

3d International Scientific-Practical Conference
on the Humanities and the Natural Science 2015

ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Khamagaeva I.S., Zambalova N.A.

STUDY OF PREBIOTICS AT PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES BIFIDOBACTERIA

Khamagaeva I.S., Russia, Doctor of Technical science,
Professor, East Siberia State University of Technology and
Management

Zambalova N.A., Russia, Candidate of Economic
Sciences, East Siberia State University of Technology and
Management

Abstract

The effects of barley, oat flour and cedar nut kernel cake on physiological and biochemical properties of bifidobacteria *Bifidobacterium longum* DK-100 and *Bifidobacterium bifidum* 8₃. The studies selected optimal dose of prebiotics to ensure active growth of bifidobacteria. It is noted that the investigated strains of bifidobacteria possess high adhesive properties, colonized the surface of the cereal kernel cake and pine nuts to form aggregates, which increases their resistance to adverse environmental factors. It was revealed that the adhesion processes and the cohesive effect on the metabolism of bifidobacteria and increases their viability at low pH.

Keywords: adhesion, cohesion, pine nut kernel cake, oat flour, barley flour

Введение

Известно, что пребиотики стимулируют активность бифидобактерий и способствуют адгезии лакто- и бифидобактерий на внутренней поверхности кишечника.

3d International Scientific-Practical Conference on the Humanities and the Natural Science 2015

Пребиотики устойчивы к действию пищеварительных соков и ферментов, благодаря чему они не адсорбируются и не гидролизуются в верхнем отделе желудочно-кишечного тракта, доходя без изменений до места обитания лакто- и бифидобактерий. Пребиотики из группы пищевых волокон быстрее и в большем количестве доставляют пробиотические бактерии в нижние отделы кишечника [1, 2, 3].

Ценным источником пищевых волокон являются жмых кедрового ореха и злаковые культуры. Повышенное содержание в кедровом жмыхе белковых фракций, микроэлементов, жира, незаменимых аминокислот и витаминов свидетельствует о высоком пробиотическом потенциале [4, 5].

Одной из проблем использования пробиотических препаратов является потеря бифидобактериями жизнеспособности в процессе хранения при воздействии неблагоприятных технологических факторов или в агрессивной среде желудка. Поэтому важной биотехнологической задачей, имеющей коммерческую значимость, является повышение устойчивости бифидобактерий в пробиотических концентратах.

Известны эффективные лечебные препараты, созданные путем адсорбции молочнокислых бактерий на различных биоволокнах, повышающих их жизнеспособность [6-10].

В связи с этим нами выдвинута гипотеза о возможности повышения стрессоустойчивости бифидобактерий путем непосредственного культивирования в питательной среде с субстратом – адсорбентом, в качестве которого могут служить злаковые культуры и жмых ядра кедрового ореха, обладающие пробиотическими свойствами.

Целью данной работы является исследование влияния пребиотиков на метаболизм бифидобактерий *Bifidobacterium longum* DK-100 и *Bifidobacterium bifidum* 8₃.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили культуры бифидобактерий: штаммы *Bifidobacterium longum* DK-100, *Bifidobacterium bifidum* 8₃, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика» (Москва), активизированные биотехнологическим методом, разработанным в Восточно-Сибирском государственном университете технологий и управления [11]. В исследованиях использовали растительные добавки: из злаковых культур (ячменная мука по ТУ 9293-002-43175543-03, овсяная мука по ГОСТ 27168-86) и жмых ядра кедрового ореха по ТУ 9146-001-53163736-06. Культивирование бифидобактерий

3d International Scientific-Practical Conference on the Humanities and the Natural Science 2015

осуществляли на ранее разработанной нами сывороточной среде с добавлением ростовых факторов. В качестве инокулята использовали суточную культуру бифидобактерий, выращенную на обезжиренном молоке. Пребиотики в питательную среду вносили вместо агара, который входил в состав питательной среды. Количественный учет бифидобактерий определяли по МУК 4.2.999-00. Адгезивные свойства изучали на формализированных эритроцитах по развернутому методу В.И. Брилис, об адгезивности штамма судили по индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ) [12], антимугагенную активность - по тесту Эймса [13]. Микрокартина бифидобактерий получена с использованием микроскопа марки МИКМЕД-6 (видимое увеличение 1000-кратное). В таблицах обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований изучено влияние ячменной, овсяной муки и жмыха ядра кедрового ореха на биохимическую активность ранее не исследованных штаммов бифидобактерий *B. bifidum* 8; и *B. longum* DK-100.

При подборе условий культивирования бифидобактерий для получения пробиотических концентратов руководствовались следующими требованиями: низкая себестоимость процесса; высокий титр бифидобактерий в стационарной фазе роста; высокая устойчивость при неблагоприятных факторах внешней среды.

В результате проведенных исследований с учетом количества жизнеспособных клеток бифидобактерий и органолептических свойств, были выбраны оптимальные дозы вносимых компонентов: для жмыха ядра кедрового ореха – 2%, для ячменной муки – 1,5 %, для овсяной муки – 1%. В дальнейших исследованиях выбранные дозы использовали при изучении биохимической активности бифидобактерий. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Данные, представленные на рисунке 1, показывают, что внесение растительных компонентов ускоряет рост бифидобактерий *B. longum* DK-100.

Анализ динамики роста бифидобактерий показывает, что при внесении ячменной и овсяной муки количество жизнеспособных клеток бифидобактерий через 18 ч достигает 10^{11} КОЕ/см³, тогда как в контроле такое значение наблюдается через 24 ч культивирования. Следует отметить, что при внесении жмыха ядра кедрового ореха стационарная фаза

**3d International Scientific-Practical Conference
on the Humanities and the Natural Science 2015**

наступает через 18 ч культивирования, при этом количество жизнеспособных клеток бифидобактерий составляет 10^{12} КОЕ/см³, что свидетельствует о более высоких пребиотических свойствах (рис. 1). Такая же динамика отмечена при культивировании бифидобактерий *B. bifidum* 8₃.

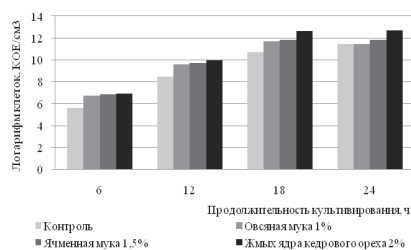


Рисунок 1 – Динамика роста *B. longum* ДК-100

В результате проведенных исследований выбраны оптимальные дозы пребиотиков, обеспечивающие активный рост бифидобактерий.

Адгезия к слизи, гликопротеинам и эпителиальным клеткам, а также колонизация в желудочно-кишечном тракте человека являются основополагающими характеристиками микроорганизмов, обладающих пребиотическими свойствами.

Злаковые культуры и жмыха ядра кедрового ореха содержат высокое количество растворимых и нерастворимых пищевых волокон и могут адсорбировать и колонизировать бифидобактерии в процессе культивирования. В связи с этим в дальнейших исследованиях изучали адгезивные свойства бифидобактерий при их культивировании на питательной среде с внесением пребиотиков. Адгезию бифидобактерии оценивали по среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту участия эритроцитов (КУЭ), индексу адгезивности микроорганизмов (ИАМ). Микроорганизмы считаются высокоадгезивными при ИАМ более 4,0; среднеадгезивными – при ИАМ от 2,51 - 4,0; малоадгезивными – при ИАМ от 1,76 - 2,54. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Результаты исследований, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что исследуемые штаммы

**3d International Scientific-Practical Conference
on the Humanities and the Natural Science 2015**

бифидобактерий в присутствии пребиотиков обладают более высокими адгезивными свойствами. Вероятно, высокомолекулярные полисахариды, содержащиеся в исследуемых растительных добавках, повышают адгезивные свойства бифидобактерий.

Таблица 1 - Влияние пребиотиков на адгезивные свойства бифидобактерий *B. longum* DK-100 и *B. bifidum* 8₃

Наименование штамма микроорганизмов	СПА	КУЭ, %	ИАМ	Адгезивность
<i>B. longum</i> DK-100				
1. Контроль	4,2	84	4,76	Высокоадгезивный
2. Овсяная мука 1,0 %	4,3	83	5,18	
3. Ячменная мука 1,5 %	4,5	85	5,29	
4. Жмых ядра кедрового ореха 2,0 %	4,4	86	5,11	
<i>B. bifidum</i> 8₃				
1. Контроль	3,6	82	4,12	Высокоадгезивный
2. Овсяная мука 1,0 %	4,3	85	5,05	
3. Ячменная мука 1,5 %	4,4	85	5,17	
4. Жмых ядра кедрового ореха 2,0 %	4,6	88	5,22	

К механизмам, гарантирующим стабильность микробного консорциума, кроме адгезии относится также когезия (агрегация клеток). В литературных источниках недостаточно сведений о межклеточных контактах микроорганизмов, отражающих закономерности развития микробных популяций как саморегулирующих многоклеточных систем.

Дальнейшие исследования посвящены изучению влияния пребиотиков на когезию бифидобактерий.

Результаты исследований представлены на рисунке 2.

Из представленного выше рисунка 2 б-г видно, что внесение пищевых волокон приводит к агрегации клеток бифидобактерий и формированию микроколоний. Согласно современным данным, механизм позитивного эффекта пищевых волокон, растворимых β-глюканов овса и ячменя и нерастворимых высокомолекулярных полисахаридов, заключается в создании дополнительной площади для фиксации бифидобактерий и биотрансформации пищевых волокон с образованием доступных источников углерода и энергии. Вероятно, что адсорбция и иммобилизация на биоволокнах

**3d International Scientific-Practical Conference
on the Humanities and the Natural Science 2015**

защищают клетки бифидобактерий при стрессовых воздействиях.

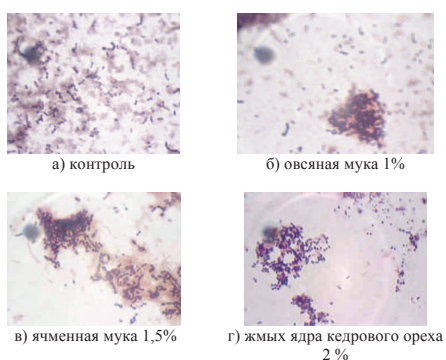


Рисунок 2 – Микрокартина бифидобактерий *B. longum* DK-100 (видимое увеличение микроскопа 1000-кратное)

В результате проведенных исследований установлено, что исследуемые штаммы бифидобактерий обладают высокими адгезивными свойствами, колонизируются на поверхности пищевых волокон злаковых культур и жмыха ядра кедрового ореха с образованием агрегатов, что повышает их устойчивость к неблагоприятным факторам среды.

Дальнейшие исследования были посвящены изучению устойчивости бифидобактерий к низким значениям pH. Для этого проводили модельные опыты. Результаты представлены на рисунке 3.

Как видно из рисунка 3, внесение пребиотиков в питательную среду повышают устойчивость бифидобактерий при снижении pH в сравнении с контролем. Наиболее высокой устойчивостью к низким значениям pH среды характеризуются бифидобактерии выращенные на среде со жмыхом ядра кедрового ореха. Так, например, при pH=5 выживаемость бифидобактерий составляет 96,6 %, тогда как в контроле без добавления жмыха ядра кедрового ореха количество жизнеспособных клеток снижается до 83%. Отмечена достаточно высокая выживаемость бифидобактерий на среде с

**3d International Scientific-Practical Conference
on the Humanities and the Natural Science 2015**

пребиотиками в сравнении с контролем при pH=3. При этом количество жизнеспособных клеток на питательной среде со жмыхом ядра кедрового ореха составляет 77,2%, со злаковыми культурами находится в пределах (70,3-71)%, тогда как в контроле – 60%.

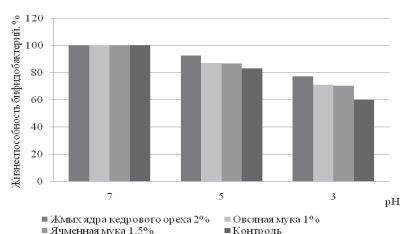


Рисунок 3 – Влияние различных значений pH на выживаемость клеток *B. longum* DK-100

Полученные результаты подтверждают, что процессы адгезии и когезии влияют на метаболизм бифидобактерий и повышают их жизнеспособность при низких значениях pH среды.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что внесение пребиотиков в питательную среду не только стимулирует рост бифидобактерий, но и повышает их устойчивость при экстремальных условиях культивирования.

Известно, что бактерии эволюционно наиболее древние существа, постоянно подвергающиеся мутагенным и инактивирующим факторам среды. Это обстоятельство предполагает, что бактерии должны обладать надежными средствами защиты для сохранения стабильности своего генома. В настоящее время доказано, что бифидобактерии обладают антимуtagenными свойствами, которые зависят от различных факторов [14]. Одним из факторов, влияющих на антимуtagenную активность пробиотических микроорганизмов, является состав питательных сред.

В связи с этим нами изучено влияние пребиотиков на антимуtagenные свойства *B. bifidum* 8₃ и *B. longum* DK-100. Полученные результаты исследований представлены в таблице 2.

**3d International Scientific-Practical Conference
on the Humanities and the Natural Science 2015**

Таблица 2 – Влияние пребиотиков на антимутагенную активность бифидобактерий

Наименование штамма микроорганизмов	Среднее число ревертантов на чашку	Ингибирование, %
B. bifidum 83:		
1. Контроль	751	40
2. Жмых ядра кедрового ореха 2,0%	648	56
3. Ячменная мука 1,5%	606	54,4
4. Овсяной муки 1,0 %	603	51,3
B. longum DK-100:		
1. Контроль	1013	43
2. Жмых ядра кедрового ореха 2,0%	915	54,6
3. Ячменная мука 1,5%	982	51,3
4. Овсяная мука 1%	752	54

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что культивирование бифидобактерий на питательной среде с внесением пребиотиков повышает антимутагенные свойства бифидобактерий. Это, вероятно, связано с биотрансформацией сложных углеводов и изменением метаболизма бифидобактерий, что способствует более высокому синтезу антимутагенных веществ.

Следует отметить, что полученные нами результаты согласуются с литературными данными о высокой антиоксидантной активности β -глюкана и нерастворимых пищевых волокон, содержащихся в пребиотиках и повышающих антимутагенные свойства бифидобактерий.

Выводы

1. Подобраны условия культивирования, обеспечивающие высокую биохимическую активность бифидобактерий.

2. Установлено, что бифидобактерии фиксируются на поверхности биоволокон с образованием агрегатов, что повышает их устойчивость к неблагоприятным факторам среды.

3. Отмечено, что процессы адгезии и когезии влияют на метаболизм бифидобактерий и повышают их устойчивость к низким значениям pH.

4. Биотрансформация сложных углеводов субстрата способствует более высокому синтезу антимутагенных веществ

**3d International Scientific-Practical Conference
on the Humanities and the Natural Science 2015**

и повышает холестеринметаболизирующую активность бифидобактерий.

References

- [1] Pogozheva A.V. Dietary fiber and preventive nutrition // Nutrition. - 1998. - № 1. - P. 39-42
- [2] Sheveleva S.A. The role of probiotic food products // Quality of life. Medicine. Functional food. - 2006. - P. 2-3.
- [3] Shenderov B.A. Probiotics, prebiotics and synbiotics. General and selected sections of the problem // Food Ingredients. Raw materials and additives. - 2005. - № 2. - P. 23-26.
- [4] Khamagaeva I.S., Kaluga Y.G. Influence of vegetable raw materials for consumer properties of bioproducts // Dairy industry. - 2009. - №7. - P. 38-39.
- [5] Khamagaeva I.S., Hanturgaev A.G., Shiretorova V.G. Investigation of the process of fermentation of cedar meal bifidobacteria // Storage and processing of agricultural raw materials. - 2011. - №10. - P. 60-63.
- [6] Bill S. From Prebiotic concept to prebiotic effect – metabolic. Health benefits. ILSI Europe Prebiotic Taskforce report: Proc. of 8th meeting of the ISSAP. Barcelona. –2010. – P. 38-42.
- [7] De Preter V. Baseline microbiota activity and initial bifidobacteria counts influence responses to prebiotic dosing in healthy subjects / V. de Preter, T.Vanhoutte, G. Huys, et. al.// Aliment Pharmacol Ther. – 2008. – № 27. – P.504-513.
- [8] L.-G. Ooi, R. Bhat, A. Rosma, K.-H. Yuen, and M.-T. Liong. A synbiotic containing Lactobacillus acidophilus CHO-220 and inulin improves irregularity of red blood cells // Journal of Dairy Science. Vol. 93. No. 10. – 2010. – P. 4535-4544.
- [9] Ramnani P., E. Gaudier, M. Bingham, P. van Bruggen, K. M. Tuohy and G.R. Gibson Prebiotic effect of fruit and vegetable shots containing Jerusalem artichoke inulin a human intervention study /British Journal of Nutrition, 2010. – № 104. – P. 233-240.
- [10] Rokka S. Protecting probiotic bacteria microencapsulation: challenges for industrial applications / S. Rocca, P. Rantamaki // Eur. Food. Res. Technol. – 2010., V.11. –№2. – P. 1-12.
- [11] Khamagaeva I.S. Scientific bases of biotechnology of dairy products for children and dietary: monograph. - Ulan-Ude. -2005. - 279 p.