

Особенности ферментации пищевых волокон под действием бифидо- и лактобактерий (in vitro)

Седакова Валентина Антоновна

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова, доцент кафедры естествознания, кандидат технических наук, доцент, Республика Беларусь

Клебанов Александр Владимирович

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова, доцент кафедры естествознания, кандидат химических наук, доцент, Республика Беларусь

Клебанова Наталья Александровна

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова, доцент кафедры естествознания, кандидат химических наук, доцент, Республика Беларусь

Седаков Евгений Владимирович

Могилевский государственный университет продовольствия, доцент кафедры машин и аппаратов пищевых производств, кандидат технических наук, Республика Беларусь

Аннотация. В статье представлены экспериментальные данные по исследованию ферментативного распада пищевых волокон различного происхождения под действием бифидо- и лактобактерий. В качестве субстрата использовали цитрусовый и яблочный пектины, льняную клетчатку и глюкозу. Динамику процесса распада определяли по зависимости содержания короткоцепочечных жирных кислот (пропионовой, масляной, валериановой) в анализируемых системах от времени. Качественный и количественный состав анализируемых кислот определяли методом газовой хроматографии.

Установлено, что количество образуемых при ферментации пищевых волокон метаболитов (пропионовой, масляной и изовалериановой кислот) зависит как от вида ферментируемого субстрата, так и от вида бактерий используемых для ферментации.

Ключевые слова: пектин цитрусовый, пектин яблочный, клетчатка льняная, глюкоза, хроматографический метод, бифидо- и лактобактерии, короткоцепочечные жирные кислоты.

Введение

Проблеме применения пищевых волокон в составе пищевых рационов, как в виде отдельных биологически активных добавок, так и в комплексе с обогащенными пищевыми продуктами, с точки зрения влияния на микрофлору кишечника в последние два-три десятилетия посвящены многочисленные исследования [1 ... 5]. С позиций теории функционального питания пищевые волокна относятся к пребиотикам. Пребиотики – это неперева-

ваемые в организме человека компоненты пищи, оказывающие благотворное влияние на организм через стимуляцию его собственной микрофлоры. Благодаря адсорбционным свойствам пищевые волокна снижают уровень холестерина и триацилглицеринов в плазме, способствуют снижению уровня постпрандиальной гликемии и снижению доступности нутриентов, уменьшают время контакта слизистой оболочки с токсинами и желчными кислотами [2].

Известно, что расщепление пищевых волокон в желудочно-кишечном тракте происходит не за счет собственных ферментов, а под действием ферментов микрофлоры кишечника. Основными продуктами при этом являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), в основном уксусная, пропионовая и масляная, реже – валериановая и изовалериановая.

Функции КЦЖК весьма разнообразны: они препятствуют размножению гнилостных и патогенных микробов, регулируют апоптоз, обладают антиканцерогенным эффектом, снижая пролиферацию клеток и повышая их дифференцировку [4, с. 217-242], создают слабокислую среду и являются важнейшими регуляторами водного, электролитного и кислотно-щелочного балансов. Кроме того КЦЖК выполняют энергетическую функцию, покрывая энергозатраты макроорганизмов на 5-10 %. Одной из наиболее значимых функций КЦЖК является способность влиять на кишечный транспорт [5]. Существует мнение [6, 7], что КЦЖК являются маркерами относительного благополучия в кишечнике. В ряде работ [6, 8, 9] отмечается, что количественный и качественный состав КЦЖК зависит от вида субстрата, доступного для ферментации кишечной микрофлорой.

В связи с чем целью настоящего исследования являлось изучение динамики и выявления особенностей образования короткоцепочечных жирных кислот при действии бифидо- и лактобактерий на различные пищевые волокна и глюкозу *in vitro*.

Основная часть

Материалы и методы. В качестве действующей сахаролитической анаэробной микрофлоры использовали препараты «Бифидумбактерин форте» и «Лацидофил-WM». Препарат «Бифидумбактерин форте» представлял собой микробную массу живых бактерий антоганистически активного штамма *Bifidobacterium bifidum* №1, сорбированных на частицах активированного угля, – не менее 50 млн колониеобразующих единиц (КОЕ) в одной дозе. Препарат «Лацидофил-WM» содержал микробную массу живых лиофилизированных бактерий – в одной дозе 2 миллиарда бактерий (*Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11 – 1,9 млрд; *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52 – 0,1 млрд).

В качестве потребляемых субстратов для бактерий использовали цитрусовый пектин (НМ SS цитрусовый пектин, производитель: компания Каргилл, Германия), яблочный пектин (страна-производитель – Китай), льняную клетчатку (ТУ ВУ 19009841.005 – 2011) и глюкозу (ГОСТ 975-78). Иссле-

дование систем «глюкоза-бифидобактерии» и «глюкоза-лактобактерии» проводили для сопоставления динамики, а также качественного и количественного состава продуктов ферментативного распада простых и сложных углеводов.

Анализируемые системы готовили путем предварительного растворения (глюкоза) либо набухания (пищевые волокна) 1 г образца в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл и добавления 1 дозы препарата бактерий. Всё содержимое помещали в термостат при температуре 38 °С. Отбор проб для анализа проводили в промежутке времени от 2 до 24 часов.

Для качественного и количественного анализа КЦЖК использовали хроматографический метод анализа. Пробоподготовку биологического материала для хроматографического анализа осуществляли в соответствии с ранее установленными параметрами [10].

В исследуемых системах были обнаружены уксусная (C_2), пропионовая (C_3), масляная (C_4), изовалериановая (iC_5) кислоты и в некоторых системах следы валериановой (C_5) и капроновой кислот (C_6).

Анализ уксусной кислоты малоинформативен, так как её содержание, как правило, выше, чем остальных кислот и изменение ее количества мало специфично, поскольку она является основным продуктом метаболизма всех макромолекул пищевых продуктов и в виде ацетилкоэнзима – исходным веществом в цикле Кребса. Поэтому в последнее время в научной литературе особое внимание уделяется таким метаболитам кишечной микрофлоры, как масляная и пропионовая кислоты. Именно повышение выработки кишечной микрофлорой масляной кислоты большинство исследователей связывают с профилактикой возникновения колоректального рака [12]. Повышение выработки пропионовой кислоты связывают с антибактериальным эффектом различных пищевых волокон, а повышение содержания изовалериановой кислоты – с увеличением протеолитической активности кишечной микрофлоры [7]. Поэтому основное внимание было направлено на определение пропионовой, масляной и изовалериановой кислот в анализируемых системах.

Исследуемые системы анализировали на газовом хроматографе ГАЛС-311 и ХРОМОС ГХ-1000 с использованием кварцевой капиллярной колонки ОРТИМА FFAP длиной – 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, неподвижная фаза – пленка сополимера полиэтиленгликоля с 2-нитротерефталевой кислотой; толщина пленки 0,25 мкм. Производитель «Macherey-Nagel». Регистрацию хроматограмм проводили как в изотермическом режиме, так и в режиме с программируемой температурой, с пламенно-ионизационным детектированием.

Полученные хроматограммы обрабатывали с помощью компьютерной программы МультиХром 1.5. Идентификацию компонентов на хроматограммах осуществляли, сравнивая времена удерживания компонентов смеси со

временами удерживания индивидуальных чистых веществ в стандартных растворах.

На рис. 1 представлена хроматограмма короткоцепочечных жирных кислот, образующихся при действии лактобактерий на яблочный пектин в течение 2 часов.

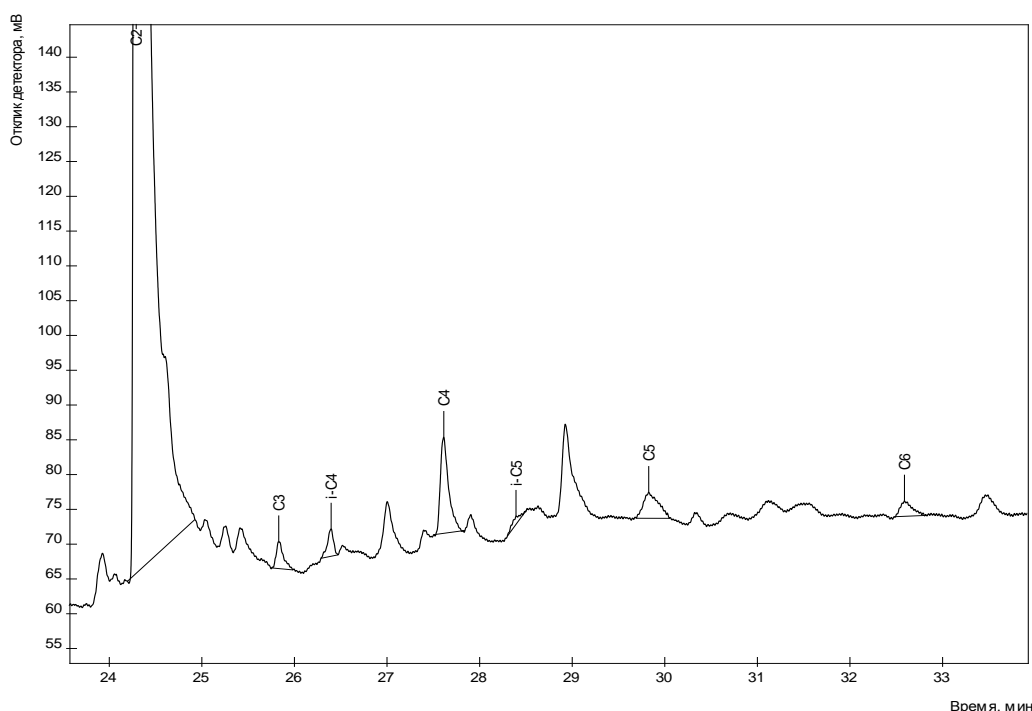


Рисунок 1 – Хроматограмма короткоцепочечных жирных кислот, образующихся при действии лактобактерий на яблочный пектин в течение 2 часов

Количественный анализ проводили методом стандартной добавки по площади пика определенного компонента. В качестве стандарта использовали раствор изомасляной кислоты [11]. Расчетные формулы для определения содержания КЦЖК:

$$C_i = \frac{m_{st}}{V_n * \left(\frac{S_{st2}}{S_{st1}} - 1\right)}, \text{ мг/см}^3 \quad (1)$$

где m_{st} – масса стандартной добавки, мг;

V_n – объем пробы, взятой для анализа, см³;

S_{st2} – площадь пика, принятого за стандарт, на хроматограмме после добавления стандарта;

S_{st1} – площадь пика, принятого за стандарт, на хроматограмме до добавления стандарта.

$$C_i = \frac{m_{st}}{V_n * \left(\frac{S_{i2} * K_i}{S_{i1} * K_i} - 1\right)}, \quad (2)$$

где S_{i2} – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме смеси, в которую был введен стандарт;

S_{i1} – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме исходной смеси;

K_i – относительный поправочный коэффициент для определяемого компонента.

Условия калибровки и анализа смесей были идентичны.

Базы данных с результатами исследования формировались с использованием MS Excel. Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft). Для выбора метода статистической обработки и описания полученных данных оценивался вид распределения количественных значений на соответствие закону нормального распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка (уровень значимости $p < 0,05$). Количественные данные с нормальным распределением значений обработаны статистически и представлены с указанием средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m). С целью проверки статистической нулевой гипотезы об однородности групп исследования использовались непараметрические методы: при сравнении двух групп – U-критерий Манна-Уитни, более двух групп – H-критерий Краскала-Уоллиса ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. Результаты определения количественного содержания пропионовой кислоты, образующейся при действии бифидо- и лактобактерий в зависимости от времени ферментации для всех исследуемых объектов, представлены на рис. 2, 3.

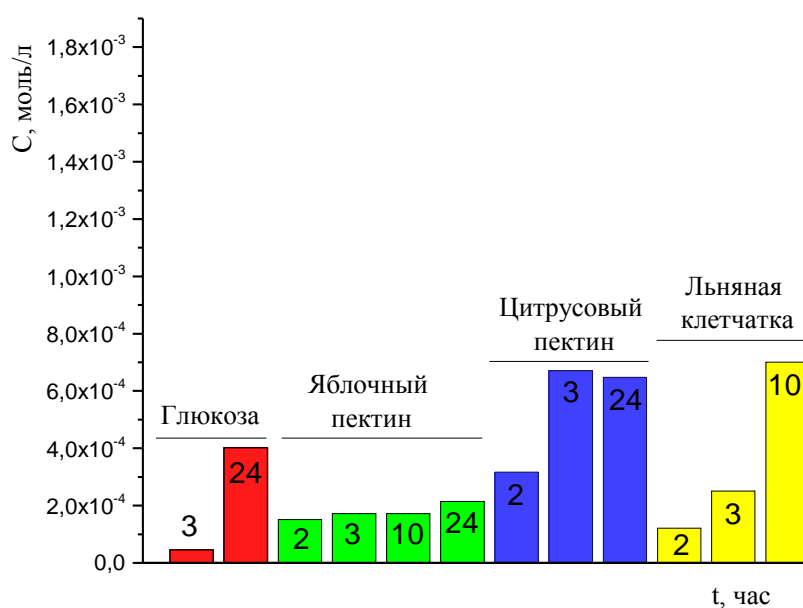


Рисунок 2 – Содержание пропионовой кислоты, образующейся при действии бифидобактерий, в зависимости от времени ферментации

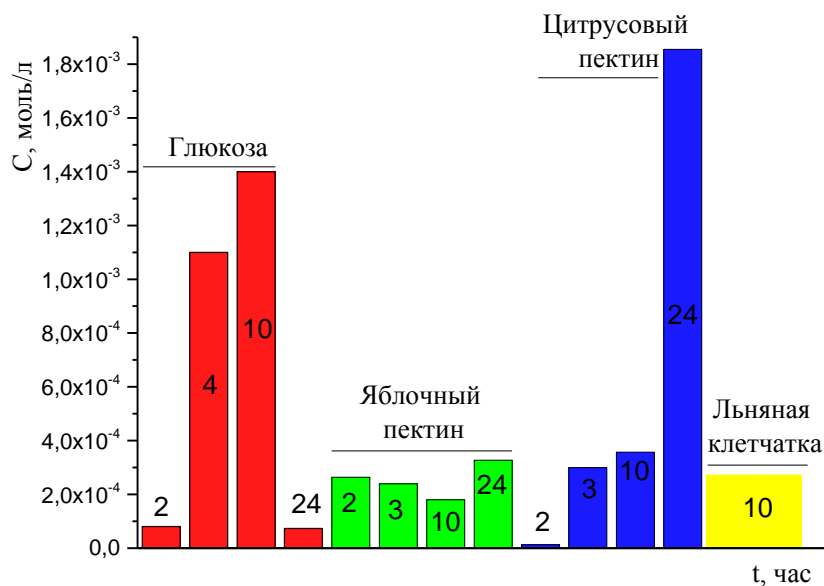


Рисунок 3 – Содержание пропионовой кислоты, образующейся при действии лактобактерий, в зависимости от времени ферментации

Как видно из представленных данных, с увеличением времени ферментации количество пропионовой кислоты увеличивается для всех видов субстрата под действием как бифидо-, так и лактобактерий. При действии бифидобактерий на изученные субстраты (рис. 2) с увеличением времени ферментации зафиксировано увеличение количества пропионовой кислоты для всех образцов. Статистически значимые различия концентрации данной кислоты при действии на разные субстраты выявлены для сроков ферментации: в 3 часа ($p = 0,022$), в 10 часов ($p = 0,014$) и 24 часа ($p = 0,018$).

Наибольшее увеличение количества пропионовой кислоты установлено для цитрусового пектина (через 3 часа концентрация C_3 составляет $(6,7 \pm 0,6) \times 10^{-4}$ моль/л и льняной клетчатки (через 10 часов её концентрация составляет $(7,0 \pm 0,6) \times 10^{-4}$ моль/л. При действии лактобактерий на изученные субстраты (рис. 3) зафиксировано статистически значимое увеличение концентрации пропионовой кислоты для сроков: 2 часа ($p = 0,015$), 3 часов ($p = 0,022$) и 24 часов ($p = 0,015$). Также наибольшее увеличение количества пропионовой кислоты установлено для цитрусового пектина (через 24 часа концентрация C_3 составляет $(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ моль/л.

Для всех исследуемых объектов, кроме льняной клетчатки, концентрация пропионовой кислоты зарегистрирована значительно выше в системах, содержащих лактобактерий, чем в системах с бифидобактериями.

Результаты определения количественного содержания масляной кислоты, образующейся при действии бифидо- и лактобактерий в зависимости от времени ферментации для всех исследуемых объектов, представлены на рис. 4, 5.

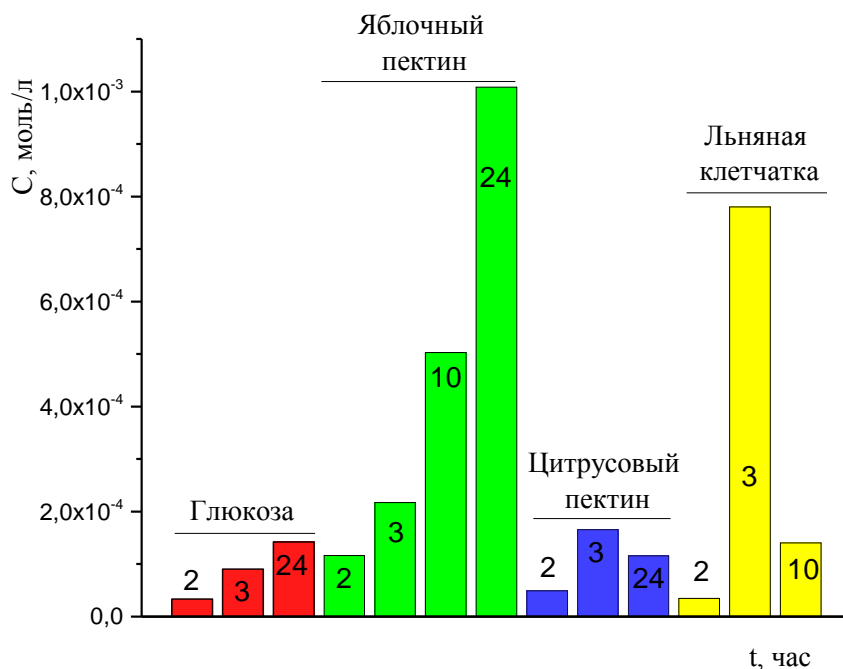


Рисунок 4 – Содержание масляной кислоты, образующейся при действии бифидобактерий, в зависимости от времени ферментации

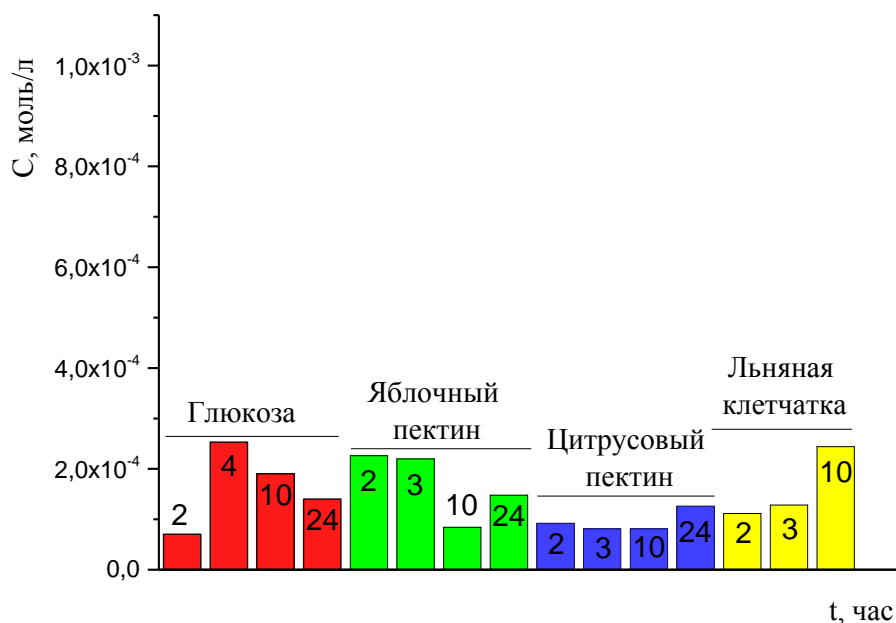


Рисунок 5 – Содержание масляной кислоты, образующейся при действии лактобактерий, в зависимости от времени ферментации

Из представленных данных видно, что в системах, содержащих бифидобактерии, с ростом времени ферментации концентрация масляной кислоты непрерывно увеличивается для таких субстратов, как глюкоза и яблочный пектин и к моменту времени 24 часа составляет $(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ моль/л и $(1,01 \pm 0,10) \times 10^{-3}$ моль/л соответственно. А при использовании в качестве субстрата для бифидобактерий цитрусового пектина и льняной клетчатки значения концентрации образующейся масляной кислоты проходят через максимум, который приходится на момент времени 3 часа. Статистически значимые различия концентрации масляной кислоты при действии на разные субстраты бифидобактерий выявлены для сроков ферментации: в 3 часа ($p = 0,044$), в 10 часов ($p = 0,014$) и 24 часа ($p = 0,022$).

В системе «глюкоза-лактобактерии» (рис. 5) значения концентрации масляной кислоты также проходят через максимум, причем величина этого максимума превышает аналогичные значения в системе, содержащей бифидобактерии (уже через 4 часа при действии лактобактерий концентрация C_4 составляла $(2,53 \pm 0,30) \times 10^{-4}$ моль/л, а при действии бифидобактерий через 24 часа – $(1,42 \pm 0,15) \times 10^{-4}$ моль/л. Для системы «яблочный пектин – лактобактерии» максимальное количество масляной кислоты достигается в первые 2 часа, затем её содержание постепенно уменьшается. По-видимому, уменьшение концентрации масляной кислоты может быть связано с её включением в метаболические процессы.

При действии лактобактерий на изученные субстраты (рис.5) зафиксировано статистически значимые различия в концентрациях масляной кислоты для времени ферментации 10 часов ($p = 0,034$). В системе «цитрусовый пектин – лактобактерии» зафиксировано незначительное повышение количества масляной кислоты к 24 часам, а в системе «льняная клетчатка-лактобактерии» – к 10 часам повышение количества масляной кислоты до $(2,44 \pm 0,27) \times 10^{-4}$ моль/л.

Для всех исследованных субстратов динамика накопления масляной кислоты противоположна динамике накопления пропионовой кислоты: масляной кислоты образуется больше при действии бифидобактерий на изученные субстраты, чем при действии лактобактерий.

Результаты определения количественного содержания изовалериановой кислоты, образующейся при действии бифидо- и лактобактерий в зависимости от времени ферментации для всех исследуемых объектов, представлены на рис. 6, 7.

Как видно из представленных данных, для систем «глюкоза – лактобактерии», «цитрусовый пектин – лактобактерии» и «цитрусовый пектин – бифидобактерии» изовалериановая кислота обнаруживается на уровне следовых количеств.

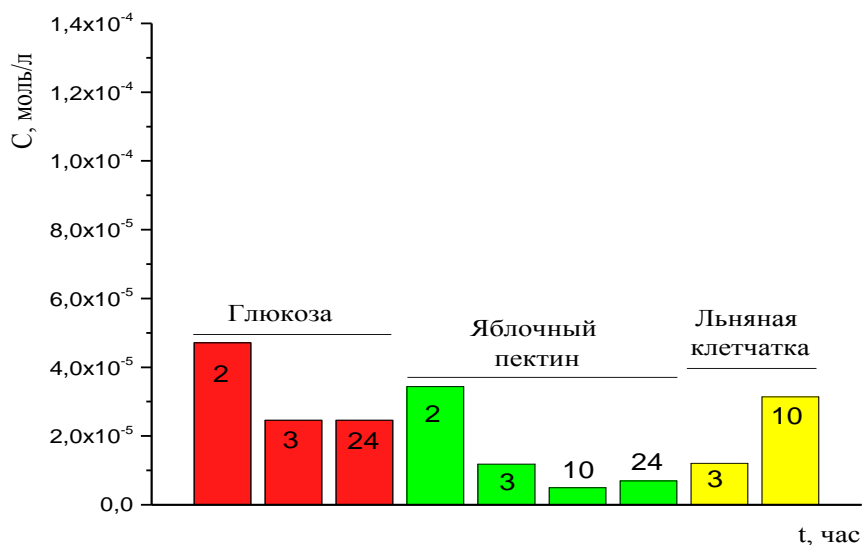


Рисунок 6 – Содержание изовалериановой кислоты, образующейся при действии бифидобактерий, в зависимости от времени ферментации

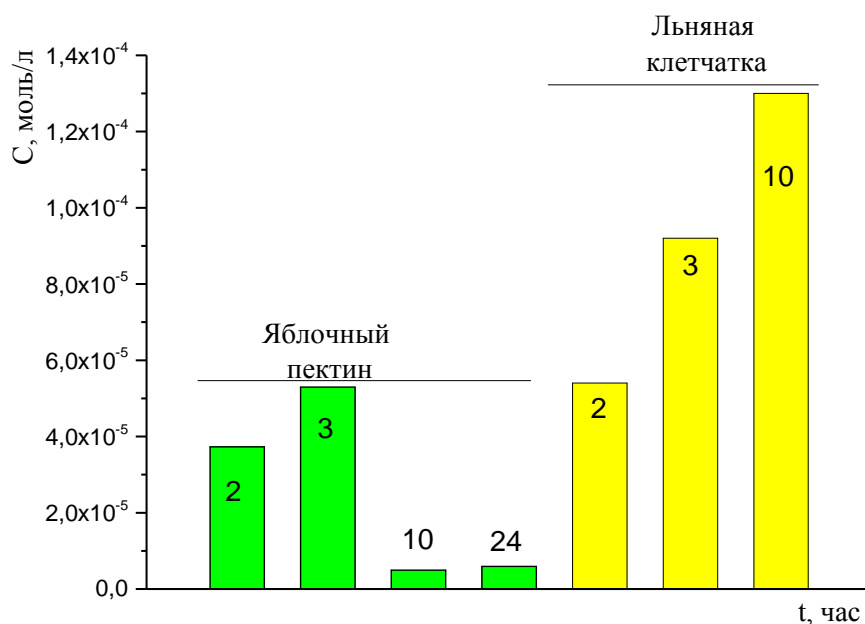


Рисунок 7 – Содержание изовалериановой кислоты, образующейся при действии лактобактерий, в зависимости от времени ферментации

Для систем «глюкоза – бифидобактерии» и «яблочный пектин – бифидобактерии» максимальное количество изовалериановой кислоты регистрируется через 2 часа от начала ферментации $(4,7 \pm 0,28) \times 10^{-5}$ моль / л и $(3,4 \pm 0,22) \times 10^{-5}$ моль / л соответственно и к 24 часам её содержание умень-

шается. Для системы «льняная клетчатка – бифидобактерии» и «льняная клетчатка – лактобактерии» с увеличением времени ферментации количество изовалериановой кислоты возрастает, причем максимальное её значение $(1,3 \pm 0,08) \times 10^{-4}$ моль/л достигается при действии лактобактерий. В системе «яблочный пектин – лактобактерии» наблюдается уменьшение количества изовалериановой кислоты. Следует отметить, что для рассматриваемых систем количество изовалериановой кислоты образуется больше при действии лактобактерий, чем при действии бифидобактерий на исследуемые субстраты. Статистически значимые различия концентрации изовалериановой кислоты при действии на разные субстраты бифидобактерий (рис. 6) выявлены для сроков ферментации: в 2 часа ($p = 0,013$), 3 часа ($p = 0,039$), в 10 часов ($p = 0,014$) и 24 часа ($p = 0,014$).

При действии лактобактерий на изученные субстраты (рис. 7) зафиксированы статистически значимые различия концентрации изовалериановой кислоты для времени ферментации 3 часа ($p = 0,014$), 10 часов ($p = 0,014$) и 24 часа ($p = 0,013$).

Сравнительный анализ полученных данных показал, что для систем «глюкоза – бифидобактерии» и «глюкоза – лактобактерии» содержание КЦЖК можно расположить в ряд: $C_3 > C_4 > iC_5$. Однако при действии лактобактерий на глюкозу содержание всех кислот больше, чем при действии бифидобактерий, за исключением изовалериановой кислоты, которая не обнаруживается при действии лактобактерий. Анализируя метаболиты систем, содержащих в качестве субстрата цитрусовый пектин была выявлена аналогичная зависимость, как и для систем «глюкоза – бифидобактерии» и «глюкоза – лактобактерии»: $C_3 > C_4$, как для бифидо-, так и лактобактерий с тем лишь отличием, что уровень концентраций КЦЖК значительно выше, чем для глюкозы.

В ходе эксперимента выявлено, что для системы «яблочный пектин – лактобактерии» наблюдается аналогичная зависимость, как для глюкозы и цитрусового пектина: $C_3 > C_4 > iC_5$. Однако при действии бифидобактерий на яблочный пектин выявлены некоторые отличия: $C_4 > C_3 > iC_5$, причем концентрация масляной кислоты значительно превышает концентрации других кислот. Для системы «льняная клетчатка – лактобактерии» по количественному содержанию КЦЖК наблюдается такая же зависимость, что и для системы «яблочный пектин – лактобактерии»: $C_3 > C_4 > iC_5$, а для системы «льняная клетчатка – бифидобактерии»: $C_4 > C_3 > iC_5$.

Выводы

На основе изучения динамики образования короткоцепочечных жирных кислот при действии бифидо- и лактобактерий на пищевые волокна *in vitro* можно сделать следующие выводы:

- утилизация одинакового субстрата зависит от вида бактерий;

- качественный и количественный состав продуктов ферментации для одних и тех же бактерий зависит от природы пищевого волокна;
- основными продуцентами пропионовой и изовалериановой кислот из изученных пищевых волокон являются лактобактерии, а масляной кислоты – бифидобактерии;
- из всех изученных видов пищевых волокон под действием бифидобактерий пропионовой и масляной кислоты образуется больше, чем из глюкозы.

Поскольку в экспериментах *in vitro* в яблочном пектине под действием бифидобактерий образуется наибольшее количество масляной кислоты, то с точки зрения профилактики колоректального рака при разработке биологически активных добавок онкопротекторного действия следует сочетать пребиотические свойства яблочного пектина и пробиотические свойства бифидобактерий для достижения максимального эффекта. Наибольшее количество пропионовой кислоты образуется из цитрусового пектина под действием лактобактерий *in vitro*, поэтому при разработке биологически активных добавок с бактерицидными свойствами следует сочетать пребиотические свойства цитрусового пектина и пробиотические свойства лактобактерий. Из льняной клетчатки под действием бифидобактерий образуется максимальное количество пропионовой кислоты, а под действием лактобактерий – масляной, поэтому для разработки биологически активной добавки комплексного действия следует использовать пребиотические свойства льняной клетчатки и пробиотические свойства бифидо- и лактобактерий.

Эксперименты проводились на базе ресурсного центра Могилевского государственного университета имени А. А. Кулешова.

Перечень использованных источников

1. Мейер Р. Пищевые волокна и короткоцепочечные жирные кислоты [Электронный ресурс] / Р. Мейер // Сайт медицины критических состояний. – Режим доступа: – <http://goo.gl/OPSGEg>. – По состоянию на 01.02.2016. – Загл. с экрана.
2. Истомин А. В. Гигиенические аспекты использования пектина и пектиновых веществ в лечебно-профилактическом питании : пособие для врачей / [А. В. Истомин, Т. Л. Пилат]. – Москва : [Б. и.], 2009. – 44 с.
3. Доронин А. Ф. Функциональные пищевые продукты. Введение в технологию / А. Ф. Доронин [и др.] ; под ред. А. А. Кочетовой. – Москва: ДеЛи принт, 2009. – 288 с.
4. Sivieri K. Probiotics and intestinal microbiota: implication in colon cancer prevention/ K. Sivieri [et. al.] // Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock purposes / ed. by M. Kongo. – [S. l.] : InTech, 2013. – 670 p.
5. Хавкин А. И. Пробиотические продукты питания и естественный иммунитет / А. И. Хавкин // Лечащий врач. – 2009. – №8. – С. 84-86.

6. Sun Y. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal short chain fatty acids / Y. Sun, M. X. D. O’Riordan // *Advances in Applied Microbiology* – 2013. – Vol. 85. – P. 93-118.

7. Ардатская М. Д. Летучие жирные кислоты и их диагностическое и прогностическое значение в гастроэнтерологической клинике / М. Д. Ардатская [и др.] // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2000. – № 5. – С. 63-70.

8. Pryde S.E. The microbiology of butyrate formation in the human colon / S. E. Pryde, S. H. Duncan, G. L. Hold // *FEMS Microbiology Letters*. – 2002. – № 217. – P. 133-139.

9. Wong JM, Colonic health: fermentation and short chain fatty acids / JM. Wong, R. de Souza, CW. Kendall, A. Emam, DJ. Jenkins // *Journal of Clinical Gastroenterology*. – 2006. – № 40(3). – P. 235-243.

10. Седакова В. А. Определение короткоцепочечных жирных кислот в крови человека / В. А. Седакова [и др.] // *Проблемы устойчивого развития регионов Республики Беларусь и сопредельных стран : сб. науч. статей III Международной науч.-практ. конф., 4 апреля 2014 г., Могилев*. – Могилев : МГУ имени А. А. Кулешова, 2014. – С. 444-448.

11. Седакова В. А. Определение короткоцепочечных жирных кислот в биологических объектах методом газожидкостной хроматографии / В. А. Седакова [и др.] // *Вестник фармации*. – 2013. – №3 (61). – С. 43-50.

12. Головенко О. В. Роль масляной кислоты и инулина в лечение органических и функциональных заболеваний кишечника : пособие для врачей / О. В. Головенко, И. Л. Халиф, А. О. Головенко ; ФГБУ «ГНЦ Колопроктологии» Минздравсоцразвития России. – 2-е изд., доп. – Москва : 4ТЕ АРТ, 2012. – 40 с.

© В. А. Седакова, А. В. Клебанов,
Н. А. Клебанова, Е. В. Седаков

Порядок цитирования:

Седакова В. А. Особенности ферментации пищевых волокон под действием бифидо- и лактобактерий (in vitro) [Электронный ресурс] : научная статья / В. А. Седакова [и др.] // *Траектория науки*. – 2016. – №2(7). – 0,48 авт. л. – Режим доступа: <http://pathofscience.org/index.php/ps/article/view/60>. – Загл. с экрана.

Features of fiber fermentation under bifidobacteria and lactobacilli (in vitro)

Sedakova Valentina

*Mogilev State A. Kuleshov University, Associate Professor of Department of Nature Science,
PhD in Technical Sciences, Associate Professor, Republic of Belarus*

Klebanov Alexander

*Mogilev State A. Kuleshov University, Associate Professor of Department of Nature Science,
PhD in Chemistry, Associate Professor, Republic of Belarus*

Klebanova Natalia

*Mogilev State A. Kuleshov University, Associate Professor of Department of Nature Science,
PhD in Chemistry, Associate Professor, Republic of Belarus*

Sedakov Eugen

*Mogilev State University of Food Technologies, Associate Professor of Department of Machinery and
Equipment for Food Production, PhD in Technical Sciences, Republic of Belarus*

Abstract. The article presents experimental data on the study of fermentation of dietary fibers of different origin under the action of bifidobacteria and lactobacilli. Citrus and apple pectin, flax fiber and glucose were used as substrate. The dynamics of the process was determined by the dependence of the content of short-chain fatty acids (propionic, butyric, valeric) in the analyzed systems on time. Qualitative and quantitative composition of short-chain fatty acids were determined by gas chromatography.

It was found that the amount of metabolites (propionic, butyric and isovaleric acids) depends both on the type of the fermentable substrate, and the type of bacteria used for fermentation.

Keywords: dietary fiber, chromatography, lactobacillus, bifidobacteria, short chain fatty acids.

© V. Sedakova, A. Klebanov,
N. Klebanova, E. Sedakov