

**Є.П. Пивоваров<sup>1</sup>, С.К. Воцелко<sup>2</sup>, Н.В. Кондратюк<sup>3</sup>, О.П. Неклеса<sup>1</sup>,  
О.О. Гринченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Харківський державний університет харчування та торгівлі,  
вул. Ключківська, 333, Харків ДСП, Д61051, Україна

<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна

<sup>3</sup> Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ ДСП, Д49050, Україна

## **РОЛЬ АЛЬГІНАТ-КАЛЬЦІЄВОГО ГЕЛЮ ЯК ЗАХИСНОГО КОМПОНЕНТА ШТАМУ *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* BB 12 ВІД АГРЕСИВНИХ ЧИННИКІВ ТРАВНОГО ТРАКТУ**

*Досліджено вплив агресивних чинників травного тракту на вміст вільних та інкапсульованих клітин пробіотичного препарату на основі *Bifidobacterium lactis* BB 12. Вивчено фізико-хімічні характеристики основного компонента захисної оболонки даного пробіотичного препарату – альгінат-кальцієвого гелю під впливом агресивних чинників травного тракту. Отримані результати свідчать про можливість використання капсул як кислотостійкої транспортної форми *Bifidobacterium lactis* BB 12.*

Ключові слова: *капсульовані форми біфідобактерій, пробіотичні мікроорганізми, Bifidobacterium lactis* BB 12, альгінат-кальцієвий гель.

Сьогодні існує безліч чинників, що послаблюють природні захисні бар'єри людського організму, зокрема: забруднення довкілля за рахунок антропогенного впливу та безпосередня дія хімічних і біологічних агентів. Тому, підтримка власного здоров'я на належному рівні залишається основним усвідомленим завданням сучасної людини, в якому провідна роль належить якості їжі та раціональному харчуванню [2, 5, 7].

Ефективність засвоєння їжі залежить від функціонального стану травної системи та одного із її складових – симбіотичної мікрофлори. Симбіотична мікрофлора травного тракту здійснює ряд функцій, спрямованих на засвоєння харчових речовин, позитивно впливає на імунну систему, здійснює детоксикаційну функцію, регулює вуглеводний та ліпідний обмін, в тому числі і холестерину, запобігає розвитку умовно патогенної та патогенної мікрофлори тощо. Основними складниками мікробного ценозу є молочнокислі та біфідобактерії (відповідно 10-20 % та 80-90 % від загального складу ценозу) [6, 9]. Головним місцем локалізації цих мікроорганізмів є товстий кишечник [9]. На жаль, сучасна система харчування, неконтрольоване використання лікувальних засобів, дія стресів та негативних чинників навколишнього середовища тощо призводить до порушення структури мікробного ценозу макроорганізму [6]. Одним із способів профілактики таких явищ є використання сучасних пробіотичних препаратів та продуктів харчування, що містять біфідо- та лактобактерії [7]. Останні є основним чинником сучасного напрямку у харчуванні – функціонального харчування [2, 5]. Саме тому, кисломолочні продукти – невід'ємний компонент сучасного функціонального харчування. Їх позитивний вплив перевірений часом. Проте слід зазначити, що шлях корисної мікрофлори до основного місця її локалізації є достатньо складним. На життєздатність цієї групи мікроорганізмів істотно впливають агресивні умови верхніх відділів травного тракту [6]. Так, деякими дослідниками встановлено, що до товстого кишечника потрапляє лише 30 % від спожитої кількості мікрофлори продукту [6]. Тому виникає проблема її захисту від агресивних чинників травної системи. Одним із найбільш поширених способів такого захисту є використання полімерних капсул, що розчиняються лише в товстому кишечнику, вивільняючи при цьому корисну мікрофлору [8]. Зокрема, нами попередньо одержано патенти на винахід та на спосіб одержання капсул та обладнання для капсулювання [11, 12]. Основним захисним чинником у даній технології є використання у ролі оболонки альгінат-кальцієвого гелю [12]. Така технологія має ряд переваг перед деякими вже існуючими аналогами [7, 8]. Крім того, на сьогодні в Україні є небагато вітчизняних кислотостійких форм пробіотиків, що містять у своєму складі екологічно безпечні компоненти біологічного походження.

Саме тому метою даних досліджень було вивчення впливу агресивних чинників травного тракту (кислого та лужного рН) на виживання *Bifidobacterium lactis* BB 12 та фізико-хімічні властивості захисної альгінат-кальцієвої оболонки.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були незахищені клітини штаму біфідобактерій – *Bifidobacterium lactis* BB 12 (виробник – Chr. Hansen, Данія) та інкапсульовані у альгінат-кальцієвому (NaAlg-Ca<sup>2+</sup>) гелі клітини даного штаму одержані нами. У роботі також використовували основний компонент захисної оболонки для клітини *Bifidobacterium lactis* BB 12 – альгінат-кальцієвий гель розроблений нами попередньо [12, 16].

Культивування біфідобактерій проводили у середовищі Блаурокк за анаеробних умов методом Вайнберга [3, 13]. Контроль чистоти культури та вивчення її морфолого-культуральних властивостей здійснювали загальноприйнятими методами. Чисельність біфідобактерій визначали згідно з методичних вказівок [3, 13]. У ролі агресивних чинників травного тракту використовували фізіологічний розчин з додаванням NaOH (рН 8,1–8,5) та фізіологічний розчин з додаванням HCl (рН 1–2).

Молекулярно-масовий розподіл (ММР) альгінат-кальцієвого гелю як основної складової оболонки капсул досліджували за описаним раніше методом [1], шляхом розділення речовин у комбінованому градієнті щільності солей NaCl і CsCl. Центрифугування здійснювали на препаративно-аналітичній центрифугі фірми “Весман L-7” із застосуванням розчинів солей NaCl=(1,03...1,2) г/см<sup>3</sup> і CsCl=(1,37...1,6) г/см<sup>3</sup> протягом 6 годин, за швидкості – 30000 об/хв. та температури – 17 °С. У ролі маркерів молекулярних мас використовували декстрини фірми Fluka з молекулярними масами 20, 40, 70, 110 та 500 тис., 1 млн., 2 млн. Да. Наявність у фракціях вуглеводів визначали фенол-сірчанним методом [4]. Середньомовову молекулярну масу (M<sub>w</sub>) розраховували за методом Орлова Д.С. [10] наступним чином:

$$M_w = \frac{\sum M_i \cdot n_i^2}{\sum M_i \cdot n_i},$$

де n<sub>i</sub> – частка речовини з певною молекулярною масою в загальній молекулярній масі; M<sub>i</sub> – величина молекулярної маси

Осад, що утворювався під час встановлення ММР альгінат-кальцієвого гелю (NaAlg-Ca<sup>2+</sup>), піддавали ультразвуковій обробці протягом 10 хвилин.

**Результати та їх обговорення.** Аналіз морфолого-культуральних властивостей пробіотичного препарату *Bifidobacterium lactis* BB 12 виявив наявність у зразку грампозитивних мікроорганізмів з характерною для біфідобактерій формою клітин [3, 15]. Після дії агресивних чинників травного тракту морфологія клітин біфідобактерій незахищених альгінат-кальцієвим гелем зазнала значних змін – з'явилося багато клітин у вигляді «комет», що втратили широку хвостову частину, а інші набули крихко подібного вигляду, що є нетиповим для даного виду мікроорганізмів. Натомість захищені NaAlg-Ca<sup>2+</sup> гелем клітини *Bifidobacterium lactis* BB 12 мали типову для даної фізіологічної групи морфологію клітин («цвяшки», «черевички», «комети» з широкою хвостовою частиною) [3, 13] та інтенсивним зростанням до зони аеробіозу. Навіть, протягом двогодинного контакту з агресивними чинниками травного тракту морфологія клітин не зазнала значних змін.

У ході досліджень нами також встановлено, що чисельність біфідобактерій у вихідному пробіотичному препараті *Bifidobacterium lactis* BB 12 (виробник – Chr. Hansen, Данія) склала 10<sup>11</sup> КУО/г (табл.1.). Титр клітин у контрольному зразку біфідобактерій, захищених альгінат-кальцієвим гелем, також складав 10<sup>11</sup> КУО/г. За умов годинної експозиції за впливу агресивних чинників травного тракту кількість незахищених NaAlg-Ca<sup>2+</sup> гелем біфідобактерій зменшилася з 10<sup>11</sup> КУО/г до 10<sup>8</sup> КУО/г, а після двогодинної експозиції у аналогічних умовах – з 10<sup>8</sup> КУО/г до 10<sup>6</sup> КУО/г. Натомість, титр культури *Bifidobacterium lactis* BB 12, захищеної альгінат-кальцієвим гелем, після годинної експозиції у розчині з додаванням HCl складав 10<sup>10</sup> КУО/г, а після двогодинної експозиції – 10<sup>8</sup> КУО/г (табл. 1).

Тобто, хоча і у варіанті з використанням альгінат-кальцієвого гелю як захисної оболонки для клітин штаму *Bifidobacterium lactis* BB 12 відбувалося зменшення вихідного титру біфідобактерій, але воно було не настільки істотним, як у випадку незахищених клітин *Bifidobacterium lactis* BB 12. Це свідчить, що оболонка капсул, розроблена на основі альгінат-

кальцієвого гелю, захищає живі мікроорганізми від згубної дії соляної кислоти як ключового компонента шлункового соку.

Таблиця 1

**Вплив агресивних чинників травного тракту на виживання вільних та інкапсульованих клітин штаму *Bifidobacterium lactis* BB 12**

№ зразку	Характеристика	Час витримки, години	Титр <i>Bifidobacterium lactis</i> BB 12 за дії pH середовища від 1,0 до 2,0 КУО/г
1	Клітини <i>B. lactis</i> BB 12 у фізіологічному розчині (контроль)	0	10 <sup>11</sup>
2	Клітини <i>B. lactis</i> BB 12 + альгінат-кальцієвий гель+молочна сироватка (дослід)	0	10 <sup>11</sup>
3	Клітини <i>B. lactis</i> BB 12 у фізіологічному розчині	1	10 <sup>8</sup>
4	Клітини <i>B. lactis</i> BB 12 + альгінат-кальцієвий гель + молочна сироватка	1	10 <sup>10</sup>
5	Клітини <i>B. lactis</i> BB 12 у фізіологічному розчині	2	10 <sup>6</sup>
6	Клітини <i>B. lactis</i> BB 12 + альгінат-кальцієвий гель+молочна сироватка (дослід)	2	10 <sup>8</sup>

Важливим з погляду використання капсул як транспортної системи для доставки пробіотичних мікроорганізмів до тонкого кишечника є дослідження гідродинамічних властивостей основного компонента оболонки капсул – NaAlg-Ca<sup>2+</sup> гелю за умов дії агресивних чинників травного тракту. За результатами вагового аналізу та мікроскопії (визначення масорозмірних характеристик досліджуваних зразків капсул) доведено, що одно- та двогодинна експозиція у розчині з додаванням HCl не руйнує і не привносить масо- та формозмін оболонки досліджуваних капсул. Натомість, аналогічна експозиція у розчині з додаванням NaOH показала, що досліджувані зразки капсул втрачають цілісність вже через 15...20 хвилин експозиції та утворюють аморфний осад вже наприкінці першої години експозиції.

Як видно з таблиці 2 альгінат натрію має середньовагову молекулярну масу ( $M_w$ ) – 686 тис. Да. Крім того, в його складі майже пропорційно представлені як низько- (20000...110000 Да) – 54,5 %, так й високомолекулярні фракції (1000000...2000000 Да) – 40,8 %. Натомість, альгінат-кальцієвий гель ( $M_w = 162$  тис. Да), порівняно з альгінатом натрію ( $M_w = 686$  тис. Да), характеризується зменшенням середньовагової молекулярної маси майже в 4,2 рази. Це пояснюється вираженою комплексоутворюючою здатністю альгінату натрію при взаємодії з іонами Ca<sup>2+</sup>, в результаті чого утворюється альгінат-кальцієвий гель. При утворенні основного компонента оболонки капсул також спостерігається збільшення вмісту низькомолекулярних фракцій до 82,8 % та зменшення кількості високомолекулярних фракцій до 3,2 %, що підтверджує утворення конгломератів та нерозчинного осаду, які спостерігалися візуально (табл. 2).

Обробка даних агрегатів, утворених у альгінат-кальцієвому гелі, ультразвуком привела до механолізу останніх. При цьому середньовагова молекулярна маса ( $M_w$ ) цих агрегатів, згідно з проведеними дослідженнями, склала 1,2 млн. Да. Слід також зазначити, що у досліджуваних зразках на фоні істотного зменшення низькомолекулярних фракцій – до 37,2 % виявлено незначне збільшення високомолекулярних фракцій – до 62,8 %.

Після експозиції альгінат-кальцієвого гелю у лужному середовищі спостерігається зниження його середньовагової молекулярної маси ( $M_w$ ) до 161 тис. Да, що свідчить про розпад альгінат-кальцієвих агрегатів на фракції з меншою молекулярною масою та перерозподіл вмісту низько- та високомолекулярних фракцій. Зокрема, показано характерне збільшення частки низькомолекулярних фракцій – до 90,4 % і зменшення високомолекулярних фракцій – до 9,6 %.

У результаті дії кислого середовища на альгінат-кальцієвий гель його середньовагова молекулярна маса ( $M_w$ ) становила 1,3 млн. Да, що майже в 8 раз більше, порівняно з аналогічним показником у даного компонента оболонки капсул після впливу на нього лужного серед-

овища. Збільшення середньомолекулярної маси альгінат-кальцієвого гелю після дії кислого середовища підтверджується і даними молекулярно-масового розподілу. Так, після обробки даного компонента оболонки капсул у кислому середовищі кількість високомолекулярних фракцій збільшується до 66,9 %, а кількість низькомолекулярних зменшується відповідно до 10,6 %. Слід також зазначити, що цей зовнішній фактор значно збільшує, порівняно з усіма дослідженими зразками, вміст у даному гелі фракцій з середньою молекулярною масою (22,5 %) (табл. 2).

Таблиця 2

**Молекулярно-масовий розподіл альгінат-кальцієвого гелю  
за дії агресивних чинників травного тракту**

Маркери молекулярних мас, Да	Вміст фракцій у зразках, % від середньомолекулярної $M_w$				
	Альгінат натрію (контроль)	Альгінат-кальцієвий гель (контроль) *	Альгінат-кальцієвий гель після дії ультразвуку (10 хв.)	Альгінат-кальцієвий гель після експонування у кислому розчині (рН 1,0...2,0)	Альгінат-кальцієвий гель після експонування у лужному розчині (рН 8,1...8,5)
20 тис.	42,3	36,1	3,3	3,3	39,9
40 тис.	6,8	19,9	11,2	2,8	25,8
70 тис.	2,7	12,2	20,2	2,8	16,2
110 тис.	2,7	14,6	2,5	2,2	8,5
500 тис.	4,7	14,0	–	22,5	5,9
1 млн.	17,0	1,2	6,7	15,7	–
2 млн.	23,8	2,0	56,1	50,7	3,7
Итого:	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
$M_w$ , Да	<b>686 тис.</b>	<b>162 тис.</b>	<b>1,2 млн.</b>	<b>1,3 млн.</b>	<b>161 тис.</b>

**Примітка:** \* – під час структурування утворювався осад, молекулярну масу складових якого даним методом визначити неможливо, тому з метою визначення молекулярної маси осаду, що утворився, систему піддавали ультразвуковому диспергуванню та впливу рН

Тобто, діапазон рН від 8,1 до 8,5 значно сильніше, порівняно з діапазоном рН від 1,0 до 2,0, впливає на молекулярно-масові характеристики альгінат-кальцієвого гелю як компонента оболонки капсул пробіотичного препарату на основі штаму *Bifidobacterium lactis* BB 12. Як відомо, будь-який макронутрієнт їжі в процесі його перетравлювання зазнає значних біохімічних перетворень не тільки з боку ферментативної системи шлунково-кишкового тракту, а і за рахунок зміни значень рН у різних відділах даної системи макроорганізму. Зокрема, під час процесу розщеплення компонентів їжі, у ротовій порожнині рН слабко лужне, у шлунку – кисле, а у дванадцятипалій кишці та різних відділах тонкого і товстого кишечника – лужне. Саме тому, встановлена нами відносна кислотостійкість альгінат-кальцієвого гелю підтверджує можливість ефективного його використання для інкапсуляції біфідобактерій з метою вдалого їх транспортування до основного місця локалізації.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють прогнозувати ефективність використання даного способу інкапсуляції як транспортної системи для доставки пробіотичних мікроорганізмів саме до тонкого кишечника, де, по суті, відбувається їх вивільнення із капсульних форм. Проведені дослідження визначають принципову можливість створення кислотостійких капсул з інкапсульованим пробіотичним препаратом на основі *Bifidobacterium lactis* BB 12 [11, 12, 14]. Даний факт відкриває перспективу подальшого використання таких форм пробіотичних препаратів у складі широкого спектру харчових продуктів, функціонального призначення зокрема: йогуртах, сирах, паштетах, кетчупах, емульсійних соусах, джемах, соках та інші кінцевих формах харчової індустрії, що не піддаються тепловій обробці [7, 8, 14].

**Е.П. Пивоваров<sup>1</sup>, С.К. Воцелко<sup>2</sup>, Н.В. Кондратюк<sup>3</sup>, О.П. Неклеса<sup>1</sup>, О.А. Гринченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Харьковский государственный университет питания и торговли, Харьков

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

<sup>3</sup>Днепропетровский национальный университет им. Олеса Гончара, Днепропетровск

## **РОЛЬ АДЪГИНАТ-КАЛЬЦИЕВОГО ГЕЛЯ КАК ЗАЩИТНОГО КОМПОНЕНТА ШТАММА *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* BB 12 ОТ АГРЕССИВНЫХ ФАКТОРОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА.**

### **Резюме**

Исследовано влияние агрессивных факторов пищеварительного тракта на численность свободных и инкапсулированных клеток пробиотического препарата на основе *Bifidobacterium lactis* BB 12. Изучены физико-химические характеристики основного компонента защитной оболочки данного пробиотического препарата – альгинат-кальциевого геля под воздействием агрессивных факторов пищеварительного тракта. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования капсул как кислотоустойчивой транспортной формы *Bifidobacterium lactis* BB 12.

Ключевые слова: капсулированные формы бифидобактерий, пробиотические микроорганизмы, *Bifidobacterium lactis* BB 12, альгинат-кальциевый гель.

**Ye.P. Pyvovarov<sup>1</sup>, S.K. Votselko<sup>2</sup>, N.V. Kondratjuk<sup>3</sup>, O.P. Neklesa<sup>1</sup>, O.A. Grynchenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Kharkov State University of Food Technology and Trade, Kharkov

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>3</sup>Dnepropetrovsk National University by Oles' Gonchar, Dnepropetrovsk

## **ROLE OF CALCIUM-ADGINAT GEL AS PROTECTION COMPONENT OF BIFIDOBACTERIUM LACTIS BB 12 STRAIN FROM AGGRESSIVE AGENTS OF GASTRO-INTESTINAL TRACT.**

### **Summary**

The influence of aggressive agents of the gastro-intestinal tract on quantity of free and encapsulated cells of the probiotic preparation based on *Bifidobacterium lactis* BB 12 has been investigated. The physico-chemical characteristics of the main component of the protective shell of this probiotic preparation – calcium-alginate gel under the influence of aggressive agents of the gastro-intestinal tract have been studied. The results indicate the possibility of these capsules using as an acid-resistant transport forms of *Bifidobacterium lactis* BB 12.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: encapsulated form of bifidobacteria, probiotic microorganisms, *Bifidobacterium lactis* BB 12, alginate-calcium gel.

The author's address: Pyvovarov Ye.P., Kharkov State University of Food Technology and Trade; 333, Klochkovskaya St., Kharkov MSP, D61051

1. А. с. № 1451166 СССР, МКИ<sup>4</sup> G 12 P 19/00. Способ определения молекулярно-массовой неоднородности микробных полисахаридов / С.К. Воцелко, Г.П. Пирог, Ю.Р. Малащенко и др. – Опубл. 15.01.89, Бюл. № 2.
2. Деркач Т.М., Кондратюк Н.В. Сучасні наукові напрями в харчіванні : навч. посібник. – Дніпропетровськ: ДНУ, 2009. – 238 с.
3. Жоган Г.В, Кігель Н.Ф., Рожанська О.М. Дослідження технологічних властивостей біфідобактерій // Харчова промисловість. – 2004. – Додаток до журналу №3 – С. 65–66.
4. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. – К.: Наукова думка, 1982. – 262 с.
5. Капельяниц Л.В., Йоргачова К.Г. Функциональні продукти. – Одеса: Друк, 2003. – С. 25–26.
6. Коваленко Н.К., Полтавська О.А., Зелена Л.Б. Видовий склад біфідобактерій травного тракту людей різних вікових груп // Мікробіол. журн. – 2012. – 74, № 1. – С. 8–13.

7. *Кондратюк Н.В.* Наукове обґрунтування використання капсульних продуктів із пробіотичними властивостями у складі збивної десертної продукції // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій : зб. наук. пр. Сер. Технічні науки. – 2011. – Вип. 40, Т. 2. – С. 191–196.
8. *Кондратюк Н.В.* Технологія солодких страв з використанням капсульованих продуктів з пробіотичними мікроорганізмами: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Харків, 2012. – 19 с.
9. *Мосійчук С.М., Хоменко М.Б., Михайлова Т.С., Кігель Н.Ф., Карпов О.В.* Пробиотики: можливість застосування при гіперхолестеринемії // Український медичний часопис – 2006. – 52, № 2. – С10–23.
10. *Орлов Д.С. и др.* Применение метода гель-хроматографии в почвоведении, мелиорации и сельском хозяйстве: Методическое руководство. – Москва: Новочеркасск, 1978. – 60 с.
11. *Пат.* 91616 Україна, МПК (2009) А23Р 1/00, А61J 3/07. Пристрій для виробництва капсульованих продуктів / П.П. Пивоваров, Є.П. Пивоваров. – Опубл. 10.08.2010, Бюл. № 15.
12. *Пат.* 92250 Україна, МПК (2009) А23Р 1/00, А61К 9/00. Спосіб одержання багат шарових капсул / П.П. Пивоваров, Є.П. Пивоваров. – Опубл. 11.10.2010, Бюл. № 19.
13. *Передерій В.К., та інші.* Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах МВК 10.10.2.2. –119–2005: Методичні вказівки. – 2005. – 20 с.
14. *Пивоваров Є.П., Кондратюк Н.В.* Перспективи використання капсульних структурованих продуктів у харчуванні // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій : зб. наук. пр. Сер. Технічні науки. – 2009. – Вип. 36, т. 2. – С. 194-199.
15. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J. T., Garrity G.M.* – New York; USA: Springer Science+ Business Media – 2005. –Vol.2. – 1108 p.
16. *Okovytyu S.I. , Pivovarov P.P., Pivovarov E.P., Kondratyuk N.V., Kalashnikova K.I.* A DFT Study of the Complexation of Alginic Acid with Ca<sup>2+</sup> Ions // 10th Southern School on Material Science and Computational Chemistry. – Jackson, 2010. – P. 62-63.

Отримано 27.09.2013