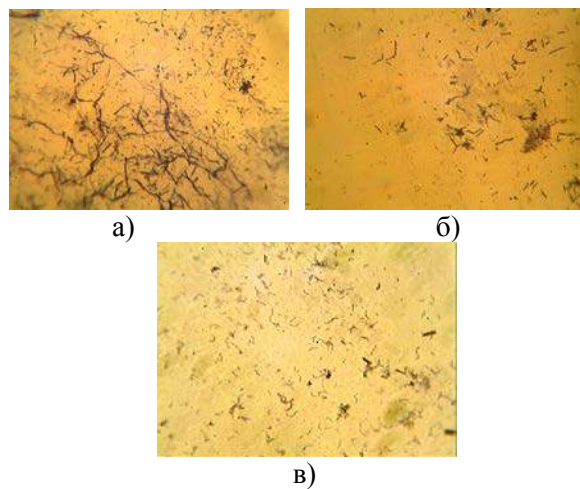


Рисунок 1 - Интенсивность роста *B. bifidum* на средах с различными углеводами (увеличение 1350 раз): а) манноза, б) маннозосодержащий гидролизат; в) инулин.

Интенсивность метаболических процессов у бифидобактерий контролировали по изменению pH среды, что служило показателем трансформации сахаров в органические кислоты как конечные продукты метаболизма (рисунок 2).

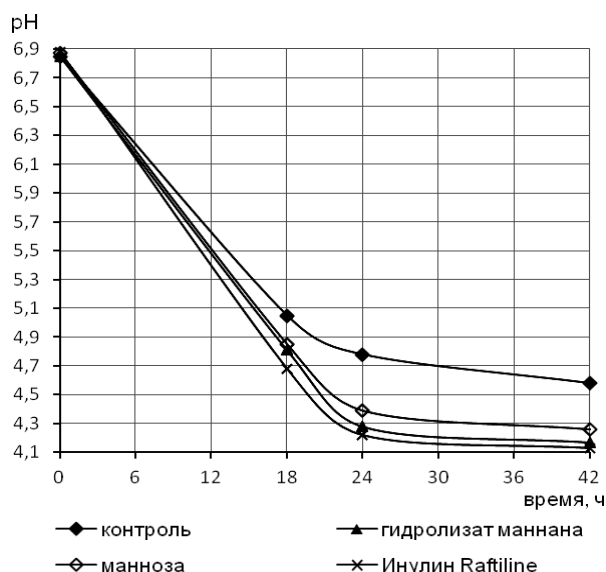


Рисунок 2 - Изменение pH при развитии бифидобактерий на средах с различными углеводами.

Максимальное снижение pH наблюдалось на всех вариантах сред к 42 ч культивирования. Наиболее интенсивное накопление органических кислот происходило на средах с гидролизатом маннана и инулином, что коррелировало с накоплением биомассы *B. bifidum* на этих средах.

Одной из причин дисбактериоза может быть длительное лечение препаратами антибиотиков. В связи с этим *in vitro* исследовалось влияние антибиотика широкого спектра действия — азитромицина на развитие и рост культуры бифидобактерий в среде с различными углеводами.

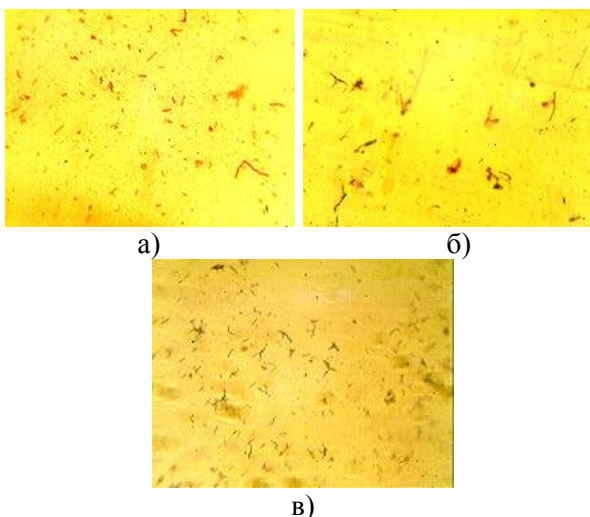


Рисунок 3 - Интенсивность роста *B. bifidum* на средах с различными углеводами в присутствии антибиотика (увеличение 1350 раз): а) манноза; б) гидролизат маннана; в) инулин.

Как показали исследования (рисунок 3), бифидобактерии сохраняли свои морфологические свойства на средах с маннозой, гидролизатом маннана и инулином, что косвенно свидетельствует о повышении резистентности пробиотиков в стрессовых ситуациях для микробной клетки.

В результате проведенных исследований установлено, что культивирование бифидобактерий *B. bifidum* в условиях *in vitro* на среде с гидролизатом маннана отличается высокой активностью их роста, уровнем накопления биомассы, продукцией органических кислот.

Таким образом, гидролизат маннана наравне с маннозой и инулином обладает пребиотическими свойствами, что позволяет рассматривать возможность включения его в состав функциональных продуктов, предназначенных для коррекции микробиоценоза кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Капрельянц, Л.В. Пребиотические пищевые ингредиенты. Современное состояние и перспективы [Текст] / Л.В. Капрельянц // Продукты и ингредиенты. - 2005. - № 6. - С. 60 – 62.
- 2 Шендеров, Б.А. Пробиотики, пребиотики и синбиотики [Текст] / Б.А. Шендеров // Пищевые ингредиенты, сырье и добавки. - 2005. - № 2. - С. 23-26.
- 3 Корнеева, О.С. Пребиотические свойства маннозы и ее влияние на специфическую резистентность [Текст] / О.С. Корнеева, А.С. Глущенко, И.В. Черемушкина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2012. - № 5. - С. 51-57.
- 4 Черемушкин, И.В. Оптимизация ферментативного гидролиза трудногидролизуемых маннанов и исследование пребиотических свойств маннозы [Текст] / И.В. Черемушкина и др. // Биотехнология. - 2010. - № 5 – С. 56-61.
- 5 Черенков, Д.А. Антиоксидантная активность продуктов гидролиза природных полимеров (маннана и фукоидана) [Текст] / Д.А. Черенков и др. // Вестник ВГУИТ. - 2012. - №1. - С. 151-153.
- 6 Laere, K.M. Transglycosidase activity of *Bifidiobacterium adolescentis* DSM 20083 galactosidase / K.M. Laere et al // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - V. 52. - P. 681–688.
- 7 Черемушкина, И.В. Получение рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* – продуцента β-маннаназы [Текст] / И.В. Черемушкина и др. // Биотехнология. - 2011. - № 5. - С. 32-37.

8 Шуваева, Г.П. Биология и микробиология [Текст]: учебное пособие / Г.П. Шуваева и др. – Воронеж: ВГТА, 2003. – 300 с.

9 Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования [Текст] / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 384 с.

REFERENCES

1 Kaprelyants, L.V. Prebiotic food ingredients. Current state and prospects [Text] / L.V. Kaprelyants // Products and ingredients. - 2005. - № 6. - P. 60 - 62.

2 Shenderov, B.A. Probiotics, prebiotics and synbiotics [Text] / B.A. Shenderov // Food ingredients, raw materials and additives. - 2005. - № 2. - P. 23-26.

3 Korneeva, O.S. Prebiotic properties of mannose and its effect on specific resistance [Text] / O.S. Korneeva, A.S. Glushchenko, I.V. Cheremushkina // Journal of Epidemiology and Microbiology, Immunobiology. - 2012. - № 5. - P. 51-57.

4 Cheremushkina, I.V. Optimization of enzymatic hydrolysis hard hydrolysable mannans and study of prebiotic properties of mannose [Text] / I.V. Cheremushkina et al // Biotechnology. - 2010. - № 5 - P. 56-61.

5 Cherenkov, D.A. Antioxidant activity of the products of hydrolysis of natural polymers (mannan and fucoidan) [Text] / D.A. Cherenkov et al // Bulletin of VSUET. - 2012. - № 1. - P. 151-153.

6 Laere, K.M. Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 galactosidase / K.M. Laere et al // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - V. 52. – P. 681–688.

7 Cheremushkina, I.V. Preparation of recombinant strain *Bacillus subtilis* - producing β -mannanase [Text] / I.V. Cheremushkina et al // Biotechnology. - 2011. - № 5. - P. 32-37.

8 Shuvaeva, G.P. Biology and microbiology [Text]: a tutorial / G.P. Shuvaeva et al. - Voronezh: VSTA, 2003. - 300 p.

9 Kvasnikov, E.I. Lactic acid bacteria and ways to use them [Text] / E.I. Kvasnikov, O.A. Nesterenko. – М.: Nauka, 1975. - 384 p.