

УДК 637.344

Ультразвуковая модуляция метаболической активности *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* при получении пищевых продуктов, обогащённых витамином B₁₂

Шершенков Б.С. shersh-brain@mail.ru
канд. техн. наук Сучкова Е.П. silena07@bk.ru

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО
Институт холода и биотехнологий
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

*Витамин B₁₂ – одно из важнейших биологически-активных соединений, участвующих во многих процессах в организме человека. В современных условиях жизни часто наблюдается его дефицит, из-за чего необходимо введение в рацион специальных обогащённых продуктов. Однако его синтез очень сложен и в настоящее время он является одним из наиболее дорогостоящих витаминов. Статья посвящена модуляции ультразвуком метаболизма основного промышленного продуцента витамина B₁₂ *Propionibacterium shermanii* с целью повышения эффективности биотехнологического процесса его производства.*
Ключевые слова: *Propionibacterium*, метаболическая активность, витамин B₁₂, ультразвуковая обработка, молочная сыворотка.

Ultrasonic modulation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* metabolic activity in production of enriched by B₁₂ vitamin food products

Shershenkov B.S., Ph.D. Suchkova E. P.

National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics
Institute of Refrigeration and Biotechnologies
191002, St. Petersburg, Lomonosov str., 9

B12 vitamin is one of the most important bioactive compounds participating in many processes of a human body. In modern living conditions its deficiency is often observed and because of that introduction in a diet of the special enriched products is necessary. However its synthesis is very complex and now it is one of the most expensive vitamins. This article discusses modulation of a metabolism of the main industrial producer of B₁₂ vitamin

***Propionibacterium shermanii* by ultrasound for the purpose to increase efficiency of biotechnological process of its production.**

Key words: *Propionibacterium, metabolic activity, B₁₂ vitamin, ultrasound treatment, milk whey.*

Витамин В₁₂ – группа кобальтсодержащих биологически-активных корриноидных соединений, известных как кобаламины. Он также известен как экзогенный (внешний) фактор Кастла, или животный белковый фактор.

Витамин В₁₂ осуществляет биокаталитические реакции, обеспечивающие кроветворную функцию организма. Он также способствует нормализации функции печени, благоприятно влияет на регенерацию нервных волокон и активизирует созревание форменных элементов крови [2].

Наиболее важными для производства кобаламинами являются цианокобаламин и оксикобаламин благодаря своей стабильности при хранении и высокой биологической активности. Всасывание витамина происходит в тонком кишечнике после взаимодействия в желудке с гастромукопротеином - «внутренним фактором Кастла», который секретируется клетками слизистой оболочки желудка и обеспечивает его абсорбцию.

Основным источником витамина являются пищевые продукты животного происхождения, а также микрофлора желудка и кишечника. В организме человека кишечные бактерии также синтезируют витамин В₁₂, но в обычных условиях осуществляют этот синтез в тех областях, где всасывание витамина в кровь не происходит, так как не происходит связывание витамина с внутренним фактором, поэтому основное его количество должно поступать с пищей [2].

В₁₂-гиповитаминоз может возникать при различных обстоятельствах: длительном вегетарианском питании, беременности, хроническом алкоголизме, а также в связи с различными нарушениями его усвоения при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а относительная алиментарная недостаточность витамина наблюдается практически повсеместно, что может быть исправлено введением в рацион специальных обогащённых витамином В₁₂ пищевых продуктов. Однако химический синтез витамина В₁₂ отличается высокой сложностью, и в настоящее время его производят биотехнологическими методами.

Одним из важнейших продуцентов витамина являются пропионовокислые бактерии. Морфологически это неподвижные бесспорные палочки разной величины, от коккообразных до длинных, располагаются единично, парами или короткими цепочками,

способные расти как в анаэробных, так и в аэробных условиях. Они активно сбраживают глюкозу, сахарозу, лактозу и пентозы, благодаря чему способны активно развиваться на различных субстратах, например в молочной сыворотке [6].

В клетках *Propionibacterium shermanii* корриноиды находятся в 5'-аденозильной форме, в виде которой они проявляют свое биокаталитическое действие и осуществляют метаболические функции и в организме человека, однако для их максимального накопления в культуральной среде необходимо создавать специальные условия культивирования [3].

Одним из способов направленного изменения метаболизма в клетках бактерий является обработка жидких сред ультразвуком, под действием которого ускоряются реакции механохимического происхождения, имевшие место в озвучиваемой среде до воздействия ультразвука и иницируются специфические сонохимические реакции, в основе которых лежит механизм разрыва химических связей и образования свободных радикалов [1]. Таким образом, с помощью ультразвуковой обработки можно проводить направленную модуляцию метаболической активности бактерий для обеспечения увеличения конечного выхода витамина В₁₂ без увеличения длительности производственного процесса [5].

Для определения влияния ультразвука на метаболизм бактерий производилось культивирование клеток штамма *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* I-63, используемого в промышленном производстве витамина В₁₂, в субстрате на основе восстановленной молочной сыворотки с концентрацией лактозы 5%, а также добавками 0,002% CoCl₂·6H₂O и 0,001% MgSO₄. pH в процессе культивирования удерживался на уровне порядка 6,9 с помощью периодической нейтрализации среды.

Во время культивирования раз в сутки производилось кратковременное озвучивание сред ультразвуком низкой интенсивности и различной частоты. Для исследования метаболической активности бактерий в процессе культивирования были выбраны метод определения титруемой кислотности для определения количества синтезируемых бактериями органических кислот, по результатам титрования выяснено, что обработка ультразвуком вызывает повышение титруемой кислотности, причём на частоте 20 КГц этот эффект более выражен, чем на 22 КГц при одинаковой интенсивности облучения.

Следующим этапом был выбор длительности озвучивания; при этом производилось культивирование пропионовокислых бактерий на аналогичной среде с обработкой субстрата ультразвуком на частоте 20 КГц в течение 10 и 20 минут каждые 24 часа.

Для сравнения различных режимов обработки использовались метод определения титруемой кислотности и спектрофотометрический метод для мониторинга состава сброженной сыворотки [4], а также микроскопический метод для сравнения морфологии клеток.

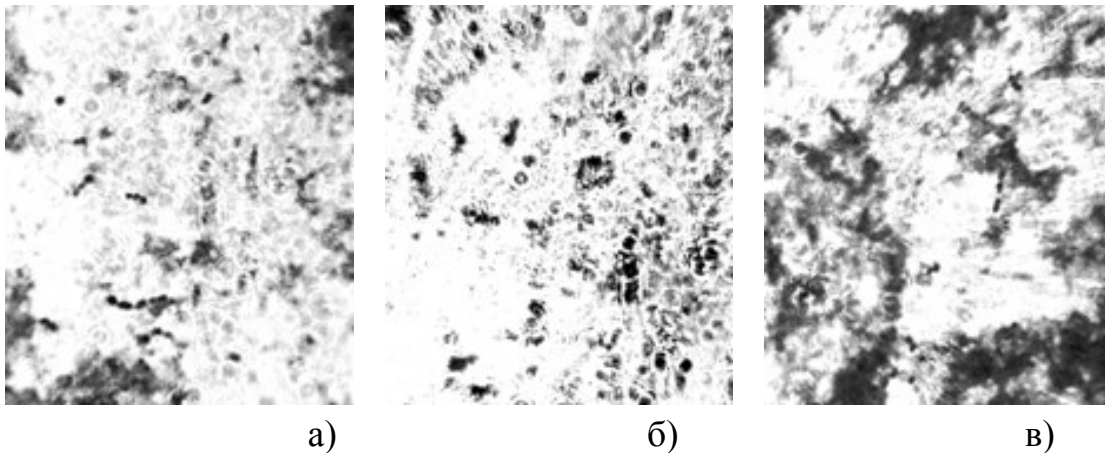


Рис. 1. Микроскопические препараты сброженной сыворотки при различных режимах озвучивания: а) без озвучивания; б) 10 минут; в) 20 минут

При этом выяснено, что при увеличении длительности обработки также увеличивается нарастание титруемой кислотности, а значит, ускоряются процессы брожения и увеличивается активность бактерий; кроме того, как видно на микроскопических препаратах, наблюдаются изменения в морфологии клеток, подвергающихся ультразвуковой обработке, в частности уменьшение их размеров по сравнению с контролем.

При фотометрировании сброженной сыворотки после предварительной деструкции клеток и фильтрации среды были получены следующие спектры поглощения:

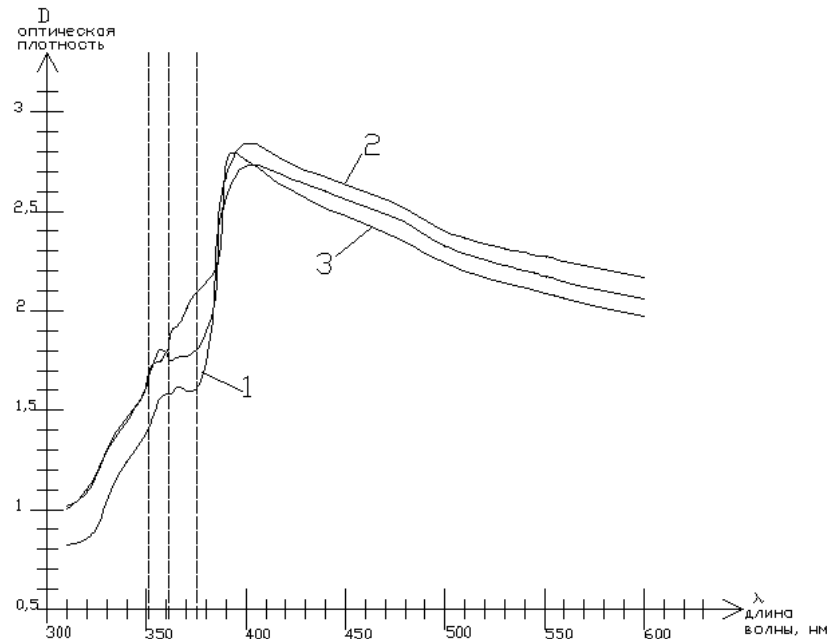


Рис. 2. Спектры поглощения сброженной сыворотки при различных режимах озвучивания: 1) без озвучивания; 2) 10 минут; 3) 20 минут

Максимумы поглощения света в видимой области образуемых в процессе роста пропионовокислых бактерий корриноидов относятся к порфириновому кольцу и имеют следующие значения: для цианокобаламина – 361 и 548 нм, оксикобаламина – 351 и 525 нм, 5'-дезоксиаденозилкобаламина - 375 нм; а также менее выраженные максимумы при 315, 340 и 522 нм [2,4].

Полученные спектры имеют ярко выраженные максимумы поглощения в областях, близких длине волны 351 (для второго образца), 361 (для первого образца) и 375 нм (для третьего образца), при этом спектры поглощения озвученных проб в коротковолновой части спектра практически совпадают.

Благодаря полученным результатам можно сделать вывод, что подбором определённых условий озвучивания сред можно также направленно изменять соотношение различных форм витамина в среде при культивировании.

Таким образом, ультразвуковая модуляция метаболизма пропионовокислых бактерий является перспективным направлением для интенсификации промышленного получения витамина В₁₂ и может быть использована также в производстве различных ферментированных пищевых продуктов, обогащённых витамином В₁₂ и его аналогами.

Список литературы:

1. Акопян Б.В., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами: Учеб. пособие / Под ред. С. И. Щукина. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. – 224 с.
2. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. В 2 ч.: Учебн. пособие. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 624 с.
3. Воробьёва Л.И. Промышленная микробиология: Учеб. пособие. – М.: изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
4. Долгов В.В., Ованесов Е.Н., Щетникович К.А. Фотометрия в лабораторной практике. - М.: Российская медицинская академия последипломного образования, 2004.- 142 с.
5. Сучкова Е.П., Шершенков Б.С. Технологические решения при получении обогащённой витамином В12 молочной сыворотки. / Б.С. Шершенков, Е.П. Сучкова // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств», 2013. - №1. [Электронный ресурс]: <http://www.processes.ihbt.ifmo.ru>
6. Шершенков Б.С. Производство витаминизированных продуктов на основе молочной сыворотки. – Сборник трудов молодых учёных. Ч. I: Сб. тр., с. 3-6. – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2012. - 89 с.