

УДК 668.393.5

Е.Л. Конева, Н.М. Аминина, Е.В. Якуш*

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4

БИФИДОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Установлена пребиотическая активность биогеля из бурых водорослей в отношении *Bifidobacterium bifidum*. Показано, что бифидобактерии могут использовать альгинат натрия в качестве единственного источника углерода и энергии.

Ключевые слова: биогель из бурых водорослей, альгинат натрия, пребиотики, пробиотики, бифидогенная активность.

Koneva E.L., Aminina N.M., Yakush E.V. Bifidogenic properties of kelp products // Izv. TINRO. — 2010. — Vol. 161. — P. 303–308.

Prebiotics activity toward *Bifidobacterium bifidum* is determined for biogel from kelps. In the biogel, sodium alginate is defined as a sole source of carbon and energy for the bifidobacteria.

Key words: biogel, kelp, sodium alginate, prebiotic, probiotic, bifidogenic activity.

Введение

Пребиотики являются уникальным инструментом для создания кисломолочных пробиотических продуктов с регулируемым количественным составом бифидобактерий. По мнению большинства исследователей (Dubep, Mistre, 1996; Шендеров, 2001; Goderska et al., 2008; Macfarlane et al., 2008), пребиотическими свойствами обладает довольно широкий спектр веществ: олигосахариды (галакто-, фрукто-, изомальтоолигосахариды), полисахариды, сахарные спирты, биологически активные иммунные белки (лактоглобулин, гликопептиды), отдельные витамины и их производные (пантотеновая кислота, β -каротин).

Потребность промышленности в пребиотиках натурального происхождения для производства пробиотических продуктов, содержащих высокий титр бифидобактерий, полностью не удовлетворена. Новым направлением является получение пробиотических продуктов питания с использованием сырья морского происхождения. Ранее было показано (Akiyama et al., 1992), что деполимеризованные альгинаты (олигосахариды альгината натрия) могут применяться в качестве субстрата для роста бифидобактерий, а также выяснено (Wang et al., 2006), что олигосахариды альгината натрия стимулируют рост *Bifidobacterium bifidum* и *B. longum* как *in vivo*, так и *in vitro* более значительно, чем фруктоолигосахари-

* Конева Елена Леонидовна, кандидат технических наук, научный сотрудник, e-mail: koneva@tinro.ru; Аминина Наталья Михайловна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, e-mail: aminina@tinro.ru; Якуш Евгений Валентинович, кандидат химических наук, заместитель генерального директора, e-mail: evyakush@tinro.ru.

ды. Более того, под их действием наблюдается снижение численности энтеробактерий и энтерококков в желудочно-кишечном тракте человека. Таким же действием *in vivo* обладает и продукт переработки бурых водорослей, содержащий альгинат натрия (Аминина, 2006). Получены данные (Аминина и др., 2006), что биогель из бурых водорослей, содержащий альгинат натрия, активизирует развитие бифидобактерий в процессе молочнокислого брожения. В то же время в литературе не встречаются сведения о способности бифидобактерий расщеплять высокомолекулярные альгинаты.

Целью настоящей работы являлось исследование бифидогенных свойств биогеля из бурых водорослей, а также альгината натрия в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований использовали культуру *B. bifidum*, полученную из коллекции микроорганизмов Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (г. Москва); биогель из бурых водорослей, соответствующий требованиям ТУ 9284-175-00472012-2007; альгинат натрия, полученный из ламинарии японской (*Laminaria japonica* Aresch.), соответствующий ТУ 15-544-83. Молекулярная масса альгината натрия — 85,7 кДа, вязкость 1 %-ного раствора альгината натрия — 4,1 °Э.

Количество жизнеспособных клеток бифидобактерий определяли методом предельных разведений на среде Блаурокка. Наиболее вероятную численность клеток в единице объема рассчитывали по таблице Мак-Креди (Руководство ..., 1983). Морфологию клеток исследовали после окраски по Граму в мазках с помощью оптического микроскопа МБИ-15.

С целью регенерации питательную среду перед инокулированием кипятили 10 мин, затем охлаждали до температуры культивирования. Культивирование проводили при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24–72 ч.

Бифидогенные свойства биогеля и альгината натрия оценивали по росту пробиотической культуры бифидобактерий *B. bifidum in vitro* в среде Блаурокка или изотоническом 0,9 %-ном растворе хлорида натрия, содержащих указанные субстраты. Для предупреждения оседания бифидобактерий в физиологический раствор добавляли “голодный агар” в концентрации 0,05 %.

Результаты и их обсуждение

С целью установления бифидогенных свойств биогеля исследовали его влияние на рост бифидобактерий *in vitro*. Для этого определяли динамику численности *B. bifidum* на полужидкой среде Блаурокка, включающей 5, 10 и 20 % биогеля. Контролем служила питательная среда Блаурокка без биогеля, которая является общепринятой для культивирования бифидобактерий.

Результаты исследований показали, что увеличение концентрации биогеля “Ламиналь” способствует увеличению численности бифидобактерий (рис. 1), причем зависимость носит нелинейный характер. Максимальный прирост бифидобактерий наблюдали при концентрации биогеля 10 %. Дальнейшее увеличение его концентрации до 20 % не способствовало возрастанию численности бифидобактерий. К концу срока наблюдения численность микроорганизмов в присутствии 10 и 20 % биогеля “Ламиналь” была в 10 раз выше, чем при его 5-ной % концентрации, и в 100 раз больше, чем в контроле.

Как известно, важнейшим фактором, определяющим скорость размножения бактерий, является присутствие в среде в достаточной мере основных компонентов питания (Тамбиев, Кирикова, 1981; Bezkorovainy, Miller-Catchpole, 1989). Для бифидобактерий это в первую очередь углеводы — как источник углерода (Bezkorovainy, Miller-Catchpole, 1989; Biavati, Matarelli, 2006).

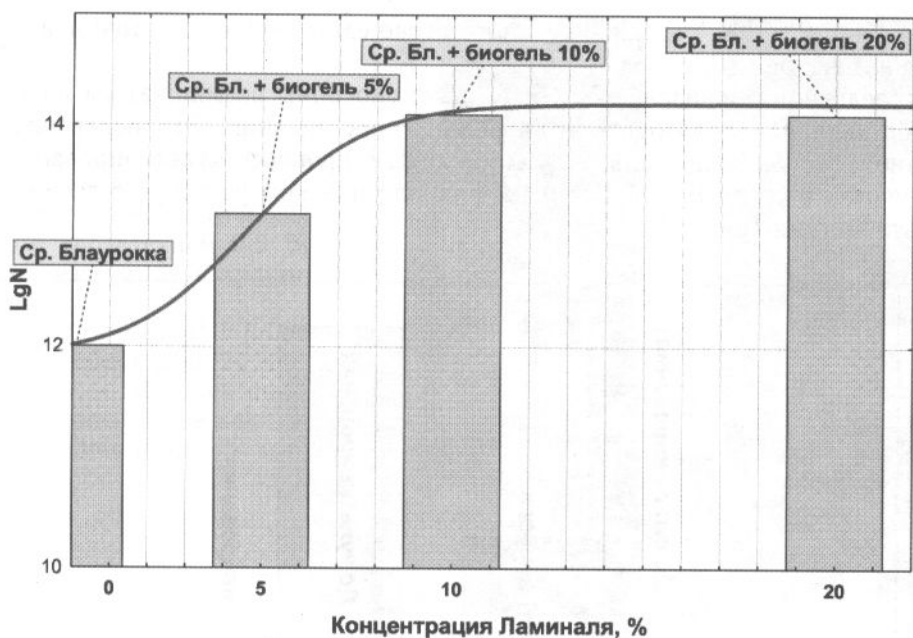


Рис. 1. Влияние концентрации биогеля на рост *B. bifidum* (N — кл./мл)

Fig. 1. Effect of the biogel concentration on the growth of *Bifidobacterium bifidum* (N — cel./ml)

Помимо компонента питания на интенсивность репродукции бактерий оказывают влияние и биологически активные вещества (стимуляторы роста) (Сиренко, Козицкая, 1988). Известно, что стимулирующее действие компонентов питания на размножение бактерий снижается при уменьшении концентрации этих веществ, тогда как стимуляторы роста оказывают влияние на рост бактерий при их разведении вплоть до 10^{-11} (Дьяков, 2000). Таким образом, усиление биологического эффекта при разведении указывает на действие стимулятора роста. Обратная ситуация или отсутствие подобного эффекта свидетельствуют о влиянии исследуемого вещества на рост бактерий как компонента питания.

В нашем случае возрастание концентрации биогеля свыше 10 % не приводит к увеличению численности *B. bifidum*. Следовательно, можно сделать вывод, что активизация процесса размножения бифидобактерий в присутствии биогеля обусловлена действием компонента питания.

Известно, что одним из основных компонентов питания бифидобактерий являются углеводы (моно-, олиго- и полисахариды) (Bezkorovainy, Miller-Catchpole, 1989; Goderska et al., 2008). Бифидобактерии активно сбраживают сахарозу, глюкозу, фруктозу, лактозу и др. (Scardovi, 1986). Благодаря наличию специфических ферментов бифидобактерии способны усваивать и полисахариды: амилозу, амилопектин, полигалактуронаны, гуммиарабик — и использовать их в качестве углеродного и энергетического источника свойственным только им способом, называемым “бифидус путь” (Scardovi, Trovatelli, 1965; Salyers et al., 1978; Palframan et al., 2003).

Биогель из бурых водорослей содержит в основном высокомолекулярный полисахарид — альгинат натрия (не менее 35 %), а также в незначительных количествах клетчатку, белок, маннит и другие минорные компоненты (Подкорытова, 1991). Поскольку основным составляющим компонентом биогеля является альгинат натрия, мы предположили, что бифидобактерии могут использовать его в качестве источника питания. Чтобы проверить это, бифидобактерии выращивали на физиологическом растворе с добавлением “голодного агара” в

концентрации 0,05 %, содержащего в качестве единственного источника углерода альгинат натрия (0,5 %).

Исследования показали, что *B. bifidum* способны размножаться на указанном субстрате и использовать его как источник питания. Это подтверждается снижением концентрации альгиновой кислоты в процессе культивирования микроорганизмов в среде Блаурокка и на физиологическом растворе с добавлением альгината натрия (рис. 2).

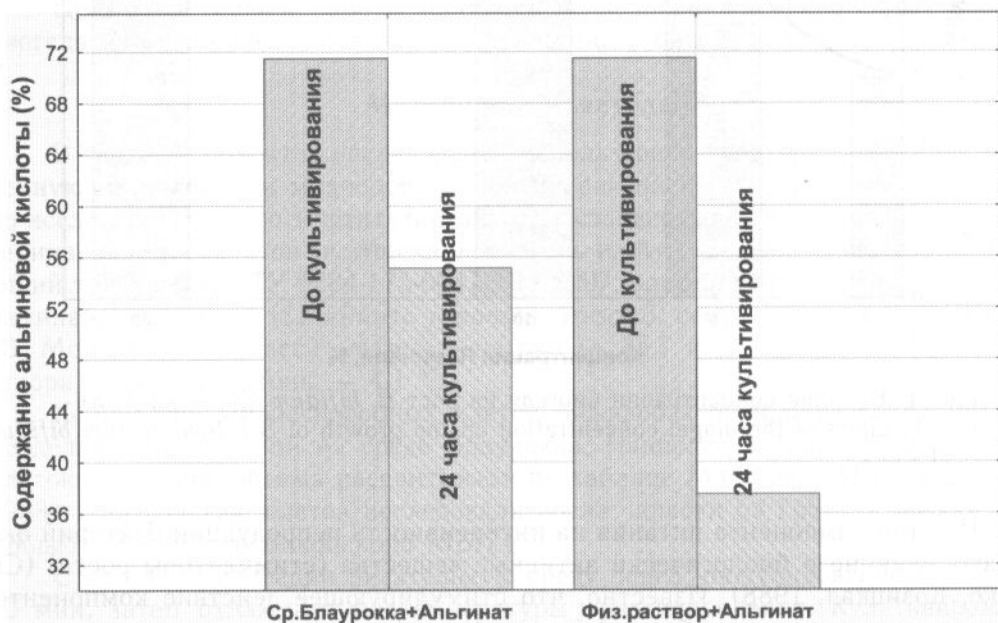


Рис. 2. Изменение содержания альгиновой кислоты в средах, содержащих альгинат натрия, в процессе культивирования

Fig. 2. Change of alginic acid contents in the media containing sodium alginate during the process of bifidobacteria cultivation

По мере роста культуры *B. bifidum* содержание альгиновой кислоты в среде Блаурокка уменьшается в 1,3 раза, а в полужидком голодном агаре — в 2,0 раза. Более интенсивное потребление альгината натрия бактериями при культивировании на физиологическом растворе объясняется отсутствием в данной системе каких-либо питательных компонентов помимо альгината натрия.

Еще одним доказательством того, что альгинат натрия утилизируется бифидобактериями, является установленный факт роста *B. bifidum* на среде, содержащей физиологический раствор с добавлением 0,5 % альгината натрия (рис. 3). Однако значительно меньший размер колоний бифидобактерий, выращенных на физиологическом растворе, содержащем альгинат натрия, по сравнению со средой Блаурокка свидетельствует о том, что альгинат натрия в чистом виде не является сбалансированным питательным субстратом для бифидобактерий.

Более благоприятным питательным субстратом для бифидобактерий, чем альгинат натрия, является биогель (рис. 4). Как видно, через 24 ч культивирования количество бифидобактерий в среде с добавлением альгината натрия составило 10^{13} кл./мл. Это на порядок выше, чем в контроле (среда Блаурокка). За этот же период времени на среде Блаурокка с добавлением биогеля концентрация *B. bifidum* достигала 10^{14} кл./мл. Следовательно, биогель является более благоприятным питательным субстратом для бифидобактерий по сравнению с альгинатом натрия. Можно предположить, что это связано с присутствием в биогеле других компонентов (клетчатки, макро- и микроэлементов), стимулирующих размножение бифидобактерий (Bezkorovainy, Miller-Catchpole, 1989).

Рис. 3. Культура *B. bifidum* на разных средах: 1 — среда Блаурокка; 2 — физиологический раствор с добавлением 0,5 % альгината натрия. 24 ч культивирования

Fig. 3. Culture of *B. bifidum* on different media after 24 h of cultivation: 1 — Blaurock medium; 2 — normal saline solution with the addition of 0.5 % sodium alginate

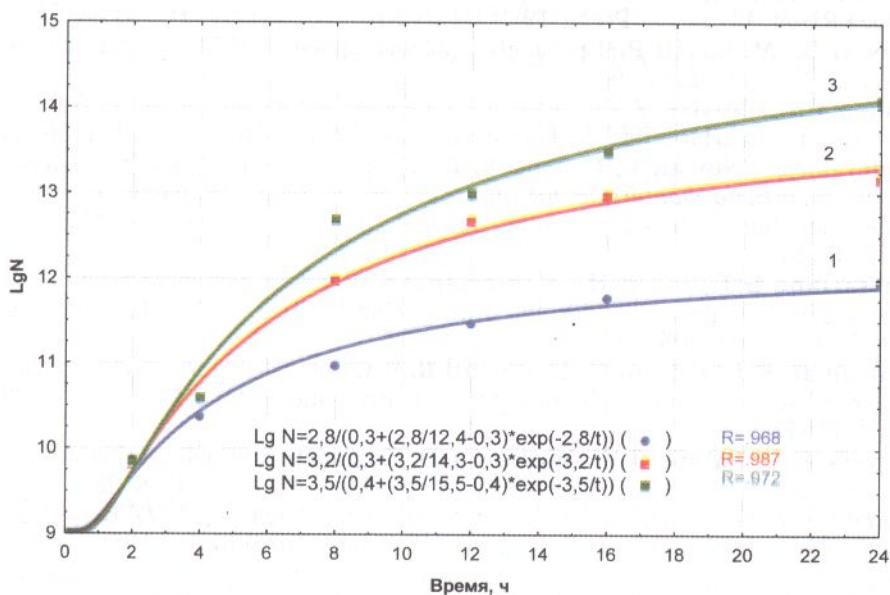
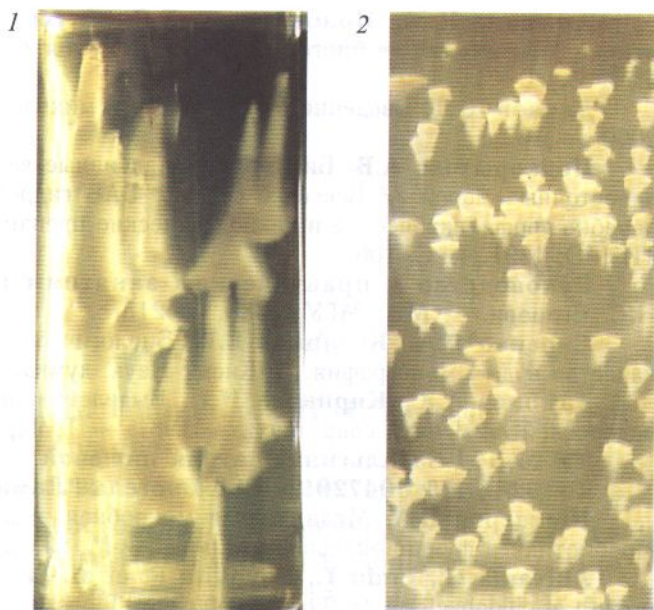


Рис. 4. Динамика численности *B. bifidum* на разных средах: 1 — среда Блаурокка; 2 — среда Блаурокка + альгинат натрия; 3 — среда Блаурокка + биогель (N — кл./мл)
 Fig. 4. Population dynamics of *B. bifidum* on different media: 1 — Blaurock medium; 2 — Blaurock medium + sodium alginate; 3 — Blaurock medium + biogel (N — cel./ml)

Закключение

Таким образом, биогель из бурых водорослей стимулирует рост бифидобактерий *in vitro* и, следовательно, является бифидогенным фактором. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что биогель может применяться как основной компонент питания в биотехнологии пробиотиков.

Список литературы

Аминина Н.М. Лечебно-профилактический продукт “Ламиналь — биогель из морских водорослей” : науч-практ. пособие. — Владивосток : ТИПРО-центр, 2006. — 34 с.

Аминина Н.М., Половинкина Е.С., Якуш Е.В. Пробиотические продукты на основе "Ламиналя" — биогеля морской капусты // Молоч. пром-сть. — 2006. — № 5. — С. 70–71.

Дьяков Ю.Т. Введение в альгологию и микологию : учеб. пособие. — М. : МГУ, 2000. — 192 с.

Подкорытова А.В. Биологически активные вещества морских водорослей Дальневосточных морей // Всесоюз. совещ. "БАВ гидробионтов — новые лекарственные, лечебно-профилактические и технологические препараты" : тез. докл. — Владивосток : ТИНРО, 1991. — С. 106.

Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. — М. : МГУ, 1983. — 215 с.

Сиренко Л.А., Козицкая В.И. Биологически активные вещества водорослей и качество воды : монография. — Киев : Наук. думка, 1988. — 256 с.

Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н. Выделение органического вещества у морских водорослей // Успехи совр. биол. — 1981. — Т. 92, вып. 1, № 4. — С. 100–114.

ТУ 15-544-83 Альгинат натрия пищевой.

ТУ 9284-175-00472012-2007 Биогель "Ламиналь".

Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Пробиотики и функциональное питание. — М. : Грантъ, 2001. — Т. 3. — 288 с.

Akiyama H., Endo T., Nakakita R. et al. Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1992. — Vol. 56. — P. 355–356.

Bezkorovainy A., Miller-Catchpole R. Biochemistry and physiology of Bifidobacteria. — Boca-Raton, FL : CRC Press, 1989. — 213 p.

Biavati B., Matarelli P. The family Bifidobacteriaceae // The prokaryotes. — N.Y., 2006. — Vol. 3. — P. 322–359.

Dubep U.K., Mistre V.V. Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of Bifidobacteria in infant formulas // J. Dairy Sci. — 1996. — № 79. — P. 1156–1163.

Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplement with selected saccharides including prebiotics // Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment. — 2008. — Vol. 7, № 2. — P. 5–20.

Macfarlane G.T., Steed H., Macfarlane. S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics // J. of Applied Microbiology. — 2008. — № 104. — P. 305–344.

Palframan R.J., Gibson G.R., Rastall R.A. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut // Curr. Issues Intest. Microbiol. — 2003. — № 4. — P. 71–75.

Salyers A.A., Palmer J.K., Wilkins T.D. Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes // Am. J. Clin. Nutr. — 1978. — № 31. — P. S128.

Scardovi V. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472^{AL} // Bergey's Manual of systemic Bacteriology, 1th ed. Baltimore : Williams and Wilkins, 1986. — Vol. 2. — P. 1418–1434.

Scardovi V., Trovatelli L.D. The fructose-6-phosphateshuntas peculiar pattern of hexoce degradation in the genus Bifidobacterium // Ann. Microbiol. Enzimol. — 1965. — № 15. — P. 19–29.

Wang Y., Han F., Hu B. et al. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate // Nutrition research. — 2006. — Vol. 26, iss. 11. — P. 597–603.

Поступила в редакцию 2.03.10 г.