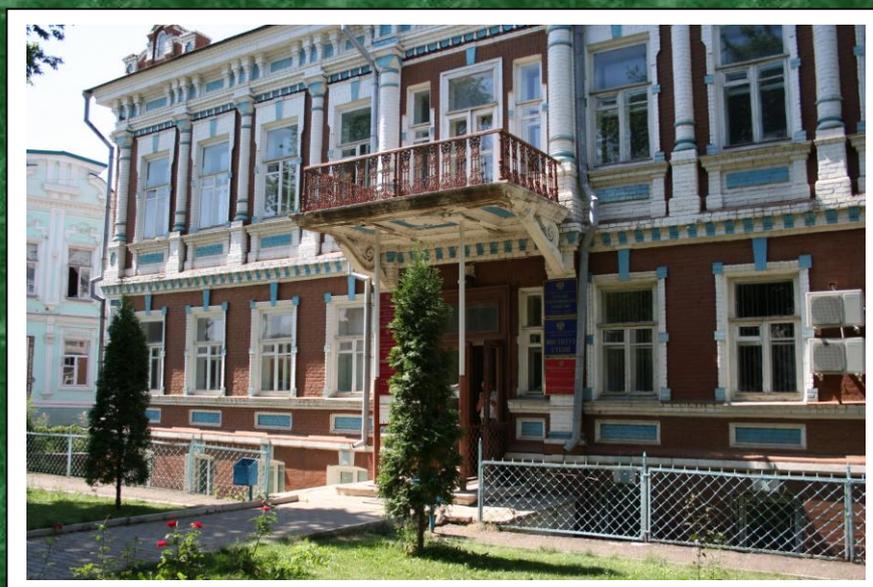


Учредители:  
Уральское отделение РАН  
Оренбургский научный центр УрО РАН

**Бюллетень**  
**Оренбургского научного центра**  
**УрО РАН**  
(электронный журнал)



**2012 \* № 3**

On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

© А.В. Вальшев, В.В. Головченко, 2012

УДК 579.61

*А.В. Вальшев<sup>1</sup>, В.В. Головченко<sup>2</sup>*

## **ПРЕБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

<sup>1</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия;

<sup>2</sup> Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

В обзоре представлены данные о влиянии пектиновых полисахаридов и их производных на рост ключевых компонентов микробиоты пищеварительного тракта человека. Описано влияние углеводов данной группы на плотность популяции смешанных культур бактерий из образцов фекалий в условиях *in vitro*. Охарактеризована связь между химической структурой пектинов и их способностью стимулировать рост бифидобактерий. Приводятся результаты исследований о получении и практическом применении бифидогенных соединений из сырья, содержащего пектины.

*Ключевые слова:* пребиотики, пектины, полисахариды, олигосахариды, бифидобактерии, кишечная микробиота

*A.V. Valyshev<sup>1</sup>, V.V. Golovchenko<sup>2</sup>*

## **PREBIOTIC ACTIVITY OF PECTINS AND THEIR DERIVATIVES**

<sup>1</sup> Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Physiology Komi SC UrB RAS, 50, Pervomaiskaya str., Syktyvkar 167982, Russia

In review data on influence of pectic polysaccharides and their derivatives on the growth of key components of human intestinal microbiota are presented. The *in vitro* effects of this carbohydrate group on population density of mixed bacterial cultures from faecal samples are described. The relationship between chemical structures of pectins and their bifidogenic potential is characterized. Results of research on the production and practical implementation of bifidogenic substances from pectin-containing sources are depicted.

*Key words:* prebiotics, pectins, polysaccharides, oligosaccharides, bifidobacteria, intestinal microbiota

В 1995 г. Гленн Гибсон и Марсель Роберфройд предложили термин «пребиотик» для характеристики «неперевариваемого пищевого ингредиента, благотворно влияющего на организм хозяина за счет избирательной стимуляции роста и/или активности одной группы или ограниченного числа видов бактерий

в толстой кишке и, таким образом, улучшающего здоровье хозяина» [5]. Поскольку данное определение стали широко использовать по отношению к различным пищевым олиго- и полисахаридам, потребовалось уточнение - ингредиент должен: 1) быть устойчивым к кислотности среды в желудке, гидролизу ферментами млекопитающих и всасыванию в желудочно-кишечном тракте; 2) сбразиваться кишечной микрофлорой и 3) избирательно стимулировать рост и/или активность кишечных бактерий, связанных со здоровьем и благополучием [4]. Так как основным представителем таких бактерий считают микроорганизмы рода *Bifidobacterium*, было осуществлено тестирование большого ряда соединений на бифидогенную активность: инулина, олигофруктозы, лактулозы, лактосахарозы, галакто-, изомальто-, ксило-и глюкоолигосахаридов и других веществ [11].

Одним из классов растительных полисахаридов являются пектиновые вещества (пектины), содержащиеся во всех высших цветковых растениях [1]. Пектины используются в пищевой промышленности (в качестве гелеобразователей, загустителей), а также в медицинской и фармацевтической промышленности (в качестве веществ с чрезвычайно широким спектром физиологической активности). Высокое содержание пектинов в ягодах, фруктах, овощах, корнеплодах ставит вопрос о возможном их применении в качестве пребиотических соединений. Однако до недавнего времени эти исследования были сравнительно малочисленны.

Результаты одного из первых сравнительных исследований бифидогенных свойств пектинов и олигогалактуронанов *in vitro* опубликованы в 2002 г. [8] В работе использовали высокометилэтерифицированный (степень метилэтерификации (СМ) - 66%) цитрусовый пектин (НМР) и низкометилэтерифицированный (СМ 8%) яблочный пектин (LMP). Олигогалактуронаны получали путем контролируемого гидролиза НМР (POS I) и LMP (POS II). Исследование роста чистых культур кишечных бактерий в присутствии данных углеводов показало, что в целом низкометилэтерифицированные соединения являются более предпочтительными субстратами для роста микроорганизмов, чем их высокометилэтерифицированные аналоги. Бифидобактерии *B. angulatum*, *B. infantis* и *B. adolescentis* не способны к росту в среде с НМР, но растут при наличии соответствующего олигосахаридов. Бактерии *Bacteroides thetaiotamicron* и *Clostridium ramosum* растут в среде с НМР, но не с POS I. Другие «полезные» микроор-

ганизмы, часто используемые в пробиотиках (*B. lactis* Bb12, *L. plantarum* и *L. pentosus*), не дают какого-либо видимого роста после 48 ч инкубации в среде с POS I, но растут в среде с НМР. Бактерии *C. innocuum* не растут в присутствии POS II, хотя имеют очень высокую скорость роста в среде с LMP (13,92 ч<sup>-1</sup>). Скорость роста *C. perfringens* ниже при инкубации с POS II (по сравнению с LMP), тогда как *B. pseudolongum* и *B. adolescentis* имеют более высокую скорость роста в среде с POS II, а не с LMP. Однако, лактобациллы растут лучше при добавлении в качестве источника углерода LMP.

Интересные данные были получены при оценке влияния пектинов и их производных на рост смешанной периодической культуры в условиях ферментера. Количество микроорганизмов определяли методом флюоресцентной гибридизации *in situ*, а пребиотический индекс (PI) на определенный момент времени  $t_x$  рассчитывали по формуле:

$$PI_{t_x} = \frac{(\Delta \log_{10} Bifidobacteria)_{t_x-t_0}}{(\log_{10} TotalCounts)_{t_x}} + \frac{(\Delta \log_{10} LAB)_{t_x-t_0}}{(\log_{10} TotalCounts)_{t_x}} - \frac{(\Delta \log_{10} Bacteroides)_{t_x-t_0}}{(\log_{10} TotalCounts)_{t_x}} - \frac{(\Delta \log_{10} Clostridia)_{t_x-t_0}}{(\log_{10} TotalCounts)_{t_x}},$$

где Total Counts – общее количество микроорганизмов, Bifidobacteria - количество бифидобактерий, LAB – количество молочно-кислых бактерий (*Lactobacillus/Enterococcus*), Bacteroides – количество бактероидов, Clostridia – количество клостридий (*Clostridium subgrp. histolyticum*).

По сравнению со значением PI<sub>12</sub> для олигофруктозы (которая, как известно, является пребиотиком) - 0,118, ни один из исследованных продуктов не обладает выраженным пребиотическим действием, но во всех случаях олигосахариды имеют более высокие значения PI, чем их родительские полисахариды (табл. 1).

Этот эффект молекулярной массы на пребиотический потенциал был также выявлен у ксилоолигосахаридов [6], олигодекстранов [9] и глюкоолигосахаридов [12]. Увеличение периода брожения приводит к снижению PI пектинов; пребиотический индекс олигосахаридов, напротив, повышается.

LMP имеет более высокий PI, чем НМР; пребиотический индекс для POS II выше, чем для POS I. Данное исследование наглядно продемонстрировало, что степень этерификации (СЭ) пектина влияет на сбразивание субстрата: вы-

сокометилэтерифицированные источники определяют более низкую скорость роста микроорганизмов по сравнению с низкометилэтерифицированными [8]. Подобные результаты были получены в работе [2] при исследовании пектинов со СЭ 95, 66, 34 и 0%: высокоэтерифицированные пектины деполимеризуются и ферментируются фекальной микрофлорой человека *in vitro* (рН 7,8) медленнее, чем их низкоэтерифицированные аналоги. Высокоэтерифицированный пектин и олигогалактуронаны продолжают присутствовать после 24 ч инкубации с кишечной микрофлорой, тогда как следы низкоэтерифицированных образцов отсутствуют.

Таблица 1. Пребиотический индекс пектинов и их производных [8]

Пектины и их производные	Пребиотический индекс на момент времени, ч*		
	8	24	48
HMP	0,016	-0,11	0,004
LMP	0,066	0,033	0,012
POS I	0,046	0,071	0,081
POS II	0,082	0,092	0,120

\* - ферментация в анаэробных условиях при рН 6,8 и температуре 37°C.

Пектины имеют сложную структуру и роль их отдельных участков в процессах микробного брожения плохо изучена. В этом плане интерес представляют данные сравнительного исследования пектинов и их производных на состав микробной популяции образцов фекалий человека в условиях *in vitro* (ферментер с рабочим объемом 5 мл, контроль температуры и рН) [10]. Некоторые исследованные препараты (табл. 2) имеют кислую природу (OGalA и MOGalA), другие – нейтральную (OAr и PGOS); OGalA включают остатки галактуроновой кислоты со свободной карбоксильной группой, MOGalA – с метилэтерифицированной. Две фракции OGalA различались степенью полимеризации (СП). ORham имеет в углеводной цепи чередующиеся остатки рамнозы и галактуроновой кислоты, другие являются гомогенными олигосахаридами. OGalA, MOGalA и ORham имеют линейную структуру, тогда как OAr и PGOS могут содержать разветвление.

За исключением ORham, соединения, содержащие остатки галактуроновой кислоты (PGalA, OGalA DP5, OGalA DP9, MPec и MOGalA) не способствуют росту бифидобактерий: уровень последних в процессе ферментации остается стабильным или имеет тенденцию к снижению. Для галактана, PGOS, ара-

бинана и OAg отмечен схожий с инулином характер действия. Значительное повышение количества бифидобактерий происходит при росте в среде с PGOS, арабинаном и OAg в промежутке между 12 и 36 ч ферментации. Галактан повышал уровень бифидобактерий в промежутке между 12 и 24 ч после инокуляции проб. Препарат ORham оказывает только транзиторный бифидогенный эффект: значительное повышение количества *Bifidobacterium* spp. отмечено через 12 ч брожения.

Таблица 2. Пектины и их производные, использованные в исследовании [10]

Родительский полимер	Олигомер
Галактуронан (PGalA)	Олигогалактурониды (OGalA DP5; средняя СП 5)
Галактуронан (PGalA)	Олигогалактурониды (OGalA DP9; средняя СП 9)
Метилэтерифицированный цитрусовый пектин (MPec; степень метилэтерификации 34,5%)	Метилэтерифицированные олигогалактурониды (MOGalA; степень метилэтерификации 29%, средняя СП 5)
Рамногалактуронан I из слизи семян резуховидки Таля ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Олигорамногалактурониды (ORham; средняя СП 10)
Галактан мякоти картофеля (галактан)	Олигогалактозиды (PGOS; средняя СП 5)
Свёкольный арабинан (арабинан)	Олигоарабинозиды (OAg; средняя СП 6)

Бактерии *Faecalibacterium prausnitzii* не растут в присутствии большинства субстратов, включая инулин, но повышенное количество микроорганизмов наблюдали при росте в среде с MOGalA и MPec; статистически значимое увеличение числа бактерий было отмечено только при инкубации с MOGalA. Отличий при росте бактерий групп *Lactobacillus/Enterococcus* и *E. rectale/C. coccoides* в среде с нейтральными и кислыми олигосахаридами в качестве субстратов не было отмечено; общая концентрация клеток микроорганизмов также не определяется химической природой соединений.

Значительное повышение числа бактерий группы *Bacteroides/Prevotella* было выявлено при росте на всех субстратах с 12 ч от начала процесса брожения. Плотность популяций *Bacteroides/Prevotella* не изменяется при росте в среде с OGalA DP5, но повышается через 36 ч в среде с MPec. Значительное повышение количества *C. histolyticum* наблюдается при сбраживании PGalA. Уве-

личение (по сравнению с базисным уровнем) общего количества бактерий происходит при росте на всех углеводах, за исключением МРес, но значительных отличий, определяемых субстратами, не было выявлено [10].

С наличием пектина в яблоках связывают их влияние на кишечную микробиоту человека [13]. Инкубация образцов фекалий здоровых людей в жидкой питательной среде с яблочным пектином приводит к увеличению содержания бифидобактерий и лактобацилл (по сравнению со средой без пектина). После употребления яблок (два яблока в день в течение двух недель) здоровыми взрослыми волонтерами (восемь человек) количество бифидобактерий в фекалиях повышается ( $p < 0,05$  на 7 день и  $p < 0,01$  на 14 день). Количество лактобацилл и стрептококков/энтерококков также увеличивается. В то же время число лецитиназоположительных клостридий (включая *C. perfringens*) достоверно снижается; тенденция к снижению отмечена для энтеробактерий и псевдомонад.

Грудное молоко человека содержит нейтральные (75-85%) и кислые (15-25%) олигосахариды. Для получения продукта, лучше соответствующего по химическому составу материнскому молоку, к хорошо известным нейтральным пребиотикам – галактоолигосахаридам (ГОС) и длинноцепочечным фруктоолигосахаридам (ФОС) – добавили кислые олигосахариды (КОС), полученные при гидролизе пектина. Введение комбинации ГОС/ФОС/КОС в молочную смесь приводит к повышению содержания бифидобактерий и лактобацилл в фекалиях младенцев [3]. Схожие результаты продемонстрированы в другом исследовании [7]: повышение количества бактерий рода *Bifidobacterium* и снижение доли групп *Bacteroides* и *Clostridium coccoides* в фекалиях детей на смешанном вскармливании, получающих комбинацию ГОС/ФОС/КОС. Отмечено, что доля бифидобактерий значительно выше в группе детей, получавших ГОС/ФОС/КОС (по сравнению с группой ГОС/ФОС).

Получение бифидогенных соединений из сырья, содержащего пектины, может быть достаточно простым биотехнологическим процессом, обеспечивающим высокий выход целевых компонентов. Примером может являться выделение растворимых волокон из картофельной пульпы, которая образуется в больших объемах при промышленном производстве картофельного крахмала и обычно плохо утилизируется. Обработка картофельной пульпы пектинлиазой из *Aspergillus nidulans* (1,0% в весовом отношении, фермент/субстрат) и поли-

галактуроназой из *Aspergillus aculeatus* (1,0% в весовом отношении, фермент/субстрат) при pH 6,0 и 60°C приводит к высвобождению 75% (в весовом отношении) сухого вещества из 1% (в весовом отношении) картофельной пульпы в течение 1 мин [14]. Разделение по молекулярной массе солюбилизированных волокон выявило две основные фракции. Первая фракция с высоким содержанием галактуроновой кислоты и молекулярной массой 10-100 кДа представлена главным образом гомогалактуронаном. Вторая фракция (молекулярная масса более 100 кДа) с высоким содержанием галактозы состоит, по видимому, главным образом из  $\beta$ -1,4-связанных цепей галактана рамногалактуронана I. Сбраживание обеих фракций *in vitro* микробными сообществами из образцов фекалий трех здоровых волонтеров показало, что они обладают более выраженным бифидогенным действием, чем ФОС. Важно отметить, что волокна с молекулярной массой более 100 кДа избирательно повышают плотность популяций бифидобактерий и лактобацилл в 2-3 раза больше, чем ФОС [14].

Наличие пектина в соевом молоке не только способствует поддержанию жизнеспособности пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий (концентрация микроорганизмов превышала  $10^7$  КОЕ/мл через 24 инкубации), но и значительно усиливает их рост [15].

Представленные результаты свидетельствуют о том, что пектиновые вещества могут представлять значительный интерес для создания на их основе новых групп лекарственных средств, содержащих пребиотический компонент (например, синбиотиков), или продуктов функционального питания для профилактики и лечения дисбиотических нарушений и болезней микробной этиологии человека.

*(Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-И-4-2052 «Пектиновые полисахариды для лечения и профилактики инфекционных процессов»).*

## **Литература**

1. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорган. химия. 2009. 35(3): 293-310.
2. Dongowski G., Lorenz A. Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by *in vitro* treatment of pectin with human faecal flora // Carbohydr. Res. 1998. 314(3-4): 237-244.
3. Fanaro S., Jelinek J., Stahl B. et al. Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2005. 41 (2): 186-190.

4. Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J.A.E., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics // *Nutr. Res. Rev.* 2004. 17(2): 259-275.
5. Gibson G.R., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // *J. Nutr.* 1995. 125 (6): 1401-1412.
6. Hartemink R., Van Laere K.M.J., Mertens A.K.C., Rombouts F.M. Fermentation of xyloglucan by intestinal bacteria // *Anaerobe.* 1996. 2(4): 223-230.
7. Magne F., Hachelaf W., Suau A. et al. Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008. 46 (5): 580-588.
8. Olano-Martin E., Gibson G.R., Rastall R.A. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides // *J. Appl. Microbiol.* 2002. 93 (3): 505-511.
9. Olano-Martin E., Mountzouris K.C., Gibson G.R., Rastall R.A. In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria // *Br. J. Nutr.* 2000. 83 (3): 247-255.
10. Onumpai C., Kolida S., Bonnin E., Rastall R.A. Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. 77 (16): 5747-5754.
11. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited // *J. Nutr.* 2007. 137(3 Suppl. 2): 830S-837S.
12. Rycroft C.E., Jones M.R., Gibson G.R., Rastall R.A. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides // *J. Appl. Microbiol.* 2001. 91(5): 878-887.
13. Shinohara K., Ohashi Y., Kawasumi K. et al. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans // *Anaerobe.* 2010. 16(5): 510-515.
14. Thomassen L.V., Vignæs L.K., Licht T.R. et al. Maximal release of highly bifidogenic soluble dietary fibers from industrial potato pulp by minimal enzymatic treatment // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. 90(3): 873-884.
15. Yeo S.K., Liong M.T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk // *J. Sci. Food Agric.* 2010. 90(2): 267-275.

*Поступила 20.09.2012*

*(Контактная информация: Вальшев Александр Владимирович - доцент, к.м.н., заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, ИКВС УрО РАН, р.т. (3532) 778697, e-mail: valyshev@esoo.ru)*