

УДК 664.764:[579:577.114]

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.40627

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КСИЛООЛИГОСАХАРИДОВ ИЗ ПШЕНИЧНЫХ И РЖАНЫХ ОТРУБЕЙ *IN VITRO***

© Е. Д. Журлова, Л. В. Капрельянц

*В статье представлено исследование пребиотической активности препаратов ксилоолигосахаридов in vitro, полученных путём ограниченного ферментативного гидролиза пшеничных и ржаных отрубей, согласно результатам которого препараты КОС, показавшие высокое стимулирующее действие на рост пробиотических культур, сравнимое с классическим пребиотиком лактулозой, можно рекомендовать для включения в состав функциональных продуктов, предназначенных для коррекции микрофлоры кишечника*

**Ключевые слова:** пшеничные и ржаные отруби, пребиотическая активность, ксилоолигосахариды, лактулоза, лактобактерии, бифидобактерии

*The article presents a study of prebiotic activity of xylooligosaccharides in vitro, obtained by limited enzymatic hydrolysis of wheat and rye bran. The results showed a high prebiotic effect of XOS comparable with the classical prebiotic lactulose. It can be recommended as the functional supplement designed for correction of microflora*

**Keywords:** wheat and rye bran, prebiotic activity, xylooligosaccharides, lactulose, lactobacteria, bifidobacteria

**1. Введение**

Биотехнологии получения природных олигосахаридов-пребиотиков, которые способствуют поддержанию иммунной системы человека, регулируя микрофлору кишечника и индуцируя положительные эффекты не только на уровне желудочно-кишечного тракта, но и организма в целом, – одно из основных направлений современной нутрициологии.

Ксилоолигосахариды (КОС) – это углеводные олигомеры, молекулы которых построены из остатков ксилозы, соединённых в основном  $\beta$ -(1→4)-гликозидными связями. КОС получают путём ограниченного гидролиза ксиланов, которые являются основными компонентами растительных гемицеллюлоз – гетерополисахаридов с гомополимерными ответвлениями ксилопиранозных остатков. В зависимости от источника ксилана, используемого для получения КОС, строение их варьируется по степени полимеризации (от 2 до 10), мономерному составу и типам связей. В общем, КОС представляет собой смесь олигосахаридов, образованных из остатков ксилозы, связанных между собой  $\beta$ -(1→4)-связями [1, 2]. КОС являются ценными пищевыми ингредиентами для функциональных продуктов и они имеют потенциальные пребиотические свойства.

**2. Литературный обзор**

Пшеница и рожь являются важнейшими компонентами в питании населения Украины, употребле-

ление хлебопродуктов составляет 40–45 % от общего рациона [3]. Продукты переработки этих злаковых культур (отруби) являются богатейшим сырьевым источником ксиланов (28–34 %), из которых путём ограниченного химического или ферментативного гидролиза получают препараты КОС. Многочисленные исследования препаратов ксилоолигосахаридов показали многообразие их биологических свойств, среди которых проявляются митогенная, антиоксидантная, противовоспалительная и антигиперлипидемическая активности. Однако, важнейшим свойством КОС является их пребиотическая активность – избирательное стимулирование роста пробиотической микрофлоры кишечника человека [2, 4]. Пребиотики – неусваиваемые пищевые ингредиенты, способствующие пролиферации и адсорбции бифидо- и лактобактерий в кишечнике [4]. К ним относят лактулозу, лактосахарозу, галакто-, фрукто-, изомальтоолигосахариды, лизоцим, дрожжевые экстракты, низкоосахаренная кукурузная патока, ячменно-солодовый экстракт, гидролизаты казеина и сывороточных белков, муцин, пантетин, лактоферрин и другие [5].

Бифидо- и лактобактерии в толстом кишечнике секретируют гидролитические ферменты, расщепляющие КОС, при этом выделяются энергия, необходимая для их размножения и роста, а так же метаболиты (органические кислоты), короткоцепочечные жирные кислоты, способствующие сокращению популяции патогенной микрофлоры [6].

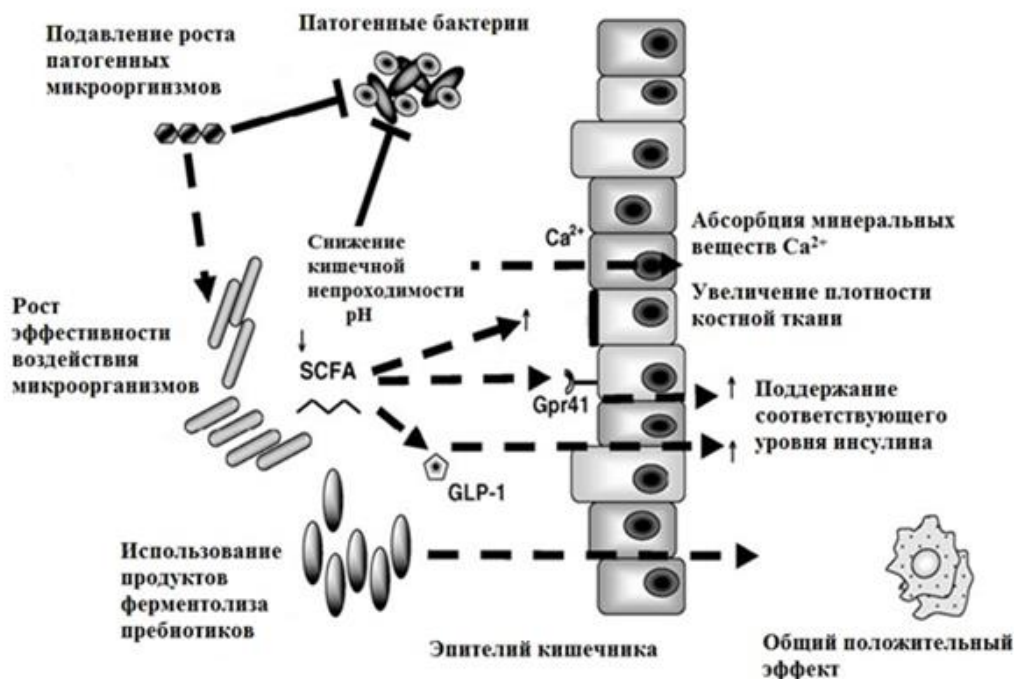


Рис. 1. Механизм пребиотического воздействия

Важнейшей функцией действия пребиотиков является влияние на рост микроорганизмов и их количество в толстой кишке. Известны исследования их антипатогенного и антиканцерогенного воздействия, позволяющих снизить уровень риска заболеваний кишечника. На рис. 1 представлен механизм действия пребиотиков, который включает в себя следующие положительные эффекты: увеличение объема и улучшение влажности стула, снижение уровня холестерина, количества длинноцепочечных жирных кислот, значения pH, а так же интенсификацию адсорбции минеральных веществ [6].

Целью данной работы является исследование *in vitro* пребиотической активности ксилоолигосахаридов пшеничных отрубей в сравнении с известным пребиотиком – лактулозой.

### 3. Методика проведения экспериментов

Фракционный состав КОС определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), предложенным Кубатой и др. [7]. Моносахаридный состав препаратов КОС сухого и сиропа определяли методом ТСХ, предложенным Чандражу и др. [8].

В качестве пребиотических культур использовали препарат *Bifidobacterium bifidum* «Бифидумбактерин-Биофарма» и культура *Lactobacillus acidophilus*-Ер-317/402. Препарат лактобактерий сухой предварительно растворяли в питательной среде MRS и культивировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Затем закваску вносили для культивирования в обезжиренное коровье молоко в асептических условиях. В качестве источника углерода добавляли исследуемые пребиотики с концентрацией 2 %. Подсчет количества клеток лактобактерий осуществляли по методу, изложенному в ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов» [9].

Препарат «Бифидумбактерин-Биофарма» предварительно растворяли в тиогликолевой питательной среде и культивировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Затем его вносили в подготовленные для культивирования питательные среды. В качестве источника углерода добавляли исследуемые пребиотики с концентрацией 2 %. Подсчет клеток бифидобактерий проводили методом, основанном на их способности к росту в полужидких питательных средах, разлитых высокими столбиками в пробирках, при температуре 36...38 °С с образованием колоний в виде «гвоздиков» в течение 2...3 суток.

Ферментацию проводили, контролируя показатели активной и титруемой кислотности каждые 2 ч [10].

Статистический анализ данных проводили методом наименьших квадратов. При количестве повторностей опытов  $n=3$  и допустимой величине относительной ошибки не превышающей 5 % ( $P \geq 0,95$ ) результаты считали достоверными [11].

Результаты исследований были обработаны с помощью программы пакета Microsoft Office табличного процессора Microsoft Excel.

### 4. Обсуждение результатов

В работе была исследована *in vitro* пребиотическая активность КОС из пшеничных отрубей, полученных методом ограниченного ферментативного гидролиза [12]. Моносахаридный состав необработанных пшеничных отрубей представлен в табл. 1.

Препараты КОС добавляли в питательную среду, как в сухом виде, так и в виде сиропа. Химический состав препаратов приведен в табл. 2.

В табл. 3 представлен углеводный состав образцов препаратов КОС, которые были использованы в качестве источника углерода: сухой препарат КОС из пшеничных отрубей, сироп КОС из пшеничных отрубей, сухой препарат КОС из ржаных отрубей, сироп КОС из ржаных отрубей.

Таблица 1

Моносахаридный состав пшеничных (1) и ржаных (2) отрубей (% абс. сух.в.) ( $n=3, P \leq 0,95$ )

№	Арабиноза	Рамноза	Галактоза	Глюкоза	Ксилоза	Манноза
1	7–9	0–0,1	0,7–1	19,8–24	12–16	0–0,3
2	6,5–8	0	0,8–1,1	25–26	13–15	0–0,1

Таблица 2

Химический состав препаратов КОС из пшеничных и ржаных отрубей ( $n=3, P \leq 0,95$ )

Показатель	Количество, %			
	Пшеничные отруби		Ржаные отруби	
	Сухой	Сироп	Сухой	Сироп
Влажность	8	30	8	30
Углеводы	76,5	58,2	76	57,8
КОС	65,4	49,8	68	51,7
Белок	5,8	4,4	6	4,6
Зола	9,7	7,4	10	7,6

Таблица 3

Углеводный состав образцов препаратов КОС из пшеничных и ржаных отрубей ( $n=3, P \leq 0,95$ )

КОС	Общее содержание углеводов, %	КОС, %	Моносахариды, %				
			Кси-лоза	Араби-ноза	Глюко-за	Галак-тоза	Ман-ноза
Пшеничные отруби							
КОС сухой	76,5	65,4	43,6	12,4	13,3	4,4	2,8
КОС сироп	58,2	49,8	28,4	8,2	8,7	2,7	1,8
Ржаные отруби							
КОС сухой	76,0	68,0	45,6	12,2	12,9	5,3	0
КОС сироп	57,8	51,7	34,7	9,3	9,8	4,0	0

Фракционный состав препаратов КОС был определен методом ТСХ и представлен в табл. 4.

Таблица 4

Фракционный состав препаратов КОС из пшеничных и ржаных отрубей ( $n=3, P \leq 0,95$ )

КОС	Пшеничные отруби, %	Ржаные отруби, %
Ксилоза	14,42	14,45
Ксилобиоза	15,19	15,23
Ксилотриоза	22,5	22,8
Ксилотетроза	23,08	22,9
Ксилопентоза	19,62	19,71
Высшие КОС	5,19	4,91

Преобладающими олигосахаридами в препаратах КОС, полученных ограниченным ферментативным гидролизом пшеничных и ржаных отрубей, являются ксилотетроза и ксилотриоза, их количество суммарно составляет 45,58 % и 45,70 %, соответственно. Согласно литературным данным, они обладают наибольшей пребиотической активностью среди прочих углеводных олигомеров ксилана [4, 6, 13].

Биохимическую активность лактобактерий определяли по нарастанию активной (рис. 2, 3) и титруемой кислотности (рис. 4, 5).

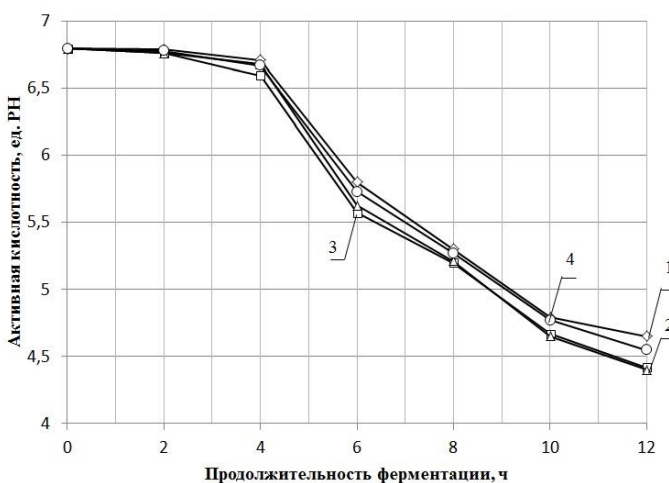


Рис. 2. Изменение активной кислотности в процессе накопления культуры *Lb. acidophilus*: 1 – контроль, 2 – лактоза, 3 – КОС сухие, 4 – КОС сироп

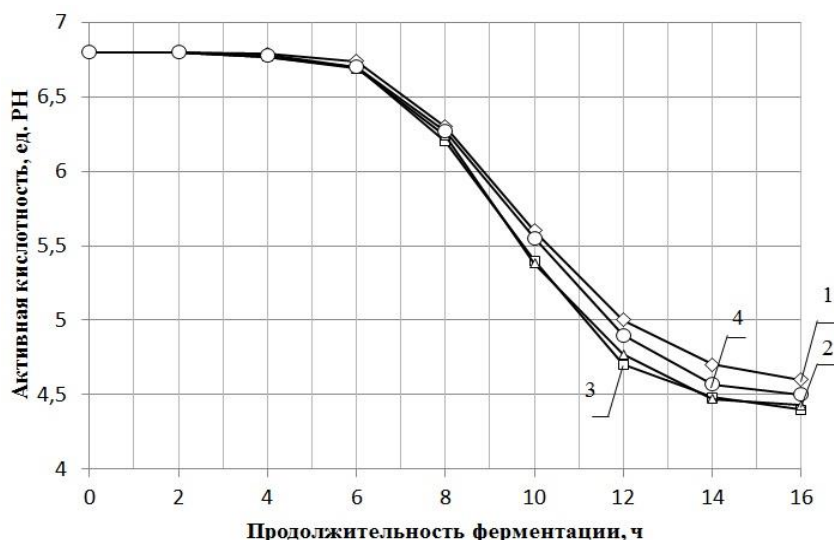


Рис. 3. Изменение активной кислотности в процессе накопления культуры *V. bifidum*: 1 – контроль, 2 – лактулоза, 3 – КОС сухой, 4 – КОС сироп

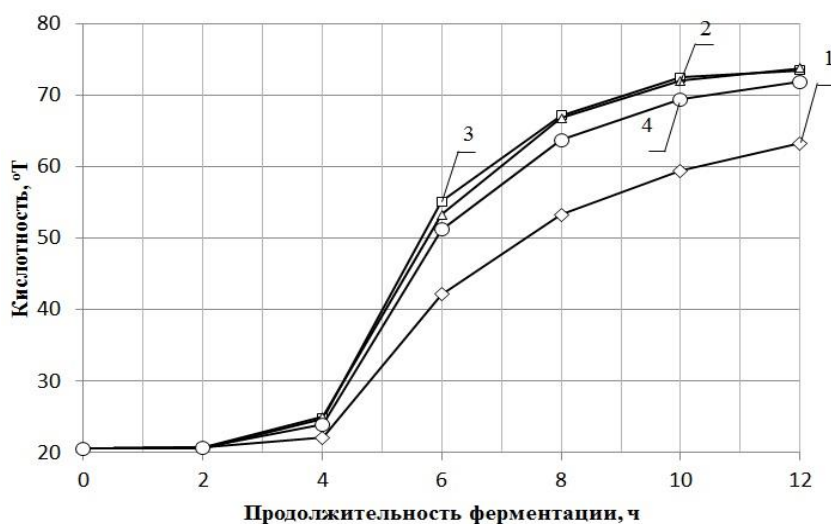


Рис. 4. Изменение титруемой кислотности в процессе накопления культуры *Lb. acidophilus*: 1 – контроль, 2 – лактулоза, 3 – КОС сухие, 4 – КОС сироп

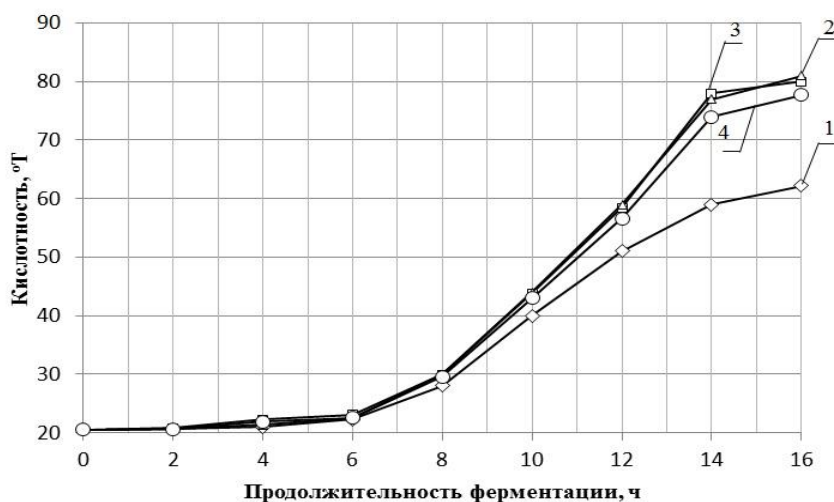


Рис. 5. Изменение титруемой кислотности в процессе накопления культуры *V. bifidum*: 1 – контроль, 2 – лактулоза, 3 – КОС сухой, 4 – КОС сироп

В связи с тем, что сырьевой источник препаратов КОС не оказал влияния на показатели титруемой кислотности, pH и рост лакто- и бифидобактерий, на графиках представлены данные по КОС в общем виде.

Из результатов видно, что в процессе культивирования и лакто-, и бифидобактерий происходило изменение значения pH среды и титруемой кислотности: для штаммов лактобактерий в течение 12 ч культивирования наблюдалось увеличение скорости кислотообразования и снижение показателя pH среды по сравнению с начальным их значением. Так же прослеживается больший пребиотический эффект КОС сухого по сравнению с лактулозой. За 12 часов культивирования pH в среде с добавлением КОС сухого снизилось до 4,4, в среде с добавлением лактулозы – до 4,4, в среде с добавлением КОС сиропа – до 4,55, а в контрольном образце составил 4,65. Показатель титруемой кислотности в среде с добавлением КОС сухого вырос до 73,5 °Т, в среде с добавлением лактулозы – до 73,8 °Т, в среде с добавлением КОС сиропа – до 71,9 °Т, в контрольном образце составил 63,3 °Т. Для штаммов бифидобактерий за 16 ч культивирования pH в среде с добавлением: КОС сухого снизилось до 4,4, лактулозы – до 4,43, КОС сиропа – до 4,5, молока составил 4,6. Показатель титруемой кислотности в среде с добавлением: КОС сухого вырос до 80 °Т, лактулозы – до 81 °Т, КОС сиропа – до 77,7 °Т, молока составил 62,2 °Т. Это свидетельствует о сокращении времени накопления биомассы пробиотических культур при стимуляции роста лакто- и бифидобактерий КОС сухого по сравнению с пребиотиком – лактулозой. Более низкий показатель активности КОС сиропа связан с меньшей концентрацией пребиотика в препарате за счёт большего количества влаги (30 %).

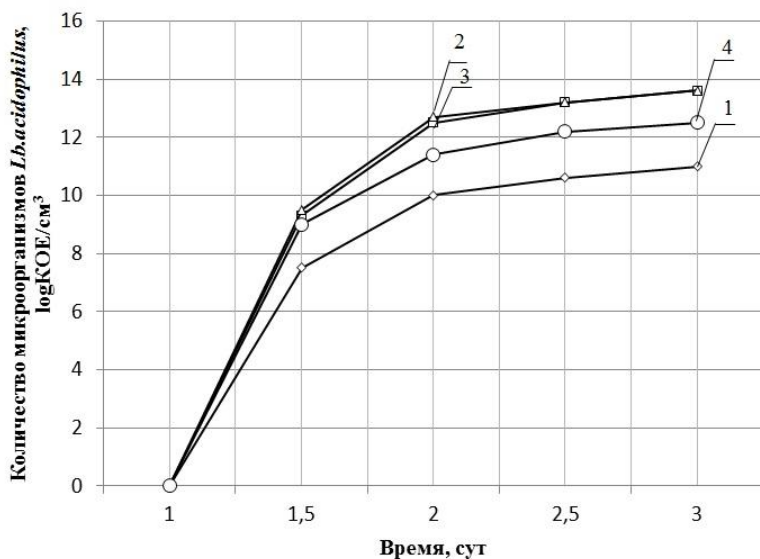


Рис. 6. Динамика накопления клеток *Lb. acidophilus* при культивировании на средах с различными углеводами: 1 – контроль, 2 – лактулоза, 3 – КОС сухой, 4 – КОС сироп

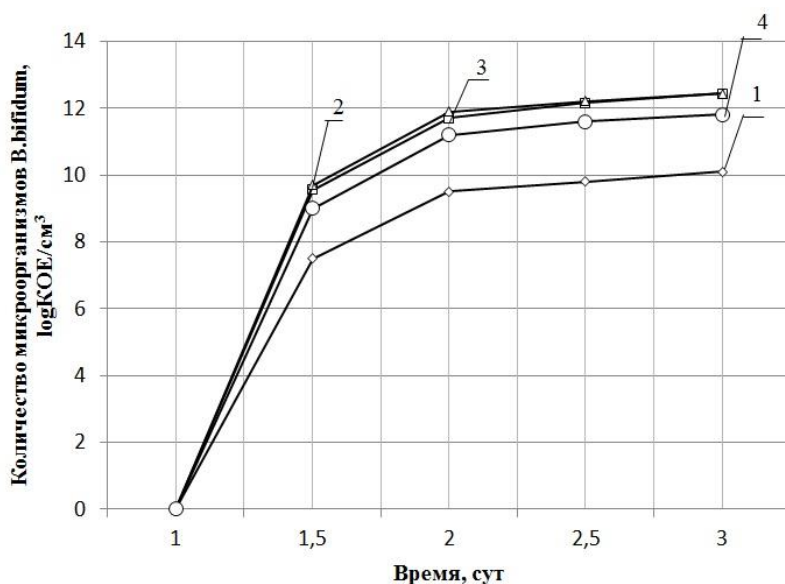


Рис. 7. Динамика накопления клеток *B. bifidum* при культивировании на средах с различными углеводами: 1 – контроль, 2 – лактулоза, 3 – КОС сухой, 4 – КОС сироп

Стационарная фаза роста молочнокислых микроорганизмов характеризуется уравниванием размножения и отмирания бактерий под действием продуктов обмена. Эти изменения обусловлены ограничением количества питательных веществ, большой концентрацией клеток и накоплением токсичных продуктов обмена. Стационарная фаза размножения микроорганизмов (максимальная концентрация бактерий), после которой следует фаза замедления роста. При стационарном росте количество жизнеспособных клеток остаётся без изменений. Согласно данным рис. 5 и 6 активное накопление биомассы лакто- и бифидобактерий наблюдается в первые 48 часов культивирования. В следующие 24 часа – незначительное накопле-

ние биомассы бактерий, что позволяет сделать вывод о наступлении стационарной фазы роста молочнокислых микроорганизмов.

Количество клеток *Lb. acidophilus* на среде с добавлением КОС сухого составило  $13,6 \cdot 10^{14}$  КОЕ/см<sup>3</sup> на третьи сутки культивирования, такой же показатель был получен на среде с добавлением лактулозы, что на  $1,1 \cdot 10^{14}$  КОЕ/см<sup>3</sup> больше, чем в КОС сиропе и на  $2,6 \cdot 10^{14}$  КОЕ/см<sup>3</sup> больше контроля (рис. 5). Количество клеток *B. bifidum* на среде с добавлением КОС сухого составило  $12,43 \cdot 10^{13}$  КОЕ/см<sup>3</sup> на третьи сутки культивирования, такой же показатель был получен на среде с добавлением лактулозы, что на  $0,63 \cdot 10^{13}$  КОЕ/см<sup>3</sup> больше, чем в КОС сиропе и на  $2,33 \cdot 10^{13}$  КОЕ/см<sup>3</sup> больше контроля (рис. 6). При дальнейшем культивировании количество клеток *Lb. acidophilus* и *B. bifidum* не увеличивалось.

## 5. Выводы

Использование КОС пшеничных и ржаных отрубей в качестве пребиотика показало высокое стимулирующее действие на рост пробиотических культур *Lb. acidophilus* и *B. bifidum*, сравнимое с классическим пребиотиком лактулозой. Полученные данные активной и титруемой кислотности свидетельствуют о сокращении времени сквашивания молока: для *Lb. acidophilus* время сквашивания составило 10 ч, для *B. bifidum* – 12 ч. Количество клеток *Lb. acidophilus* и *B. bifidum*, выросших на среде с добавлением КОС показало такой же высокий результат, как и на среде с добавлением лактулозы и составило на  $13,6 \cdot 10^{14}$  КОЕ/см<sup>3</sup> и  $12,43 \cdot 10^{13}$  КОЕ/см<sup>3</sup>, соответственно. Резюмируя вышеизложенное, препарат КОС из пшеничных и ржаных отрубей, после дополнительных микробиологических исследований, можно рекомендовать для включения в состав функциональных продуктов, предназначенных для коррекции микрофлоры кишечника.

## Литература

1. Kumar, G. P. A Review on Xylooligosaccharides [Text] / G. P. Kumar, A. Pushpa, H. Prabha // International Research Journal of Pharmacy. – 2012. – Vol. 8, Issue 3. – P. 71–74.
2. Singh, R. D. Prebiotic Potential of Oligosaccharides: a Focus on Xylan Derived Oligosaccharides [Text] / R. D. Singh, J. Banerjee, A. Arora // Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber. – 2014. – Vol. 73, Issue 1. – P. 1–28. doi: 10.1016/j.bcdf.2014.11.003
3. Kaprelyants, L. V. Bioactive compounds and dietary fibers in new developed cereal products [Text] / L. V. Kap-

relyants, O. S. Voloshenko, E. D. Zhurlova // Зернові продукти і комбікорми. – 2012. – № 3. – С. 17–21.

4. Reddy, S. S. Production of Prebiotics and Antioxidants as Health Food Supplements from Lignocellulosic Materials Using Multienzymatic Hydrolysis [Текст] / S. S. Reddy, C. Krishnan // Int. J. Chem. Sci. – 2010. – Vol. 3, Issue 3. – P. 535–549.

5. Gibson, G. R. Prebiotics: Development and Application [Text] / G. R. Gibson, R. A. Rastall. – John Wiley and Sons Ltd, 2006. – P. 256. doi: 10.1002/9780470023150

6. Slizewska, K. Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology [Text] / K. Slizewska, J. Kapusniak, R. Barczynska, K. Jochym, – InTech, 2012. – 570 p. doi: 10.5772/51573

7. Kubata, B. K. Purification and Characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 xylanase V, which produces exclusively xylobiose from xylan [Text] / B. K. Kubata, T. Suzuki, H. Horitsu, K. Kawai, K. Takamizawa // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60, Issue 2. – P. 531–535.

8. Chandraru, S. Extraction, Isolation and Identification of Sugar from Banana peels (*Musa Sapientum*) by HPLC coupled LC/MS instrument and TLC analysis [Text] / S. Chandraru, R. Mythily, C. S. Chidan Kumar // J. Chem. Pharm. Res. – 2011. – Vol. 3, Issue 3. – P. 312–321.

9. ГОСТ 10444.11–89. Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://helpnik.college.ks.ua/standart/gost/Catalog/Index/11/11148.htm>

10. МБК 10.10.2.2.-119-2005 Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах. Методичні вказівки [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://text.normativ.ua/doc12926.php>

11. Грачёв, Ю. П. Математические методы планирования экспериментов [Текст] / Ю. П. Грачёв. – М.: Пищ. пром-сть, 1979. – 200 с.

12. Журлова, Е. Д. Энзиматическое получение функциональных ингредиентов из зернового сырья [Текст]: сб. науч. докл. / Е. Д. Журлова, Л. В. Капельянец // Техника и технология пищевых производств. – Могилёв. – 2014. – Т. 1. – С. 88.

13. Achary, A. A. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications [Text] / A. A. Achary, S. G. Prapulla // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2011. – Vol. 10, Issue 1. – P. 2–16. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x

#### References

1. Kumar, G. P., Pushpa, A., Prabha, H. (2012). A Review on Xylooligosaccharides. International Research Journal of Pharmacy, 8 (3), 71–74.

2. Singh, R. D., Banerjee, J., Arora, A. (2015). Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5 (1), 19–30. doi: 10.1016/j.bcdf.2014.11.003

3. Kaprelyants, L. V., Voloshenko, O. S., Zhurlova, E. D. (2012). Bioactive compounds and dietary fibers in new developed cereal products. Cereal products and Fodder, 3, 17–21.

4. Reddy, S. S., Krishnan, C. (2010). Production of Prebiotics and Antioxidants as Health Food Supplements from Lignocellulosic Materials Using Multienzymatic Hydrolysis. Int. J. Chem. Sci., 3 (3), 535–549.

5. Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2006). Prebiotics: Development and Application. England: John Wiley and Sons Ltd, 256. doi: 10.1002/9780470023150

6. Slizewska, K., Kapusniak, J., Barczynska, R., Jochym, K. (2012). Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. InTech, 570. doi: 10.5772/51573

7. Kubata, B. K., Suzuki, T., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K. (1994). Purification and Characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 xylanase V, which produces exclusively xylobiose from xylan. Appl. Environ. Microbiol., 60 (2), 531–535.

8. Chandraru, S., Mythily, R., Chidan Kumar, C. S. (2011). Extraction, Isolation and Identification of Sugar from Banana peels (*Musa Sapientum*) by HPLC coupled LC/MS instrument and TLC analysis. J. Chem. Pharm. Res., 3 (3), 312–321.

9. ГОСТ 10444.11–89. Food products. Methods for determination of lactic acid microorganisms. Available at: <http://helpnik.college.ks.ua/standart/gost/Catalog/Index/11/11148.htm>

10. MIR 10.10.2.2.-119-2005 Determination of the number of bifidobacteria in dairy products. Methodological instructive regulations. Available at: <http://text.normativ.ua/doc12926.php>

11. Grachov, U. P. (1979). Matematicheskie metodi planirovaniya eksperimentov [Mathematical methods of planning experiments]. Moscow: Food Industry, 200.

12. Zhurlova, E. D., Kaprelyants, L. V. (2014). Enzimaticeskoe poluchenie funkcionálnikh ingredientov iz zernovogo siriya [Enzymatic obtaining of functional ingredients from cereal raw material]. Technic and Technology of Food Manufacturing. Mogilyov (Belarus), 1, 88.

13. Achary, A. A., Prapulla, S. G. (2010). Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10 (1), 2–16. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x

*Дата надходження рукопису 23.03.2015*

**Журлова Елена Дмитриевна**, асистент, кафедра біохімії, мікробіології і фізіології харчування, Одеська національна академія харчових технологій, ул. Канатна, 112, г. Одеса, Україна, 65039  
E-mail: [lyasya89@mail.ru](mailto:lyasya89@mail.ru)

**Капельянец Леонид Викторович**, доктор технічних наук, професор, кафедра біохімії, мікробіології і фізіології харчування, Одеська національна академія харчових технологій, ул. Канатна, 112, г. Одеса, Україна, 65039  
E-mail: [leonid@onaft.edu.ua](mailto:leonid@onaft.edu.ua)