

Т.Н. Рогожина, В.И. Ганина, Г.С. Комолова, Е.А. Гущина

ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА ДЛЯ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

Показано влияние различных концентраций лизоцима и лактоферрина на пробиотические культуры разных таксономических групп. На основании результатов исследований обоснован состав полифункциональной биологически активной добавки, включающей пробиотические культуры, лизоцим и лактоферрин, для обогащения молочных продуктов.

Биологически активная добавка, биологически активные белки молока, лактоферрин, лизоцим, пробиотические культуры.

Введение

В распоряжении Правительства РФ № 1873-р от 25.10.2010 г. «Основы государственной политики в области здорового питания населения на период до 2020 года» отмечается, что «несмотря на положительные тенденции в питании населения, смертность от хронических болезней, развитие которых в значительной степени связано с алиментарным фактором, остается значительно выше, чем в большинстве европейских стран». Одной из основных задач государственной политики в области здорового питания населения является «развитие производства пищевых продуктов, обогащенных незаменимыми компонентами, специализированных продуктов детского питания, продуктов функционального назначения, диетических (лечебных и профилактических) пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище, в том числе для питания в организованных коллективах (трудоустроенные, образовательные и др.)» [1]. В этой связи разработка новых продуктов с направленными функциональными свойствами, а также повышение эффективности действия существующих продуктов относится к одной из актуальных проблем современной пищевой биотехнологии.

Одним из направлений решения данной проблемы может быть применение в питании биологически активных природных комплексов. Комплексы должны мягко воздействовать на организм и повышать его сопротивляемость к негативным факторам различного характера. Среди таких соединений можно назвать биологически активные белки молока, в частности лизоцим и лактоферрин, которые являются естественными факторами защиты живых организмов и обладают целым рядом уникальных свойств, к важнейшим функциям которых относят противомикробную, иммуномодуляторную, противовоспалительную, антиоксидантную, регенеративную и другие. Однако технологические приемы, используемые при производстве молочных продуктов, приводят к инактивации или значительному снижению исходного содержания биологически активных веществ в сырье. В этой связи рациональное использование сырьевых ресурсов, более глубокая и полная их переработка, а также поиск новых подходов сохранения биологически активных веществ в готовой продукции являются приоритетными направлениями в науке и технологии.

Для усиления функциональных свойств биологически активных белков молока было предложено изучить возможность их совместного применения с пробиотическими микроорганизмами, которые широко используются в технологии молочных продуктов. Известно, что пробиотические бактерии относят к функциональным компонентам. Это обусловлено тем, что пробиотические микроорганизмы являются естественными обитателями кишечника человека, которые способствуют нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта, а продукты их метаболизма участвуют в регулировании таких важнейших функций, как обмен веществ, укрепление иммунитета, снижение концентрации токсических веществ, улучшение общего самочувствия и др. [2, 3].

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили пробиотические культуры из коллекции Университета *Lactobacillus acidophilus* AE-5 (ВКПМ В-8153), *L. acidophilus* АСТ-41 (ВКПМ В-9644), *L. acidophilus* АСТ-44, новый штамм *L. acidophilus* 887, *L. fermentum* LFM-2 (ВКПМ В-10368), *L. plantarum* ГВИ-1 (ВКПМ-8556), *L. rhamnosus* LC-52GV (ВКПМ В-9475), *B. adolescentis* BGV-11 (ВКПМ Ас-1742); куриный лизоцим (Fluka Bio Chemika, Бельгия); лактоферрин (Sigma-Aldrich, США); лактоферрин, выделенный из молочного сырья; тест-культуры *E. coli* O 147, *Staph. aureus* P 209.

Количество клеток молочнокислых бактерий определяли по ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов».

Количество клеток бифидобактерий определяли согласно МУК 4.2.999-00 «Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах. Методические указания».

Выделение лактоферрина осуществляли на хроматографической установке Bio-Rad Bio-Logic LP (США) с использованием сорбента Macro Prep CM-Support (США).

Перевод лактоферрина в апо-форму осуществляли с помощью диализа против 0,1 М лимонной кислоты $C_6H_8O_7$ (pH = 2) («Лабтех», Россия) в течение 24 ч при $t = (4 \pm 2) ^\circ C$. Избыток лимонной кислоты удаляли диализом против дистиллированной воды при $t = (4 \pm 2) ^\circ C$ в течение 3 ч.

Антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно-патогенным тест-микроорганизмам определяли диффузионным методом и методом совместного культивирования.

Диффузионный метод определения антагонистической активности заключается в том, что в зараженном тест-культурой агаре делают лунки диаметром 8 мм на расстоянии 1,5–2 см друг от друга. В полученные лунки закапывают исследуемый образец и культивируют при оптимальной для тест-микроорганизма температуре.

Результаты и их обсуждение

В научной литературе сообщается, что лизоцим и лактоферрин в определенных дозах могут инактивировать грамотрицательные и грамположительные бактерии [4, 5], а некоторые источники сообщают об их ростостимулирующей способности на бифидобактерии и некоторые виды лактобактерий [6, 7]. Поэтому важным этапом в исследовании было изучение влияния лизоцима и лактоферрина на рост пробиотических бактерий.

На первом этапе исследований было изучено влияние различных концентраций лизоцима на пробиотические культуры из коллекции Университета.

Лизоцим – фермент класса гидролаз, механизм его антимикробного действия обусловлен способностью лизоцима нарушать клеточную стенку бактерий, тем самым вызывая лизис бактерий. Для более объективной оценки сочетаемости лизоцима и пробиотических культур предложено использовать турбидиметрический метод. Поэтому изучали развитие бактерий на стандартной жидкой прозрачной среде. На основании полученных данных были построены калибровочные кривые. На рис. 1 представлены некоторые из них. Влияние лизоцима на пробиотические бактерии оценивали по изменению оптической плотности и активной кислотности.

В ходе исследований по влиянию лизоцима на пробиотические культуры установлено, что лизоцим в определенных дозах может оказывать отрицательное действие на развитие не только штаммов, относящихся к различным таксономическим группам пробиотических микроорганизмов, но и к одному виду (рис. 2). В результате изучения антагонистической активности модельных композиций, состоящих из штаммов пробиотических бактерий и лизоцима, в отношении патогенных и условно-патогенных тест-культур было установлено количество лизоцима, которое может применяться в сочетании с конкретными штаммами пробиотических бактерий. Именно в этом случае достигается синергетический эффект в отношении подавления развития патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

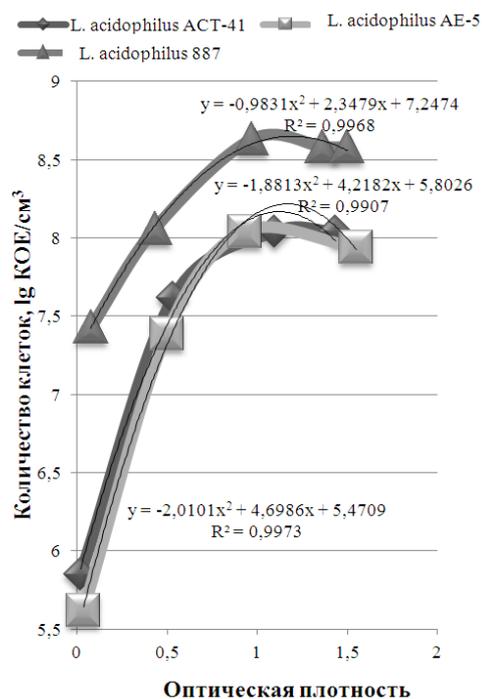


Рис. 1. Калибровочные кривые на стандартной жидкой питательной среде для *L. acidophilus*

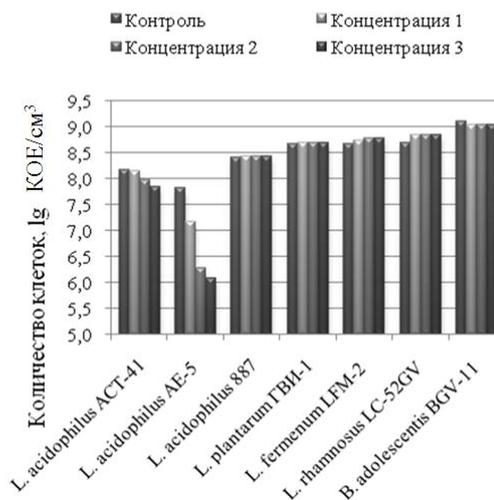


Рис. 2. Влияние различных концентраций лизоцима на количество клеток пробиотических культур

Лактоферрин – железосвязывающий гликопротеид семейства трансферринов, его молекула организована в два домена [8], каждый из которых имеет сайт связывания железа (рис. 3). Белок существует в двух формах: холо-форме (насыщенной железом) и апо-форме (железоненасыщенной), отличающихся в том числе пространственной конфигурацией. В научной литературе имеются разные сведения о механизме действия лактоферрина на микроорганизмы: некоторые ученые связывают его с насыщенностью железом [5], другие – с наличием на клеточных стенках бактерий особых лактоферринсвязывающих рецепторов [9]. Поэтому исследования по изучению взаимодействия лактоферрина и пробиотических бактерий осуществляли и с бактериями разных ро-

дов, и с разными штаммами, и с лактоферрином с различной степенью насыщенности железом.

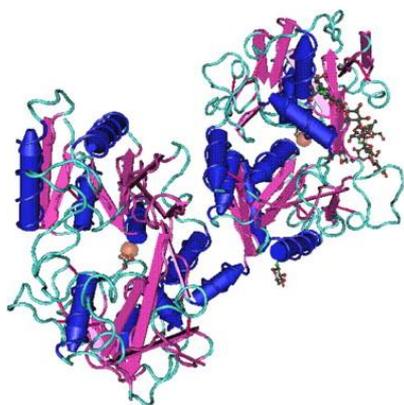


Рис. 3. Трехмерная структура коровьего лактоферрина с разрешением 2,8 ангстрем

Результаты исследований влияния различных доз лактоферрина на пробиотические бактерии показали, что лактоферрин в выбранном диапазоне концентраций не оказывал отрицательного воздействия на исследованные пробиотические культуры (рис. 4). Установлено, что действие лактоферрина на пробиотические бактерии зависит от штамма и степени насыщенности лактоферрина железом. Анализ результатов исследований позволил выявить модельные системы, в которых лактоферрин оказывал ростостимулирующее действие на пробиотические бактерии. Изучение антагонистической активности модельных композиций разных штаммов пробиотических культур совместно с лактоферрином показало, что достигается синергетический эффект в отношении подавления развития патогенных и условно-патогенных тест-культур, количество которых снижалось на три порядка по сравнению с контролем.

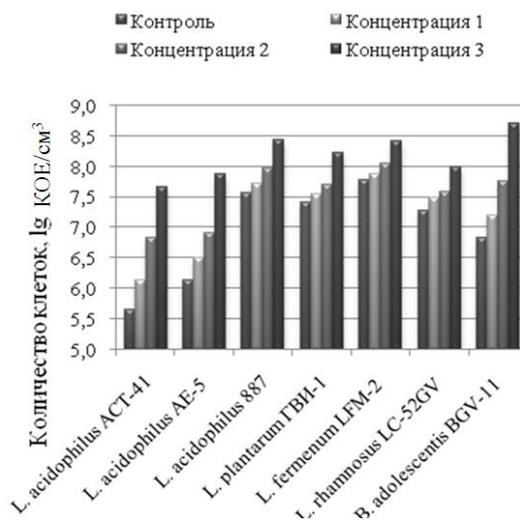


Рис. 4. Влияние лактоферрина на количество клеток пробиотических бактерий

В результате комплекса проведенных исследований теоретически и экспериментально обоснован состав биологически активной добавки, а именно в ее состав предложено включить пробиотические культуры: *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 (ВКПМ Ас-1742), *Lactobacillus rhamnosus* LC-52GV (ВКПМ В-9475), *Lactobacillus plantarum* ГВИ-1 (ВКПМ-8556), *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41 (ВКПМ В-9644) и в установленных определенных количествах лизоцим и лактоферрин.

Разработанная биологически активная добавка будет способствовать оздоровлению населения, а ее применение в технологии молочных продуктов позволит обогатить их функциональными компонентами и расширить линейку продуктов здорового питания, потребность населения в которых постоянно возрастает.

Список литературы

1. Распоряжение Правительства РФ № 1873-р от 25.10.2010 г. «Основы государственной политики в области здорового питания населения на период до 2020 года» // Российская газета. – Федеральный выпуск № 5328 от 3 ноября 2010 г.
2. Ганина, В.И. Технологические аспекты производства кисломолочного мороженого с функциональными ингредиентами / В.И. Ганина, М.А. Федотова, В.А. Обелец, А.А. Творогова // Молочная промышленность. – 2009. – № 7. – С. 63–64.
3. Ганина, В.И. Разработка ресурсосберегающей биотехнологии молокосодержащего функционального продукта / В.И. Ганина, Е.Н. Терешина, С.В. Карпычев // Молочная промышленность. – 2011. – № 5. – С. 72.
4. Толокнова, И.В. Обогащение жидких детских адаптированных кисломолочных продуктов лизоцимом: автореф. дис. – М., 1988.
5. In vitro growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin / E.A. Griffiths [et al.] // Digestive Diseases and Sciences. – 2003. – Vol. 48. – № 7. – P. 1324–1332.
6. Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. / W.-S. Kim [et al.] // BioMetals. – 2004. – № 17. – P. 279–283.
7. Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains / V. Rada [et al.] // Biotechnology Letters. – 2010. – 32(3). – P. 451–455.
8. González-Chávez, S.A. Lactoferrin: structure, function and applications / S.A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegosa, Q. Rascón-Cruz // Int J Antimicrob Agents. – 2009. – № 33. – P. 301. e1–8.
9. Examination of bovine lactoferrin binding to bifidobacteria / M.M. Rahman [et al.] // Prikl Biokhim Mikrobiol. – 2008. – № 44. – P. 529–532.

SUMMARY**T.N. Rogozhina, V.I. Ganina, G.S. Komolova, E.A. Gushchina****MULTIFUNCTIONAL BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE FOR DAIRY PRODUCTS**

The effect of different concentrations of lysozyme and lactoferrin on probiotic cultures of different taxonomic groups is shown. On the basis of the research the composition of multifunctional biologically active additive for the enrichment of dairy products has been substantiated. It includes probiotic cultures, lysozyme and lactoferrin.

Biologically active additive, biologically active milk proteins, lactoferrin, lysozyme, probiotic cultures.

Moscow State University of Food Industry
33, Talalikhina street, Moscow, 109316, Russia
Phone: 8(495) 677-07-23; 677-03-90
e-mail: techmol@inbox.ru