

31-13-09.

Певченко Борис Васильевич, заместитель генерального директора, директор по науке, кандидат технических наук, доцент Открытого акционерного общества «Федеральный научно-производственный центр «Алтай» (ОАО «ФНПЦ «Алтай», post@frpc.secna.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-58-88, факс (3854) 31-13-09.

УДК 663.1 (045)

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА КАК ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ СУШКИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ*

О.Н. Гора, А.С. Жарков, Б.В. Певченко, И.Н. Павлов

*Подобран оптимальный состав питательной среды для культивирования пропионово-кислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii*. Полученная жидкая закваска с максимальным накоплением биомассы пропионовокислых бактерий высушена методом распылительной сушки. При проведении процесса подобраны защитные среды, при которых достигается минимальная гибель и сохраняется достаточное количество живых бактерий по отношению к жидкой закваске.*

Ключевые слова: пропионовокислые бактерии, питательная среда, витамин B₁₂, сухая закваска, распылительная сушка, защитная среда.

Введение

В последние годы все большее внимание уделяется созданию продуктов функционального питания, способных оказывать определенное регулирующее действие на организм в целом или на его определенные системы и органы или на их функции. Большое внимание исследователей привлекают пропионовокислые бактерии (ПКБ), отличительной способностью которых является широкий синтез витамина B₁₂ и высокие иммуногенные и антимутогенные свойства. ПКБ приживаются в кишечнике людей и способны к снижению геннотоксичного действия ряда химических соединений и УФ – лучей [1]. В связи с этим является актуальным создание препарат-пробиотиков на основе ПКБ. В этой связи одним из направлений при решении задач, направленных на оздоровление населения, являются исследования в области разработки новых эффективных пробиотических продуктов, в частности, на основе ПКБ, а также совершенствование выпускаемых форм этих препаратов и интенсификация производства для получения качественного продукта с наилучшими свойствами.

Для использования этих препаратов в пищевой промышленности необходимо создать условия для продления сроков их хранения, что определяется экономическими условиями производства. Подобные препараты приобретают различные конечные формы. Их использование возможно и в виде жидкого концентрата, и в суспензированной форме, и в виде сухих концентрированных форм. Получение препарата в той или иной форме продиктовано условиями последующего применения, наилучшего сохранения целевых свойств; поддержания микроорганизмов в биологически активном состоянии, сохранностью полезных активных веществ (аминокислоты, органические кислоты, витамины и т.д.). Не исключением является и получение сухих концентрированных препаратов.

Поэтому целью данной работы служит апробирование методики получения сухого концентрата пропионовокислых бактерий. На основе литературных данных по культивированию пропионовокислых бактерий был определен состав основной питательной среды, которая принята в качестве контрольной при последующей отработке по повышению на-

копления биомассы ПКБ и режимов процесса сушки. В состав этой среды входят: молочная сыворотка, дрожжевой автолизат, гидролизованное молоко, аскорбиновая кислота, сульфат аммония, буфер, лактоза и хлорид кобальта. В качестве инокулята используется концентрат пропионовокислых бактерий, который содержит клетки селективных штаммов *Propionibacterium freudenreichii* (подвиды *shermanii* и *globosum*) с высокой температурой второго нагревания. Количество жизнеспособных бактерий в одной порции концентрата - не менее $(2,8 \pm 0,8)$ млрд. КОЕ. Основные условия накопления: соотношение компонентов, температура культивирования, количество вносимой закваски, добавки к среде, продолжительность культивирования продуцента.

МЕТОДЫ И СРЕДСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ

Оптимизация проводилась по методу крутого восхождения (метод Бокса - Уилсона). В качестве параметра оптимизации принято накопление биомассы бактерий.

Определение количества витамина B_{12} осуществлялось спектрофотометрическим методом, а биомассы – методом взвешивания [2].

Спектрофотометрический метод определения витамина B_{12} заключается в отделении и промывке клеток бактерий с переводом кобаламинов в водный раствор путем гидролиза, воздействию светом на полученный гидролизат для перевода кобаламина в оксикобаламин и определении оптической плотности при длине волны 530 нм. Оптическая плотность раствора пропорциональна содержанию кобаламина. Чувствительность метода – 10 мкг в пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы проводилась оптимизация состава ростовых компонентов питательной среды для культивирования *Propionibacterium freudenreichii*.

Установлено, что пропионовокислые бактерии и бифидобактерии относятся к актиномицетной группе микроорганизмов. Так, для количественного учета этих бактерий применяются идентичные среды, вследствие чего для накопления биомассы пропионовокислых бактерий была взята фоновая среда на основе сыворотки с добавлением ростовых компонентов дрожжевого автолизата и гидролизованного молока для культивирования бифидобактерий с последующей оптимизацией.

Пропионовокислые бактерии являются активными продуцентами витамина B_{12} . Сле-

дует отметить, что синтез витамина зависит от условий культивирования. Известно, что корриноиды включают в группу тетрапиррольных соединений, несущих жизненно важные функции. Ионы металлов в этих соединениях находятся в комплексе с органическими лигандами, а в коферментах B_{12} атом кобальта связан с углеродом. Энзиматический гемолиз Co-C связи приводит к образованию реактивных веществ. Эти вещества провоцируют протекание реакций, которые в иных случаях должны быть подавлены. Однако в естественных питательных средах содержание кобальта минимально, поэтому в фоновую питательную среду мы также добавляли ионы Co^{2+} , которые влияют на выход биомассы и синтез витамина B_{12} [3].

Оптимизация проводилась по методу Бокса - Уилсона. В качестве параметра оптимизации принято накопление биомассы бактерий. По результатам определены оптимальный состав питательной среды и условия культивирования, позволяющие добиться максимального накопления биомассы пропионовокислых бактерий с высоким титром жизнеспособных клеток [4]. В качестве основного компонента питательной среды для культивирования ПКБ была взята молочная сыворотка [5], так как молочная сыворотка обладает пищевой и биологической ценностью, имеет специфический химический состав, физико - химические свойства, структурно - механические, оптические, теплофизические и электрические характеристики.

Переработка и использование молочной сыворотки является одним из самых актуальных вопросов молочной промышленности. Рациональное использование молочной сыворотки заслуживает внимание как с точки зрения полной утилизации всех составных частей молока, так и с точки зрения проблемы охраны окружающей среды [6].

В качестве варьируемых факторов выступают дрожжевой автолизат, гидролизованное молоко, аскорбиновая кислота, сульфат аммония, буфер, лактоза.

За постоянный уровень было принято использовать: инокулят - 5 об. % и $CoCl_2$ в дозировке 20 мг/л, а также температуру культивирования. По проведенным нами предварительным испытаниям данное содержание $CoCl_2$ дает наибольшее содержание витамина B_{12} и наименьшее угнетение ПКБ. 5 % содержание инокулята выявлено также из предварительных испытаний. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что с повышением дозы инокулята, увеличивается наращивание биомассы.

Так, при увеличении дозы инокулята с 1 % до 5 % значение оптической плотности резко возрастает. Количество клеток при дозе 5 % на 3 порядка выше, чем при дозе 1 % и на порядок выше при дозе 3 %. Дальнейшее повышение дозы с 5 % до 7 % незначительно сказывается на показаниях оптической плотности. Анализ полученных данных показал, что наиболее оптимальной дозой инокулята для наращивания биомассы *Propionibacterium freudenreichii* является 5 % от объема питательной среды, что дает оптимальный выход биомассы бактерий, накопление витамина В₁₂, а также ведет к удешевлению конечного продукта. Температура культивирования 30 °С была взята за постоянную величину, так как из многочисленных литературных источников известна оптимальная температура культивирования *Propionibacterium freudenreichii* [6, 7].

Итак, варьируемые факторы:

- x₁ - дрожжевой автолизат, %
- x₂ - гидролизованное молоко, %
- x₃ - аскорбиновая кислота, %
- x₄ - сульфат аммония, г/л
- x₅ - фосфатный буфер, %
- x₆ - лактоза, г/л

Таблица 1 – Факторы и их интервалы варьирования

Номер опыта	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	5,279	4,815	0,165	3	5	5,279
2	5,558	4,63	0,23	3	5	5,558
3	5,837	4,445	0,295	3	5	5,837
4	6,116	4,26	0,36	3	5	6,116
5	6,395	4,075	0,425	3	5	6,395
6	6,674	3,89	0,49	3	5	6,674
	дрож. авт, %	гид мол %	аскорб. %	сул ам, г/л	буфер, %	лакт, г/л
Основной уровень	5	5	0,1	3	5	5

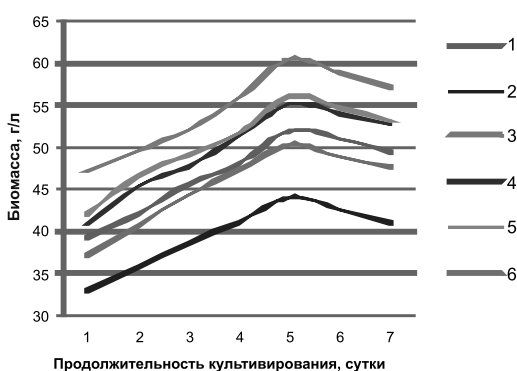


Рисунок 1 – Динамика накопления биомассы бактериями *Pr. freudenreichii* в зависимости от состава питательной среды

Из рисунка 1 видно, что оптимальной питательной средой для накопления биомассы *Propionibacterium freudenreichii* является среда под номером 3 (таблица 1), поскольку позволяет бактериям накапливать значительную биомассу.

Ряд наиболее важных характеристик жидкой закваски приведен в таблице 2.

Таблица 2 – Качественные характеристики жидкой закваски по результатам оптимизации

Показатели	Характеристики
Вкус и запах	Приятный кисломолочный привкус, специфический для данного продукта, без посторонних запахов
Консистенция	Однородная, с умеренной вязкостью
Биомасса бактерий, г/л	60,5
Витамин В ¹² , мкг/мл	108,1
Количество пропионовокислых бактерий, КОЕ/см ³	12×10 ¹²

На конечной стадии обезвоживания продукта рассматривается выбор рационального способа получения из раствора сыворотки сухого препарата, при котором обеспечивается решение комплекса задач. К числу таковых, в первую очередь, принадлежат обеспечение выживаемости пропионовокислых бактерий, накопленных при культивировании, и гарантия стабильности получаемой сухой закваски при хранении. Анализ литературных данных показывает, что независимо от применяемого метода и режима обезвоживания культур микроорганизмов всегда определенная часть клеток данной популяции теряет жизнеспособность. Причины потерь жизнеспособности бактерий при обезвоживании многообразны и зависят от метода обезвоживания, состава среды, химического состава клеточной массы, систематической принадлежности организма и ряда других факторов. Существенные недостатки имеет и сушильная техника, предназначенная для обезвоживания высоковлажных термочувствительных растворов, к которым относится и изучаемая культура пропионовокислых бактерий.

В нашем случае рассматривается широко используемый на практике метод конвективной сушки – высушивание при диспергировании (распылении) раствора в сушильном про-

странстве, куда поступает сушильный агент. Процесс распылительной сушки является чрезвычайно сложным, особенно применительно к обезвоживанию термочувствительных препаратов. Поэтому при исследовании сушки раствора пропионовокислых бактерий нами в качестве важнейшего фактора выделена температура сушильного агента на выходе из сушильного аппарата. Именно в это время бактерии подвержены наиболее сильному температурному воздействию. К другим факторам, также оказывающим влияние на выживаемость бактерий в ходе сушки, отнесены: скорость движения агента сушки в камере, концентрация распыляемого раствора и его расход. При исследованиях сушка проводилась на лабораторной распылительной сушильной установке, где контакт сушильного агента с распыляемым раствором осуществлялся по схеме прямоточного движения. Такой режим взаимного движения выбран в силу того, что он позволяет добиться наиболее мягкого обезвоживания при высокой вероятности выживаемости термочувствительных бактерий.

Используя такой подход, проведена сушка пробиотического продукта при комбинировании условий и параметров высушивания. Анализ полученных данных позволил судить о том, что выживаемость и соответственно количество жизнеспособных бактерий заметно снижается при сушке растворов без внесения защитных сред. В технологии обезвоживания микробиологических культур известно о необходимости использования защитных сред, действие которых проявляется в повышении выживаемости микроорганизмов. Защитные среды играют большую роль при сохранении жизнеспособности клеток в процессах сублимации, лиофилизации, замораживания и также высокотемпературного обезвоживания. В качестве защитных сред в различных исследованиях предложено использование растворов: углеводов, белков, аминокислот и витаминов.

В нашем исследовании проведена апробация применения в качестве защитной среды растворов окисленного декстрана. Такое применение декстранов связано с общеизвестной характеристикой данных природных соединений как носителей и модификаторов природных и синтетических биологически активных веществ. Однако наибольшим эффектом обладает активная форма данного полимера – окисленный декстран. Окисленные декстраны являются альдегидной формой, у которой в процессе окисления формируются альдегидные группы. Благодаря их наличию они спо-

собны образовывать связь с биологически активными веществами, что и позволяет использовать окисленные декстраны в качестве эффективного модификатора свойств биологически активных веществ, а также активного адсорбента и носителя микробных культур. В своей работе мы предложили использовать окисленный декстран, в качестве матрицы-носителя предполагая проявление его защитных свойств при температурном воздействии в процессе сушки. Для этого готовился 10 % раствор декстрана, который затем вносился в жидкую закваску, подвергаемую распылительному высушиванию. Для сравнения мы параллельно использовали защитную среду, описанную в литературных источниках.

Результаты проведенной серии экспериментов подвергли, прежде всего, анализу на определение сохранности жизнеспособных бактерий в условиях использования защитной среды окисленного декстрана, защитной среды из литературных источников и без защитной среды (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика препаратов по общему количеству пробиотиков в препарате

Показатели	Виды защитных сред			Жидкая закваска
	1*	2**	Без защитной среды	
Микробиологические: – определение общего количества пробиотиков, КОЕ/см ³	6×10 ¹⁰	8×10 ¹¹	10×10 ⁴	12×10 ¹²
1* – Аскорбиновая кислота – 2 % и глутамат натрия – 1,25 %				
2** – Окисленный декстран – 10 %.				

По результатам проведенного исследования можно заключить, что сохранность жизнедеятельности бактерий при высушивании в условиях отсутствия защитной среды довольно низкая. В случае применения защитной среды количество жизнеспособных клеток в сухой закваске гораздо выше. Таким образом, при используемых температурных условиях сушки (температура агента на входе 120 °С, температура на выходе 60 °С), установленном сочетании скорости сушильного агента и

расхода жидкого препарата получен препарат с приемлемой выживаемостью при употреблении в качестве защитной среды окисленного декстрана.

ВЫВОДЫ

1. Определён оптимальный состав питательной среды для культивирования пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii*.

2. Проведена апробация в качестве защитной среды растворов окисленного декстрана.

3. Подобраны защитные среды, при которых достигается минимальная гибель и сохраняется достаточное количество живых бактерий по отношению к жидкой закваске.

* Работа выполнялась в рамках ГК №16.522.12.2001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюхова, С.И. / Использование пробиотиков и пребиотиков в биотехнологии производства биопродуктов: монография / С.И. Артюхова, Ю.А. Гаврилова. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2012. – 112 с.

2. Нетрусов, А.И. / Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.: под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

3. Муруев И.Е. Разработка технологии пробиотического бактериального концентрата: дисс... – Улан-Удэ, 2005. – 112 с.

4. Митыпова Н.В. Разработка технологии концентрированной закваски на основе симбиоза пробиотических бактерий: дисс... – Улан-Удэ, 2007. – 183 с.

5. Хамагаева, И.С. / Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий / И.С. Хамагаева. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 172 с.

6. Гора О.Н., Павлов И.Н. Отработка контрольной среды для развития *Propionibacterium freudenreichii* // Ползуновский альманах. – 2011. – № 2. С.125-128.

7. Гора, О.Н., Павлов И.Н. Исследование некоторых основных факторов, определяющих получение сухих препаратов пропионовокислых бактерий // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 4. – С. 78-81.

Гора Оксана Николаевна, научный сотрудник лаборатории ультрадисперсных алмазов Открытого акционерного общества «Федеральный научно-производственный центр «Алтай» (ОАО «ФНПЦ «Алтай»), goga@bk.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-58-88, факс (3854) 31-13-09.

Жарков Александр Сергеевич, генеральный директор, член-корреспондент РАН, доктор технических наук, профессор Открытого акционерного общества «Федеральный научно-производственный центр «Алтай» (ОАО «ФНПЦ «Алтай»), post@frpc.secna.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-58-88, факс (3854) 31-13-09.

Певченко Борис Васильевич, заместитель генерального директора, директор по науке, кандидат технических наук, доцент Открытого акционерного общества «Федеральный научно-производственный центр «Алтай» (ОАО «ФНПЦ «Алтай»), post@frpc.secna.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-58-88, факс (3854) 31-13-09.

Павлов Игорь Николаевич, научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук, доцент Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), pin@bti.secna.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.