

Ж. И. Исламова¹, Д. К. Огай², О. И. Абраменко², А. Л. Лим², Б. Б. Абдуазимов¹,
М. Х. Маликова¹, Р. К. Рахманбердыева¹, З. А. Хушбактова¹, В. Н. Сыров¹

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРЕБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

¹ Институт химии растительных веществ им. акад. С. Ю. Юнусова АН РУз, Узбекистан, Ташкент,
e-mail: zainab@icps.org.uz

² ООО "OROM-BIOPREPARAT" ГАК Фармацевтической промышленности РУз, Узбекистан, Ташкент

Описано выделение пектиновых полисахаридов из надземной части дикорастущего растения Узбекистана ферулы кухиستانской (*Ferula kuhistanica*), культивируемых в местных условиях яблок *Malus sieversii*, сорт розмарин (использовали яблочный жмых после получения сока) и кожуры мандаринов (*Citrus reticulata*, сорт танжерин). Определена их пребиотическая активность в отношении ряда пробиотических культур *Bifidobacterium longum* 17х и *Propionibacterium avidum* 1, а также монокультуры *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 906 и *Lactobacillus rhamnosus* 925ак. По полученным данным наиболее перспективным в этом плане представляется пектиновый полисахарид из *Ferula kuhistanica*.

Ключевые слова: пектиновые полисахариды; ферула кухистанская; жмых яблок; кожура мандаринов; пребиотическая активность.

В последние годы для профилактики и коррекции нарушенного микробиоценоза пищеварительного тракта, а также для комплексной терапии неспецифического язвенного колита [1, 2], синдрома раздраженного кишечника [3], профилактики некротизирующего энтероколита [4], аллергических реакций у детей [5 – 7] и лечения острых диарей [8] широко используются пребиотики. Они в неизменном виде достигают толстого кишечника, селективно ферментируются его микрофлорой, стимулируя активный рост таких полезных микроорганизмов, как лактобациллы и бифидобактерии. Чаще всего в качестве пребиотиков используются растительные пищевые волокна (полисахариды, олигосахариды и др.). С учетом того, что потребность в этих препаратах велика и показания к их применению расширяются, ведутся постоянные исследования по разработке новых эффективных пребиотиков. В настоящей работе проведено сравнительное изучение пребиотического потенциала пектиновых полисахаридов, выделенных из надземной части широко распространенного дикорастущего растения в Узбекистане ферулы кухиستانской (*Ferula kuhistanica*), выжимок культивируемых в местных условиях яблок (*Malus sieversii*, сорт розмарин) и кожуры мандаринов (*Citrus reticulata*, сорт танжерин). Исследования проводили с местными штаммами пробиотических культур, оценивая их жизнеспособность в сравнении с широко применяемым пребиотиком лактулозой (на основе которой создан препарат Дюфалак).

Экспериментальная химическая часть

Выделение пектиновых полисахаридов из листьев ферулы кухиستانской. 100 г листьев ферулы кухиستانской, собранной в Кашкадарьинской области на перевале Тахта-Карача (Узбекистан), после выделения водорастворимых полисахаридов пектиновые вещества экстрагировали дважды смесью 0,5 % растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) при

70 °С в течение 3 ч [9]. Экстракты объединяли и диализовали против дистиллированной воды. Упаривали до густой консистенции и осаждали спиртом в соотношении 1:3. Осадок отделяли центрифугированием, обезжировали ацетоном и сушили. Выход пектиновых веществ из ферулы кухиستانской (ПВ-Ф) составил 8,6 г.

Выделение пектиновых полисахаридов из жмыха яблок. Экстракцию пектиновых полисахаридов проводили по известной методике [10], включающей гидролиз-экстрагирование яблочных выжимок (100 г) соляной кислотой при соотношении сырья и экстрагента 1:8, 1:4 при температуре 65 – 70 °С, pH = 2,0 в течение 1,5 – 2 ч дважды. Экстракты объединяли, диализовали против проточной воды до нейтральной реакции, упаривали и осаждали этанолом в соотношении 1:3. Осадок отделяли центрифугированием и промывали спиртом в возрастающей концентрации (80 – 96 %), сушили. Выход пектиновых веществ из яблок (ПВ-Я) составил 5,47 г.

Выделение пектиновых полисахаридов из кожуры мандаринов. 50 г измельченной кожуры мандаринов дважды экстрагировали 600 мл HCl (pH = 2) в течение 1,5 – 2 ч при 80 – 85 °С [11]. Экстракты объединяли, упаривали и осаждали 2 объемами спирта. Осадок пектиновых веществ кожуры мандаринов (ПВ-М) обработали по вышеуказанной методике. Выход ПВ-М равен 2,29 г.

Все выделенные пектиновые полисахариды представляют собой аморфные порошки светло-кремового цвета, которые полностью растворяются в воде с образованием вязких растворов.

Молекулярную массу пектиновых полисахаридов определяли методом седиментационного анализа на ультрацентрифуге MOM-3170. Вязкость измеряли на вискозиметре Оствальда с диаметром капилляра 0,73 мм при температуре 22 °С. Как видно из табл. 1, наибольшей вязкостью обладают пектиновые веществ-

Таблица 1
Физико-химическая характеристика пектиновых полисахаридов

Растение, орган	Выход, %	ММ, Да	$\eta_{\text{отн}}^c$ (с 1%, H ₂ O)	Титриметрические показатели, %		
				Кс	Кэ	λ
<i>Ferula kuhistanica</i> (листья)	8,6	25500	8,4	13,5	44,6	76,7
<i>Malus sieversii</i> (выжимки)	5,47	45000	3,06	2,7	16,8	85,9
<i>Citrus reticulata</i> (кожура)	4,58	30000	14,0	3,96	10,44	72,5

Примечание. Кс и Кэ — количество свободных и этерифицированных карбоксильных групп, λ — степень этерификации.

ва из кожуры мандаринов, а высокой молекулярной массой — из яблочных выжимок.

Моносахаридный состав пектиновых полисахаридов (табл. 2) определяли после полного кислотного гидролиза: 100 мг образцов гидролизовали 3 мл 2 н. H₂SO₄, 100 °С, 24 ч. Гидролизаты обрабатывали и анализировали с помощью БХ (Filtrak FN 18) в системе бутанол — пиридин — вода (6:4:3), моносахариды фиксировали кислым фталатом анилина.

ГЖХ анализ проводили на хроматографе Chrom-5 с пламенно-ионизационным детектором, колонка из нержавеющей стали (200 × 0,3 см), 5 % Silicone XE-60 на хроматоне NAW-0,200 – 0,250 мм, 210 °С, газ-носитель — азот, скорость газа — 60 мл/мин, в виде ацетатов альдононитрилов.

Пектиновые полисахариды *F. kuhistanica* характеризуются доминирующим моносахаридом — арабинозой; в меньших количествах (2 – 3 раза) находятся галактоза и ксилоза. Аналогичное соотношение характерно и для пектиновых полисахаридов из жмыха *M. sieversii*, но следует отметить и достаточное количество глюкозы. Несколько отличаются соотношения моносахаридов ПВ-С, где арабиноза и галактоза являются преобладающими моносахаридами. Важным показателем для пектиновых полисахаридов является степень этерификации, которую определяли титриметрическим методом [12], и она соответствовала 72,5 – 85,9 %. Содержание галактуронової кислоты

Таблица 3
Влияние лактулозы и исследуемых полисахаридов на жизнеспособность *Bifidobacterium longum* 17x + *Propionibacterium avidum* 1

№	Условия эксперимента	Ig КОЕ/мл	<i>p</i>	Эффект, %	Общая титруемая кислотность, °Т
1	MRS бульон с глюкозой (контроль)	8,89 ± 0,23	-	100	150
2	MRS бульон + лактулоза	10,68 ± 0,37	< 0,001	120,1	180
3	MRS бульон + ПВ-Ф	10,56 ± 0,34	< 0,001	118,8	175
4	MRS бульон + ПВ-Я	9,86 ± 0,28	< 0,001	110,9	162
5	MRS бульон + ПВ-М	10,64 ± 0,42	< 0,001	119,76	170

Таблица 2
Моносахаридный состав пектиновых полисахаридов

Пектиновый полисахарид	Соотношение нейтральных моносахаридов, ГЖХ					Количество GalA, %
	Rha	Xyl	Ara	Glc	Gal	
<i>Ferula kuhistanica</i> (листья)	-	1,0	3,0	-	1,4	64,5
<i>Malus sieversii</i> (выжимки)	1,0	1,1	3,5	2,3	1,2	70,3
<i>Citrus reticulata</i> (кожура)	1,3	1,2	4,2	1,0	2,5	78,2

Примечание: Rha — рамноза, Xyl — ксилоза, Ara — арабиноза, Glc — глюкоза, Gal — галактоза, GalA — галактуронової кислота.

определяли карбазольным методом [13], оно варьировало в пределах 64,5 – 78,2 %. Следовательно, основными моносахаридами изучаемых пектиновых полисахаридов являются галактуронової кислота и пентозид — арабиноза.

ИК-спектры образцов снимали на ИК-Фурье спектрометре фирмы Perkin-Elmer, модель 2000, в пластинках, прессованных с KBr. Число сканирований — 100. Полосы поглощения в области (832 ± 2) см⁻¹ характерны для пектинов, имеющих α -конфигурацию гликозидных связей между остатками D-галактуронової кислоты. Полосы поглощения (889 ± 2) см⁻¹ характеризуют 1,4 тип этой связи, а (950 ± 1) см⁻¹ — деформационные колебания метильных групп, (1150 ± 2) см⁻¹ — этерифицированные карбоксильные группы. В спектре полоса поглощения (1370 ± 3) см⁻¹ характерна для метила в сложном эфире, а (1630 ± 3) см⁻¹, (1740 ± 2) см⁻¹ — валентные колебания карбонила карбоксильных групп, т.е. эфирно-карбонильная полоса. Все вышеуказанные полосы поглощения отличаются различной интенсивностью [14].

Данные ИК-спектроскопии находятся в соответствии с результатами титриметрического анализа и свидетельствуют о том, что изучаемые пектиновые полисахариды являются этерифицированными по карбоксильной группе остатками метильных групп.

Таким образом, выделены высокоэтерифицированные пектиновые полисахариды с высоким показателем относительной вязкости водных растворов, раз-

Таблица 4
Влияние лактулозы и исследуемых полисахаридов на жизнеспособность *Lactobacillus del. subsp. bulgaricus* 906

№	Условия эксперимента	Ig КОЕ/мл	<i>p</i>	Эффект, %	Общая титруемая кислотность, °Т
1.	MRS бульон с глюкозой (контроль)	10,45 ± 0,48	-	100	160
2.	MRS бульон + лактулоза	12,07 ± 0,54	< 0,05	116	180
3.	MRS бульон + ПВ-Ф	12,40 ± 0,62	< 0,05	118,7	170
4.	MRS бульон + ПВ-Я	12,03 ± 0,50	< 0,05	115,2	165
5.	MRS бульон + ПВ-М	12,66 ± 0,70	< 0,05	121,2	190

личной молекулярной массой. Основная цепь пектиновых полисахаридов состоит из α -1,4 связанных остатков D-галактурановой кислоты, а нейтральные моносахариды составляют боковые ответвления.

Экспериментальная биологическая часть

В проведенных исследованиях использовали ассоциации из местных штаммов бифидобактерий: *Bifidobacterium longum* 17x и *Propionibacterium avidum* 1, а также монокультуры *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 906 и *Lactobacillus rhamnosus* 925ak.

В стерильный MRS бульон производства Hi-Media вносили пребиотик лактулозу и исследуемые ПВ-Ф, ПВ-Я или ПВ-М до конечной концентрации 0,25 %.

Инокулят, полученный при выращивании *B. longum* 17x и *P. avidum* 1; *L. del. subsp. bulgaricus* 906, *L. rhamnosus* 925ak в MRS бульоне в течение 24 ч при 38 °С, вносили в количестве 1 мл на 9,0 мл питательной среды в пробирке. Бифидобактерии и рамнозусы выращивали при (38 ± 1) °С, болгарские палочки при 43 °С в анаэробном состоянии в атмосфере азота в течение 24 ч. При этом учитывали количество живых клеток в 1 мл культивируемой среды (lg КОЕ/мл). Эксперименты проводили в пятикратной повторности. Результаты подвергали статистической обработке с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Полученные данные показали, что внесение потенциальных пребиотиков в среду культивирования способствует их активной утилизации, увеличивая тем самым количество живых клеток.

Сопоставляя рост исследуемых культур на сбалансированной, стандартной MRS среде и на средах с пребиотическими добавками, необходимо отметить, что последние обеспечивают высокий титр живых клеток — от 10,64 до 12,66 lg КОЕ/мл (табл. 3 – 5). Стимуляционный эффект всех исследуемых веществ зависит от рода, вида и штамма исследуемых микроорганизмов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что лактулоза в концентрации 0,25 % повышает рост бифидо- и пропионобактерий на 20 %. Почти на одном уровне идет стимуляция роста при добавлении пектинов из ферулы кухистанской и кожуры мандари-

Таблица 5
Влияние лактулозы и исследуемых полисахаридов на жизнеспособность *Lactobacillus rhamnosus* 925

№	Условия эксперимента	lg КОЕ/мл	<i>p</i>	Эффект, %	Общая титруемая кислотность, °Т
1	MRS бульон с глюкозой(контроль)	10,33 ± 0,38	–	100	130
2	MRS бульон +лактозула	11,7 ± 0,48	< 0,05	113,25	149
3	MRS бульон + ПВ-Ф	11,77 ± 0,52	< 0,05	113,9	135
4	MRS бульон + ПВ-Я	10,95 ± 0,42	< 0,05	106,1	134
5	MRS бульон + ПВ-М	11,45 ± 0,32	< 0,05	110,8	138

нов (18 – 19 %) и намного меньше при добавлении пектина из яблочного жмыха. Из всех исследованных культур наиболее эффективным оказалось влияние пектиновых веществ на болгарские палочки *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 906 (табл. 4).

Титр живых клеток, в данном случае, при внесении лактулозы, ПВ-Ф, ПВ-Я и ПВ-М составляет 12,03 – 12,66 lg КОЕ/мл. Наибольший стимуляционный эффект выявлен при внесении ПВ-М (увеличение роста на 21,24 %). Высокое количество живых клеток соответствует высокому кислотообразованию — 190 °Т.

Несколько ниже увеличение количества живых клеток в культивируемой среде с этими же веществами у культуры *L. rhamnosus* 925ak. Тем не менее титр живых клеток увеличивается на 13 % при внесении лактулозы и ПВ-Ф. Для данной культуры характерно незначительное кислотообразование, составляющее от 130 до 149 °Т (табл. 5).

Активная утилизация лактулозы и исследуемых пектиновых веществ микроорганизмами тесно связана с увеличением кислотообразования в культивируемой среде. Так, если при выращивании в стандартном MRS бульоне общая титруемая кислотность соответствует 130 – 160 °Т, то с добавками значительно больше и составляет 134 – 190 °Т.

Также весьма значимые результаты получены в экспериментах при исследовании пектинов в качестве сорбентов для приготовления пробиотических препаратов (рассмотрены на примере яблочного и мандари-

Таблица 6
Влияние лактозы и исследуемых полисахаридов на количество живых иммобилизованных клеток

Наименование препарата	Исходный титр клеток до иммобилизации, lg КОЕ/мл	Титр иммобилизованных клеток в восстановленном препарате (lg КОЕ/мл) в зависимости от концентрации сорбента, %		
		0,5	1,0	1,5
Яблочный пектин				
Бифидумбактерин PL	10,6 ± 0,56	8,65 ± 0,50*	9,8 ± 0,20	9,8 ± 0,20
Лактобактерин Ором	10,12 ± 0,61	8,25 ± 0,40*	8,95 ± 0,20	8,65 ± 0,15*
Мандариновый пектин				
Бифидумбактерин PL	10,6 ± 0,56	10,6 ± 0,79	10,8 ± 0,28	9,2 ± 0,70
Лактобактерин Ором	10,12 ± 0,61	9,9 ± 0,44	9,98 ± 0,80	9,5 ± 0,52

* Достоверность по отношению к исходному титру (*p* < 0,05).

нового пектинов). Методы проведения иммобилизации описаны в работе [15]. В табл. 6 представлены данные по изучению влияния различных концентраций указанных пектинов на количество живых микроорганизмов в сублимированных препаратах, выпускаемых предприятием “OROM — BIOPREPARAT” ГАК Фармацевтической промышленности РУз: “Бифидумбактерин PL” и “Лактобактерин Ором”, микробиологический состав которых описан в [16, 17]. Оба тестируемых пектина в этих условиях проявили определенную сорбционную способность пробиотических культур. Однако следует отметить, что на мандариновом пектине отмечено более высокое содержание живых иммобилизованных клеток.

По сравнению с мандариновым пектином, яблочный пектин значительно меньше адсорбирует живые клетки пробиотических культур. Возможно, это объясняется физико-химическими особенностями этих пектинов.

Электронно-микроскопическое исследование иммобилизованной биомассы показало, что клетки бифидобактерий *B. longum* 17x густо покрывают частицы носителя и представляют собой клетки кокковидной формы, склонные к агрегации.

Изучение влияния иммобилизации на метаболическую активность и стабильность производственных партий препаратов “Бифидумбактерин PL” и “Лактобактерин Ором” показало, что эти свойства сохраняются при длительном хранении в течение более 3 лет.

Таким образом, пектиновые полисахариды, выделенные из листьев *Ferula kuhistanica*, выжимок *Malus sieversii* и кожуры *Citrus reticulata* относятся к высокоэтерифицированным полисахаридам, водные растворы которых имеют высокий показатель относительной вязкости и молекулярной массы (25500 – 45000 Da). Основная цепь исследуемых пектинов состоит из α -1,4 связанных остатков D-галактуроновой кислоты, боковые ответвления представлены нейтральными моносахаридами. Все они проявляют определенной степени выраженную пребиотическую активность, сравнимую с лактулозой (препарат дюфалак). Стимуляционный эффект на жизнеспособность

ассоциации культур бифидобактерий — *Bifidobacterium longum* 17x и *Propionibacterium avidum* 1, а также монокультур *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 906, *Lactobacillus rhamnosus* 925ak — был наиболее четко выражен у пектиновых веществ из листьев *Ferula kuhistanica*. Все это свидетельствует о том, что пектиновые вещества, выделенные из листьев *Ferula kuhistanica*, представляют наибольший интерес для создания на их основе нового эффективного пребиотического средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Fukuda, O. Kanauchi, Y. Araki, et al., *J. Mol. Med.*, **9**, 65 – 70 (2002).
2. R. Holma, P. Juvonen, M. Z. Asmawi, et al., *Scand. J. Gastroenterol.*, **37**, 1042 – 1047 (2002).
3. A. J. Burns, I. R. Rowland, *Cur. Issues Intest Microbiol.*, **1**(1), 13 – 24 (2000).
4. M. R. Stenger, K. M. Reber, P. J. Giannone, et al., *Cur. Infect. Dis Rep.*, **13**(1), 13 – 20 (2011).
5. E. M. Quigley, *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **40**(1), 207 – 222 (2011).
6. K. Kukkonen, E. Savilahti, T. Haahtela, et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119**(1), 192 – 198 (2007).
7. D. A. Osborn, J. K. Sinn, *Cochrane Database Syst Rev.*, (4):CD006474 (2007).
8. S. Arslanoglu, G. E. Moro, J. Schmitt, et al., *J. Nutr.*, **138**(6), 1091 – 1095 (2008).
9. З. Э. Ёркулов, М. Х. Маликова, Р. К. Рахманбердыева, *Химия природ. соедин.*, № 2, 169 – 171 (2011).
10. Е. А. Махова, З. А. Добронравова, А. А. Лобанова, Т. А. Данилова, Патент RU 2095996, кл. C08B 37 / 06 (1997).
11. Л. В. Донченко, *Технология пектина и пектинопродуктов*, Москва (2000), сс. 118 – 119.
12. Г. Б. Аймухамедова, З. Алиева, Н. Д. Щелухина, *Свойства и применение пектиновых сорбентов*, Фрунзе, Илим (1984).
13. *Биохимические методы анализа плодов*, Арасимович В. В. (ред.), Штинца, Кишинев (1984), сс. 12 – 14.
14. Р. К. Рахманбердыева, М. П. Филиппов, *Химия природ. соедин.*, № 2, 166 – 168 (2011).
15. М. С. Ла, Д. К. Огай, *Узб. биол. ж.*, № 1 – 2, 102 – 108 (2006).
16. Д. К. Огай, Г. Д. Золотилина, Л. Н. Панова, А. Г. Халмуратов, Патент РФ № 2048517.
17. D. K. Ogay, R. I. Fimushkina, R. V. Ulanova, S. Tillaeva, UK Patent GB 22284945 B.

Поступила 11.09.14

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE PREBIOTIC ACTIVITY OF SOME PECTIN POLYSACCHARIDES

Zh. I. Islamova^{1*}, D. K. Ogay², O. I. Abramenko², A. L. Lim², B. B. Abduazimov¹, M. Kh. Malikova¹, R. K. Rakhmanberdiyeva¹, Z. A. Khushbaktova¹, and V. N. Syrov¹

¹ Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

² OROM-BIOPREPARAT Company, State Stock Company of Pharmaceutical Industry of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

* e-mail: zainab@icps.org.uz

We describe the isolation of pectin polysaccharides from the aerial parts of *Ferula kuhistanica* plant growing wild in Uzbekistan, locally cultivated *Malus sieversii* rosemary apples (apple pomace after juice extraction), and tangerine peels (*Citrus reticulata* tangerine variety). Pronounced prebiotic activity has been confirmed against a number of probiotic cultures (*Bifidobacterium longum* 17x, *Propionibacterium avidum* I, as well as monoculture *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 906 and *Lactobacillus rhamnosus* 925ak). The obtained data show that most promising in this respect is the pectin polysaccharide from *Ferula kuhistanica*.

Keywords: pectin polysaccharides; *Ferula kuhistanica*; apple pomace; tangerine skin; prebiotic activity.