

СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ β -ГЛЮКАНУ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ОТРИМАНОВОГО ПЕРОКСИДНИМ МЕТОДОМ

Черно Н.К., д-р техн. наук, професор, Шапкіна К.І., канд. техн. наук, асистент
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Встановлено, що бета-глюкану дріжджів, отриманому пероксидним методом, притаманна фібрилярна ультраструктура, в якій присутні ділянки з різним ступенем впорядкування. Надано характеристику його сорбційної активності та пребіотичної дії. За складом і властивостями полісахарид належить до категорії природних харчових ентеросорбентів – харчових волокон.

It was established that the yeast beta-glucan, obtained by the peroxide method have the fibrillary ultrastructure, that contain the area with the different degrees of orderliness. It was determined its sorption and prebiotic activities. Polysaccharide with such composition and properties belongs to natural enterosorbents – dietary fibers.

Ключові слова: глюкан дріжджів, надмолекулярна структура, функціонально-фізіологічні властивості.

В останні роки набули інтенсивного розвитку дослідження β -глюканів різноманітного походження. Детально вивчено будову та властивості зернових β -(1 \rightarrow 3)/(1 \rightarrow 4)-глюканів, які визнані важливим функціональним інгредієнтом, що має виражений позитивний вплив на організм людини. Проте за фізіологічними ефектами вони значною мірою поступаються ϵ β -(1 \rightarrow 3)/(1 \rightarrow 6)-глюканам дріжджів та грибів, яким, крім усього іншого, притаманна значна протипухлинна активність [1].

Існують різні підходи щодо вилучення β -глюкану з клітинної стінки хлібопекарських дріжджів. Однак відомі способи їх виділення дуже громіздкі та енерговитратні. Нами було розроблено спрощений спосіб отримання β -глюкану клітинних оболонок дріжджів – пероксидний [2], який передбачає обробку хлібопекарських дріжджів розчином H_2O_2 (3...24 %), внаслідок чого відбувається руйнація клітинних оболонок, з наступним видаленням білкової компоненти та манану відповідно 3 та 6 % розчинами NaOH та 0,5 н оцтовою кислотою для видалення глікогену, завдяки чому виявилось можливим виключити цілу низку стадій наявних у стандартній методиці [3], зокрема двократне автоклавування.

Під дією H_2O_2 могла відбуватися модифікація надмолекулярної будови і властивостей полісахариду, що зумовило доцільність їхньої характеристики.

Отже, метою даної роботи було визначення особливостей структури та властивостей зразків глюкану, отриманого новим методом.

Для вивчення надмолекулярної структури препаратів глюкану використовували атомно-силову мікроскопію (АСМ), ІЧ-спектроскопію, кислотний гідроліз.

АСМ виконували в зондовій нанолaboratorії «Прима» дослідного комплексу «ІНТЕГРА». Для проведення досліджень наважку полісахариду масою 10 мг розчиняли в 100 см³ диметилсульфоксиду при кімнатній температурі протягом 24 годин при періодичному перемішуванні. Перед нанесенням розчин полісахариду нагрівали і витримували при температурі 100 °С 10 хвилин. Нанесення зразків на заздалегідь приготовані кремнієві підложки розміром 12x25 мм проводили методом осадження крапель. При цьому діаметр краплі становив не більше 10 мм, товщина шару – менше 2 мм. Зразки висушували при кімнатній температурі, розчинник випаровувався природним шляхом. Сканування на мікроскопі проводили в конфігурації «напівконтактний метод» при частоті 1 Гц за допомогою зондового датчика типу CSG10, використовуючи програму управління мікроскопом «NOVA». Отримані зображення були оброблені за допомогою програмного модуля Image Analysis.

ІЧ-спектроскопічні дослідження проводили на спектрофотометрі «FTIR – 8301 PC». Зразки являли собою таблетки, що містять 4 мг полісахариду і 200 мг калій броміду. Кількісний аналіз ІЧ-спектрів аналізованих продуктів проводили за значеннями відносної оптичної щільності, застосовуючи метод базисної лінії і внутрішнього стандарту. Як внутрішній стандарт використовували максимум смуги поглинання при 1425 см⁻¹, відповідної деформаційних коливань СН– груп. Індекс кристалічності біополімерів визначали як співвідношення оптичної щільності смуг поглинання при 1430 см⁻¹ і 900 см⁻¹ [4]. Індекс симетричності оцінювали по відношенню ширини високочастотної і низькочастотної частин поглинання в області 3000...3750 см⁻¹, виміряних від середини перпендикуляра, проведеного через максимум смуги поглинання ОН– груп і базисну лінію [5].

Водоутримувальну (ВУЗ) та жирозв'язувальну (ЖЗЗ) здатності визначала за [6], сорбцію холевих кислот за [7].

Дослідження біфідогенного ефекту проводили з використанням біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum*. У попередньо стерилізоване коров'яче молоко вносили 5 % суспензії клітин біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum* і 2 % суспензії глюкану клітинних стінок дріжджів. Контролем служила проба, в якій замість глюкану використовували 2 % розчин фруктози. Процес сквашування проводили при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,8$ до початку утворення згустку. Для визначення концентрації клітин отримані зразки висівали на тіогліколевому середовищі. Культивування проводили протягом 72 годин при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

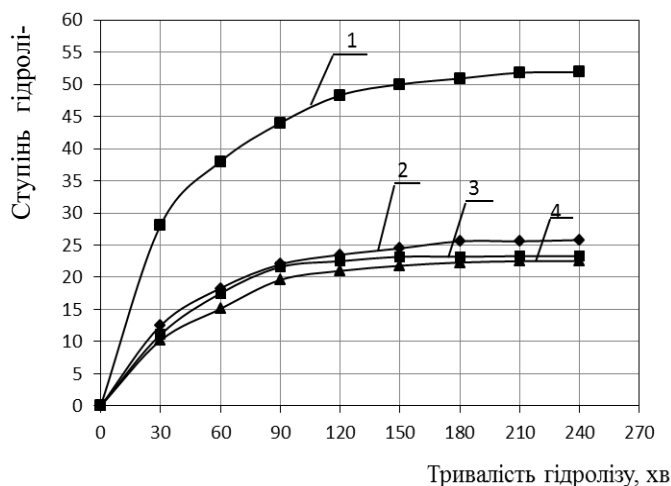
У табл. 1 наведено індекси кристалічності і симетрії зразків. Перші характеризують відношення кристалічних і аморфних областей, другі – щільність і міцність сітки водневих зв'язків. Зростання індексу кристалічності свідчить про збільшення частки кристалічної фракції у зразку, збільшення індексу симетрії – про зниження впорядкованості структури.

Таблиця 1 – Склад, індекси кристалічності і симетрії препаратів β -глюкану

Зразок	Хімічний склад, %		Індекс кристалічності	Індекс симетрії
	Полісахарид	Білок		
Контроль	90,3	3,8	0,95	1,25
1	89,7	8,3	2,55	0,86
2	93,9	2,8	2,92	0,80
3	97,3	сліди	3,21	0,78

Контрольний зразок має найменший індекс кристалічності і, відповідно, – найбільший індекс симетрії, що характеризує його як найменш впорядкований у ряду досліджуваних препаратів.

На рисунку 1 представлені криві, як ілюструють динаміку гідролізу зразків глюкану 2 % розчином хлоридної кислоти.



1 – стандартний; 2 – зразок № 1; 3 – зразок № 2; 4 – зразок № 3.

Рис. 1 – Динаміка кислотного гідролізу препаратів β -глюкану

Отже, використання гідроген пероксиду для виділення препаратів глюкану супроводжується значним підвищенням ступеня їх кристалічності в порівнянні з контрольним зразком. Це було очікувано, тому що під дією розчинів H_2O_2 більш виразним є руйнування ділянок полісахаридів з аморфною структурою, які характеризуються більшою реакційною здатністю і доступністю дії хімічних реагентів та ферментів, ніж кристалічні. Між собою зразки, отримані пероксидним методом, різняться незначною мірою, проте, все ж простежується тенденція збільшення їхньої впорядкованості із зростанням концентрації розчину гідроген пероксиду, яким обробляли сировину.

Використання АСМ дає можливість на атомному рівні проводити аналіз структур різноманітних матеріалів. На рисунках 2 – 5 представлено 3D-мірні зображення зразків препаратів глюкану (1 – глюкан, виділений стандартним методом [3]; 2 – зразок № 1, виділений пероксидним методом з використанням 3 % H_2O_2 , 3 – зразок № 2, виділений пероксидним методом з використанням 13 % H_2O_2 , рис. 4 – зразок № 3, виділений пероксидним методом з використанням 24 % H_2O_2).

Відомо, що швидкість і глибина гідролізу полісахаридів, яким притаманна надмолекулярна структура, розведеними розчинами мінеральних кислот залежать від вмісту в них аморфної фракції.

Як видно з представлених даних, глибина гідролізу β -глюкану, виділеного стандартним методом, значно – практично вдвічі – вище, ніж зразків однойменного полісахариду, отриманих із застосуванням пероксидного реагенту, що може бути обумовлено меншою впорядкованістю їхньої структури. Ці результати узгоджуються з даними визначення індексів кристалічності і симетрії (табл. 1), розрахованих на підставі даних ІЧ-спектроскопії.

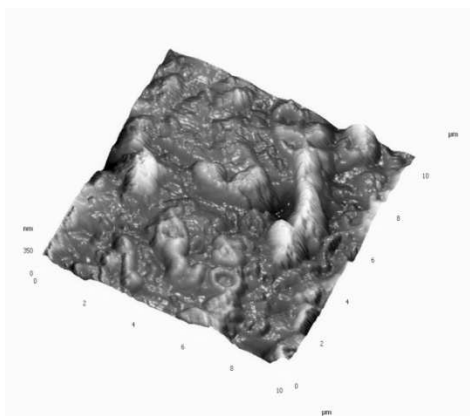


Рис. 2 – Зображення поверхні контрольного зразка глюкану, побудованого за результатами АСМ при 10×10 нм

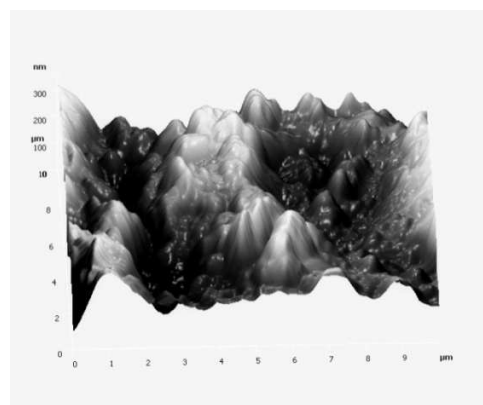


Рис. 3 – Зображення поверхні зразка глюкану № 1, побудованого за результатами АСМ при 10×10 нм

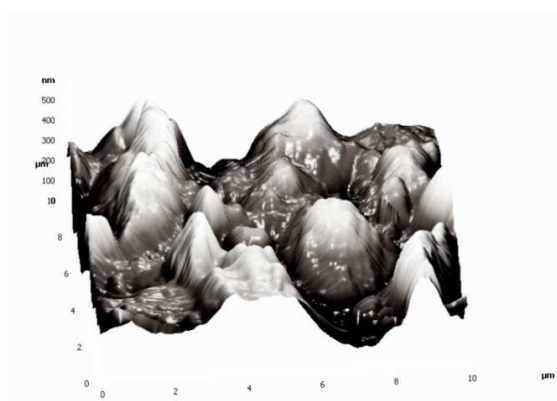


Рис. 4 – Зображення поверхні зразка глюкану № 2, побудованого за результатами АСМ при 10×10 нм

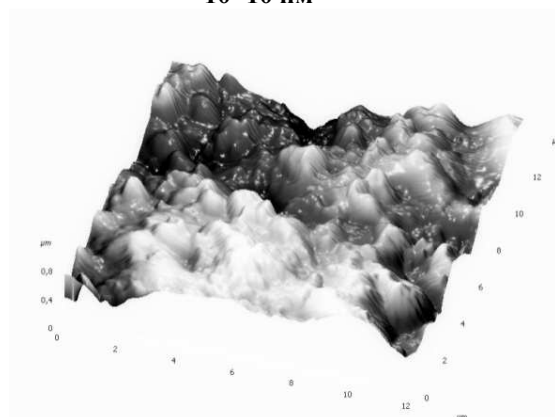


Рис. 5 – Зображення поверхні зразка глюкану № 3, побудованого за результатами АСМ при 10×10 нм

Як видно з наведених даних, у препаратах глюкану присутня фібрилярна ультраструктура. Розміри волокон дослідних зразків знаходяться в межах від 0,6 до 1,3 нм, контрольного – 1,2 нм. Таким чином, під дією окиснювача, окрім руйнування аморфних ділянок (на рисунках ці ділянки відображаються біло-сірим відтінком), може відбуватися зменшення розмірів мікрочолонок, що пов'язано зі збільшенням концентрації пероксиду гідрогену, який використовували для обробки дріжджів.

Оскільки у шлунково-кишковому тракті людини відсутні травні ферменти, які розщеплюють β-глюкани, ці полісахариди відносять до категорії харчових волокон (ХВ). Нижче наведено дані з оцінки функціональних властивостей досліджуваних зразків β-глюкану дріжджів, що характеризують їх як ХВ. Це водоутримувальна здатність (ВУЗ), жирозв'язувальна здатність (ЖЗЗ) та сорбція холевих кислот (таблиця 2). Аналогічні дані представлені для харчових волокон висівок пшениці як еталона порівняння.

Таблиця 2 – Характеристика функціонально-фізіологічні властивості препаратів глюкану

№ зразка	Сорбція холевих кислот, мг/г	ВУЗ, г/г	ЖЗЗ, г/г
Харчові волокна висівок пшениці	9,25	6,1	3,4
Препарати глюкану:			
1	6,3	8,8	3,2
2	6,2	8,6	2,8
3	5,9	7,6	2,0

За здатністю зв'язувати холеві кислоти отримані препарати глюкану поступаються харчовим волокнам висівок, що може бути обумовлено наявністю в складі останніх лігніну і білка, відповідальних за сорбцію холевих кислот шляхом гідрофобних взаємодій. З досліджуваних препаратів меншою мірою зв'язує холеву кислоту зразок, з найменшим вмістом білка – № 3.

Максимальне значення ВУЗ притаманне зразку глюкану, який отримували в найбільш м'яких умовах – при використанні розведеного розчину окиснювача. Він характеризується більшою аморфністю структури (рис. 3), ніж інші препарати, отримані пероксидним методом, чим, імовірно, і обумовлена його найбільш висока ВУЗ, адже відомо, що аморфність структури полісахаридів сприяє їх набряканню. За цим показником препарати глюкану перевершують ХВ пшеничних висівок.

Найбільшою здатністю зв'язувати жир характеризується препарат глюкану, отриманий з використанням 3 % розчину гідроген пероксиду (зразок № 1), за цим показником він практично не відрізняється від ПВ пшеничних висівок.

Наведені дані свідчать, що дріжджовий глюкан проявляє ряд властивостей, притаманних харчовим волокнам – фізіологічним ентеросорбентам природного походження.

Численними дослідженнями показано, що зернові глюкани мають пребіотичну дію [1]. Нами були проведені дослідження біфідогенного ефекту препаратів β -глюкану, отриманих з дріжджів пероксидним методом.

Кожен з препаратів додавали до молока, в яке попередньо було внесено біфідобактерії (*Bifidobacterium bifidum*) – дослідні зразки. В якості контролю використовували молоко (контрольний зразок 1) і молоко з додаванням фруктози (контрольний зразок 2). У процесі сквашування контролювали зміну титрованої і активної кислотності (рис. 6 а і б). Початкові значення рН молока становило 6,80, кислотність – 17,8 °Т.

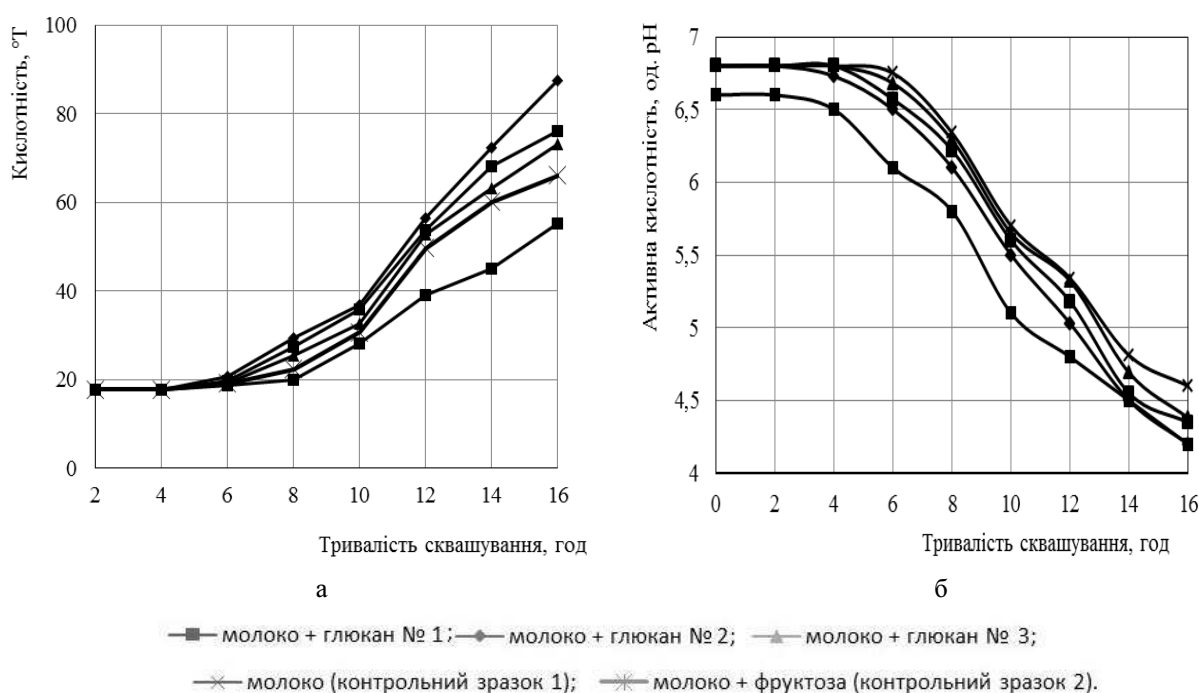


Рис. 6 – Зміна кислотності в процесі сквашування зразків: а. титрована; б. активна

Як видно з наведених даних (рис. 6), в перші години сквашування показники титрованої і активної кислотності знаходяться на початкових значеннях, що свідчить про процес адаптації бактерій до умов культивування; далі (з 6...16 годин сквашування) настає фаза активного росту.

Всі зразки глюкана клітинних стінок дріжджів позитивно впливають на процес сквашування. Утворення згустку в їх присутність проходить більш активно в порівнянні з контрольними зразками.

Паралельно визначали вплив глюкану на активне зростання біфідобактерій. Показано, що після 72 годин культивування концентрація бактерій в контрольному зразку становила $1,1 \times 10^{10}$ КУО в 1 см^3 середовища, для фруктози – $1,1 \times 10^{12}$ КУО в 1 см^3 середовища і для зразків з β -глюканом – $6,2 \dots 6,4 \times 10^{12}$ КУО в 1 см^3 середовища. У всіх зразках бактерії мали форму прямих чітких паличок, які були присутні у вигляді одиночних і парних клітин.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що зразки глюкану дріжджів, отримані пероксидним методом, проявляють виражений біфідогенний ефект, який перевищує такий фруктози.

Отже, дріжджовий глюкан, отриманий пероксидним методом, має більш високий ступінь впорядкованості структури, що є наслідком деструкції аморфних ділянок макромолекул під впливом гідроген пероксиду, та проявляє ряд функціонально-фізіологічних властивостей, притаманних харчовим волокнам, – високу ентеросорбційну здатність та виражений біфідогенний ефект.

Література

1. Marika, L. Added β -Glucan as a source of fibre for consumers [Text] / acad. dissertation / L. Marika. – Espoo: VTT Pub., 2006. – 594 p.
2. Черно, Н.К. Спосіб отримання бета-глюкану клітинних стінок дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* [Текст] / Н.К. Черно, К.І. Шапкіна, О.В. Коваленко // Збірник наукових праць «Прогресивна техніка та технологія харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі». – № 2 (16). – Харків, 2012. – С. 321-326.
3. Методы химии углеводов [Текст] / под ред. Н. К. Кочеткова. – М.: Мир, 1967. – 125 с.
4. Методы исследования древесины и ее производных [Текст] / Н.Г. Базарнова, Е.В. Карпова, И.Б. Катраков и др. // Уч. Пособие– Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та, 2002. – 160 с.
5. Жбанков, Р.Г. ИК-спектры и структура углеводов [Текст] / Минск: Наука, 1992. – 456 с.
6. Купина, Е.Э. Разработка методики и оценка липидосвязывающей способности энтеросорбентов – пищевых волокон *in vitro* [Текст] / Е.Э. Купина, Е.В. Осипова, Е.В. Бачище // Рыбная промышленность. – 2004. – № 3. – С. 44-46.
7. Данилова, Е.И. Сорбция холевых кислот пищевыми волокнами [Текст] / Е.И. Данилова, М.С. Дудкин, Л.Ф. Щелкунов, А.А. Фомичев // Вопр. питания. – 1996. – № 1. – С. 30-33.

УДК [543.635.4:547.953]:[602.4:577.15]

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Капельянец Л.В., д-р техн. наук, проф., Винкерт Д.Я., аспирант,

Величко Т.А., канд. техн. наук, доцент

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

Показана возможность использования соевых лецитинов для получения липосом – наноконтейнеров ферментных препаратов. Выбраны оптимальные условия образования фосфолипидных везикул и ввода в них ферментов. Разработана технология получения липосомальных форм ферментных препаратов.

Possibility of use soy lecithins for receiving liposomes – nanocontainers of fermental preparations is shown. Optimum conditions of receiving the phospholipid vesicles and input of enzymes in them are chosen. The technology of receiving the liposomal forms of fermental preparations is developed.

Ключевые слова: лецитин, липосомы, ферменты, технология.

Здоровье нации – приоритетная задача государства, в рамках которой развивается одно из главных направлений пищевой промышленности – производство продуктов здорового и функционального питания, которые удовлетворяют потребностям организма в энергии, пищевых и эссенциальных нутриентах, а также способствуют профилактике многих хронических неинфекционных заболеваний. В настоящее время в мире, в том числе и в Украине, все более расширяется ассортимент продуктов функционального питания, благоприятно оказывающих влияние на здоровье человека при их регулярном потреблении и с повышенным физиологическим воздействием находящихся в них биоактивных ингредиентов, осуществляющих биологически значимый положительный эффект на организм в целом.

Часто для повышения биологической полноценности и физиологического воздействия на организм пищевого продукта в пищевые системы дополнительно вносят отдельные ингредиенты или биологически активные добавки [1-4].

Функциональные ингредиенты (витамины, ферменты, полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе ω -3 и ω -6, антиоксиданты, пробиотики и пребиотики и др.), как правило, в пищевые системы вносят в процессе переработки пищевого сырья, в ходе технологического процесса они подвергаются различным нежелательным воздействиям (окислению, денатурации, разрушению и др.), приводящим к количественному их снижению в готовом продукте и частичной утрате своих физико-химических и биологических свойств. Для предотвращения таких нежелательных изменений используют различные методы защиты и щадящие технологические параметры переработки.

Особый интерес среди таких методов вызывает инкапсулирование ингредиентов в наноконтейнеры – липосомы.

Липосомы – микроскопические полые частицы, содержимое которых ограничено замкнутой фосфолипидной мембраной. Это везикулы, состоящие из одного или нескольких амфифильных непрерывных