

УДК 579.66

**Филиппова А.М. [Filippova A.M.],
Денисова Е.В. [Denisova E.V.],
Андрусенко С.Ф. [Andrusenko S.F.]**

РАЗРАБОТКА НОВЫХ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА АЦИДОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ НА ОСНОВЕ ФРАКЦИЙ ТОПИНАМБУРА

The use of jerusalem artichoke (*helianthus tuberosus* L.) As a component of the nutrient solution

В данной работе были проведены исследования различных фракций топинамбура, которые можно успешно использовать в качестве компонента питательных сред для роста ацидофильных лактобактерий. Выявлена зависимость роста ацидофильной микрофлоры от введения в качестве стимуляторов фракции углеводов, органических кислот, аминокислот из топинамбура. Определены минимальные стимулирующие концентрации углеводов, органических кислот, аминокислот, для всех фракций они составляют 0,25%. Прирост бактерий при этом составляет 9,5%, 6%, 4,3% соответственно по сравнению с контрольной средой. По результатам исследования показано, что выделенные фракции оказывают стимулирующее влияние на рост и развитие микроорганизмов при добавлении к среде для культивирования. При этом наиболее эффективной является фракция углеводов топинамбура.

In this paper we present the studies of various Jerusalem artichoke fractions, which can be successfully used as a component of nutrient media for the growth of acidophilic lactobacilli. The dependence of the growth of acidophilic microflora on the introduction of a fraction of carbohydrates, organic acids, amino acids from Jerusalem artichoke as stimulants has been revealed. The minimal stimulating concentrations of carbohydrates, organic acids, amino acids are determined, for all fractions they are 0.25%. The growth of bacteria in this case is 9.5%, 6%, 4.3%, respectively, compared with the control environment. According to the results of the study, it was shown that the isolated fractions exert a stimulating effect on the growth and development of microorganisms when adding to the culture medium. In this case, the most effective fraction is the carb of Jerusalem artichoke.

Ключевые слова: топинамбур, ацидофильная палочка, питательная среда, факторы роста.

Key words: Jerusalem artichoke, acidophilous bacterium, nutrient solution, growth factors.

Быстрый рост и высокие показатели синтеза микроорганизмов напрямую зависят от питательной среды. Питательная среда должна быть сбалансирована по составу и наличию соединений, необходимых для роста и развития определенного микроорганизма. При этом актуальным является поиск недорогого сырья, включающего в состав различные факторы роста, а также источники углерода, азота и других веществ при производстве различных питательных сред.

На сегодняшний день одним из перспективных растений, широко используемых в качестве сырья для фармацевтической, пищевой промышленности относится топинамбур. В сухом веществе клубней находится значительное количество углеводов: полисахарида инулина 30–40% и плодового сахара до 7%, что дает возможность применять топинамбур в кондитерском

производстве. По этой же причине топинамбур представляет большую ценность как сырье для производства спирта и сахара. Особенно большое значение топинамбур имеет как кормовая культура. Клубни ее содержат в среднем около 80% воды, 13–17% азотистых экстрактивных веществ, 1,5% сырого протеина [1, 6].

Одной из важных особенностей топинамбура является сбалансированность его по микро- и макроэлементному составу. Он содержит большое количество железа, кремния, цинка, магния, калия, марганца, фосфора, кальция.

Клубни топинамбура практически не накапливают в себе нитраты, способные вызывать мутации клеток, и, следовательно, развитие онкологических процессов, и, напротив, за счет своего уникального химического состава превращают нитраты в безопасные соединения и используют для синтеза необходимых аминокислот [7].

В настоящее время для профилактики и лечения дисбактериозов различной этиологии используют пищевые добавки, лекарственные препараты, продукты функционального питания, а также продукты питания, содержащие ацидофильные лактобактерии. Лактобактерии являются представителями резидентной микрофлоры человека, в первую очередь обнаружены в полости рта, кишечника и влагалища. Наиболее часто встречаемыми являются *Lactobacillus acidophilus*. Эти микроорганизмы способствуют перевариванию сложных белков в организме человека [4, 5]. При этом выделяются молочная кислота, витамины группы В, ферменты и антибактериальные вещества, которые замедляют рост патогенной микрофлоры [2]. Кроме того, эти бактерии улучшают сопротивляемость организма к стафилококкам, усиливают всасывание питательных веществ в толстом кишечнике и снижают уровень холестерина в крови. Недостаток этих микроорганизмов усиливает активности существующих патогенных бактерий, что увеличивает риск развития множества заболеваний.

Таким образом, было актуально оценить эффективность использования клубней топинамбура в качестве сырья для культивирования ацидофильных лактобактерий.

Результаты исследований в совокупности могут быть использованы при разработке нового состава питательных сред в микробиологии для выращивания ацидофильных лактобактерий. Целью работы являлось исследование взаимосвязи структуры компонентов питательной среды с добавлением фракций топинамбура и роста ацидофильной микрофлоры.

Материалы и методы исследований

Для исследования использовались клубни топинамбура, выращенного в Ставропольском крае. Сырье заготавливалось в осенний период (сентябрь-октябрь). В качестве источника бактерий *L.acidophilus* использовали препарат 410San, L.Acidophilus San (Л. Ацидофилус Сан). Одна капсула препарата содержит $2,5 \times 10^9$ лиофилизированных клеток.

Получение углеводных фракций топинамбура

Готовили водную вытяжку из клубней топинамбура. Для этого измельченные клубни топинамбура переносили в ступку, растирали с 1–2 г песка до однородной массы. Затем содержимое переносили через воронку в мерную колбу на 250 мл, доливали горячей дистиллированной водой в соотношении 1:6 и нагревали 30 мин на водяной бане при $t = 75\text{--}80^\circ\text{C}$.

После охлаждения вытяжки осаждали белки, содержимое доводили до метки, закрывали пробкой и перемешивали.

После отстаивания вытяжку фильтровали в сухой стакан, отбирали 50 мл фильтрата в колбу на 200 мл. В эту же колбу прибавляли раствор сульфат натрия Na_2SO_4 (5:1) для осаждения избытка ионов свинца, водой доводили объем до метки, закрывали пробкой, взбалтывали и давали отстояться. Жидкость фильтровали в стакан через двойной бумажный фильтр [3].

Получение фракции органических кислот топинамбура

Для приготовления водной вытяжки органических кислот клубней топинамбура отвешивали на теххимических весах 25 г клубней. Вещество растирали в фарфоровой ступке с 2–10 мл воды и 3 г песка. Измельченную массу количественно с 50 мл воды переносили в мерную колбу емкостью 250 мл, взбалтывали до получения однообразной взвеси и добавляли 1 мл толуола. Колбу наполняли водой до метки, болтушку хорошо перемешивали и настаивали 2 часа при комнатной температуре. Затем фильтровали, прозрачного фильтрата отмеривали пипеткой 50 мл вытяжки, переносили ее в колбу и титровали 0,1 н. раствором щелочи в присутствии фенолфталеина до слабо-розового окрашивания.

Получение фракции аминокислот топинамбура

Для приготовления вытяжки аминокислот брали 4–6 г измельченных клубней топинамбура. В стакан с навеской приливали около 50 см³ дистиллированной воды, перемешивали содержимое стеклянной палочкой и стакан устанавливали на кипящую водяную баню. После того как температура в стакане с растительным веществом достигла 60°C, не охлаждая содержимого стакана, прибавляли в него 25 см³ раствора медного купороса – CuSO_4 , а затем при помешивании небольшими порциями туда же приливали 25 см³ раствора NaOH . Образовалась основная соль сернокислой меди ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$), которая и осаждают белки. Выпадал осадок комплекса белковых молекул и меди. стакан с содержимым ставили на отстаивание в течение 1–1,5 ч. Осадок в стакане промывали декантацией несколько раз горячей дистиллированной водой. Затем осадок полностью без потерь переносили на фильтр и продолжали промывание горячей водой до исчезновения ионов серной кислоты в вытекающем фильтрате (реакция с раствором BaCl_2). Отсутствие мути после добавле-

ния $BaCl_2$ к небольшой порции вытекающего фильтрата указывало на то, что все небелковые азотсодержащие соединения отмыты из осадка белка.

Подготовка посевного материала ацидофильных лактобактерий

Лиофильно высушенный препарат 410 San, *L. Acidophilus* San восстанавливали, растворяя 1 капсулу в 100 мл стерильного гидролизованного молока. Через 5 мин экспозиции при комнатной температуре суспензию микроорганизмов стерильно переносили пипеткой из флакона в пробирку. Концентрация живых ацидофильных лактобактерий в этой исходной суспензии составляла $2,5 \times 10^7$ на 1 мл молока.

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящей работе в качестве возможных стимуляторов роста *L. acidophilus* испытывали следующие БАВ, выделенные из топинамбура: фракция углеводов; фракция органических кислот; фракция аминокислот.

Определение минимальной стимулирующей концентрации каждого из выше указанных биологических материалов в отношении ацидофильных лактобактерий проводили методом разведения в гидролизованном молоке.

Полученные фракции углеводов топинамбура вносили в различных концентрациях: 0,25%, 0,5% и 0,75% в готовое гидролизованное молоко.

Из исходной суспензии ацидофильных лактобактерий, содержащей $2,5 \times 10^7$ живых м.к. в 1 мл среды готовили разведением на молоке, содержащем 10^4 м.к. в 1 мл и стерильно засеивали из него по 2,0 мл во все опытные пробирки с разведениями биологического материала в молоке, а также в контрольную пробирку К1, содержащую 2 мл молока без биологического материала. Получали таким образом в посевах концентрацию живых бактерий, равную 5 тыс./мл. Контрольную пробирку К2, содержащую 4 мл молока, не засеивали. Все пробирки помещали в термостат при $37,5 \pm 0,5$ °С. Через 24 часов культивирования посевов учитывали результаты роста. Результаты роста бактерий учитывали по методу Виноградского-Брида. Результаты эксперимента представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ СТИМУЛИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ФРАКЦИЙ ПОЛИСАХАРИДОВ ТОПИНАМБУРА

Исследованные субстанции	Концентрация биоматериала, %			Контроль
	0,25	0,5	0,75	
инулин	$6,03 \pm 0,14$	$6,21 \pm 0,15$	$6,27 \pm 0,13$	$5,69 \pm 0,14$
пектин	$5,76 \pm 0,16$	$5,80 \pm 0,15$	$5,87 \pm 0,14$	$5,69 \pm 0,14$
водная вытяжка углеводов	$6,23 \pm 0,13$	$6,30 \pm 0,15$	$6,34 \pm 0,13$	$5,69 \pm 0,14$

Количество живых клеток в 1 мл культивируемой среды выражено в lg КОЕ/мл.

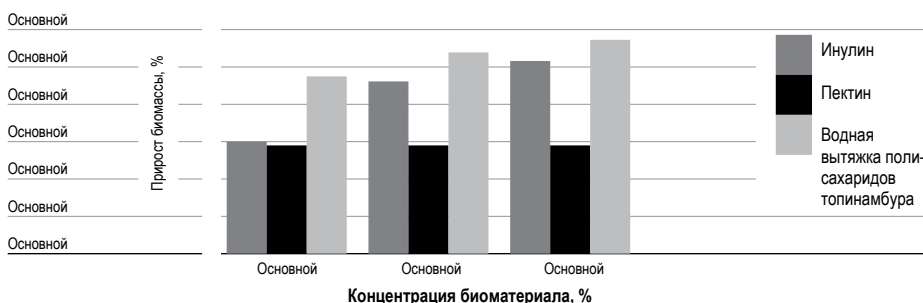


Рисунок 1. Стимулирующее влияние углеводных фракций топинамбура на рост ацидофильной микрофлоры.

Определена минимальная стимулирующая концентрация фракции углеводов на рост ацидофильных лактобактерий в гидролизованном молоке, и она составляет 0,25%. Прирост бактерий при этом составляет 9,5% по сравнению с контрольной средой.

Полученные фракции органических кислот топинамбура вносили в различных концентрациях: 0,25%, 0,5% и 0,75% в готовое гидролизованное молоко, по методике описанной выше. Результаты эксперимента представлены в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ СТИМУЛИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ФРАКЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ТОПИНАМБУРА

Исследованные субстанции	Концентрация биоматериала, %			Контроль
	0,25	0,5	0,75	
Фракция органических кислот	6,06 ± 0,10	6,14 ± 0,12	6,08 ± 0,10	5,71 ± 0,15

Количество живых клеток в 1 мл культивируемой среды выражено в lg КОЕ/мл.

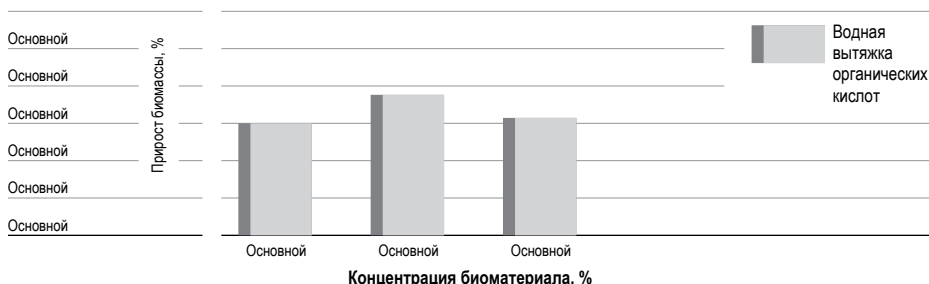


Рисунок 2. Стимулирующее влияние фракции органических кислот топинамбура на рост ацидофильной микрофлоры.

Минимальная стимулирующая концентрации фракции органических кислот составляет 0,25%. Прирост ацидофильных лактобактерий составляет 6% по сравнению с контрольной средой.

Полученные фракции аминокислот топинамбура вносили в различных концентрациях: 0,25%, 0,5% и 0,75% в готовое гидролизованное молоко.

Результаты эксперимента представлены в таблице 3 и на рисунке 3.

Таблица 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ СТИМУЛИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ФРАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ ТОПИНАМБУРА

Исследованные субстанции	Концентрация биоматериала, %			Контроль
	0,25	0,5	0,75	
Фракция аминокислот	5,73 ± 0,14	5,83 ± 0,14	5,92 ± 0,13	5,49 ± 0,13

Количество живых клеток в 1 мл культивируемой среды выражено в lg КОЕ/мл.

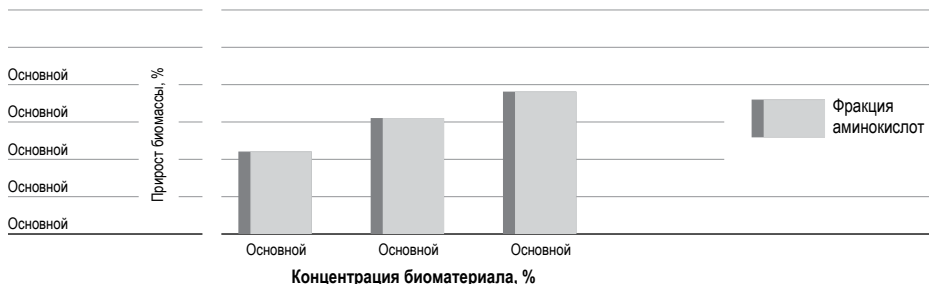


Рисунок 3. Стимулирующее влияние фракции аминокислот топинамбура на рост ацидофильной микрофлоры.

Определена минимальная стимулирующая концентрация фракции аминокислот составляет 0,25%. Прирост ацидофильных лактобактерий составляет 4,3% по сравнению с контрольной средой

Таким образом, выделенные из топинамбура фракции углеводов, витаминов, органических кислот, аминокислот могут рассматриваться как перспективные компоненты питательных сред для культивирования *L.acidophilus*, а также как потенциальные пребиотические средства. В системе опытов *in vitro* они оказывают стимулирующее влияние на рост и развитие микроорганизмов при добавлении к среде для культивирования. Наиболее эффективно в этом плане действует фракция углеводов топинамбура.

Библиографический список

1. Виноградова А.В., Паклина О.В., Анашкина Е.Н. Топинамбур – перспективное сырье биотехнологии / Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. 2010. № 11. С. 137–142.
2. Иркитова, А.Н. Эколого-биологическая оценка штаммов *Lactobacillus acidophilus*, используемых в производстве пробиотических продуктов: автореф. дис. ... канд. биолог. наук / Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук. Пермь, 2012.
3. Лапенко М.А., Аванесян С.С., Андрусенко С.Ф. Подбор оптимальных параметров для выделения высокомолекулярных углеводов на примере инулина / В сборнике: XII Международная научно-инновационная конференция аспирантов, студентов и молодых ученых с элементами научной школы «Теоретические знания – в практические дела» сборник материалов конференции: в 2 ч. Омск, 2011. С. 37–39.
4. Лысенко Ю.А., Лунова А.В., Волкова С.А., Николаенко С.Н., Петрова В.В. Подбор оптимальной питательной среды для культивирования, концентрирования и высушивания клеток *Lactobacillus acidophilus* // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2014. № 102. С. 689–699.
5. Мустафаев А.А., Лысенко Ю.А., Пономарева Л.О., Носенко А.В., Петрова В.В., Ситников И.В. Использование продуктов растительного сырья как основы для культивирования лактобактерий // В сборнике: Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции Сборник статей по материалам II научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. 2016. С. 204–207.
6. Топинамбур-инновационный ресурс в развитии экономики России / В.И. Старовойтов, О.А. Старовойтова, П.С. Звягинцева [и др.] // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. 2013. №2. С. 30–33.
7. Титок В., Веевник А., Ярошевич М. Топинамбур – культура многофункционального назначения / Наука и инновации. 2014. Т. 5. № 135. С. 26–28.

References and Internet resources

1. Vinogradova A.V., Paklina O.V., Anashkina E.N. Topinambur – perspektivnoe syr'e biotekhnologii (The Jerusalem artichoke is a promising raw materials of biotechnology), Vestnik Permskogo natsional'nogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Khimicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya, 2010, No 11, pp. 137–142.
2. Irkitova, A.N. Ekologo-biologicheskaya otsenka shtammov lactobacillus acidophilus, ispol'zuemykh v proizvodstve probioticheskikh produktov (Environmental and biological evaluation of strains of lactobacillus acidophilus, used in the production of probiotic products): Avtoref. dis. ... kand. biolog. nauk / Institut ekologii i genetiki mikroorganizmov Ural'skogo otdeleniya Rossiiskoi akademii nauk, Perm', 2012.
3. Lapenko M.A., Avanesyan S.S., Andrusenko S.F. Podbor optimal'nykh parametrov dlya vydeleniya vysokomolekulyarnykh uglevodov na primere inulina (The selection of optimal parameters for isolation of high molecular weight carbohydrates, for example, inulin), V sbornike: XII Mezhdunarodnaya nauchno-innovatsionnaya konferentsiya aspirantov, studentov i molodykh uchenykh s elementami nauchnoi shkoly "Teoreticheskie znaniya – v prakticheskie dela" sbornik materialov konferentsii: v 2 ch. – Omsk, 2011, pp. 37–39.
4. Lysenko Yu.A., Luneva A.V., Volkova S.A., Nikolaenko S.N., Petrova V.V. Podbor optimal'noi pitatel'noi sredy dlya kul'tivirovaniya, kontsentrirvaniya i vysushivaniya kletok lactobacillus acidophilus (Selection of the optimal nutrient medium for culturing, concentration and drying of cells of lactobacillus acidophilus), Politematicheskii setevoi elektronnyi nauchnyi zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2014, No 102, pp. 689–699.
5. Mustafaev A.A., Lysenko Yu.A., Ponomareva L.O., Nosenko A.V., Petrova V.V., Sitnikov I.V. Ispol'zovanie produktov rastitel'nogo syr'ya kak osnovy dlya kul'tivirovaniya laktobakterii (Product use plant materials as the basis for the cultivation of lactobacilli), V sbornike: Sovremennye aspekty proizvodstva i pererabotki sel'skokhozyaistvennoi produktsii Sbornik statei po materialam II nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh, 2016, pp. 204–207.
6. Topinambur – innovatsionnyi resurs v razvitii ekonomiki Rossii (Jerusalem artichoke – an innovative resource in the development of Russia's economy), V.I. Starovoitov, O.A. Starovoitova, P.S. Zvyagintseva [i dr.], Pishchevye ingredienty. Syr'e i dobavki, 2013, No 2, pp. 30–33.
7. Titok V., Veevnik A., Yaroshevich M. Topinambur – kul'tura mnogofunktsional'nogo naznacheniya (Jerusalem artichoke – a culture multi-purpose), Nauka i innovatsii, 2014, T. 5, No 135. pp. 26–28.