Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи• •Experimental and theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 2 (64), 2012

УСВОЕНИЕ ПРЕБИОТИКОВ ПРИРОДНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ШТАММОМ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EP 307/412 “НАРИНЕ” IN VITRO

Г.Г. ОГАНЕСЯН, А.А. БАРСЕГЯН, В.П. АКОПЯН, С.С. ОГАНЕСЯН, А.В. МАРУТЯН

Институт микробиологии, НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
hhov@sci.am

Изучалась эффективность усвоения растительных инулинов и лактулозы пробиотическим штаммом *Lactobacillus acidophilus* Ep 307/412 “Нарине” в условиях in vitro. Разработан метод выделения и очистки инулинов из различных растений. Установлено, что лактулоза и инулин, выделенный из корней лопуха, легко усваиваются штаммом “Нарине”, тогда как инулин, выделенный из цикория, почти не усваивается. По поддержанию роста и накоплению биомассы лактулоза и инулин, выделенные из лопуха, незначительно уступают глюкозе.

Пробиотик – пребиотик – синбиотик – инулин – лактулоза

Ուսումնասիրվել է բուսական ինուլինների և լակտուլոզի յուրացման արդյունավետությունը *Lactobacillus acidophilus* Եր 307/412 «Նարինե» պրոբիոտիկ շտամի կողմից in vitro պայմաններում: Մշակվել է տարբեր բույսերից ինուլինի անջատման և մաքրման եղանակ: Հաստատվել է, որ լակտուլոզը և կռատուկ մեծի արմատներից անջատված ինուլինը հեշտ են յուրացվում «Նարինե» շտամի կողմից, այն դեպքում, երբ ճարճատուկից անջատվածը գրեթե չի յուրացվում: Աճի պահպանմամբ և կենսազանգվածի կուտակմամբ լակտուլոզը և կռատուկ մեծի արմատներից անջատված ինուլինը շատ քիչ են զիջում գլյուկոզին:

Պրոբիոտիկ - պրեբիոտիկ - սինբիոտիկ - ինուլին - լակտուլոզ

Effectiveness of utilization of plant inulins and lactulose by probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* Er 307/412 “Narine” in vitro has been studied. A method of recovery and purification of inulins from various plants has been elaborated. It is revealed, that lactulose and inulin obtained from Burdock common (Arctum lappa) roots are easily consumed by strain “Narine”, whereas inulin obtained from chicory ruts is consumed slightly. On maintenance of growth and accumulation of biomass lactulose and inulin selected from burdock a little bit concede glucose.

Probiotic – prebiotic – symbiotic – inulin – lactulose

В настоящее время для коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), улучшения функционирования пищеварительного тракта, профилактики и лечения дисбактериозов широко применяются пребиотики, к которым относятся неперевариваемые ингредиенты пищи, способствующие улучшению

здоровья за счет избирательной стимуляции роста и/или метаболитической активности пробиотиков, обитающих в толстой кишке [3, 9]. Чтобы компонент пищи был классифицирован как пребиотик, он не должен подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами человека и абсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта, однако должен являться селективным субстратом для роста и/или метаболической активации одного вида или определенной группы микроорганизмов, заселяющих толстый кишечник, приводя к нормализации их соотношения [5, 7, 8]. Природный пребиотик – инулин выделяют из клубней/корней топинамбура, лопуха, цикория и других растений [6, 11, 13]. В зависимости от растительного источника инулины различаются по степени полимеризации. Они состоят из одной терминальной молекулы глюкозы и 10-60 молекул фруктозы [3, 4, 13, 14]. Большинство инулинов состоят из 34-35 звеньев, в их составе присутствуют также (10-15%) молекулы с низкой степенью полимеризации, так называемые инулиды или фруктоолигосахариды (ФОС), содержащие глюкозу и 2-12 остатка фруктозы [3]. Инулины с высокой степенью полимеризации в холодной воде практически не растворимы. Эффективность усвоения инулина пробиотиками зависит от степени его полимеризации. Для повышения усвояемости инулины с длинными цепями подвергают частичному ферментативному гидролизу, в результате которого образуются ФОС.

В отличие от инулина, лактулоза – синтетический дисахарид, не встречающийся в природе, состоящий из остатков молекул галактозы и фруктозы, соединенных гликозидной связью [1,10]. С целью повышения эффективности пробиотики и пребиотики используют совместно в форме синбиотиков [3, 5], перед созданием которых необходимо изучить степень усвоения пребиотика пробиотиком.

Целью настоящей работы являлось выделение и изучение эффективности усвоения инулинов, выделенных из различных растений, а также лактулозы штаммом *L. acidophilus* Ep 307/412 в условиях in vitro.

Материал и методика. Культуру *Lactobacillus acidophilus* Ep 307/412 (ИНМИА-9602) получили из РЦДМ, г. Абовян, РА. Дикорастущие растения лопуха большого (*Arctum lappa*), цикория (*Cicorium intybus*) были собраны на территории Армении. Культуры лактобацилл выращивали на качалке в жидкой среде LAPT [15] при 37^0C, куда в качестве единственного источника углерода добавляли 1% глюкозы, инулина или лактулозы. Оптическую плотность культур (ОП) измеряли на фотоколориметре КФК-2 МП при длине волны 590 нм.

Сбор корней производили поздней осенью или ранней весной. Растительное сырье тщательно промывали, измельчали и сушили при комнатной температуре, избегая прямого попадания света. Извлечение инулинов осуществляли кипячением с последующей фильтрацией. Инулин из растворов выделяли путем глубокого замораживания (от –22º до –24ºC) и размораживания при комнатной температуре, а в осадке определяли в соответствии фармакопейным статьям Британии [16]. Осадок обрабатывали концентрированной HCl с последующим добавлением α–нафтола. Появление розовато-красной окраски свидетельствовало о наличии инулина.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием компьютерного теста Стьюдента, принимая уровень $p < 0.05$ достаточным для достоверной разницы в результатах.

Результаты и обсуждение. Выделение и очистка инулина. Инулин, в отличие от других полисахаридов, не осаждается 78%-ным спиртом, по этой причине долгое время со стороны Food and Drug Administration (FDA) не регистрировался в качестве пищевой добавки. Принимая во внимание сильную зависимость растворимости инулина от температуры, в водных экстрактах его осаждали путем замораживания при температурах -20°, -24°C с последующим размораживанием при комнатной температуре. Последовательность действий, начиная со сбора сырья, его подготовки, водной

экстракции, затем выделения и очистки инулина, приведена на рис. 1. По указанной методике из лопуха и цикория удалось извлечь до 28 % и 33 % инулина соответственно.

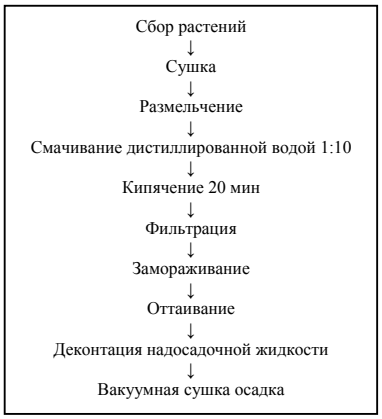

Рис. 1. Схема выделения инулина из корней растений

Изучалось влияние полученных инулинов на рост и накопление биомассы отечественного пробиотика *L. acidophilus* Ep 317/402. Опыты проводили на среде LAPT, куда в качестве основного источника углерода добавляли по 1,0 % глюкозы, инулины лопуха (ИЛ) и цикория (ИЦ). После инокуляции указанных ростовых сред суточной культурой *L. acidophilus* Ep 317/402 колбы инкубировали при 37°С на водяной качалке и периодическим измерением ОП следили за ростом культур. Кривые роста штамма Ep 317/402 на средах, содержащих инулин лопуха и цикория (контроль-глюкоза), представлены на рис.2.

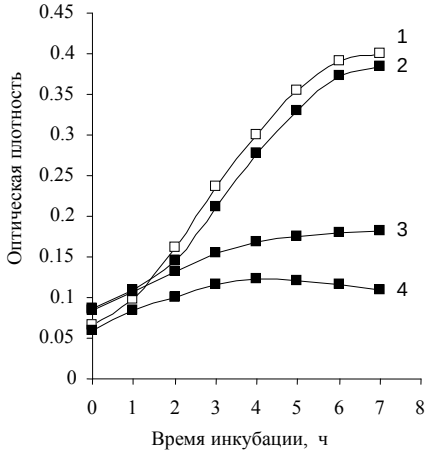

Рис. 2. Динамика роста культуры *Lactobacillus acidophilus* в бульоне LAPT, содержащем инулины, выделенные из различных растений:
1 – LAPT + глюкоза; 2 – LAPT + инулин лопуха;
3 - LAPT + инулин цикория; 4 – LAPT-контроль

Как видно из рис.2, культура, растущая на ИЛ, по скорости роста незначительно уступает культуре, растущей на глюкозе. В то же время рост культуры на инулине, выделенном из цикория, как и у контрольной культуры, после 3-х часов постепенно останавливается. Как следует из полученных данных, ИЦ плохо усваивается штаммом Ер 317/402. Наблюдаемый незначительный рост по сравнению с контролем, по-видимому, происходит за счет низкомолекулярных инулидов, присутствующих в препаратах сырых инулинов [13]. Другими авторами тоже показано, что инулин, выделенный из цикория, in vitro плохо усваивается лактобациллами [5, 13]. Для повышения его усвояемости необходимо проводить неполный ферментативный гидролиз, в результате которого образуются легкоусвояемые фруктоолигосахариды (ФОС) и олигофруктаны (ОФ). Можно также предположить, что высокая эффективность усвоения инулина лопуха штаммом Ер 317/402 обусловлена низкой степенью его полимеризации, а также высоким содержанием легкоусвояемых ФОС и ОФ.

Известно, что вязкость растворов полисахаридов находится в прямой зависимости от степени их полимеризации или разветвленности, в связи с чем было бы интересно определение сравнительной вязкости инулинов, выделенных из лопуха и цикория. Данные по определению вязкости 10 % -них растворов ИЛ и ИЦ представлены на рис. 3. Как видно из рис. 3, вязкость водного раствора ИЦ на 30 % выше, чем у ИЛ, что свидетельствует о более высокой степени полимеризации инулина, выделенного из цикория, так как полимеры инулинов редко бывают разветвленными.

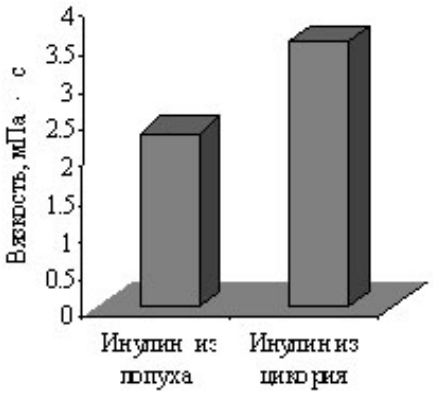

Рис. 3. Вязкость 10%-ных водных растворов инулинов, выделенных из лопуха и цикория.

Кисломолочный продукт “Нарине” широко используется в детском питании в качестве заменителя материнского молока. Как известно, в материнском молоке присутствует аналог лактулозы, который играет важную роль в формировании кишечного микробиоценоза у ребенка. В связи с этим очень важно изучить эффективность усвоения лактулозы штаммом Ер 307/412 для ее использования в качестве добавки к кисломолочному продукту “Нарине”, предназначенному как для детей, так и для взрослых, а также с целью создания синбиотиков в виде капсул или таблеток.

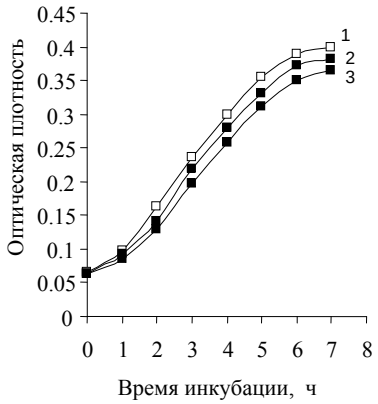

Рис. 4. Динамика роста культуры *Lactobacillus acidophilus* в бульоне LAPT, содержащем лактулозу. 1 - LAPT + глюкоза, 2 - LAPT + 20 мкг/мл лактулозы, 3 - LAPT + 40 мкг/мл лактулозы

На рис. 4 представлены данные по скорости роста и накоплению биомассы у штамма *L. acidophilus* Ep 307/412 на среде, содержащей в качестве основного источника углерода лактулозу (контролем служила глюкоза). Полученные результаты показывают, что исследуемая культура хорошо усваивает лактулозу и по росту и накоплению биомассы незначительно уступает культуре, растущей на среде, содержащей глюкозу. Большой разницы между 1%-ной и 2%-ной концентрациями лактулозы не было обнаружено, повышение ее концентрации даже слегка замедляло рост культуры.

Согласно последним исследованиям американских ученых, пробиотики обладают специфической, генетически детерминированной способностью транспорта ФОС и ОФ во внутрь клетки и их утилизации [2]. Согласно нашим данным и данным других авторов, существует некая критическая степень полимеризации (молекулярная масса), выше которой затрудняется транспорт инулина в клетку [3, 5, 13]. Непосредственное усвоение ИЛ и лактулозы лактобациллами позволяет употреблять их в составе синбиотиков, упакованных в капсулы и таблетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Каширская Н. Ю.* Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры. Русский медицинский журнал, с. 13-14, 2000.
2. *Barrangou R., Altermann E., Hutkins R., Cano R., Klaenhammer R*. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by Lactobacillus acidophilus. PNAS, *100*, 15, 8957-8962, 2003.
3. *Beirão-da-Costa M. L., Januário M. I.N., Leitão A. E. B.,. Simão F. M. L.S.* Characterisation of inulin from chicory and salsify cultivated in Portugal. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. 1-9, 2005.
4. *Biedrzycka, E.* Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. Food Science and Technology, 15, 170-175, 2004.
5. *Collins M.D., Gibson G.R.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. The American Journal of Clinical Nutrtion, *69*, 1052-1057, 1999.

6. *Foster S., Games D.A.* Medical Plants and Herbs, New York, 2000.
7. *Gibson G.R.* Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. J Nutr; SuppI., *129*, 7, 1438-1441, 1999.
8. *Gibson G.R., Roberfroid M.B.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr, *125*, 1401-1412,1995.
9. *Kailasapathy K.A., Chin J.* Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. Immunol Cell Biol., *78*, 80-88, 2000.
10. *MacGillivray P.C., Finlay H.V.L, BinnsT.B.* Use of lactulose to create a preponderance of lactobacilli in the intestine of bottle-fed infants. Scott Med J, *4*, 182-189, 1959.
11. *Macrae, R., Robinson, R. K., Sadler, M. J. (Ed.).* Encyclopedia of Food Science. Food Technology and Nutrition. Academic Press. *2*, 863-867, 1993.
12. *Niness K.R.* Inulin and Oligofructose: What Are They? J. Nutr., *129*, 1402–1406, 1999.
13. *Roberfroid M.B.* Prebiotics and probiotics: are they functional foods? Am. J. Clin. Nutr. Suppl., *71*, 6, 1682-1687, 2000.
14. *Suzuki M.* Fructans in crop production and preservation, In: Suzuki, M.; Chatterton, N. J. (ed), Science and Technology of Fructans, CRC Press, pp. 227-255, 1993.
15. *Vaningelgem F., Zamfir M., Adriany T., De Vuyst L.* Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by Streptococcus thermophilus Strains Is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristics. Journal of Applied Microbiology, *97*, 2, 1257-1273, 2004.
16. British herbal Pharmacopoeia, London British Herbal Assotetion, 1997.

Поступила 25.10.2011