

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

Капрельянц 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

фосфолипидных бислоев, разделенных изолированным от внешней среды водным объемом, в середину которых можно включать пептиды, белки, ферменты, витамины, лекарственные препараты, антитела, нуклеиновые кислоты, гормоны и другие вещества – это универсальные наноконтейнеры, дающие возможность практического применения липосом в качестве средств защиты, доставки различных включаемых веществ в определенное место и пролонгированного их высвобождения (рис. 1).

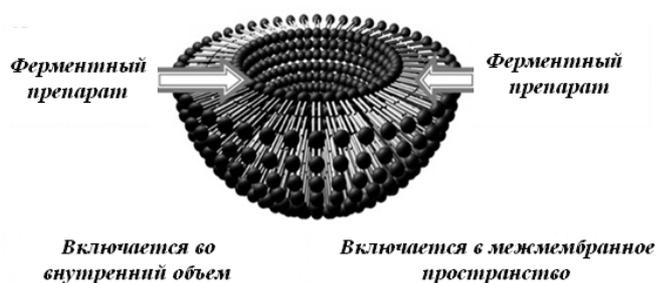


Рис. 1 – Мультиламеллярные липосомы

Липосомы нашли широкое применение в области химии и биомедицины, фармацевтике, косметологии, при производстве продуктов питания. Такое широкое использование обусловлено определенными физико-химическими свойствами липосом:

они полностью биodeградируемы и биосовместимы в организме человека и животных, так как получены из природных фосфолипидов;

способны включать многие биологически активные вещества, в том числе ферменты, гормоны, витамины, антибиотики, иммуномодуляторы, цитостатики, фармакологические препараты и другие;

обеспечивают целенаправленную транспортировку и пролонгированное высвобождение включаемого вещества;

включенные в липосомы вещества более устойчивы, так как изолированы липидной мембраной от повреждающих воздействий факторов окружающей среды.

Таким образом, разработка технологии получения фосфолипидных наноконтейнеров – липосом для ферментных препаратов с целью сохранения активности, пролонгированного действия и использования их в пищевых системах является актуальной.

Цель работы разработать технологию получения липосомальных форм ферментных препаратов протеолитического действия.

Липосомальная форма фермента представляет собой липосому (везикулу), в середину которой введен фермент.

Известны различные методы получения липосом: в виде водной эмульсии липидов; многократного ресуспендирования водной эмульсии липидов в хлороформе; дегидратации/регидратации; тепловым; замораживания-оттаивания; экструзии через мембранные фильтры [5-8], каждый из приведенных методов позволяет получить липосомы определенного размера, формы, количества бислоев, включаемого объема, заряда и свойств.

Так как физико-химические свойства липосом зависят от: размера используемых фосфолипидных молекул и длины их жирнокислотных хвостов; технологических параметров получения везикул и физико-химических свойств включаемого вещества, нами при выборе метода и его апробировании были проведены исследования по изучению: влияния pH среды, типа используемого растворителя, количества циклов гомогенизации, массовой доли включаемого фермента на физико-химические свойства липосом и липосомальную форму фермента. Для предотвращения процессов окисления при получении и хранении липосомальных форм ферментных препаратов на стадии получения липосом вносили α -токоферола ацетат (витамин E).

В работе использовали:

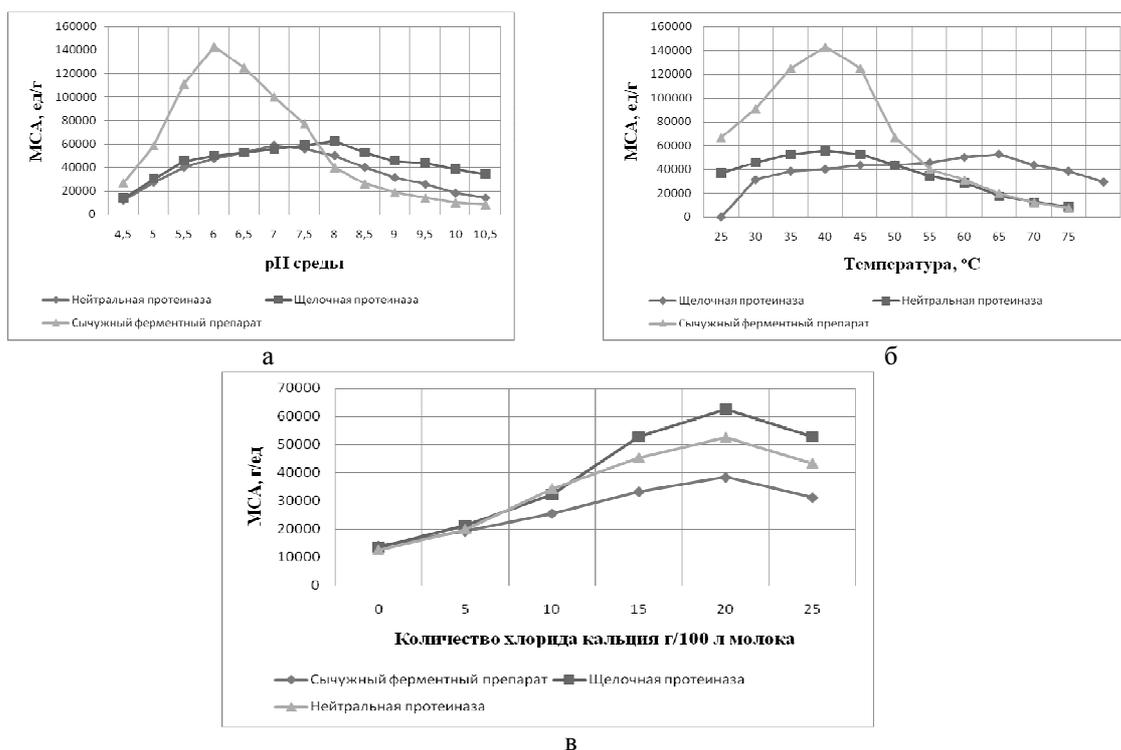
Для получения липосом – соевые лецитины производства ВАТ «НВФ Днепротехнология», Украина и ТМ «New Spirit Naturals, INC», США.

Фармакологический α -токоферола ацетат производства ЗАО «Технолог», Украина.

Ферментные препараты протеолитического действия разрешенных для применения в молочной промышленности Министерством здравоохранения Украины: сычужный химозин «Naturen Stamix 1150 NB», Дания с активностью 143000 ед/г и бактериальная протеаза «Протолад» как щелочная, так и нейтральная, Украина активностью 70000 ед/г и 60000 ед/г соответственно.

Так как выше приведенные липосомальные ферменты будут использоваться при производстве твердых сыров и творога, необходимо было изучить зависимость молокосвертывающей активности фермен-

тов от pH среды, температуры и массовой доли хлорида кальция (рис. 2). Молокозвертывающую активность (МСА) определяли методом Kawai, Mukai [9].



а – от pH среды; б – от температуры; в – от массовой доли хлорида кальция

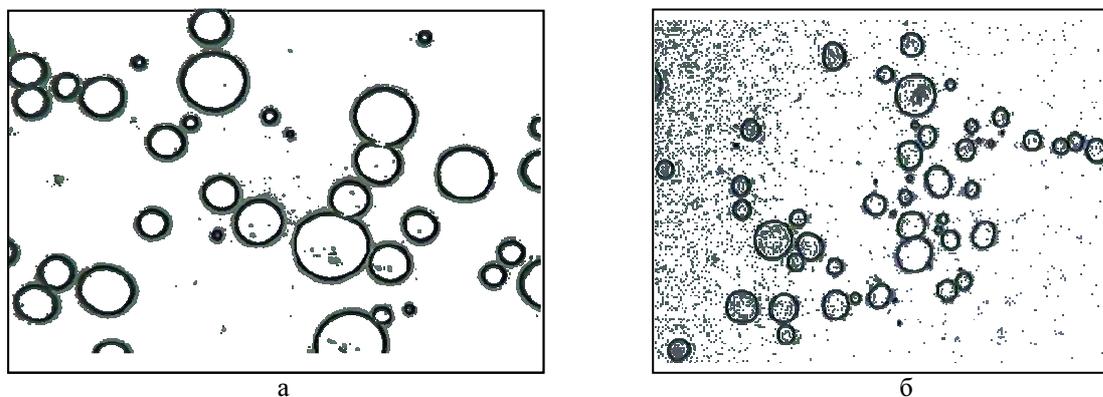
Рис. 2 – Зависимость активности ферментных препаратов

Получение липосом осуществляли всеми выше приведенными методами.

Форму, размер липосом и их липосомальных форм ферментных препаратов контролировали, используя лазерный фотокорреляционный спектрометр Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Великобритания) и просвечивающий электронный микроскоп ПЭМ JEM-2100 (Япония) [10].

Массовую долю включаемого фермента контролировали по количеству инкапсулированных единиц его активности [11].

На основании проведенных исследований выбран метод получения липосом и их липосомальных форм ферментных препаратов – дегидратации/регидратации. Такой метод позволяет получить стабильную эмульсию липосомальных форм ферментов, содержащую до 65 % везикул размером от 70 до 250 нм, и 28,5 % – от 250 до 1080 нм, при чем 62 % из них мультиламеллярные, массовая доля включенного фермента составила 55...65 % от внесенного, 20...25 % связалось и частично адсорбировалось на поверхности липосом. Микрофотографии липосомальных форм ферментных препаратов (рис. 3).



а – бактериальная протеаза «Протолад», б – сычужный химозин «Naturen Stamix 1150 NB»

Рис. 3 – Микрофотографии липосомальных форм ферментных препаратов

На основании проведенных исследований была разработана технология получения липосомальных форм ферментных препаратов сычужного химозина «Naturen Stamix 1150 NB» и бактериальной протеиназы «Протолад», включающая следующие стадии:

растворение лецитина в органическом растворителе (гексан, хлороформ) в течение 10...15 мин и внесение α -токоферола ацетата 0,01 % от массы лецитина;

отгонка растворителя на вакуум ротационном испарителе при температуре 45...50 °С до образования фосфолипидной пленки;

ресуспендирование фосфолипидной пленки смесью этилового спирта и воды. К образовавшейся липидной пленке добавляют водно-спиртовую смесь (вода : этанол в соотношении 1 : 1 объемных единиц) с гидромодулем ГМ 1 : 1,5. Содержимое встряхивают до полного растворения пленки. Охлаждают смесь в холодильной камере при температуре 5...7 °С в течение 24...36 часов;

инкапсулирование (включение) фермента в липосомы. В охлажденную смесь вносят предварительно растворенный в фосфатном буфере (рН 6,3) – химозин «Naturen Stamix 1150 NB» или (рН 7,3) – «Протолад» с таким расчетом, чтобы массовая доля его в фосфолипидной эмульсии составила 1 % и гомогенизируют при 15...20 тыс. об/мин в течение 2...5 мин;

липосомальную форму ферментного препарата лиофильно высушивают при установленном режиме охлаждения (-55 ± 1) °С и нагрева полок ($+20\pm 1$) °С до относительной влажности близкой к нулю;

фасование;

хранение при температуре 20...25 °С и относительной влажности воздуха в помещении не выше 75 %.

Технологическая схема получения липосомальных форм ферментных препаратов приведена на рис. 4.

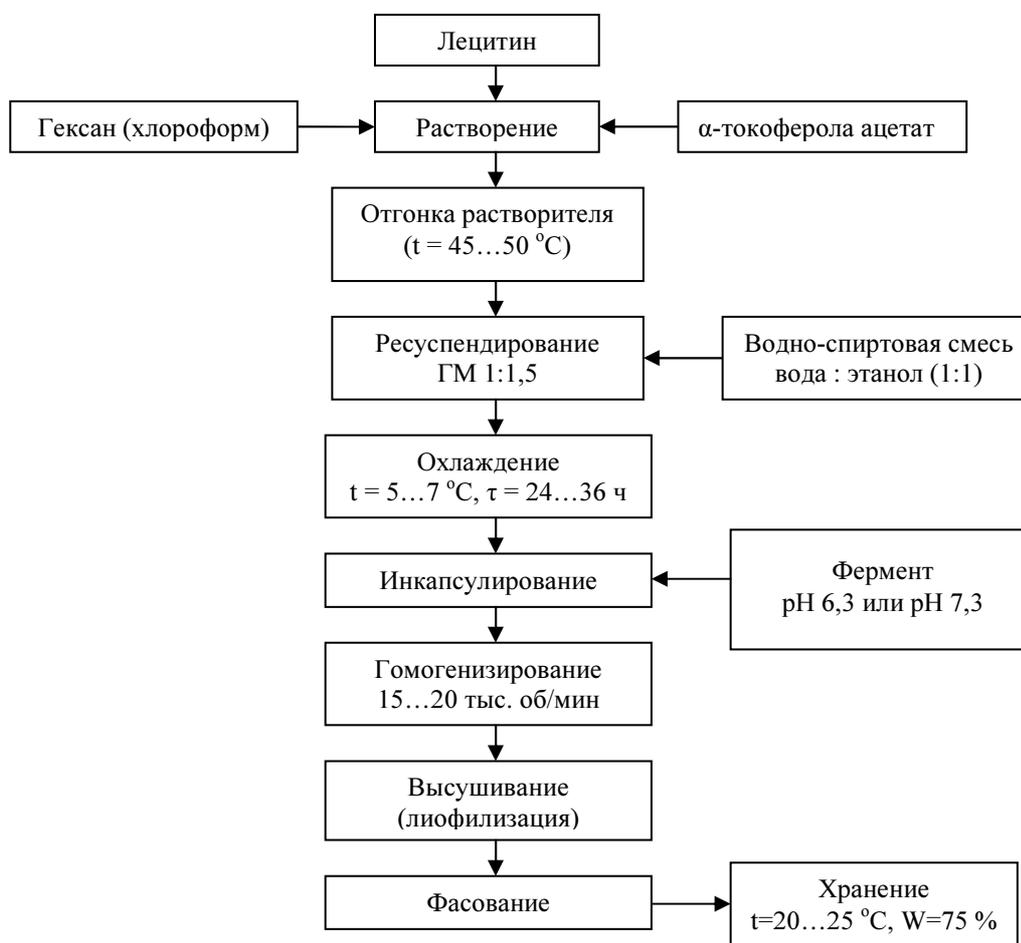


Рис. 4 - Технологическая схема получения липосомальных форм ферментных препаратов

Выводы

Разработаны параметры получения липосом и на их основе технология получения липосомальных форм ферментных препаратов. Разработанная технология позволяет получить стабильную эмульсию липосомальных форм фермента, содержащую 65 % везикул размером от 70 до 250 нм, и 28,5 % – от 250 до 1080 нм, при чем 62 % из них мультимеллярные, массовая доля включенного фермента составила 55...65 % от внесенного, 20...25 % связалось и частично адсорбировалось на поверхности липосом.

Литература

- Капрельянц, Л.В., Йоргачова К.Г., Функціональні продукти. / монографія / – Одеса: Друк, – 2003. – 312 с.
- Shahidi, F. Encapsulation of food ingredients. [Text] / F. Shahidi and X.Q. Han // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 1993. – № 33. – P. 501–547.
- Ubbink, J. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. [Text] / J. Ubbink, J. Kreger // Trends Food Sci Technol/ – 2006. – № 17. – P. 244–254.
- Zuidam, N.J. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing [Text] /N.J. Zuidam, V.A. Nedovic // Springer Science. – 2010. – Vol. 7, – P. 311–322.
- Патент на полезную модель RU № 2376012, МКИ А61К 9/127. Способ получения комбинированного липосомального антибактериального препарата / Ротов К.А., Алексеев В.В. и др. // Оpubл. 20.05.2009. – 3 с.
- Забодалова, Л.А. Получение липосом из соевого лецитина. [Текст] / Л.А. Забодалова, В.А. Чернявский и др. // Материалы V Международной конференции «Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке», СПбГУНиПТ. – 2011. – С. 296–297.
- Pick, V. Liposomes with a large trapping capability prepared by freezing. [Text] /V. Pick // Arch, Biochem. and Biophys. – 1981. – Vol. 212. – P. 186–194.
- Патент на полезную модель RU № 2391966, МКИ А61К 9/127, В82В 1/00. Наносистема на основе растительных фосфолипидов для включения биологически активных соединений и способ ее получения / Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Лисица А.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широин А.В. // заявитель и патентообладатель ООО «ЭкоБиоФарм», заявл. 13.02.2009; опубл. 20.06.2010.
- Mukai N., Kawai M. Process for producing milk clotting enzyme. US Patent № 3607655. September 1971.
- The use of zeta potential measurements to study sterically stabilized liposomes [Electronic resource] – www.malvern.co.uk.
- ГОСТ Р 53974-2010 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения протеолитической активности. – М.: Стандартинформ. – 2011. – 16 с.

УДК 602. 4: 579.864: 546.23

КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* НА СЕРЕДОВИЩАХ ІЗ СЕЛЕНОМ

Трегуб Н.С., аспірант, Капрельянц Л.В., д-р техн. наук, професор
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

*У статті наведено результати досліджень приросту біомаси *Lactobacillus acidophilus* на середовищі з додаванням різних концентрацій селеніту натрію. Визначено оптимальні концентрації селеніту натрію для культивування молочнокислих бактерій.*

*In the article the results of researches of biomass growth of *Lactobacillus acidophilus* on the medium with the addition of different concentrations of sodium selenite are resulted. The optimum concentrations of sodium selenite for cultivation of lactic acid bacteria are defined.*

Ключові слова: селеніт натрію, *Lactobacillus acidophilus*, тривалість генерації, питома швидкість росту лактобактерій.

На сьогодні індустрія біологічно активних добавок (БАД) і продуктів функціонального харчування динамічно розвивається. В останні роки розроблена велика кількість функціональних продуктів, які містять пробіотичну мікробіоту (пробіотики), збагачену мікронутрієнтами [3].