

УДК 57.084.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОМАЛЬТУЛОЗЫ В УСЛОВИЯХ IN VIVO

¹Божко О.Ю., ¹Шуваева Г.П., ¹Корнеева О.С., ²Михайлова Н.А.

¹ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
Воронеж, e-mail: olga_bojko2005@mail.ru;

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН,
Москва, e-mail: mech.inst@mail.ru

Ранее нами была разработана биотехнология изомальтулозы – натурального сахарозаменителя с применением высокоактивного бактериального фермента и доказаны ее пребиотические свойства в условиях *in vitro*. В представленной работе изложены результаты исследования влияния изомальтулозы на состав нормофлоры кишечника в условиях *in vivo* при пероральном введении животным. В качестве объекта исследования использовали белых беспородных мышей. Оценку микрофлоры кишечника животных проводили в условиях нормы и при патологии – в условиях экспериментального дисбиоза. Установлена оптимальная дозировка изомальтулозы – 0,3 мг на особь, обеспечивающая максимальный прирост показателя увеличения массы тела животного (1,6). Показано, что введение сахарозаменителя приводит к снижению количества бактерий р.р. *Streptococcus*, *Proteus*, *Ewingella* – представителей условно-патогенной микрофлоры. В исследованиях с экспериментальным дисбиозом кишечника животных изомальтулоза способствовала восстановлению количества бактерий группы кишечной палочки, а также молочнокислых лактобактерий.

Ключевые слова: изомальтулозосинтаза, изомальтулоза, сахароза, пребиотические свойства, нормофлора кишечника, дисбактериоз, белые беспородные мыши

STUDYING OF THE ISOMALTULOSE PREBIOTIC PROPERTIES IN VIVO CONDITIONS

¹Bozhko O.Y., ¹Shuvaeva G.P., ¹Korneeva O.S., ²Mikhaylova N.A.

¹FSBEI HPE «Voronezh State University of Engineering Technologies»,
Voronezh, e-mail: olga_bojko2005@mail.ru;

²FSBI Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy
of Medical Sciences, Moscow, e-mail: mech.inst@mail.ru

Previously we developed a biotechnology isomaltulose is a natural sugar substitute with highly bacterial enzyme and proved its prebiotic properties *in vitro* conditions. The paper presents the results of studies of isomaltulose effects on the composition of normal flora in the intestine after oral administration to animals. The object of these studies used the albino mice. Assessment of intestinal microflora of animals was conducted under normal and pathological conditions – in experimental dysbiosis. The optimum dosage of isomaltulose is 0,3 mg per individual, which provides the maximum increase rate of weight gain of animal (1,6). It is shown that the introduction of sugar substitute reduces the number of bacteria pp. *Streptococcus*, *Proteus*, *Ewingella* are representatives of pathogenic microorganisms. In studies with experimental animals intestinal dysbiosis isomaltulose facilitated recovery of coliform bacteria and lacto bacteria.

Keywords: isomaltulosesynthase, isomaltulose, sucrose, prebiotic properties, intestinal normoflora, dysbacteriosis, white not purebred mices

Биотехнологии природных сахарозаменителей нового поколения с пребиотическими свойствами, способствующих поддержанию иммунной системы человека, регулируя кишечную микрофлору и индуцируя полезные эффекты не только на уровне желудочно-кишечного тракта, но и организма в целом, – одно из основных направлений исследований в области нутрициологии [1, 5].

Изомальтулоза (6-О- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза) – натуральный заменитель сахара, незначительно распространенный в природе, который присутствует в меде и соке сахарного тростника. Сахарозаменитель рекомендован для создания продуктов диетического и диабетического питания, а также продуктов функционального назначения [6]. Сотрудниками кафедры микробиологии и биохимии ФГБОУ ВПО «ВГУИТ» разрабо-

тана биотехнология трансформации сахарозы в изомальтулозу ферментом изомальтулозосинтазой с применением иммобилизованных клеток бактерий *Erwinia rhapontici* [3]. Однако пребиотические свойства изомальтулозы изучены не достаточно. Проведенные исследования показали, что культивирование бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* в условиях *in vitro* на среде, содержащей изомальтулозу, отличается высокой активностью их роста, уровнем накопления биомассы, продукцией органических кислот, по сравнению с контролем (среда с сахарозой), что косвенно свидетельствует о пребиотических свойствах данного заменителя сахара [2]. Однако данные о способности представителей нормофлоры кишечника животных активно развиваться на среде с изомальтулозой в условиях *in vivo* отсутствуют.

Цель работы состояла в исследовании пребиотических свойств изомальтулозы, полученной с помощью иммобилизованных бактериальных клеток *E. rhapsodici*, в условиях *in vivo* на белых беспородных мышах.

Материал и методы исследования

В качестве экспериментальных животных использовали белых беспородных мышей массой 20 ± 2 г. В соответствии с планом эксперимента были сформированы 4 группы животных по 15 особей в каждой. Экспериментальные животные находились в свободном режиме существования и в пищу получали раствор изомальтулозы. Доступ к воде был свободный. Исследования просветной микрофлоры выполняли, анализируя по 3 пробы асептически взятых фекальных масс от 5 мышей. С целью более полного изучения бифидогенных свойств изомальтулозы испытаны возрастающие дозы препарата, вводимые мышам. Оптимальная дозировка изомальтулозы в количестве 0,5 мл по нарастанию массы тела в течение 7 суток установлена экспериментально при пероральном введении сахарозаменителя.

Микрофлору кишечника экспериментальных животных исследовали по общепринятой стандартной методике, руководствуясь нормами, приведенными в монографии Шендерова Б.А. [4]. Для выращивания микроорганизмов и определения физиолого-биохимических свойств использовали дифференциально-диагностические питательные среды.

Выделение бактерий из патологического материала и идентификацию штаммов проводили общепринятым методом с использованием соответствующих стандартизированных дифференциально-диагности-

ческих сред (кровяной агар, агар Клиглера, среда Кларка, фенилаланиновый агар, МРС-4, среда Сабу-ро, среда Плоскирева, среда Симмонса, среда с лизином, среда Эндо, среда Блаурокка, солевой агар для выращивания стафилококков, среда для выращивания клостридий, энтерококковый агар). Для создания условий экспериментального дисбиоза опытным животным вводили антибиотик доксициклин гидрохлорид (ОАО «Белмедпрепараты») в дозировке, рекомендуемой по инструкции препарата.

Опыты проводили в 3-кратной биологической повторности. В таблицах и на рисунках приведены данные типичных опытов, где каждое значение есть среднее арифметическое. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью изучения пребиотических свойств изомальтулозы в условиях *in vivo* проведено исследование исходной нормофлоры белых беспородных мышей, полученных из питомника «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (г. Москва).

Для определения оптимальной дозировки изомальтулозы при пероральном введении варьировали диапазон значений сахарозаменителя от 0,075 до 0,6 мг на мыш. Основным критерием оценки данного исследования служило нарастание массы тела животного в течение 7 суток. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Определение оптимальной дозировки изомальтулозы на белых беспородных мышах

Наименование препарата	Дозировка, мг	Метка	Динамика изменения массы тела мышей, г							Показатель увеличения массы тела
			сутки							
			1	2	3	4	5	6	7	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Изомальтулоза	0,075	Гол.	20,2	20,0	20,7	21,1	21,6	21,9	22,2	0,76
		Хв.	22,4	21,3	21,9	21,6	22,2	22,3	22,5	
		П.л.	18,2	18,5	18,7	19,4	19,4	19,4	19,5	
		З.л.	19,1	19,2	19,8	19,4	19,4	19,5	19,7	
		Чист.	20,6	21,5	20,7	21,5	21,8	22,2	22,4	
	0,15	Гол.	19,2	20,0	20,1	20,5	21,9	22,3	22,4	1,5
		Хв.	20,8	21,9	21,9	22,3	21,7	21,8	22,3	
		П.л.	22,2	23,0	22,8	22,9	23,8	23,9	24,0	
		З.л.	21,8	22,4	22,8	23,5	23,5	23,6	23,8	
		Чист.	22,0	23,3	23,0	23,5	23,1	23,3	23,6	
	0,3	Гол.	22,1	19,6	22,9	23,4	23,0	23,1	23,4	1,6
		Хв.	22,5	20,8	24,0	24,4	25,7	25,8	26,1	
		П.л.	21,3	19,7	21,1	21,3	21,4	21,5	21,7	
		З.л.	19,6	20,6	20,7	21,2	21,5	21,7	21,8	
		Чист.	19,9	21,1	21,0	20,7	21,3	21,5	21,8	
	0,6	Гол.	21,5	21,6	21,3	21,3	21,4	21,5	21,7	1
		Хв.	22,2	23,9	23,3	24,3	23,7	23,8	24,0	
		П.л.	22,2	23,6	23,6	23,9	24,1	24,3	21,6	
		З.л.	22,9	23,4	22,4	24,0	23,4	24,5	24,8	
		Чист.	21,1	22,2	21,9	21,9	21,0	21,2	21,5	

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Контроль	Интактные	Гол.	20,3	20,4	20,1	20,3	20,5	20,6	20,8	0
		Хв.	22,8	22,3	23,1	23,3	23,6	23,7	23,7	
		П.л.	22,9	24,1	22,6	23,6	23,7	23,7	23,9	
		З.л.	22,9	23,4	22,4	24,0	24,1	24,2	24,4	
		Чист.	21,1	22,2	21,9	21,9	22,0	22,2	22,3	

Примечание. Гол – голова; Хв – хвост; П.л. – передние лапки; З.л. – задние лапки; Чист – чистый вес.

Анализируя данные табл. 1, установили, что при использовании дозировки сахарозаменителя в количестве от 0,075 до 0,3 мг на особь наблюдается значительный прирост массы тел животных относительно контрольной группы. При дальнейшем увеличении количества потребляемой изомальтулозы этот показатель изменяется незначительно во всех группах. Оптимальная дозировка изомальтулозы, при которой по-

казатель увеличения массы тела достигает максимального значения – 1,6, составляет 0,3 мг на мышь. Проведенные исследования состава микрофлоры при введении в рацион животных препарата изомальтулозы в этой дозировке показали, что качественный и количественный состав микрофлоры кишечника контрольной и опытной групп животных аналогичен. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика микрофлоры мышей на фоне изомальтулозы

Наименование микроорганизмов	Норма	Здоровые мыши	Здоровые мыши, получавшие изомальтулозу
<i>E. coli lac-</i>	10^6	10^7	10^6-10^7 (1обр. lac +)
<i>E. coli lac +</i>		10^7 (2обр.)	
<i>E. faecalis</i>	10^4	10^7	10^6-10^7
<i>E. faecium</i>	10^4	10^7	10^8
<i>S. aureus</i>	10^4	10^5	0(1 обр.)- 10^5
<i>E. ictaluri</i>	-	10^6	-
<i>Clostridium</i>	$\leq 10^3$	10^5	10^4-10^5
<i>Bifidobacterium</i>	$\leq 10^3$	10^3	10^3
<i>Lactobacterium</i>	10^{10}	0(2 обр.)- 10^{10}	0(2 обр.)- 10^{10}
<i>P. mirabilis</i>	10^4	0(1 обр.)- 10^7	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealiticus</i>	10^4	0(1 обр.)- 10^7	-
<i>S. epidermidis</i>	10^4	0(2 обр.)- 10^7	-
<i>Bacillus</i> spp.	10^4	0(2 обр.)- 10^6	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	$\leq 10^3$	-	-
<i>Acinetobacter</i>	-	-	10^7
<i>C. albicans</i>	10^3	-	10^6 (2обр.)- 10^4

Как видно из табл. 1, пероральное введение изомальтулозы белым беспородным мышам способствует увеличению количества энтерококков *E. faecium*, входящих в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта, *Acinetobacter* и дрожжеподобных грибов *C. albicans*, что положительно влияет на гомеостаз животных. Важно отметить, что потребление изомальтулозы снижает количество бактерий р.р. *Streptococcus*, *Proteus*, *Ewingella* (*E. ictaluri*) – представителей условно-патогенной микрофлоры. Отличия в количестве лактобактерий и бифидобактерий не наблюдалось.

Результаты исследований по изучению влияния изомальтулозы на видовой состав микрофлоры кишечника белых мышей в ус-

ловиях экспериментального дисбиоза представлены в табл. 3.

Сравнивая состав микрофлоры животных III и IV групп, можно отметить его количественное различие. У животных с экспериментальным дисбиозом, получавших изомальтулозу, наблюдается восстановление количества бактерий группы кишечной палочки (*E. coli lac +*), энтерококков (*E. faecalis*, *E. faecium*), бактерий р.р. *Streptococcus* (*S. aureus*), *Proteus* (*P. mirabilis*) до уровня, соответствующего норме. Важным показателем, отражающим положительное влияние изомальтулозы на состав микрофлоры, является восстановление количества лактобактерий.

Таблица 3

Характеристика микрофлоры мышей, получавших изомальтулозу на фоне антибиотика

Наименование микроорганизмов	Норма	I группа	II группа	III группа	IV группа
E.coli lac-	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶ -10 ⁷ (1обр. lac +)	10 ⁶ -10 ⁷	-
E.coli lac +		10 ⁷ (2обр.)		-	10 ⁶
E.faecalis	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷	10 ⁴
E.faecium	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁴
S.aureus	10 ⁴	10 ⁵	0(1 обр.)-10 ⁵	0(2 обр.)-10 ⁶	0(2 обр.)-10 ⁴
E.ictaluri	-	10 ⁶	-	-	-
Clostridium	≤ 10 ³	10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
Bifidobacterium	≤ 10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³
Lactobacterium	10 ¹⁰	0(2 обр.)-10 ¹⁰	0(2 обр.)-10 ¹⁰	-	10 ¹¹ (2 обр.)-10 ¹⁰
P.mirabilis	10 ⁴	0(1 обр.)-10 ⁷	-	0(1 обр.)-10 ⁷	-
S.cohnii subsp. urealiticus	10 ⁴	0(1 обр.)-10 ⁷	-	-	-
S.epidermidis	10 ⁴	0(2 обр.)-10 ⁷	-	-	-
Bacillus spp.	10 ⁴	0(2 обр.)-10 ⁶	-	-	-
C.pseudodiphtheriticum	≤ 10 ³	-	-	0(2 обр.)-10 ⁴	-
Acinetobacter	-	-	10 ⁷	-	10 ⁹
C.albicans	10 ³	-	10 ⁶ (2обр.)-10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶

Примечания:

- I группа – здоровые мыши;
- II группа – здоровые мыши, получавшие по 0,3 мг изомальтулозы в течение 7 дней;
- III группа – мыши с экспериментальным дисбиозом кишечника;
- IV группа – мыши с экспериментальным дисбиозом, получавшие по 0,3 мг изомальтулозы на мышь в течение 7 дней.

Заключение

Изучение влияния изомальтулозы на микрофлору кишечника белых беспородных мышей в норме и при патологии показало положительное действие сахарозаменителя на нормализацию микрофлоры кишечника животных: увеличение количества молочнокислых бактерий, снижение числа представителей условно-патогенной микрофлоры. Сходство в строении и функционировании органов пищеварительной системы (желудка, тонкого и толстого кишечника, печени) человека и мыши дает основание считать, что пребиотическое действие изомальтулозы в условиях *in vivo* может иметь место и у человека.

Работа выполнялась в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, государственный контракт № П1333 от 11.06.2010 г.

Список литературы

1. Богатырев А.Н. Качество пищи и культура питания // Пищевая промышленность. – 2006. – № 8. – С. 68–69.
2. Божко О.Ю. Изучение пребиотических свойств заменителя сахара изомальтулозы в условиях *in vitro* / О.Ю. Божко, Г.П. Шуваева, О.С. Корнеева // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 5. – URL: www.science-education.ru/99-4920
3. Корнеева О.С. Применение изомальтулозосинтазы *Erwinia rhapsontici* с целью трансформации сахарозы в изомальтулозу / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Вестник ОГУ. – Оренбург, 2009. – № 4. – С. 130–134.

4. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том I: Микрофлора человека и животных и ее функции. – М.: Изд-во ГРАНТЪ, 1998. – 288 с.

5. Шендеров Б.А. Пробиотики, пребиотики и синбиотики // Пищевые ингредиенты, сырье и добавки. – 2005. – № 2. – С. 23–26.

6. Cheetham P.S.J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapsontici* / P.S.J. Cheetham, C.E. Imber, J. Isherwood // Nature. – 1982. – Vol. 299. – P. 628–631.

References

1. Bogatyrev A.N. *Pivevaja promyshlennost'*, 2006, no. 8, pp. 68–69.
2. Bozhko O.J., Shuvaeva G.P., Korneeva O.S. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2011, no 5, available at: www.science-education.ru/99-4920.
3. Korneeva O.S. *Vestnik OGU*. – Orenburg, 2009, no. 4, pp. 130–134.
4. Shenderov B.A. *Medicinskajamikrobnajajekologijai funkcional'noepitanie*. M. : Izdatel'stvo GRANT, 1998. 288 p.
5. Shenderov B.A. *Pivevyeingridienty,syr'eidobavki*, 2005, no. 2, pp. 23–26.
6. Cheetham P.S.J. *Nature*, 1982, Vol. 29, pp. 628–631.

Рецензенты:

Грабович М.Ю., д.б.н., доцент, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж;

Тертычная Т.Н., д.с.-х.н., профессор кафедры технологии переработки растениеводческой продукции ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 26.10.2012.