

На правах рукописи

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный технологический университет» (ВСГТУ)

КРИВОНОСОВА АННА ВЛАДИМИРОВНА

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Хамагаева Ирина Сергеевна

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор
Ханхалаева Ирина Архиповна

кандидат технических наук, доцент
Шевелёва Ольга Владимировна

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ
ДОБАВКИ, ОБОГАЩЕННОЙ ЖЕЛЕЗОМ**

Ведущая организация: Институт общей и экспериментальной
биологии СО РАН. Бурятский научный
центр (г. Улан-Удэ)

Специальности: 05.18.04 – Технология мясных, молочных, рыбных
продуктов и холодильных производств
05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов
(перерабатывающие отрасли АПК)

Защита диссертации состоится 2 ноября 2007 г в 10 часов на заседа-
нии диссертационного совета К 212.039.01 при ГОУ ВПО «Восточно-
Сибирский государственный технологический университет» по адресу:
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в.

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВСГТУ и на сайте
[www. esstu.ru](http://www.esstu.ru).

Автореферат разослан « ___ » сентября 2007 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Столярова А.С.

Улан-Удэ - 2007

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Концепция оптимального питания предполагает в качестве одного из важнейших условий сохранения здоровья человека адекватную обеспеченность его организма как макро-, так и микронутриентами, в том числе и эссенциальными микроэлементами, в частности железом. Железодефицитные состояния по-прежнему остаются актуальной и, во многих отношениях, не решенной проблемой современной медицины. Недостаток железа в организме приводит ко многим негативным последствиям. Одним из них является развитие железодефицитной анемии.

Учитывая, что в повседневной жизни человек потребляет железо в составе растительных и животных продуктов и что наличие аминокислот и пептидов, а также белков животного происхождения способствуют лучшему усвоению организмом этого микроэлемента, представляется целесообразным обогащать рационы питания именно органическими формами железа. По нашему мнению, наиболее удобным объектом для биотехнологического получения железа в органической форме являются пропионовокислые бактерии, которые обладают способностью синтезировать значительное количество гемосодержащих ферментов и корриноидов, повышающих усвоение железа.

Известно, что железо в организме может всасываться только в виде Fe^{2+} . Однако двухвалентное железо подвергается быстрому химическому окислению, переходя в нерастворимую, неусвояемую организмом трехвалентную форму. Для сохранения биодоступности железа привлекательной представляется роль хелатирующих «агентов», которые способствуют солиubilизации минералов, сохраняя их в растворимом состоянии. Одним из представителей такого рода хелаторов являются казеиновые фосфопептиды (CPPs). Следует отметить, что до сих пор казеиновые фосфопептиды недостаточно изучены и как хелатирующие «агенты» для минералов, и как потенциальные нутрицевтики в питании человека. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о влиянии CPPs на солиubilизацию железа. Поэтому исследование железосвязывающей способности CPPs представляет большой интерес.

Таким образом, разработка и создание биологически активной добавки, содержащей железо в органической хелатированной форме, является актуальным и эффективным способом кардинального улучшения здоровья населения нашей страны.

Цель и задачи исследований. Целью диссертационной работы является разработка технологии биологически активной добавки на основе биомассы пропионовокислых бактерий, обогащенной органическим железом.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи исследований:

- исследовать биохимический потенциал активизированных культур пропионовокислых бактерий;
- оценить адгезивные свойства изучаемых штаммов;

- исследовать влияние сульфата железа на рост и синтез внеклеточных факторов адаптации пропионовокислых бактерий;
- уточнить технологические параметры выделения казеиновых фосфопептидов;
- исследовать способность казеиновых фосфопептидов солиubilизировать двухвалентное железо;
- разработать технологию жидкого бактериального концентрата, обогащенного железом.

Научная новизна. В результате проведенных исследований установлено, что активизированные культуры пропионовокислых бактерий синтезируют гемосодержащие ферменты и обладают высокими адгезивными свойствами. Выявлено, что с повышением концентрации железа в среде увеличивается синтез внеклеточных метаболитов, способствующих адаптации культур к металлу. Определены оптимальные технологические параметры выделения казеиновых фосфопептидов. Доказана высокая способность казеиновых фосфопептидов солиubilизировать двухвалентное железо. Установлена взаимосвязь между концентрацией железа и степенью солиubilизации. Отмечено, что железо, хелатированное казеиновыми фосфопептидами, сохраняется в двухвалентной форме в течение длительного срока хранения. Теоретически обоснован и экспериментально подтвержден состав оптимизированной сульфатом железа и водным раствором казеиновых фосфопептидов питательной среды, обеспечивающий наибольшую эффективность биологически активной добавки.

Практическая ценность работы. На основании результатов исследований разработана технология биологически активной добавки, обогащенной органическим железом. Предложена схема получения водного раствора казеиновых фосфопептидов с максимальным содержанием низкомолекулярных соединений. На производство железосодержащей биологически активной добавки разработаны ТУ 9229-016-02069473-2007. Проведена опытно-промышленная проверка этих препаратов в научно-исследовательской лаборатории заквасок ВСГТУ.

Апробация результатов работы. Результаты работы были доложены и обсуждены на научных конференциях ВСГТУ (Улан-Удэ, 2004 -2007гг); международном научно-практическом семинаре «Теория и практика новых технологий в производстве продуктов питания» (г.Омск, 2005); международном молодежном симпозиуме «Устойчивость и безопасность в экономике, праве, политике стран Азиатско-Тихоокеанского региона» (г.Хабаровск, 2005); международных научных конференциях «Техника и технология пищевых производств» (г.Могилев, 2006), «Пищевые технологии» (г. Казань 2006), международном научном семинаре «Пробиотики» (г. Санкт-Петербург, 2007)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора, методической части, результатов эксперимента и их

анализа, выводов, списка литературы и приложений. Основная часть работы изложена на 120 страницах, включает 15 таблиц, 25 рисунков.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Экспериментальная часть исследований проводилась в лаборатории кафедры «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров» Восточно-Сибирского государственного технологического университета.

Объектом исследования служили культуры пропионовокислых бактерий: штаммы *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* AC-2503, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* AC-2500, *Propionibacterium cyclohexanicum* Kusano AC-2260 и *Propionibacterium cyclohexanicum* Kusano AC-2259, полученные из фонда ВКМ Института Биохимии и Физиологии Микроорганизмов (Москва), активизированные уникальным биотехнологическим способом, разработанным в ВСГТУ. В качестве источника железа использовали двухвалентную соль ($FeSO_4$). Раствор казеиновых фосфопептидов получали путем ферментативного гидролиза нартиевого казеината.

Схема проведения эксперимента представлена на рисунке 1.

В ходе экспериментальных исследований определяли следующие показатели: активную кислотность - потенциметрическим методом по ГОСТ 3624-87; титруемую кислотность - по ГОСТ 3624-92; оптическую плотность - фотоколориметрическим методом на KF -77 при $\lambda=590$ нм; количественный учет микроорганизмов - методом предельных разведений по ТУ 10-10-02-789-192-95; морфологию пропионовокислых бактерий путем приготовления препаратов, окрашенных по Граму с последующим микрокопированием в иммерсионной системе; антимулагенную активность - по тесту Эймса; активность каталазы определяли колориметрическим методом; активность пероксидазы определяли спекрофотометрически с о-дианизидиновым реактивом; активность супероксиддисмутазы определяли по аутоокислению адреналина; адгезивные свойства изучали на формализированных эритроцитах по развернутому методу В.И. Брилис; концентрацию экзополисахаридов - антроновым методом; количество Fe^{3+} определяли спекрофотометрическим методом; количество Fe^{2+} определяли референтным методом с использованием феррозина; молекулярно-массовое распределение пептидов в составе водного раствора CPPs оценивали методом эксклюзионной хроматографии; содержание витамина B_{12} – спекрофотометрическим методом; количество бактерий групп кишечной палочки определяли по ГОСТ 9225-84; контаминацию – по ГОСТ 9225-84.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали методами математического и корреляционного анализа на ЭВМ, используя пакет стандартных программ.

	Показатели
Исследование биотехнологического потенциала активизированных культур пропионовокислых бактерий 1,2,4,13-16	1. Органолептические показатели 2. Активная кислотность 3. Оптическая плотность
Изучение адгезивных свойств различных штаммов пропионовокислых бактерий 9,13	4. Количество клеток пропионовокислых бактерий 5. Антимулагенная активность 6. Активность каталазы
Исследование влияние сульфата железа на рост и синтез внеклеточных факторов адаптации пропионовокислых бактерий 3,4,5-10,11-13	7. Активность пероксидазы 8. Активность супероксиддисмутазы (СОД) 9. Адгезивная активность
Изучение способности казеиновых фосфопептидов солубилизовать сульфат железа 11,3,4,5-10,13	10. Концентрация экзополисахаридов 11. Содержание железа 12. Количество витамина B_{12} 13. Микроскопический препарат
Разработка технологии жидкого бактериального концентрата пропионовокислых бактерий, обогащенного железом 1,2,4,13-16	14. Определение БГКП 15. Контаминация 16. Показатели безопасности
Обработка результатов	

Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование биотехнологического потенциала пропионовокислых бактерий

На первом этапе исследований изучали биотехнологический потенциал разных штаммов пропионовокислых бактерий (ПКБ).

Известно, что ПКБ характеризуются как азотолерантные бактерии, обладающие слабой кислотообразующей способностью. Для повышения биохимической активности исследуемых штаммов была проведена активизация по ранее разработанному на кафедре ТМПГЭТ ВСГТУ биотехнологическому способу. Характеристика основных биотехнологических свойств заквасок на основе активизированных культур пропионовокислых бактерий приведена в таблице 1.

Таблица – 1 Биотехнологический потенциал пропионовокислых бактерий

Показатели	Характеристика штамма			
	<i>P. freundenreichii</i> subsp. <i>freundenreichii</i> AC-2500	<i>P. cyclohexanicum</i> Kusano AC-2259	<i>P. freudereichii</i> subsp. <i>shermanii</i> AC- 2503	<i>P. cyclohexanicum</i> Kusano AC-2260
Внешний вид и консистенция	Однородная, жидковатая консистенция	Однородная вязкая консистенция	Однородная, густая вязкая консистенция	Однородная густая консистенция
Активность, ч	14±1	15±3	14±2	16±1
Кислотность: Титруемая, °Т	76±2	71±1	72±4	70±2
Активная, рН	4,64±0,03	4,99±0,05	4,75±0,09	4,98±0,01
Предельная, °Т	142±3	110±1	148±2	122±1
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см ³	3*10 ⁹	4*10 ⁹	4*10 ⁹ -1*10 ¹⁰	1*10 ⁹
Рост клеток при:				
20% желчи	+	+	+	+
40% желчи	±	±	±	±
2% NaCl	+	+	+	+
4% NaCl	±	±	+	+
6% NaCl	±	-	+	+
pH =4,5	±	-	+	+
Антимутагенная активность (ингибирование, %)	43,6	44,8	47,7	46,2
Количество витамина В ₁₂ , мкг/мл	31,0	18,0	33,0	22,0
Активность гемовых ферментов:				
СОД, ед/мг белка	1,12	1,11	1,37	1,13
Каталаза, мкат/мл	1749,5	1511,0	2110,8	1714,3
Пероксидаза, нмоль/(мин·мг белка)	1,37	1,12	1,42	0,85

Примечание: - отсутствие роста; ± - небольшой рост (10⁵⁻⁶ кое/см³); + - активный рост (10⁷⁻⁸ кое/см³)

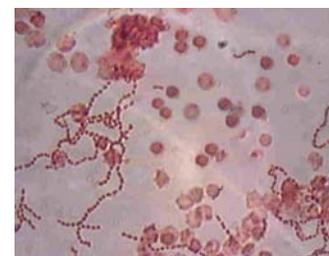
Из данных таблицы 1 видно, что все активизированные культуры обладают высокой биохимической активностью, о чем свидетельствует быстрая ферментация молока и максимальное количество жизнеспособных клеток в заквасках – 10⁹⁻¹⁰ кое/см³. Отмечено, что исследуемые штаммы (кроме *P. cyclohexanicum* Kusano AC-2259) проявили устойчивость к высокой концентрации желчи (40%), NaCl (6%) и развивались в среде с низким рН (4,5), что указывает на высокую выживаемость данных культур в неблагоприятных условиях ЖКТ человека. Установлено, что наиболее ярко выраженный антимутагенный эффект (47,7%), значительный синтез корриноидов (33,0 мкг/мл), гемсодержащих ферментов (каталазы, пероксидазы) и супероксиддисмутазы проявил штамм: *P. freudereichii* subsp. *shermanii* AC- 2503. Далее по способности синтезировать гемсодержащие соединения следует отметить *P. freundenreichii* subsp. *freundenreichii* AC-2500.

В результате проведенных исследований установлено, что изученные штаммы пропионовокислых бактерий обладают ценными биотехнологическими свойствами, что открывает широкие перспективы для их использования при создании БАД.

Изучение адгезивных свойств пропионовокислых бактерий

Одним из актуальных направлений современной микробиологии является изучение адгезивного процесса различных микроорганизмов. Адгезия – это межклеточное взаимодействие, выражающееся в прочном прикреплении клеток к субстрату. Что касается пропионовокислых бактерий, информация об их адгезивных свойствах в литературе нами не обнаружена.

Следует отметить, что от адгезивных свойств во многом зависит состав, стабильность и защитные свойства микрофлоры макроорганизма. В связи с этим дальнейшие исследования направлены на изучение адгезивных свойств разных штаммов пропионовокислых бактерий. В качестве клеток макроорганизма были выбраны клетки формализированных эритроцитов. Адгезивный процесс ПКБ с эритроцитами представлен на рисунке 2.



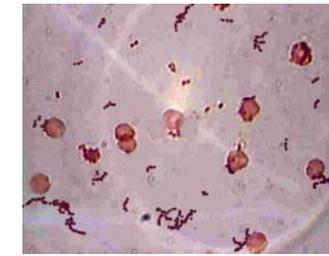
а) *P. freundenreichii* subsp. *shermanii* AC-2503



б) *P. cyclohexanicum* Kusano AC-2259



в) *P. freundenreichii* subsp. *freundenreichii* AC-2500



г) *P. cyclohexanicum* Kusano AC-2260

Рисунок 2 - Взаимодействие ПКБ с эритроцитами

Анализ данных, представленных на рисунке 2, показывает, что пропионовокислые бактерии обладают различной способностью адгезироваться

на эритроцитах. Выявлено, что некоторые штаммы адгезируются в виде отдельных бактериальных клеток (рис. 2, б, в и г), а также агрегатов, которые почти полностью закрывают эритроциты (рис. 2, а).

Адгезивные свойства культур оценивали по среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту участия эритроцитов (КУЭ); об адгезивности штамма судили по индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ). Согласно методике микроорганизмы считали неадгезивными при ИАМ менее 1,75; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0; высокоадгезивными – при ИАМ более 4,0. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Адгезивность пропионовокислых бактерий

Штамм	СПА	КУЭ	ИАМ (M±m)	Адгезивность
<i>P. freundenreichii</i> subsp. <i>freundenreichii</i> AC-2500	3,2	79 %	4,0±1,5	Среднеадгезивный
<i>P. cyclohexanicum</i> Kusano AC-2260	3,9	82 %	3,7±1,2	Среднеадгезивный
<i>P. freundenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> AC-2503	4,6	85 %	5,4±1,1	Высокоадгезивный
<i>P. cyclohexanicum</i> Kusano AC-2259	3,3	80 %	3,1±1,8	Среднеадгезивный

Из данных таблицы 2 следует, что пропионовокислые бактерии обладают достаточно высокими адгезивными свойствами. Установлено, что из всех изученных культур высокоадгезивным штаммом является *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *shermanii* AC-2503, о чем свидетельствует индекс адгезивности (ИАМ=5,4), а также показатели СПА (4,6) и КУЭ (85%). Следовательно, этот штамм лучше других закрепится на клетках кишечника, создавая защитный барьер. Остальные штаммы по всем исследуемым показателям проявили среднюю степень адгезивности.

Изучение влияния сульфата железа на рост и синтез внеклеточных факторов адаптации пропионовокислых бактерий

Внеклеточные метаболиты, синтезируемые микроорганизмами и регулирующие их активность, называются ауторегуляторами. Важно подчеркнуть, что среди многочисленных функций ауторегуляторов крайне слабо изучены факторы, обеспечивающие адаптацию микроорганизмов к неблагоприятным физико-химическим условиям среды.

В связи с этим в дальнейших исследованиях изучали влияние сульфата железа на синтез экзосубстратов пропионовокислыми бактериями. Известно, что биологический эффект взаимодействия микроорганизмов с металлами

определяется концентрацией металла, степенью его токсичности и метаболическим потенциалом микроорганизмов.

Результаты наших исследований (рис.3) показали, что сульфат железа до определенной концентрации (0,25 мг/мл для *P. freundenreichii* subsp. *freundenreichii* AC-2500 и 0,35 мг/мл для всех остальных штаммов) повышает удельную скорость роста пропионовокислых бактерий, что свидетельствует о необходимости железа для нормального метаболизма клетки. Дальнейшее увеличение концентрации в среде $FeSO_4$ приводит к замедлению скорости роста. При этом количество жизнеспособных клеток остается на высоком уровне (10^{11} кое/см³). Следует отметить, что избыточное содержание металла ингибирует метаболизм, в этом случае включаются защитные механизмы, компенсирующие отрицательное действие металла.

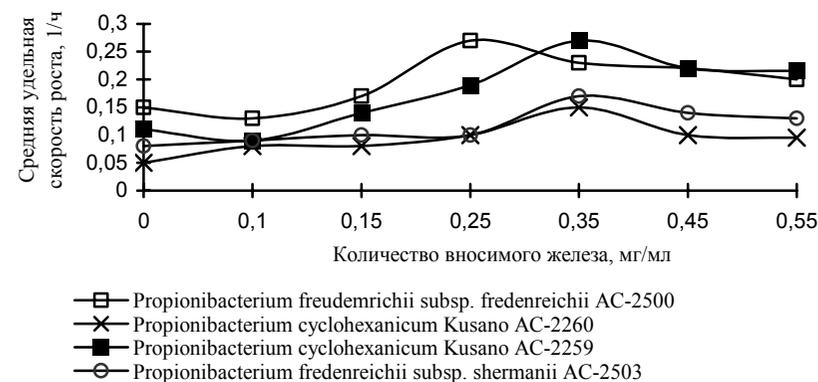


Рисунок 3 – Влияние сульфата железа на скорость роста пропионовокислых бактерий

При исследовании биотехнологического потенциала нами было установлено, что пропионовокислые бактерии синтезируют значительное количество гемсодержащих ферментов. Поскольку синтез и активность гемовых ферментов зависят от содержания в среде ионов железа, дальнейшие исследования направлены на изучение влияния $FeSO_4$ на биосинтез каталазы, пероксидазы и СОД. Результаты исследований приведены в таблице 3.

Анализ данных таблицы 3 показал, что с увеличением дозы железа у всех изученных штаммов происходит увеличение активности таких ферментов, как каталаза и СОД. Увеличение концентрации сульфата железа в среде до 0,45-0,55 мг/мл приводит к возрастанию активности каталазы (в среднем) в 1,5 раза, а СОД в 1,7-1,85 раза. Что касается пероксидазы, то её активность во всех опытных образцах практически не изменялась. Вероятно, это объясняется накоплением только экзофермента. Установлена корреляционная за-

висимость между активностью ферментов (Y) и концентрацией сульфата железа:

$$Y_1 = -38,90x^2 + 40,61x + 19,40 \text{ - по СОД;}$$

$$Y_2 = -0,115x^2 + 0,861x + 0,514 \text{ - по каталазе.}$$

Коэффициенты корреляции $R_{1,2}$ составляют 0,990 и 0,898 соответственно.

Следует отметить, что увеличение активности каталазы и СОД значительно повышает способность пропионовокислых бактерий защищаться от окислительного стресса, поскольку именно эти ферменты способны выводить из клеток супероксидные радикалы.

Таблица 3 - Влияние железа на активность антиокислительных ферментов, синтезируемых пропионовокислыми бактериями

Штамм	Содержание железа, мг/мл	Активность ферментов		
		Каталаза (мкат/мл)	Пероксидаза (нмоль/(мин·мг белка))	СОД, ед/мг белка
P. freudenreichii subsp. fredenreichii AC-2500	0	1280,0	1,573	1,02
	0,25	1290,5	1,572	1,77
	0,35	1300,9	1,572	1,77
	0,45	1492,5	1,570	1,78
	0,55	1490,6	1,571	1,78
P. cyclohexanicum Kusano AC-2260	0	1712,2	0,905	1,03
	0,25	1802,5	0,890	1,85
	0,35	1895,3	0,853	1,86
	0,45	1907,4	0,850	1,86
	0,55	1912,3	0,853	1,86
P. cyclohexanicum Kusano AC-2259	0	1561,9	1,118	1,01
	0,25	1807,0	1,125	1,83
	0,35	1991,1	1,122	1,83
	0,45	2007,0	1,119	1,83
	0,55	2091,3	1,119	1,84
P. fredenreichii subsp. shermanii AC-2503	0	2318,6	1,113	1,17
	0,25	2554,8	1,112	1,98
	0,35	2789,3	1,113	1,99
	0,45	2954,3	1,112	2,01
	0,55	2952,3	1,113	2,01

Из литературных данных известно, что защита от токсичной концентрации металла у микроорганизмов проявляется в образовании различных веществ, связывающих металл в форме малотоксичных соединений. В связи с этим дальнейшие исследования были посвящены изучению влияния сульфата железа на синтез внеклеточных факторов адаптации бактерий. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Влияние сульфата железа на синтез внеклеточных метаболитов

Штамм	Содержание железа, мг/мл	Показатель			
		Адгезивная активность (ИАМ)	ЭПС мкг/мл	Ингибирование (антимутагенная активность), %	Количество витамина В ₁₂ , мкг/мл
P. freudenreichii subsp. fredenreichii AC-2500	0	4,0	29,81	43,6	31,0
	0,25	4,0	29,96	44,2	32,0
	0,35	4,2	30,05	44,8	32,5
	0,45	4,6	35,50	48,9	34,0
	0,55	5,1	36,80	48,6	34,5
P. cyclohexanicum Kusano AC-2260	0	3,7	31,85	46,2	22,0
	0,25	3,8	32,56	48,9	26,0
	0,35	3,9	36,98	48,7	27,0
	0,45	4,4	37,20	48,6	29,0
	0,55	4,7	48,30	57,9	28,0
P. cyclohexanicum Kusano AC-2259	0	2,8	36,65	44,8	18,0
	0,25	3,1	36,90	46,2	18,0
	0,35	3,6	36,99	47,5	18,0
	0,45	4,2	38,70	52,8	19,0
	0,55	4,6	44,78	54,2	19,5
P. fredenreichii subsp. shermanii AC-2503	0	5,4	41,30	47,7	33,0
	0,25	5,4	44,52	49,6	35,0
	0,35	5,8	49,56	50,1	35,5
	0,45	6,1	50,20	51,2	36,0
	0,55	6,3	56,58	57,3	36,0

Данные, приведенные в таблице 4, свидетельствуют, что добавление ионов железа в питательную среду для культивирования ПКБ стимулирует синтез внеклеточных метаболитов. Так, было отмечено, что с увеличением дозы FeSO₄ наблюдается более высокая антимутагенная активность пропионовых бактерий, что указывает на индукцию антимутагенеза. Повышенный биосинтез экзополисахаридов (ЭПС) при добавлении железа - это проявление неферментативной защиты бактерий, когда ЭПС препятствуют проникновению излишнего железа в клетку за счет её обволакивания. Увеличение адгезии объясняется не только защитной реакцией культур по отношению к металлу, но и тем, что, согласно литературным данным, наличие в среде двух- и трехвалентных катионов приводит к уменьшению толщины двойных заряженных слоев на поверхностях в водных средах, что способствует адгезии за счет уменьшения электростатических сил отталкивания.

При исследовании морфологии пропионовокислых бактерий, культивируемых при разных концентрациях железа, было отмечено, что с увеличением дозы FeSO₄ до 0,55 мг/мл наблюдалось скопление клеток (когезия). Вероятно, в условиях межклеточных контактов посредством агрегации клетки поддерживают свою жизнеспособность.

Полученные результаты свидетельствуют, что синтез экзометаболитов способствует адаптации пропионовокислых бактерий к ионам железа. Выявленные закономерности позволяют не только понять принцип метаболической организации у пропионовокислых бактерий, но и служат научной основой для разработки технологии железосодержащей БАД.

Влияние казеиновых фосфопептидов на солюбилизацию железа в питательной среде

При проведении экспериментальных исследований нами было отмечено, что при содержании железа в среде 0,45 мг/мл и более изменяется окраска концентратов и выпадает осадок, что свидетельствует об образовании нерастворимых Fe^{3+} ионов. В связи с этим в дальнейших исследованиях изучали влияние казеиновых фосфопептидов (CPP_s) на солюбилизацию (хелатирование) железа в питательной среде. CPPs – это фосфорилированные пептиды, образующиеся из казеинов коровьего молока при их переваривании пищеварительными протеиназами.

Известно, что металлосвязывающая способность CPPs зависит от степени фосфорилирования. С целью получения гидролизата с максимальным содержанием низкомолекулярных фосфорилированных пептидов и свободных аминокислот, способных в дальнейшем образовывать растворимые комплексы с железом, нами были уточнены технологические параметры выделения CPPs. При получении CPPs применяли схему одностадийного гидролиза казеината Na с использованием пепсина и трипсина при разной продолжительности гидролиза. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций

Время гидролиза, мин	Диапазон молекулярных масс, кД	Содержание фракций (%) в диапазоне молекулярных масс, в зависимости от используемого фермента			
		пепсин 1%	пепсин 3%	трипсин 1%	трипсин 3%
40	более 138	1,8	1,6	1,7	2,0
	138-10,5	5,4	5,6	3,2	4,0
	10,5-5,1	9,5	10,3	7,8	6,2
60	более 138	2,1	1,8	1,7	2,1
	138-10,5	6,3	5,6	4,2	4,3
	10,5-5,1	9,8	11,0	7,8	6,4
120	более 138	2,2	2,3	2,2	2,1
	138-10,5	7,1	11,2	6,2	6,4
	10,5-5,1	11,9	18,7	10,3	10,8
240	более 138	1,8	1,9	1,7	1,7
	138-10,5	9,5	16,5	10,4	4,5
	10,5-5,1	12,9	18,1	10,9	10,4

Из результатов, приведенных в таблице 5, видно, что при гидролизе натриевого казеината 3%-ным пепсином уже через 120 мин достигается максимальное содержание низкомолекулярных (10,5-5,1 кД) структур: 18,7%.

Дальнейшее увеличение продолжительности гидролиза не приводит к заметному изменению в содержании низкомолекулярных фракций. Кроме того, полученные данные позволяют утверждать, что проведение гидролиза пепсином существенно эффективнее по сравнению с трипсином. Так, при одной и той же концентрации фермента (3%) низкомолекулярных пептидных фракций при гидролизе пепсином образуется в 1,7 раза больше, чем при гидролизе трипсином.

Таким образом, с учетом определения молекулярно-массового распределения пептидных фракций были выбраны оптимальные технологические параметры выделения казеиновых фосфопептидов.

На следующем этапе исследований в питательную среду вносили различные дозы водного раствора CPP_s и сульфата железа. За процессом связывания железа следили по количеству образованного хелатированного Fe^{2+} (% железа, оставшегося в двухвалентной форме от первоначальной дозы). Результаты исследований (средние показатели по всем изученным штаммам) представлены на рисунке 4.

Как показывают данные, представленные на рисунке 4, наличие в среде казеиновых фосфопептидов способствует солюбилизации железа и сохранению его в виде Fe^{2+} ионов. Максимальное количество растворимых комплексов железа (90-95%) образуется при внесении 20% водного раствора казеиновых фосфопептидов и 0,45 мг/мл сульфата железа. Интересным является тот факт, что с увеличением дозы $FeSO_4$ степень солюбилизации железа снижается. Это, вероятно, объясняется тем, что CPP_s могут связывать только ограниченное число молекул железа, то есть количество ионизированного минерала не должно превышать количество имеющихся анионных гидрофильных участков аминокислот казеиновых фосфопептидов.

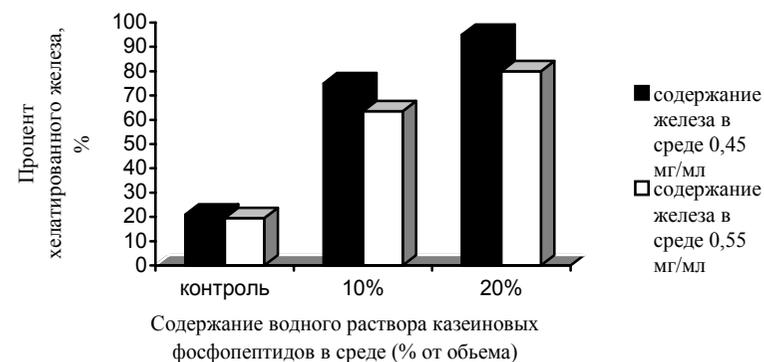


Рисунок 4 – Зависимость содержания в средах усвояемого (хелатированного) Fe^{2+} от количества водного раствора казеиновых фосфопептидов

Существует мнение, что искусственные хелатные формы минералов при хранении разрушаются и теряют свою эффективность, поэтому они уступают природным органическим солям этих элементов. В связи с этим исследовали сохранность железа, хелатированного казеиновыми фосфопептидами, в двухвалентной форме в процессе длительного хранения. Результаты исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6- Влияние CPP_s на процесс солубилизации железа при хранении

Штамм	Содержание CPPs, %	Содержание Fe ²⁺ в среде при хранении (% от первоначальной дозы внесения), сут			
		30	60	90	120
P. freudenreichii subsp. freudenreichii AC-2500	контроль	19,0	19,0	19,5	18,5
	10	58,0	62,0	62,5	60,0
	20	88,0	88,0	88,5	88,0
P. cyclohexanicum Kusano AC-2260	контроль	30,0	29,5	30,0	28,5
	10	69,0	70,5	70,0	69,0
	20	94,5	95,0	95,0	94,5
P. cyclohexanicum Kusano AC-2259	контроль	32,0	32,0	30,5	29,0
	10	60,0	60,5	60,0	59,5
	20	75,0	75,0	75,5	75,0
P. freudenreichii subsp. shermanii AC-2503	контроль	22,0	25,0	25,5	19,0
	10	66,0	67,0	66,0	63,5
	20	95,0	96,0	96,0	95,0

Данные, приведенные в таблице 6, указывают на то, что в процессе хранения количество хелатированного железа в концентратах, содержащих раствор CPP_s, практически не изменилось. Тогда как в контроле наблюдалось значительное снижение содержания растворимых ионов Fe²⁺.

Совокупность полученных данных указывает на то, что казеиновые фосфопептиды являются перспективными хелатирующими агентами для получения новых, биодоступных форм железа. В результате исследований подобраны оптимальные дозы FeSO₄ и водного раствора CPP_s, обеспечивающие максимальное количество солубилизованного железа.

Разработка технологии получения бактериального концентрата пропионовокислых бактерий, обогащенного железом

Результаты проведенных исследований показали, что наиболее высоким биотехнологическим потенциалом обладает штамм P. freudenreichii subsp. shermanii AC-2503, который в дальнейшем был использован в качестве инокулята для получения бактериального концентрата.

Полученные результаты позволили оптимизировать питательную среду за счет внесения FeSO₄ и водного раствора CPP_s, обеспечивающих высокую солубилизацию железа и активный рост пропионовокислых бактерий.

Технологическая схема получения бактериального концентрата представлена на рисунке 5.

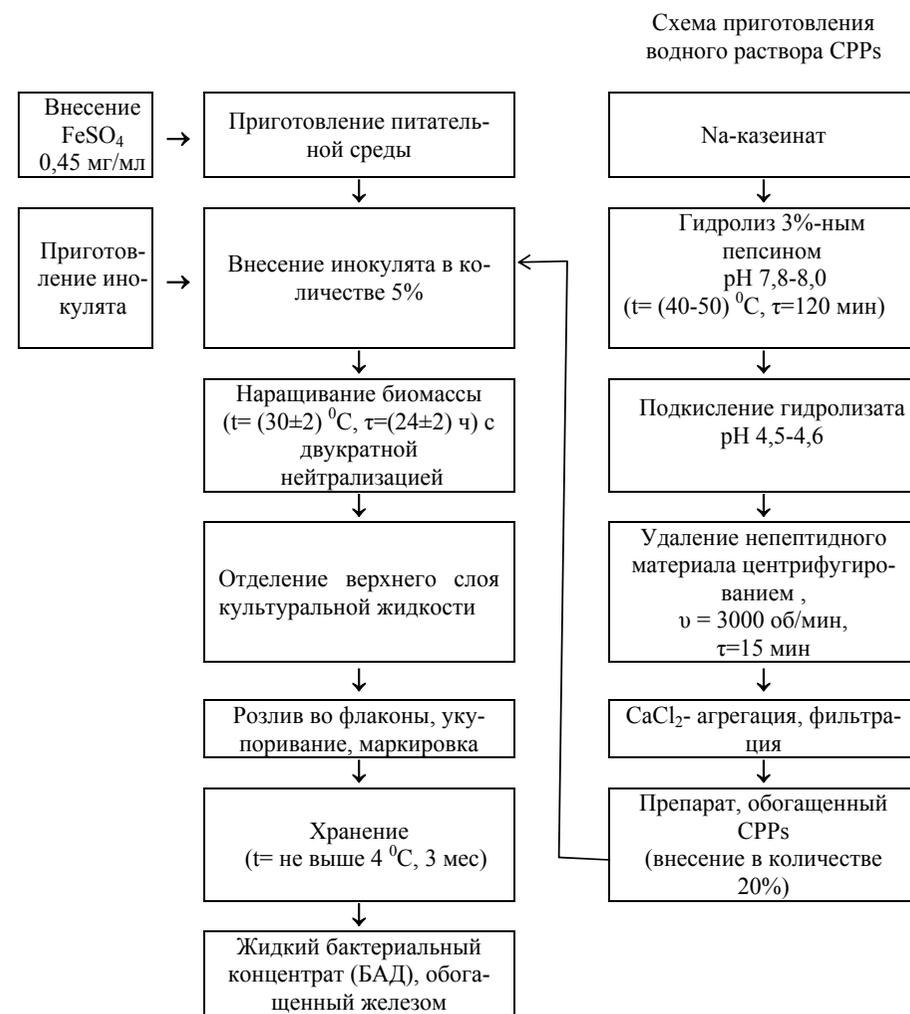


Рисунок 5 – Схема приготовления железосодержащей биологически активной добавки

В отличие от других существующих средств профилактики дефицита железа разработанная биологически активная добавка содержит пробиотиче-

ские микроорганизмы и дозированное количество железа в солюбилизированной биодоступной форме.

Качественная характеристика бактериального концентрата представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Качественная характеристика бактериального концентрата

Наименование показателя	Характеристика показателя
Консистенция и внешний вид	Однородная, допускается отделение сыворотки
Цвет	От светло-желтого до зеленоватого с белыми вкраплениями
Вкус и запах	Чистый, слегка кисловатый, без посторонних привкусов
Предельные значения pH	4,5-7,0
Температура при выпуске с предприятия, °С, не более	4
Количество жизнеспособных клеток на конец срока годности, КОЕ/см ³ , не менее:	1·10 ⁷
Масса продукта (см ³), в которой не допускаются:	
БГКП (колиформы)	10
<i>S. aureus</i>	10
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	50
Дрожжи и плесени, КОЕ/г, не более:	10
Микроскопический препарат:	Кокковидные формы, собранные в длинные цепочки

Данные таблицы 7 показывают, что железосодержащий бактериальный концентрат обладает высокими биохимическими свойствами, содержит профилактическую дозу биодоступного хелатированного железа и высокое количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий, 5 мл БАД содержит 2,25 мг железа, что составляет 20% от рекомендуемой суточной нормы потребления.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов разработана технология получения нового пищевого источника органической формы железа в виде биологически активной добавки.

Выводы

1. В результате проведенных исследований разработана технология получения биологически активной добавки на основе биомассы пропионовокислых бактерий, обогащенной органическим железом.

2. Установлено, что активизированные культуры пропионовокислых бактерий синтезируют гемсодержащие ферменты (каталазу, СОД, пероксидазу), что открывает широкие перспективы для их практического применения.

3. Установлено, что из всех изученных культур высокоадгезивным штаммом является *Propionibacterium fredenreichii* subsp. *shermanii* AC-2503. Остальные штаммы проявили среднюю степень адгезивности.

4. Подобраны оптимальные дозы сульфата железа, обеспечивающие активный рост и высокое количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий.

5. Отмечено, что добавление ионов железа в питательную среду стимулирует синтез внеклеточных метаболитов, которые способствуют адаптации пропионовокислых бактерий к металлу.

6. С учетом молекулярно-массового распределения пептидных соединений при гидролизе казеина был выбран наиболее эффективный способ выделения казеиновых фосфопептидов.

7. Установлено, что казеиновые фосфопептиды обладают высокой способностью солюбилизировать железо и поддерживать его в двухвалентной форме в течение длительного срока хранения.

8. Оптимизирован состав питательной среды за счет введения FeSO₄ и водного раствора СРР_с, обеспечивающий наибольшую эффективность железосодержащей БАД.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В. Исследования антимутагенной активности штамма *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* AC-2500 // Теория и практика новых технологий в производстве продуктов питания: Сб. тр. межрегион. науч.-практ. семинара. - Омск, 2005 - С. 99-101.

2. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В., Битуева Н.Н. Образование экзополисахаридов пропионовокислыми бактериями // Технологии и техника агропромышленного комплекса: Мат-лы всерос. науч.-практ. конф. –Улан-Удэ, 2005 - С. 86-91.

3. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В., Битуева Н.Н. Исследование антимутагенной активности пропионовокислых бактерий // Новые эколого-безопасные технологии для устойчивого развития регионов Сибири: Мат-лы всерос. науч.-практ. конф. – Улан-Удэ, 2005 - С. 76-78.

4. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В. Подбор условий культивирования пропионовокислых бактерий штамма *Propionibacterium freudenreichii* subsp.

fredenreichii AC-2500 // Научная конференция преподавателей, научных работников и аспирантов, посвященная 80-летию со дня рождения Д.Ш. Фролова: Сб. науч. тр. – Улан-Удэ, 2005 - С. 98-99.

5. Кривоносова А.В. Исследования активности каталазы в бактериальном концентрате пропионовокислых бактерий штамма *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* AC-2500 // Устойчивость и безопасность в экономике, праве, политике стран Азиатско-Тихоокеанского региона: Мат-лы докладов всерос. науч.-практ. конф. – Хабаровск, 2005 - С.131-133.

6. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В. Влияние железа на рост и активность пропионовокислых бактерий // Вестник ВСГТУ № 4. - Улан-Удэ, 2005. - С. 47-52.

7. Кривоносова А.В., Хамагаева И.С. Влияние pH питательной среды на рост и активность пропионовокислых бактерий // Техника и технология пищевых производств: V междунар. науч. конф. студентов и аспирантов. – Могилев, 2006г. - С. 180.

8. Кривоносова А.В. Влияние ионов железа на рост пропионовокислых бактерий // Пищевые технологии: Всерос. конф. молодых ученых с международным участием. – Казань, 2006. - С. 189-191.

9. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В. Влияние сульфата железа на биосинтез антиоксидантных ферментов пропионовокислых бактерий // Сб. науч. тр. Изд-во ВСГТУ, - Улан-Удэ, 2006. - С. 99-101.

10. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В. Разработка биологически активной добавки, обогащенной железом // Вестник ВСГТУ №6. - Улан-Удэ, 2006. - С.32-38.

11. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В. Влияние сульфата железа на биохимическую активность пропионовокислых бактерий // Молочная промышленность. - 2007. - № 6. - С.33

Подписано в печать 24.09.2007г. Формат 60×842/16.
Объем в усл.п.л. 1,16. Тираж 100 экз. Заказ № 138

Издательство ВСГТУ.670013. г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в