

УДК 563.6.086.83

UDC 563.6.086.83

СРАВНЕНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ЛАКТОЗЫ

COMPARISON OF PREBIOTIC ACTIVITY OF CHITOSAN AND LACTOSE DERIVATIVES

Бучахчян Жозефина Вартановна
инженер

Buchakhchyan Zhosefina Vartanovna
engineer

Алиева Людмила Руслановна
к.т.н., доцент

Alieva Ludmila Ruslanovna
Cand.Tech.Sci., associate professor

Куликова Ирина Кирилловна
к.т.н., доцент

Kulikova Irina Kirillovna
Cand.Tech.Sci., associate professor

Евдокимов Иван Алексеевич
д.т.н., профессор
Северо-Кавказский государственный технический университет, Ставрополь, Россия

Evdokimov Ivan Alekseevich
Dr.Sci.Tech., professor
North-Caucasus State Technical University, Stavropol, Russia

Каледина Марина Васильевна
к.т.н., старший преподаватель
Белгородская государственная сельскохозяйственная академия, Белгород Россия

Kaledina Marina Vasilevna
Cand.Tech.Sci, senior lecturer
Belgorod state agricultural academy, Belgorod, Russia

Жигулина Олеся Владимировна
менеджер по продажам
ООО «Банг и Бонсомер», *Ставрополь, Россия*

Zhigulina Olesya Vladimirovna
sales manager
«Bang & Bonsomer», Stavropol, Russia

Проведена оценка пребиотической активности лактитола и сукцината хитозана методом ферментации *in vitro*. Четыре субстрата (рафтилоза, лактитол, целлюлоза, сукцинат хитозана) были исследованы *in vitro* с помощью метода Batch culture fermentations (ферментация бактерий в одном цикле) путем сбраживания смешанной фекально бактериальной микрофлорой. Пребиотическая активность определялась по изменению количественного состава микроорганизмов. В качестве выходных показателей выбраны: максимальная скорость роста, динамика усвоения субстрата, накопление лактата и короткоцепочных жирных кислот. Для оценки *in vitro* веществ, исследуемых в качестве новых пребиотиков, в данной работе использована теория определения степени пребиотического эффекта (МРЕ)

This research is aimed to evaluate the prebiotic potential of lactitol and chitosan succinate using the *in vitro* fermentation model. Four substrates (raftilos, lactitol, cellulose, chitosan succinate) were tested *in vitro*, using Batch culture fermentation method with fermentation of mixed human faecal microflora. Measurement of prebiotic effect (MPE) values were generated comparing bacterial changes through determination of maximum growth rates of groups, rate of substrate assimilation and production of lactate and short chain fatty acids. The present study applied the MPE theory to evaluate the *in vitro* prebiotic potential of substrates as novel prebiotics

Ключевые слова: ПРЕБИОТИК, ЛАКТИТОЛ, СУКЦИНАТ ХИТОЗАНА

Keywords: PREBIOTIC, LACTITOL, CHITOSAN SUCCINATE

Взаимное влияние микро- и макроорганизмов носят сложный характер, выраженный на метаболическом, регуляторном, внутриклеточном и генетическом уровне [7]. Поэтому вопросы изучения микроэкологии человека на сегодняшний день являются актуальными, а

поиск средств нормализации микробиоценоза приобрел еще большую интенсивность. Действие подобных средств направлено на кишечный микробиоценоз (про-, пре-, син-, симбиотическая терапия), но, как правило, значительную роль отводят пребиотической терапии [2].

Концепция пребиотиков относительно молода и продолжает интенсивно развиваться [4]. В первую очередь, она подразумевает смену представления о доминировании бифидо- и лактогенных эффектов и распространение оценки пребиотического воздействия с позиций функционирования микробного комплекса кишечника в целом.

В соответствии с существующими критериями [12], к пребиотикам могут быть отнесены вещества, обладающие устойчивостью к желудочному соку, неперевариваемые ферментами желудочно-кишечного тракта, не всасывающиеся в нем, и избирательно стимулирующие размножение нормальной микрофлоры и/или меняющие ее функциональную активность, вследствие чего отмечается улучшение самочувствия и состояния здоровья человека.

Чаще всего пребиотиками являются различные олигосахара, остатки молекул, в которых соединены между собой β -гликозидными связями. Ферментные системы человека не содержат β -гликозидаз, поэтому пребиотики гидролизуются только нормальной микрофлорой кишечника. Наиболее известные из них: инулин и его производные, в частности, рафтилоза, олигомеры фукозы и другие гликопротеины и т.д.[3]. Кроме того, к веществам, обладающим пребиотическим потенциалом, относят и некоторые сахарные спирты.

Особое место отводится лактозе и ее производным. Лактоза или молочный сахар, дисахарид, образованный остатками D-галактозы и D-глюкозы, была найдена только у млекопитающих и при нормальных условиях содержится в молоке, являясь главным его углеводом. Лактоза

достаточно распространенный пребиотик, избирательно стимулирующий рост и активность кисломолочной микрофлоры кишечника. Производные лактозы также обладают пребиотическим потенциалом. Так лактулоза (4-*O*- β -галактопиранозил-*D*-фруктоза), представляющая собой дисахарид, в котором глюкозная часть лактозы изомеризована до фруктозы, обладает высоким пребиотическим потенциалом и уже несколько десятков лет используется при лечении дисбактериозов [6]. Относительно новые производные лактозы – галактоолигосахариды, в состав которых входят несколько галактопиранозных единиц, связанных β -(1 \rightarrow 6) гликозидной связью с последним глюкопиранозным остатком посредством α -(1 \rightarrow 4) гликозидной связи. Пребиотические свойства галактоолигосахаридов уже подтверждены исследованиями [5].

Хитозан – природный катионный аминополисахарид, является производным хитина входящего в структуру опорных, покровных тканей и внешнего скелета живых низших растений и животных [1]. Он издавна употреблялся в пищу, например, в составе сыров, пива, изделий из раков, крабов и грибов. Хитозан является эффективным пребиотиком [15]: он подавляет рост и развитие патогенных бактерий и грибов в кишечнике (*E.coli*, стафилококки, сальмонеллы, и др.) и препятствует появлению дисбактериоза, который обычно сопровождает микотоксикозы.

Науке также известны производные хитозана – олигосахариды хитозана (сукцинат, аскорбат, лактат и др.) . Они отличаются от исходного полимера более низкими значениями молекулярных масс – от 300 до 3000 Да и являются результатом ферментативного либо кислотного гидролиза последнего.

Установлено, что некоторые производные хитозана, его олигомеры, стимулируют рост молочнокислых бактерий. Так, например, введение в питательную среду 0,01% раствора аскорбата олигосахаридов хитозана

стимулирует в 10 раз интенсивность размножения и рост колоний *Bifidobacterium bifidum* и некоторых видов рода *Lactobacillus* (*L. Brevis*, *L. Casei*, *L. Acidophilus*) [14].

В настоящем исследовании было проведено сравнение пребиотического потенциала двух производных вышеупомянутых сахаров: сукцината хитозана и лактитола

В качестве положительного контроля в эксперименте был использован фруктоолигосахарид – раффиноза, в качестве отрицательного контроля – целлюлоза.

Оценка пребиотической активности различных субстратов (углеводов, полиолов, полисахаридов, молочных продуктов) была проведена при изучении процесса ферментации *in vitro* [8,9]. Эти исследования характеризуют пребиотический потенциал веществ, включенных в качестве питательных компонентов в композицию питательной среды, по отношению к полезной и вредной микрофлоре. Наиболее широко распространен метод Batch Culture Fermentation (ферментация бактерий в одном цикле), где происходит анаэробное сбраживание субстрата смешанной бактериальной микрофлорой, в частности фекальной микрофлорой человека. Метод относительно прост, позволяет в короткие сроки определить пребиотическую ценность вещества, дает возможность создания и/или регулирования определенных условий, которые невозможны в исследованиях *in vivo*. Оценка пребиотической активности осуществляется по изменению количественного состава микрофлоры методом гибридизации *in situ* (FISH – fluorescent *in situ* hybridization).

Пребиотический индекс (PI), определяют по численному изменению четырех бактериальных групп (бифидобактерий, лактобацилл, клостридий и бактероидов) [12]. Однако учитывая данные о способности

инулина и фруктоолигосахаридов к сбраживанию микроорганизмами, отличными от бифидо- и лактобактерий, следует, по-видимому, учитывать способность пребиотиков не к селективной, а к преимущественной стимуляции роста бифидобактерий и лактобацилл [10,11]. Кроме того, положительное действие пребиотиков – это не только их способность оказывать влияние на количественные показатели, но и на активность этой микрофлоры [7].

Для интегральной оценки состояния сахаролитической и протеолитической микрофлоры используются короткоцепочные жирные кислоты (КЦЖК), являющиеся конечными продуктами метаболизма.

В качестве количественного показателя пребиотической активности выбрана степень пребиотического эффекта (МРЕ).

Последовательность расчета МРЕ приведены ниже.

1. Степень сбраживания субстрата определяется исходя из следующей формуле:

$$S_t = S_0 - Ar \cdot t, \quad (1)$$

где

S_t – концентрация вещества по истечению временного интервала t (час), $г^{-1}$;

S_0 – начальная концентрация субстрата, $г^{-1}$;

Ar – коэффициент сбраживания ($час^{-1}$).

Максимальный Ar вычисляется в экспоненциальной фазе бактериального роста.

Изменение количества бактерий представлено уравнением:

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu_t, \quad (2)$$

где

N – число бактерий после временного интервала t (час);

N_0 – начальное число бактерий;

μ - градиент роста (час⁻¹).

В течение экспоненциальной фазы нутриенты находятся в избытке и рост бактерий максимальный (μ_{\max}). Таким образом, μ_{\max} описывает меру бактериального роста при специфических условиях и является различным для разных бактерий и субстратов.

Изменение количества бактерий может быть вычислено через уравнение пребиотического индекса, выраженного через μ_{\max} :

$$PI_m = \mu_{\max} Vif + \mu_{\max} Lac + \mu_{\max} Erec - \mu_{\max} Bac - \mu_{\max} Clos - \mu_{\max} Ec + \mu_{\max} SRB \quad (3)$$

где

μ_{\max} – максимальный коэффициент роста бактерий в экспоненциальной фазе;

Vif – количество клеток бифидобактерий;

Lac – количество клеток лактобактерий;

$Erec$ – количество клеток эубактерий;

Bac – количество клеток бактериоидов;

$Clos$ – количество клеток клостридий;

Ec – количество клеток кишечной палочки;

SRB – количество клеток сульфит – редуцирующих бактерий.

Максимальное количество КЦЖК обычно приходится на конец экспоненциальной фазы роста бактерий и вычисляется по формуле:

$$T_{\text{КЦЖК}} = A + B + P + L \quad (4)$$

где

A – масса уксусной кислоты, г⁻¹;

B – масса масляной кислоты, $г^{-1}$;

P – масса пропионовой кислоты, $г^{-1}$;

L – масса молочной кислоты, $г^{-1}$.

Определение суммы уксусной, молочной, пропионовой и масляных кислот в одной и той же временной точке для разных субстратов позволяет сравнить их пребиотическое действие. Отношение концентрации молочной кислоты к общей сумме КЦЖК дает качественную оценку субстрату, т.к. молочная кислота рассматривается как основной метаболит сахаролитических бактерий:

$$\text{Ratio} = dL/dT_{\text{КЦЖК}} \quad (5)$$

где

d – разница между начальным количеством кислоты и количеством кислоты в контрольной точке.

Для вычисления степени пребиотического эффекта, используется следующая формула:

$$\text{MPE} = 0,5 \sqrt{x^2 y^2 + x^2 z^2 + y^2 z^2} \quad (6)$$

x – коэффициент сбраживания (Ar);

y – пребиотический индекс (PI_{max});

z – соотношение молочной кислоты к общему количеству КЦЖК (Ratio).

Результаты подсчета основных бактериальных групп посредством гибридизации *in situ* представлены на Рисунке 1, а также в Таблице 1.

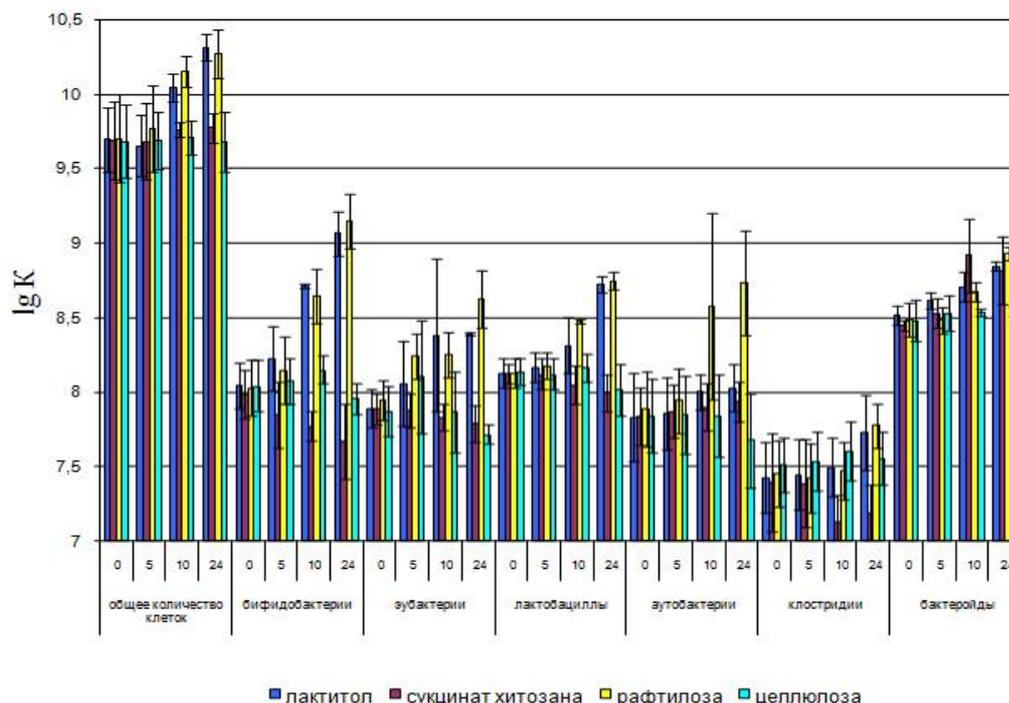


Рисунок 1. Диаграмма изменений количества клеток бактерий (lgK) в питательной среде через 0, 5, 10 и 24 часа ферментации субстратов

Анализ полученных результатов показал, что при ферментации лактитола количество бифидобактерий и лактобактерий возрастает, при этом в образцах незначительно возрастает количество клеток бактериоидов и кловстридий. При ферментации сукцината олигосахарид хитозана наблюдалась тенденция к снижению числа клеток бактерий практически для всех исследуемых бактериальных групп. Количество бактерий группы кишечной палочки и сульфит-снижающих бактерии для всех субстратов было ниже разрешающей способности метода FISH ($<10^6$) и при вычислении пребиотического индекса и MPE не учитывалось.

Максимальная концентрация молочной кислоты для всех субстратов наблюдалась через 8 часов ферментации, а через 10 часов молочная кислота не обнаруживалась. Этот факт можно объяснить тем, что фекальная микробиота способна преобразовывать молочнокислую кислоту

до конечных продуктов метаболизма, таких как масляная, пропионовая и уксусные кислоты [12].

Концентрация остальных КЦКЖ в течение всего времени ферментации для рафтилозы и лактитола увеличивалась и составляла максимум через 24 часа (Рисунок 2). При этом концентрация масляной кислоты в образцах с лактитолом было несколько выше, чем при сбраживании рафтилозы. Можно предположить, что излишнее количество молочной кислоты при ферментации легко сбраживающихся фруктоолигосахаридов, таких как рафтилоза, способно влиять на образование масляной кислоты [10]. Для сукцината хитозана и целлюлозы динамика изменения концентрации КЦКЖ была практически одинакова.

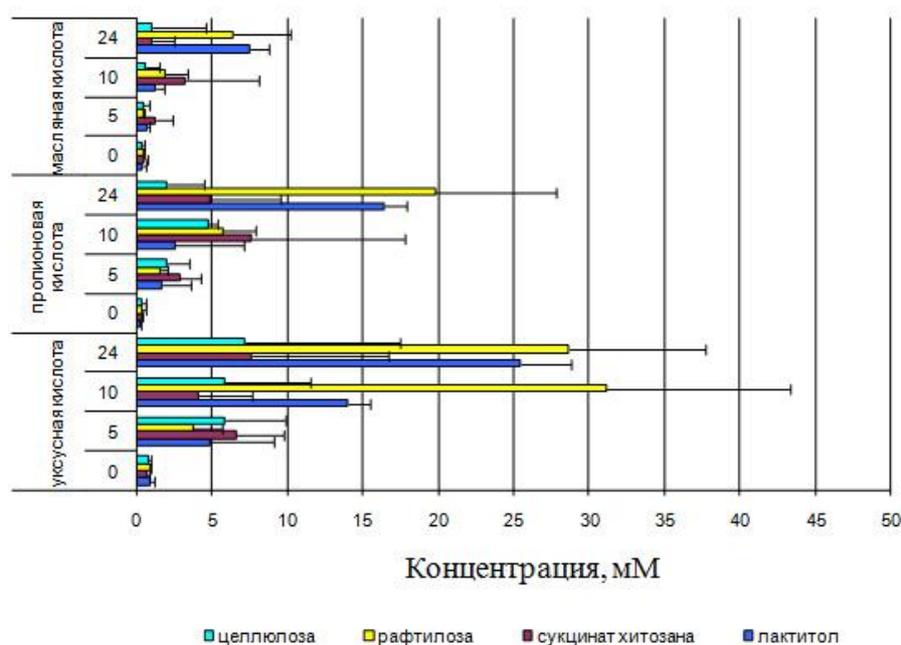


Рисунок 2. Диаграмма концентраций КЦКЖ в течение процесса ферментации

Согласно, описанной выше методике, нами был проведен расчет пребиотического индекса и пребиотической активности исследуемых веществ, представленный в Таблице 2:

Таблица 2 – ПРЕБИОТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС (PI_m) И СТЕПЕНЬ ПРЕБИОТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА (MPE) СУБСТРАТОВ

Субстрат	PI_m	MPE
Лактитол	1,74	0,72
Сукцинат хитозана	0 14	0,01
Рафтилоза	1,91	0,96
Целлюлоза	-0,59	0,01

Значение MPE, характеризующее наличие оптимального пребиотического эффекта субстрата, варьируется от 0,4 до 1,4 [13]. Полученные результаты и расчет показал, что из исследуемых субстратов лактитол продемонстрировал выраженное пребиотическое действие на микрофлору желудочно-кишечного тракта.

Литература

1. Алиева, Л. Р. Разработка технологии напитков из молочной сыворотки с применением хитозана [Текст] : / Диссертация на соискание ученой степени к. т. н.: 05.18.04: защищена 25.06.2003 / Ставрополь: СевКавГТУ, 2003.-189 с.
2. Гриневич В.Б., Захаренко С.М., Сас Е.И. Пребиотики как основа микробиоценоз-ориентированной терапии / Гриневич В.Б., Захаренко С.М., Сас Е.И.// Лечащий врач. – 2008. – № 10. – с. 21-22
3. Н. Ю. Каширская. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры / Русский медицинский журнал, 2000, №13-14
4. Ким В.В. Зарубежный опыт использования пребиотиков [Текст] / В.В. Ким, Д.В. Харитонов, Э.Г. Шубакова // Молочная промышленность. – 2001. – № 2. – с. 31-32.
5. Лодыгин А.Д., Родная А.Б., Евдокимов И.А., Рябцева С.А. Храмцов А.Г. Научно-техническое обоснование управляемого синтеза галактоолигосахаридов из лактозы молочного сырья //Материалы XXXV11 научно-технической конференции СевКавГТУ за 2007 г. Т.1.- Ставрополь:СевКавГТУ,;2008.- С.100., 0.1 п.л.
6. Рябцева С.А., Технология лактулозы. – М.: ДеЛи принт, 2003.– 232 стр.
7. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1. Микрофлора человека и животных и ее функции. М., 1998. 288 с.
8. Gibson, G.R. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project/ Gibson, G.R., Berry-Ottaway, P., Rastall, R.A. // Br. J. Nutr., 2002. – Vol. 87. – p. 203-211
9. Kleessen B., Hartman L., Blaut M. Oligofructose and long chain inulin influence the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora// Br J Nutr. 2001; 86:291–300.
10. Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. Br J Nutr 2002;87:S193–7.

11. Roberfroid M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients// J. Nutr., 2007; 137 (11):2493 –2502.
12. Roberfroid M. Prebiotics: The Concept Revisited// J. Nutr. 2007, 137 (3):830–837
13. Vulevic, J. Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides / Vulevic, J., Rastall, R.A., Gibson, G.R. // FEMS Microbiol Lett. – 2004 – vol. 236 – p.153-159.
14. <http://www.oligopharm.org/>
15. <http://www.provet.ru/ru/aviculture/item/29-feed-additives/99-page>

Приложение 1

Таблица 1 – ПОДСЧЕТ ОСНОВНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГРУПП ЧЕРЕЗ 0, 5, 10 И 24 ЧАСА
ФЕРМЕНТАЦИИ СУБСТРАТОВ

Субстрат	Время	Общее количество микроорганизмов (Dарі)	Бифидо-бактерии (Bif164)	Эубактерии (Erec303)	Лакто-бактерии (Lab158)	Аутобактерии (Ato)	Клостридии (Chis)	Бактероиды (Bac)
Лактитол	0	9,70±0,22	8,04±0,15	7,89±0,13	8,13±0,10	7,83±0,30	7,42±0,24	8,52±0,06
	5	9,66±0,21	8,23±0,21	8,06±0,28	8,17±0,10	7,86±0,24	7,44±0,23	8,61±0,05
	10	10,01±0,09	8,71±0,03	8,38±0,51	8,32±0,18	8,00±0,12	7,50±0,20	8,71±0,10
	24	10,31±0,09	9,00±0,15	8,39±0,03	8,52±0,05	8,03±0,16	7,52±0,25	8,75±0,03
Сукцинат хитозана	0	9,68±0,29	9,72±0,16	7,88±0,10	8,12±0,06	7,82±0,19	7,39±0,32	8,44±0,03
	5	9,68±0,25	7,98±0,22	7,87±0,11	8,11±0,10	7,83±0,17	7,38±0,29	8,53±0,10
	10	9,76±0,28	7,84±0,1	7,82±0,08	8,04±0,12	7,84±0,15	7,12±0,18	8,91±0,24
	24	9,77±0,19	7,77±0,24	7,78±0,12	7,99±0,12	7,93±0,13	7,18±0,19	8,81±0,22
Раффилоза	0	9,71±0,30	8,03±0,19	7,94±0,13	8,13±0,10	7,89±0,25	7,45±0,22	8,49±0,12
	5	9,77±0,29	8,15±0,23	8,24±0,16	8,17±0,09	7,94±0,22	7,42±0,23	8,48±0,09
	10	10,15±0,11	8,64±0,18	8,25±0,15	8,48±0,03	8,58±0,62	7,48±0,19	8,67±0,06
	24	10,37±0,16	9,25±0,18	8,63±0,19	8,75±0,06	8,73±0,35	7,78±0,15	8,94±0,04
Целлюлоза	0	9,68±0,24	8,04±0,17	7,87±0,17	8,14±0,09	7,84±0,25	7,51±0,18	8,48±0,13
	5	9,71±0,11	8,15±0,09	7,86±0,27	8,16±0,09	7,84±0,28	7,60±0,20	8,54±0,02
	10	9,71±0,11	8,15±0,09	7,86±0,27	8,16±0,09	7,84±0,28	7,60±0,20	8,54±0,02
	24	9,68±0,20	7,95±0,10	7,71±0,06	8,01±0,17	7,68±0,31	7,56±0,18	8,57±0,03