

УДК 663.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В В ФЕРМЕНТАЦИОННОМ БУЛЬОНЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Н.Ю. Хромова, Ю.М. Епишкина, Н.В. Хабибулина, И.В. Шакир, В.И. Панфилов

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. В настоящее время концепция пробиотиков продолжает стремительно развиваться. Положительное влияние пробиотических бактерий на организм человека и животных все больше подтверждается с помощью лабораторных и клинических исследований [1]. Одним из перспективных направлений, связанных с пробиотиками, является поиск штаммов среди лакто- и бифидобактерий, обладающих способностью синтезировать витамины группы В. В-гиповитаминозы среди населения России встречаются чаще всего [2]. Недостаток витаминов группы В у человека приводит к нарушениям в работе нервной и сердечно-сосудистой системы, иммунного гомеостаза, микробиоты, когнитивных функций, гормональной системы витамина D [2–4]. У животных дефицит витаминов группы В приводит к нарушению воспроизводительной способности и обмена веществ, потере веса и его низкому приросту, дерматитам, снижению производительности и резистентности организма, рождению нежизнеспособного потомства и развитию злокачественной анемии. Нередко В-гиповитаминозы осложняются поражениями желудочно-кишечного тракта [5]. Разумный выбор пробиотических штаммов для производства различных добавок и ферментированных продуктов позволит получить синергетический эффект, который будет заключаться не только в широком спектре полезных пробиотических свойств, но и способствовать частичному восполнению дефицита витаминов В. Пробиотические штаммы, обладающие способностью синтезировать витамины В, могут стать потенциальными кандидатами для их производства *in situ* после колонизации в кишечнике, т. е. будут выступать в качестве их поставщиков [6].

Традиционными методами для идентификации и количественного определения водорастворимых витаминов группы В в препаратах, премиксах и пищевых продуктах являются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), фотометрия и флуориметрия. Преимуществом ВЭЖХ в отличие от фото- и флуориметрических методов является одновременное определение контролируемых компонентов.

В последнее время для определения витаминов все чаще используется метод капиллярного электрофореза (КЭ), который помимо одновременного анализа всех компонентов, обладает рядом преимуществ перед хроматографическими методами: не требует наличия хроматографических колонок, для проведения анализа необходимо небольшое количество реактивов, что является экономически выгодным, а также капиллярный электрофорез обеспечивает высокую эффективность разделения биологически активных веществ [7].

Таким образом, цель работы заключалась в исследовании способности штаммов пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* (ВКПМ В-2873) и *Bifidobacterium breve* (ВКПМ АС-1911) продуцировать витамины группы В на основе анализа их ферментационных бульонов методом капиллярного электрофореза.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали штаммы пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* (ВКПМ В-2873) и *Bifidobacterium breve* (ВКПМ АС-1911), предоставленные в лиофилизированной форме Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва, Россия). Для получения инокулята лактобактерии культивировали в питательной среде Man–Rogosa–Sharpe (MRS) при 37 °С в течение 24 ч, бифидобактерии – в бифидум-среде при 37 °С в течение 24 ч. Для получения образцов для исследования витаминов группы В лакто- и бифидобактерии культивировали в различных питательных средах при 37 °С в течение 24 ч.

Для определения способности штаммов пробиотических бактерий продуцировать водорастворимые витамины группы В использовали различные варианты питательных сред в зависимости от культуры микроорганизмов: для лактобактерий: 1) стандартная среда MRS; 2) питательная среда для определения фолиевой кислоты; для бифидобактерий: 1) бифидум-среда; 2) питательная среда для определения фолиевой кислоты.

Питательная среда для определения фолиевой кислоты была составлена на основе среды для анализа фолиевой кислоты (Difco™, США) с некоторыми модификациями в составе (приблизительная формула на литр): казаминовые кислоты (триптон) – 12.0 г.; глюкоза – 40.0 г.; цитрат натрия – 20.0 г.; L-цистин – 0.2 г.; DL-триптофан – 0.2 г.; сульфат аденина – 20.0 мг; гуанина – 20.0 мг; уридин – 20.0 мг; тиамина гидрохлорид – 2.0 мг; пиридоксина гидрохлорид – 4.0 мг; рибофлавин – 2.0 мг; ниацин – 2.0 мг; p-аминобензойная кислота – 200.0 мкг; биотин – 0.8 мкг; дикалийфосфат – 1.0 г.; монокалийфосфат – 1.0 г.; сульфат магния – 0.4 г.; хлорид натрия – 20.0 мг; сульфат железа – 20.0 мг; сульфат марганца – 20.0 мг (pH 7.0).

Анализ свободных форм водорастворимых витаминов группы В и их количественное определение в ферментационном бульоне пробиотических бактерий проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель – 105М» «Люмэкс» (Россия) с положительной полярностью, оснащенной кварцевым капилляром со специальной геометрией, аналогичной аминокислотному (внутренний диаметр пор 50 мкм, общая / эффективная длина 75/65 см)) и специализированным программным обеспечением. Подготовка проб для проведения исследований состояла в осаждении клеток микроорганизмов с помощью центрифуги Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия) при 7500 об/мин в течение 10 мин. После чего для более тщательной очистки надосадочные жидкости помещали в центрифужные концентраторы Amicon Ultra-15 (Merck, Германия) с диаметром пор целлюлозной мембраны 3 кДа и центрифугировали в течение 15 мин при 7500 об/мин. Разделение, идентификацию и определение массовых концентраций водорастворимых витаминов В₁, В₂, В₃, В₆, В_с проводили методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ), витамина В₅ (никотинамид) методом мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) согласно практическому руководству по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» [8] и методики М 04–72–2011 [9]. Условия детектирования для витаминов В₁, В₂, В₃, В₆, В_с: капилляр: кварц, 50 мкм, 75 см; напряжение + 25 кВ; длина волны в начале анализа 200 нм, после выхода пика В₁ 267 нм, после выхода пика В₂ и до конца анализа 200 нм; температура 30 °С; давление в начале анализа 0 мбар, после выхода пика В₆ – 30 мбар до конца анализа. Условия детектирования для витамина В₅ (никотинамид): капилляр: кварц, 50 мкм, 75 см; напряжение + 25 кВ; длина волны 200 нм; температура 40 °С; давление 0 мбар.

Результаты. Исследование ферментационного бульона штамма *L. casei*, полученного после глубинного культивирования в стандартной среде MRS, на содержание свободных форм водорастворимых витаминов группы В методом капиллярного электрофореза показало, что данный штамм способен продуцировать и выводить в раствор витамины: В₂ (рибофлавин), В₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль) и В₅ (никотинамид). При этом наибольшая концентрация обнаруживалась для пантотеновой кислоты кальциевой соли (520.4 мг/л) (таблица 1). После культивирования *L. casei* в питательной среде для анализа фолиевой кислоты в образцах было установлено наличие витаминов: В₁ (тиамина хлорид), В₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль) и В₆ (пиридоксин) (таблица 1).

Таблица 1. Концентрация витаминов группы В в ферментационных бульонах культуры *L. casei* до и после культивирования в различных питательных средах

Витамины	Концентрация витаминов, мг/л			
	MRS		Среда для определения фолиевой кислоты	
	До	После	До	После
В ₁ (тиамина хлорид)	н/о*	н/о	н/о	19.54
В ₂ (рибофлавин)	н/о	2.43	н/о	н/о
В ₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль)	н/о	520.4	н/о	3.97
В ₅ (никотинамид)	11.37	14.21	61.37	н/о
В ₆ (пиридоксин)	0.95	н/о	0.95	11.40
В _с (фолиевая кислота)	0.27	н/о	0.27	н/о

* – не обнаружено

Исследование ферментационного бульона штамма *B. breve*, полученного после глубинного культивирования в бифидум-среде, на содержание свободных форм водорастворимых витаминов группы В методом капиллярного электрофореза показало, что данный штамм способен продуцировать и выводить в раствор витамины В₂ (рибофлавин), В₅ (никотинамид), В₆ (пиридоксин). После культивирования *B. breve* в питательной среде для анализа фолиевой кислоты в образцах было установлено наличие витаминов В₂ (рибофлавин), В₅ (никотинамид) (таблица 2).

Таблица 2. Концентрация витаминов группы В в ферментационных бульонах культуры *B. breve* до и после культивирования в различных питательных средах

Витамины	Концентрация витаминов, мг/л			
	Бифидум-среда		Среда для определения фолиевой кислоты	
	До	После	До	После
В ₁ (тиамина хлорид)	н/о*	н/о	н/о	н/о
В ₂ (рибофлавин)	0.34	0.50	1.19	0.50
В ₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль)	н/о	н/о	н/о	н/о
В ₅ (никотинамид)	н/о	0.89	52.97	н/о
В ₆ (пиридоксин)	н/о	48.07	н/о	45.73
В _с (фолиевая кислота)	н/о	н/о	н/о	н/о

* – не обнаружено

При этом концентрации пиридоксина после культивирования *B. breve* в бифидум-среде и среде для определения фолиевой кислоты были сопоставимы.

Дискуссия. Известно, что некоторые штаммы лакто- и бифидобактерий обладают способностью к биосинтезу витаминов группы В. Пробиотические свойства в совокупности с потенциалом обогащения продуктов витаминами в процессе ферментации или производства витаминов *in situ* в желудочно-кишечном тракте открывают новые перспективы для разработки пробиотических добавок и продуктов. Штаммы молочнокислых бактерий *L. casei* и бифидобактерий *B. breve* широко используются в качестве пробиотиков, а также для производства функциональных продуктов. В настоящем исследовании методом капиллярного электрофореза было установлено наличие в ферментационных бульонах штамма *L. casei* (ВКПМ В-2873) витаминов: тиамина хлорид, рибофлавин, пантотеновой кислоты кальциевая соль, никотинамид и пиридоксин. Их концентрация зависела от типа питательной среды. Можно предположить, что состав среды оказывает сильное влияние на продукцию и накопление витаминов. В ферментационных бульонах штамма *B. breve* (ВКПМ АС-1911) были обнаружены рибофлавин и пиридоксин. Последний в питательных средах до культивирования не обнаруживался. В целом полученные результаты согласуются с исследованиями других авторов [10–12]. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на скрининге различных штаммов лакто- и бифидобактерий на способность к микробному биосинтезу витаминов группы В.

Закключение. Поиск штаммов пробиотических культур, обладающих способностью синтезировать витамины группы В, в настоящее время является перспективным направлением. Такие культуры могут найти применение в кормопроизводстве и животноводстве, а также в пищевой промышленности. В настоящей работе была исследована способность штаммов пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* (ВКПМ В-2873) и *Bifidobacterium breve* (ВКПМ АС-1911) продуцировать витамины группы В. Методом капиллярного электрофореза были проанализированы ферментационные бульоны микроорганизмов, полученные после глубинного культивирования в питательных средах различного состава. В результате исследования для каждой культуры были обнаружены и определены массовые концентрации свободных форм водорастворимых витаминов. Установлено, что наличие тех или иных витаминов группы В и их количества для штамма *L. casei* заметно различалось в зависимости от типа питательной среды и ее состава. В то же время для штамма *B. breve* такого не наблюдалось. В дальнейшем интерес также представляет исследование влияния условий культивирования штаммов с целью интенсификации биосинтеза витаминов группы В.

Благодарности. Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта Президента РФ на 2021–2022 гг. для молодых ученых – кандидатов наук, соглашение № 075–15–2021–459 (МК-1171.2021.5).

Литература

- Day R.L.J. et al. Probiotics: current landscape and future horizons // *Futur. Sci. OA. Future Science*, 2019. Vol. 5, № 4. P. FSO391.
- Коденцова В.М., Вржесинская О.А. Анализ отечественного и международного опыта использования обогащенных витаминами пищевых продуктов // *Вопросы питания. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки*, 2016. Vol. 85, № 2.
- Коденцова В.М., Леоненко С.Н., Рисник Д.В. Витамины группы В в профилактике заболеваний // *Вопросы диетологии. Общество с ограниченной ответственностью Издательство Династия*, 2020. Vol. 10, № 2. P. 23–34.
- Литвицкий П.Ф. Нарушения обмена витаминов // *Вопросы современной педиатрии. Общественная организация «Союз педиатров России»*, 2014. Vol. 13, № 4.
- Волгин В.И. et al. Полноценное кормление молочного скота–основа реализации генетического потенциала продуктивности. Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российская академия наук", 2018.
- Arena M.P. et al. Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics // *Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer*, 2014. Vol. 98, № 17. P. 7569–7581.
- Бёккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. Litres, 2017.
- Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» // СПб. ООО «Веда. 2006. Vol. 212.
- М 04–72–2011. Методика измерений содержания свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных концентратах, смесях и добавках, в том числе жидких, методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105/105М».
- Deguchi Y., Morishita T., Mutai M. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria // *Agric. Biol. Chem. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 1985. Vol. 49, № 1. P. 13–19.
- Magnúsdóttir S. et al. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes // *Front. Genet. Frontiers*, 2015. Vol. 6. P. 148.
- LeBlanc J.G. et al. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria // *Microb. Cell Fact. BioMed Central*, 2017. Vol. 16, № 1. P. 1–10.