

Antokyánové farbivo ako potenciálny bifidogénny faktor

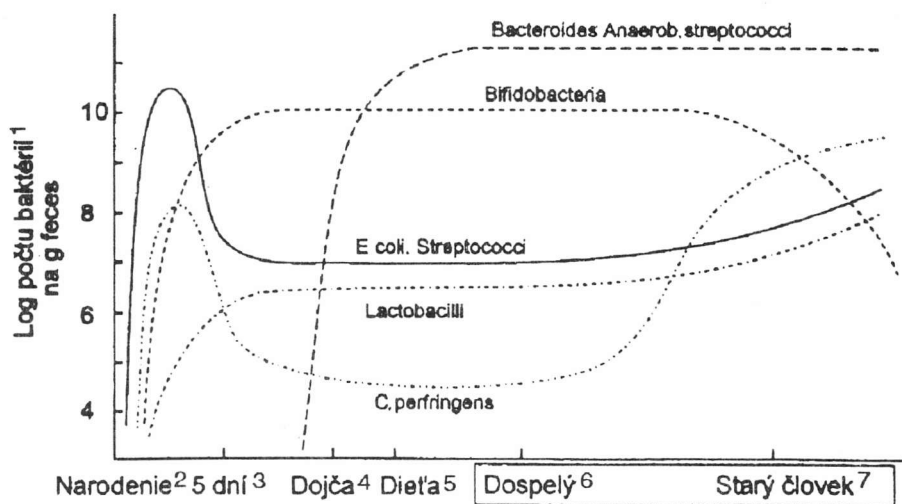
UDOVÍT POLÍVKA - BOHUMIL ŠKÁRKA -
ANNA KINTLEROVÁ - STANISLAV ŠILHÁR

Súhrn. Sledovali sme vplyv médií na rast biomasy rôznych kmeňov bifidobaktérií. Na médiu VF s 0,5 %-ným prídavkom kanavitu je tvorba biomasy vyššia a intenzívnejšia ako na médiu MRS. Vplyv koncentrátu antokyánového farbiva z arónie čiernoplodej na tvorbu biomasy bifidobaktérií: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve* sme testovali na srvátkovom médiu s 1 %-om kvasničného autolyzátu aditívovaného s 5 %-ami koncentrátu antokyánového farbiva z arónie čiernoplodej. Zistili sme jeho pozitívny vplyv na tvorbu biomasy testovanými bifidobaktériami. Nárast biomasy je vyšší o 2 až 3 rády voči neaditívovanej pôde a vyšší o takmer 2 rády v porovnaní s pôdou aditívanou zahustenou špenátovou šťavou.

Intestinálna mikroflóra je vyvážená s dominantnou populáciou užitočných, najmä bifidobaktérií, laktobacilov a niektorých druhov enterokokov. Tieto rody produkujú vitamíny, enzýmy, antimikrobiálne substancie, detoxikujú intestinálny trakt, zabráňujú kolonizácii patogénov a stimulujú imunitnú responzibilitu. Táto vyváženosť sa mení s vekom človeka (obr.1.). Môže byť však destabilizovaná nespočetnými vonkajšími aj vnútornými faktormi, používaním antibiotík a chemoterapeutík, hygienou, fyzickou a psychickou kondíciou.

Opätovné vybilancovanie v prospech uvedených užitočných baktérií sa dosahuje buď intenzívnym používaním rôznych probiotických preparátov obsahujúcich živé baktérie uvedených druhov, špeciálnou diétou, ktorá je zložená z potravín obsahujúcich uvedené druhy baktérií alebo sú aditívované špeciálnymi komponentami, ktoré podporujú najmä rast bifidobaktérií. Sú známe ako bifidogénne faktory. Z najznámejších doteraz identifikovaných sú to najmä fruktooligosacharidy, glukozamíny, fruktozamíny, karotenoidy, hydrolyzáty proteínov a glykoproteínov [2-5]. Mnohé z nich našli uplatnenie aj pri priemyselnej výrobe probiotických preparátov ako významná zložka fermentačného média.

Doc. Ing. Ludovít Polívka, CSc., Ing. Anna Kintlerová, Doc. Ing. Stanislav Šilhár, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Biocentrum, Kostolná 7, 900 01 Modra.
Prof. Ing. Bohumil Škárka, DrSc., Púlpavova 21, 841 04 Bratislava.



Obr. 1. Zmena intestinálnej mikroflóry v závislosti na veku človeka (T. Mitsouka, 1982).
 Fig. 1. Change of intestinal microflora in dependence of the age of a man (T. Mitsouka, 1982).
 1 - Log of bacteria number to g of feces, 2 - Bornng, 3 - 5 days, 4 - Suckling, 5 - Child, 6 - Adult, 7 - Old man.

Výskum nových bifidogénnych faktorov má vzrastajúcu tendenciu, najmä v oblasti prírodných zdrojov.

V rámci vývoja nových technológií výroby prírodných farbív z rastlinných zdrojov sme v našich predchádzajúcich prácach odskúšali účinky koncentrátov po extrakcii chlorofylu z vňate špenátu a petržlenu, ako aj iných medziproduktov z navrhovaných technológií na rast bifidobaktérií [7]. Aj vzhľadom k tomu, že v literatúre bola popísaná biologická účinnosť antokyánov [5], sme v tejto práci testovali vplyv nami pripraveného koncentráту antokyánového farbiva na rast *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve*.

Materiál a metódy

Mikroorganizmy

V práci sme použili zbierkové kmene: *Bifidobacterium longum* CCM 4238, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 a *Bifidobacterium breve* CCM 4237.

Kultivačné média a podmienky kultivácie

Pre prípravu inokula sme použili:

- a) základné médium VF (Imuna, Šarišské Michaľany) nasledovného zloženia: 10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 5 g glukóza, 5 g K_3PO_4 , 1000 g

destilovaná voda. K tejto pôde sme po sterilizácii pridali asepticky 1 ml kanavitu (Slovakofarma, Hlohovec),

- b) médium MRS, ktoré obsahovalo: 5 g peptón, 5 g kvasničný autolyzát, 20 g glukóza, 5 ml Tween, 2 g K_2HPO_4 , 5 g octan sodný, 2 g citronan amónny, 0,2 g $MgSO_4$, 0,5 g $MnSO_4$, 1000 ml destilovanej vody.

pH kultivčných médií bolo upravené na 6,5 až 7,0, sterilizované 20 minút pri 115 °C. Kultivovali sme staticky pri teplote 37 °C 24 hodín.

Pre sledovanie účinku potenciálneho bifidogénneho faktora sme pripravili kultivačné médium na báze ultrafiltrátu zo srvátky obohateného o kvasničný autolyzát. Médium obsahovalo: 700 ml ultrafiltrátu zo srvátky, 300 ml vody a 10 g kvasničného autolyzáta. Po úprave pH na 6,5 - 7,0 a následnej sterilizácii za tých istých podmienok sme asepticky pridali 50 g koncentráta antokyánového farbiva z arónie čiernoplodej. Kultivovali sme 48 hodín pri teplote 37 °C staticky.

Koncentrát z antokyánového farbiva z arónie čiernoplodej sme získali postupom vyvinutým pracovníkmi VÚP [9]. Prípravu zahustenej šťavy zo špenátu sme publikovali v predchádzajúcej práci [7].

Stanovenie celkového počtu viabilných buniek

Celkový počet viabilných buniek sme stanovili odčítaním kolónií vyrastených na platniach s agarizovanou pôdou VF bezprostredne po inokulácii a po náraste za 24 hodín pri teplote 37 °C.

Stanovenie špecifickej rastovej rýchlosti - μ

Špecifickú rastovú rýchlosť sme definovali výpočtom podľa Máleka [10].

Výsledky a diskusia

V prvej časti experimentu sme overovali tvorbu biomasy na VF s prídavkom roztoku 0,5 % kanavitu a MRS médiách.

Z tabulky 1. je zrejmé, že tvorba biomasy bola rýchlejšia na VF médiu s 0,5 % kanavitu ako na MRS. Preto sme na pomnoženie bifidobaktérií použili v našich experimentoch toto médium. Množstvo inokula z 15 hodín kultivácie pre ďalšiu inokuláciu média použitého na testovanie vplyvu koncentráta farbiva sme volili tak, aby počiatočná koncentrácia buniek v testovanej pôde bola vo všetkých experimentoch rovnaká - rádovo 10^3 /ml.

Sledovanie vplyvu koncentráta antokyánového farbiva z arónie čiernoplodej sme uskutočnili na médiu zo srvátky aditívovanej iba 1 %-om kvasničného extraktu a 5 % uvedeného koncentráta farbiva, resp. 10 % zahustenej špenátovej šťavy. Použitie ultrafiltrátu zo srvátky ako základného média pri odskúšavaní bifidofaktorov je popísaná aj v literatúre [3]. Ultrafiltrát zo srvátky sme použili na kultiváciu bifidobaktérií aj v našej predchádzajúcej práci [11].

Tabuľka 1. Tvorba biomasy rôznymi druhmi bifidobaktérií na VF médium s prídavkom 0,5 % kanavitu a MRS médium.
Table 1. Formation of biomass of various bifidobacteria types on VF medium with 0.5 % of vitamin K and on MRS medium.

	<i>Bifidobacterium</i>					
	<i>bifidum</i>		<i>longum</i>		<i>breve</i>	
Doba fermentácie ¹ [h]	15	23	15	23	15	23
Médium ² VF + 0,5 % kanavitu ³ [OD 660]	0,300	0,290	0,310	0,260	0,250	0,240
μ (log fáza ⁴)	0,20		0,18		0,26	
Médium MRS [OD 660]	0,190	0,190	0,180	0,160	0,210	0,200
μ (log fáza)	0,08		0,05		0,08	

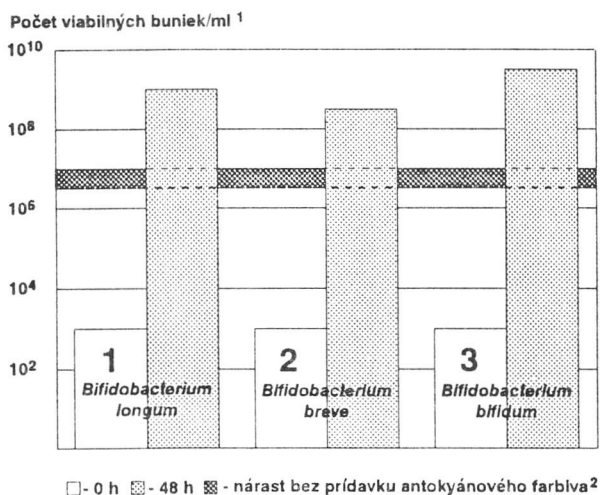
1 - fermentation time, 2 - medium, 3 - vitamin K, 4 - log phase.

Kultivovali sme staticky 48 hodín pri 37 °C. Sledovali sme nárast počtu buniek *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve* na uvedenom médiu s prídavkom 5 % koncentráту antokyánového farbiva z arónie čiernoplodej bez prídavku farbiva. Z grafu na obr.2. je zrejmé, že prídavok koncentrátu zvyšuje nárast bifidobaktérií o dva až tri rády voči pôvodnej pôde.

Porovnanie nárastu *Bifidobacterium bifidum* na srvátkovom médiu s 5 % -ným prídavkom zahustenej špenátovej šťavy je zrejmé z grafu na obr.3.

Literatúra

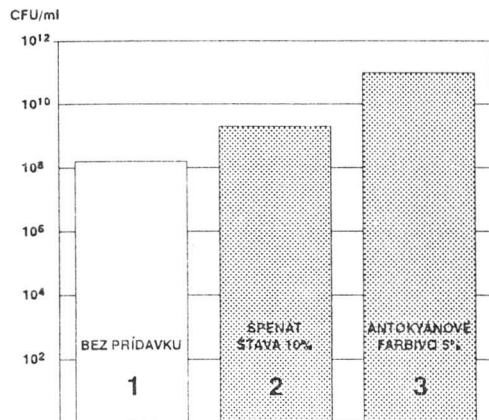
1. MITSUOKA, T.: A profile of intestinal bacteria, Yakult Housa G. Ltd, 1990.
2. MURAMATSU, K. - ONODERA, S. - KUKUCHI, M. - SHIOMI, N.: The production of beta. fructofuranosidase from *Bifidobacterium* suspecies. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 1992, 9, s. 1451-1454.
3. TANIGUCHI, M. - KOTANI, N. - KOBAYASHI, T.: High concentration cultivation of *Bifidobacterium longum* in fermenter with cross-flow filtration, Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 1987, s. 438-441.
4. CHEVALIER, P. - ROY, D. - WARD, P.: Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods, J. Appl. bacteriol., 68, 1990, 6, s. 619-624.
5. INHIBASHI, N. - SHIMAMURA, S.: Bifidobacteria: Research and development in Japan, Food Technol., 7, 1993, s. 126-134.
6. MARSHAL, V.M. - COLE, W.M. - MABBITT, L.A.: Fermentation of specially formulated milk with single strains of bifidobacteria, J. Soc. Dairy Technol., 35, 1982, 4, s. 143-144.
7. POLÍVKA, L. - ŠILHÁR, S. - ŠKÁRKA, B. - KINTLEROVÁ, A.: Potenciálne bifidogénne faktory rastlinného pôvodu, Mliekárstvo, 1995, v tlači.



Obr. 2. Nárast bifidobaktérií v prítomnosti 5 % koncentrátu antokyánového farbiva. Fermentačné médium: riedená srvátka + 1 % kvasničného autolýzátu + 5 % koncentrátu antokyánového farbiva z arónie čiernoplodej, $t = 37^{\circ}\text{C}$, doba kultivácie 48 hodín. Počiatočná koncentrácia buniek $10^3/\text{ml}$.

Fig. 2. Bifidobacteria growth in presence of 5 % concentrate of anthocyan colouring agent. Fermentation medium: diluted whey + 1 % of yeast autolysate + 5 % of anthocyan colour concentrate from black chookeberry, $t = 37^{\circ}\text{C}$, cultivating time 48 hours. Initial concentration of cells $10^3/\text{ml}$.

1 - number of viable cells/ml, 2 - growth without addition of anthocyan colouring agent.



Obr. 3. Nárast *Bifidobacterium bifidum* v prítomnosti prípravkov z rastlín. Fermentačné médium: riedená srvátka - 1 % kvasničného autolýzátu + 5 % koncentrátu antokyánového farbiva (3) resp. 10 % zahustenej špenátovej šťavy (2) $t = 37^{\circ}\text{C}$, doba kultivácie 48 hodín. Počiatočná koncentrácia buniek $10^3/\text{ml}$.

Fig. 3. Growth of *Bifidobacterium bifidum* in presence of plant agents. Fermentation medium: diluted whey - 1 % of yeast autolysate + 5 % of anthocyan colour concentrate (3) or 10 % of thick spinach juice (2) $t = 37^{\circ}\text{C}$, cultivating time 48 hours. Initial concentration of cells $10^3/\text{ml}$.

1 - without addition, 2 - spinach juice 10 %, 3 - anthocyan colouring agent 5 %.

8. TIMBERLAKE, C.F.: The biological properties of anthocyanins, NATCOL - Quarterly information bulletin, 1988, 1, s. 4-13.
9. KINTLEROVÁ, A. - MARIÁSSYOVÁ, M. - ŠILHÁR, S.: Arónia čiernoplodá - perspektívna surovina na výrobu potravinárskych farbív, Bulletin PV, 33, 1994, 1-2, s. 127-131.
10. MÁLEK, I. a kol.: Kontinuální kultivace mikroorganizmů, ČSAV Praha, 1964, s. 58-59.
11. POLÍVKA, L. - GLONČÁKOVÁ, B. - GALIS, O. - PÁLENÍK, P. - ŠKÁRKA, B.: Obohatenie strukovínových pást bifidobaktériami, Potr. vedy, 12, 1994, 2, s. 93-103.

Do redakcie došlo 9.5.1995.

Anthocyan colouring agent as a potential bifidogenic factor

LUDOVÍT POLÍVKA - BOHUMIL ŠKÁRKA -
ANNA KINTLEROVÁ - STANISLAV ŠILHÁR

Summary. Influence of media on the growth of biomass of various bifidobacteria strains has been investigated. Formation of biomass is higher and more intensive on VF medium with 0.5 % addition of vitamin K (rather than on MRS medium). Impact of anthocyan colouring agent concentrate from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) on biomass formation of bifidobacteria: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* have been tested on whey medium with 1 % of yeast autolysate added with 5 % of anthocyan colouring agent concentrate from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). Positive influence of anthocyan colouring agent on the formation of biomass by tested bifidobacteria has been detected. In terms of order growth of biomass is 2 to 3 times higher compared to non-added medium and almost 2 times higher in comparison to the medium added with concentrated spinach juice.