На правах рукописи

ШАГИНА СВЕТЛАНА ЕВГЕНЬЕВНА

СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЙ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ НА ОСНОВЕ БЕТА-СПЕЦИФИЧНОЙ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ

Специальность 03.00.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

003172459

Москва – 2008

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении
высшего профессионального образования
«Московский Государственный Университет пищевых производств»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Грачева Ирина Михайловна
кандидат технических наук, профессор
Войно Людмила Ильинична

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор
Карпенко Дмитрий Валерьевич,
кандидат технических наук,
Ефременко Елена Николаевна

Ведущая организация: Научно-технический Центр «Лекарство и биотехнология»

Защита состоится: «24» июня 2008 г. в 16[00] ч в ауд 229, корп А на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212 148 07 при ГОУ ВПО «Московский Государственный Университет пищевых производств» по адресу. 125080, Москва, Волоколамское шоссе, д 11

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО МГУПП
Отзыв на автореферат в двух экземплярах, заверенных печатью учреждения, просим направлять по адресу 125080, Москва, Волоколамское шоссе, д 11, МГУПП, ученому секретарю Совета Д 212 148 07.

Автореферат разослан «23» мая 2008 г.

Ученый секретарь
Совета, д т.н, проф. Богатырева Т Г

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Важное место среди веществ, способных выступить в качестве хозяина комплекса типа «хозяин-гость» занимают циклодекстрины (ЦД) Этим свойством циклодекстрины обладают благодаря своему строению· их молекулы имеют гидрофильную внешнюю поверхность и сквозную гидрофобную полость, по своим размерам сопоставимую с величиной многих органических и неорганических соединений ЦД связывают молекулу «гостя» главным образом путем, так называемых, гидрофобных взаимодействий

ЦД являются продуктами биохимической трансформации крахмала при помощи специальных ферментов, называемых циклодекстринглюканотрансферазами (ЦГТ-азами) Семейство ЦД включает в себя три основных продукта α-ЦД, β-ЦД и γ-ЦД, макрокольца которых состоят из шести, семи и восьми остатков глюкопиранозы соответственно В продуктах конверсии всегда присутствуют и ЦД большего размера Из реакционной смеси могут быть выделены молекулы циклических сахаров, имеющие девять, десять, одиннадцать и более звеньев глюкозы в цикле, обозначаемые буквами латинского алфавита δ-, ε-, ζ-ЦД, но практического интереса эти продукты не представляют

Использование ЦД при обогащении пищевых продуктов витаминами и другими биологически активными веществами направлено в первую очередь на повышение качества получаемых продуктов и их функциональности При образовании комплексов с ЦД уменьшается окисление витаминов, эфирных масел Ряд витаминов в виде комплексов с ЦД становятся более стабильными, устойчивыми, проявляют лучшую биодоступность Стабилизирующий эффект сказывается и на процессе фоторазложения витаминов Благодаря этому ЦД широко используются в медицинской, фармацевтической, косметической, пищевой промышленностях, сельском хозяйстве и других областях

На мировом рынке в производстве ЦД, их производных и комплексов включения с различными веществами лидерство принадлежит фирмам из Японии, США, Китаю и Венгрии В России проводились исследования в этом направлении в 80-х годах, однако рентабельные технологии разработаны не были

Таким образом, исследования, связанные с поиском активного продуцента β-ЦГТ-азы, получением ферментного препарата на основе нового штамма, ЦД и

комплексов включения ЦД с нерастворимыми в воде витаминами, являются актуальными для пищевой промышленности нашей страны

Цель и задачи исследования. Основные цели диссертационной работы состояли в поиске нового активного продуцента β-ЦГТ-азы для получения очищенного ферментного препарата со степенью очистки Г10Х и последующего синтеза β-ЦД для создания комплексов включения β-ЦД с витаминами

Для достижения поставленных целей решались следующие задачи:

– скрининг микроорганизмов-продуцентов ЦГТ-аз, выделенных из природных мест обитания, и коллекционных культур с целью отбора штамма, обладающего преимущественно β-ЦГТ-азной активностью;

– идентификация нового штамма-продуцента β-ЦГТ-азы на основании изучения совокупности его морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и филогенетических характеристик;

– получение на основе нового продуцента ферментного препарата β-ЦГТ-азы Г10Х для синтеза β-ЦД,

– синтез новых производных β-ЦД на основе поливинилового спирта и кремнезема,

– разработка технологии получения комплекса включения витамина Е с β-ЦД, определение оптимальных молярных соотношений компонентов комплекса и его анализ,

– разработка технологии получения комплекса включения витамина B_2 с β-ЦД, определение оптимальных молярных соотношений компонентов комплекса и его анализ.

– апробация полученных комплексов в опытном производстве кондитерских изделий

Научная новизна работы Проведен направленный скрининг микроорганизмов, обладающих β-ЦГТ-азной активностью, выделенных из различных видов почв и растительных объектов Из 60 выделенных изолятов 8 новых штаммов обладали высокой β-ЦГТ-азной активностью (не менее 4,5 ед/см^3) и специфичностью фермента по отношению к синтезу β-ЦД (не менее 60%) Для исследований отобран штамм-продуцент β-ЦГТ-азы с максимальной активностью фермента β-ЦГТ-азы (6,7 ед/см^3) и высокой бета-специфичностью ЦГТ-азы (79,13%) На основании

изучения совокупности морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и филогенетических характеристик исследуемой культуры новый штамм, продуцирующий β-ЦГТ-азу, идентифицирован как *Bacillus circulans 16b*

Впервые разработаны и экспериментально обоснованы условия синтеза производных β-ЦД на основе поливинилового спирта (ПВС) и кремнезема (иммобилизованного β-ЦД) Предложено и реализовано использование данных сорбентов для удаления холестерина из водных или водно-органических растворов

Разработаны условия получения комплексов включения β-ЦД с витаминами Е и B_2 на основе молекулярных моделей и анализа физических методов обработки, изучены их свойства, позволившие обосновать возможность их применения в технологии кондитерских изделий Экспериментально установлено, что комплексы могут быть получены с молярным содержанием витаминов и β-ЦД 1 1 Оптимальным стехиометрическим соотношением компонентов в комплексе витамин Е: β-ЦД *является 1·3, для комплекса* витамин B_2 β-ЦД 1 2 моль/моль Впервые термическим методом анализа подтверждено образование комплексов между β-ЦД и витаминами Е и B_2 Флуориметрическим методом подтверждено образование комплексов витамина B_2 с β-ЦД

Выявлено положительное влияние процесса комплексообразования с β-ЦД на устойчивость витаминов к воздействию света и кислорода воздуха Установлено, что комплексообразование витаминов с β-ЦД позволяет повысить их растворимость в воде. Для витамина Е растворимость в воде при комнатной температуре в виде комплекса включения 25,9 мг/100 $см^3$, для витамина B_2 – 81 мг/100 $см^3$, увеличившись более чем в 6 раз по сравнению с чистым витамином

Практическая значимость работы. В результате направленного скрининга продуцентов ЦГТ-аз, пополнена коллекция культур микроорганизмов кафедры «Биотехнология» МГУПП На основе нового штамма-продуцента β-ЦГТ-азы *Bacillus circulans 16b* в лабораторных условиях осуществлена наработка опытной партии ферментного препарата β-ЦГТ-азы, проведен синтез β-ЦД из картофельного крахмала с использованием выделенного фермента Получены опытные партии комплексов включения витаминов Е и B_2 с β-ЦД с молярным содержанием компонентов от 1·5 до 1 1 Разработаны проекты Технических Условий, составлены акты об изготовлении опытных партий этих комплексов

В лабораторных условиях кафедры «Технология кондитерского производства» МГУПП изготовлены кондитерские изделия (сахарная помадка и мармелад) с добавлением комплексов витаминов Е и B_2 с β-ЦД Применяемые комплексы не оказывают негативного влияния на форму, структуру и консистенцию данных кондитерских изделий, не влияют на вкус и аромат продукции, при этом повышают пищевую ценность получаемых продуктов, обогащая их витаминами Результаты проведенной работы подтверждены актом лабораторных испытаний

«Способ получения иммобилизованного бета-циклодекстрина» защищен патентом РФ №2295539 от 20 03.2007 Синтезированные новые производные β-ЦД на основе ПВС и кремнезема могут быть рекомендованы для удаления холестерина из различных пищевых продуктов

Апробация работы. Основные положения работы докладывались на международных конференциях и симпозиумах на Третьем международном симпозиуме «Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК» (Москва, 2006), на V Международной научно-технической конференции «Технологии и продукты здорового питания» (Москва, 2007), на V юбилейной школе-конференции с международным участием «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации» (Москва, 2007)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 1 патент РФ, где отражены основные положения диссертации.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, библиографического списка, включающего 204 источника, и 6 приложений Работа изложена на 186 страницах машинописного текста, включает 23 таблицы и 44 рисунка

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре освещена история исследования ЦД и развития их производства в мире Рассмотрены строение и свойства ЦД и ЦГТ-аз, технологии их получения, приведены примеры использования ЦД в пищевой и фармацевтической промышленностях, медицине и химических процессах, биотехнологии Рассмотрены методы получения комплексов различных веществ с ЦД, влияние хими-

ческих модификаций на свойства ЦД Описаны строение и свойства витаминов Е и B_2, их биологическая активность.

В ходе анализа данных научно-технической литературы выявлены аспекты, которые позволили сформулировать цели и задачи настоящего исследования

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы и методы исследований

Образцы почвы для скрининга. В качестве природных источников новых изолятов бактерий использовали растительные и почвенные образцы, отобранные из разных районов средней полосы

Скрининг микроорганизмов - продуцентов ЦГТ-аз, выделенных из природных мест обитания, проводили по методу, разработанному сотрудниками Института биологии Уфимского научного центра РАН (Терехова Е. Я , 1999), с введением некоторых модификаций

Изучение морфологических и физиолого-биохимических характеристик выделенных культур проводили, руководствуясь методикой идентификации аэробных спорообразующих микроорганизмов (T Deak, Eva Tımar , 1988)

Определение последовательностей гена 16S рРНК было получено методом ПЦР, проводимым на ДНК-амплификаторе MasterCycler Personal («Eppendorf», Germany)

Измерение активности β-ЦГТ-азы проводили спектрофотометрически – модифицированным фенолфталеиновым методом (Усанов Н Г , 2004)

ВЭЖХ-анализ продуктов ферментативной конверсии крахмалов проводили на колонке «SEPARON-NH_2» (размер – 4,6x250 мм, скорость подачи элюента 0,8 $см^3$/мин, элюент – 60% водный ацетонитрил) в Центре «Биоинженерия» РАН

Содержание витаминов в комплексах определяли спектрофотометрическим (UV-Vısible спектрофотометр Agılent 8453, Agılent Technologies) и флуориметрическим методами (мультиканальный флуориметр ALA-1/4, Bıosan)

Термический анализ комплексов проводили на термоанализаторе ТА – 4000 (модуль ТГ – 50) (Mettler Toledo START^e System, Швейцария) в интервале температур 20-600 °С. Кривые потери массы были рассчитаны при помощи программного обеспечения START^e на базе Белорусского Государственного технологического университета

Исследования проводились не менее чем в трех повторностях Обработку результатов экспериментов проводили с применением программы Origin 7 5 Pro

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.2.1. Скрининг ЦГТ-активных микроорганизмов из природных мест обитания

В процессе работы из 30 почвенных и 20 растительных образцов было выделено 60 изолятов культур микроорганизмов, осуществляющих деструкцию крахмала Все изоляты после глубинного культивирования были проанализированы на β-ЦГТ-азную активность фенолфталеиновым методом В результате проведенного скрининга для дальнейших исследований было отобрано 27 β-ЦГТ-активных штаммов Проведя их сравнение, отобрано 8 культур, обладающих достаточно высокой внеклеточной ферментативной активностью β-ЦГТ-азы (4,6-6,7 ед /см^3 КЖ) Далее отобранные 8 штаммов были проанализированы на ЦГТ-специфичность с помощью ВЭЖХ Результаты тестирования данных бактериальных культур представлены в табл 1

Таблица 1

β-циклизующая активность и специфичность внеклеточных ЦГТ-аз 8 штаммов бактериальных культур, отобранных в результате скрининга

Условное обозначение отобранных бактериальных культур	Средняя активность β-ЦГТазы в КЖ,(ед/см^3)	Содержание α-, β- и γ-ЦД в продуктах трансформации крахмала, %		
		α-ЦД	β-ЦД	γ-ЦД
1h	4,9	15,04	68,84	16,12
2g	5,9	6,30	73,01	20,69
4f	4,6	27,47	60,63	11,90
7e	6,0	10,46	74,40	15,14
10d	4,7	8,20	65,73	26,07
15c	4,9	8,47	68,06	23,47
16b	**6,7**	**0,00**	**79,13**	**20,87**
24a	6,4	6,46	80,21	13,34

Культуральные жидкости отобранных 8 штаммов при трансформации крахмала показали каталитическую активность преимущественно β-ЦГТ-аз Наиболее продуктивным оказался штамм 16b с активностью β-ЦГТ-азы 6,7 ед./см^3 и содержанием β-ЦД в реакционной смеси 79,13%. Этот штамм был выбран для дальнейших исследований

3.2.2. Исследование фенотипических признаков и идентификация штамма 16b продуцента β-ЦГТ-азы

Исследование любого микроорганизма проводят, изучая его морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки Это дает возможность провести идентификацию микроорганизма и установить его таксономическое положение

Изучение морфологических и культуральных признаков штамма 16b показало, что выделенный при скрининге штамм 16b принадлежит к аэробным спорообразующим бактериям, образующим эллиптические эндоспоры, раздувающие клетку терминально, субтерминально или центрально Через 24 часа инкубации при 38°С обнаруживаются подвижные грамположительные палочки размером (0,5-0,75 мкм) × (1,5-4,0 мкм) На плотной среде К1 (г/дм^3 крахмал картофельный – 10, пептон – 3, дрожжевой экстракт – 3, кукурузный экстракт – 3, агар – 16) бактерии формируют круглые колонии с фестончатым краем, диаметром от 0,5 мм до 2 мм, поверхность колоний гладкая, слегка бугристая к краям, с полупрозрачной, блестящей мучнистой структурой Цвет колоний белый с желтоватым оттенком, профиль изогнутый, структура колоний однородная, край волнистый, четко сформированный рост по «штриху».

Морфологические и культуральные признаки исследуемой культуры при сравнении ее с тест-культурой позволяют отнести ее к бактериям рода *Bacillus*

Для выявления видовой принадлежности изучались физиолого-биохимические признаки потребление углеводов и сахаро-спиртов, анаэробный рост, отрицательная реакция Фогес-Проскауэра, рост на синтетической питательной среде На основании полученных данных установлено, что исследуемый микроорганизм принадлежит к роду *Bacillus*, предположительно виду *circulans*

Для достоверности идентификации были изучены филогенетические особенности культуры Сиквенс 16S ribosomal RNA и проведенный поиск гомологичных последовательностей с построением филогенетического дерева показали, что выделенный нами штамм с точностью 96 % относится к роду *Bacillus* вида *circulans*

Таким образом, на основании изучения совокупности морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и филогенетических характеристик ис-

следуемой культуры, новый штамм *16b*, продуцирующий преимущественно β-ЦГТ-азу, идентифицирован как *Bacillus circulans*

3.2.3. Биосинтез β-ЦГТ-азы Bacillus circulans шт. 16b и β-ЦД

В лабораторных условиях осуществлено культивирование выделенного нами штамма *Bacillus circulans 16b* на среде следующего состава, г/дм^3 крахмал картофельный – 10,0, пептон ферментативный – 5,0, дрожжевой экстракт – 5,0, K_2HPO_4 – 2,0, NaH_2PO_4 – 2,0, $CaCO_3$ – 0,4 (pH среды 7,5-7,8) Культивирование продуцента β-ЦГТ-азы *Bacillus circulans 16b* проводили в колбах объемом 750 см^3 на качалочной установке (n=270 об/мин) с использованием посевной дозы 5% при температуре культивирования 38±2°С в течение 48 ч Уровень β-ЦГТ-азной активности культуральной жидкости (КЖ) в ходе лабораторной ферментации составил 6,75 ед /см^3 Полученную КЖ подвергали центрифугированию в течение 20 мин при 15000 об/мин Дальнейшее получение ферментного препарата Г10Х проводилось осаждением β-ЦГТ-азы из КЖ 4-мя объемами этанола (75% об), отделением осадка центрифугированием и его лиофильным высушиванием Полученный ферментный препарат β-ЦГТ-азы Г10Х обладал активностью 856,4 ед/г, выход препарата составил 4,5 г /дм^3

Синтез β-ЦД проводили с использованием ферментного препарата β-ЦГТ-азы *Bacillus circulans* шт. 16b Г10Х Процесс осуществляли в термостатированной емкости при 55 °С, pH=6,50±0,03 в течение 72 ч при концентрации субстрата 15% масс/объем Для биохимической трансформации использовали β-ЦГТ-азу Г10Х *Bacillus circulans 16b* в дозировке 6 едЦА/г крахмала. Выход кристаллического β-ЦД составил 63,1 г (выход целевого продукта – 28,1% от использованного субстрата)

3.2.4. Получение иммобилизованного сорбента β-ЦД–поливиниловый спирт и β-ЦД–кремнезем

Циклодекстрины и их производные способны образовывать комплексы включения с холестерином Для выведения холестерина из молочных продуктов наиболее эффективно использовать β-ЦД в виде производных в нерастворимой форме, так как их можно легко удалить из реакционной смеси, регенерировать и использовать повторно

Для получения новых производных β-ЦД нами были исследованы ПВС и кремнезем, подобраны условия проведения реакции (время, температура, соотношение компонентов в реакционной смеси) Синтез новых производных β-ЦД проводился через альдегидные группы

В результате проведенных исследований был получен сшитый сорбент β-ЦД–ПВС с содержанием β-ЦД 0,420 г/г ПВС и сорбент β-ЦД–кремнезем с содержанием β-ЦД 0,295 г/г кремнезема Наиболее благоприятными условиями для синтеза иммобилизованного сорбента β-ЦД–ПВС являются. время ведения реакции 70 мин при t=45-50 °С и соотношении β-ЦД и ПВС-СНО по массе – 1,6 1,0, а для синтеза иммобилизованного сорбента β-ЦД–кремнезем время ведения реакции 60 мин, t= 48-53 °С и оптимальное соотношение β-ЦД и кремнезема по массе 1,4 1,0

Сорбенты, полученные в результате сшивки ПВС или кремнезема полиальдегидными группами с β-ЦД, исследовали на способность связывать холестерин О комплексообразующей способности синтезированных производных β-ЦД судили по снижению концентрации холестерина в водном растворе после внесения данных сорбентов Результаты проведенных исследований представлены на рис 1.

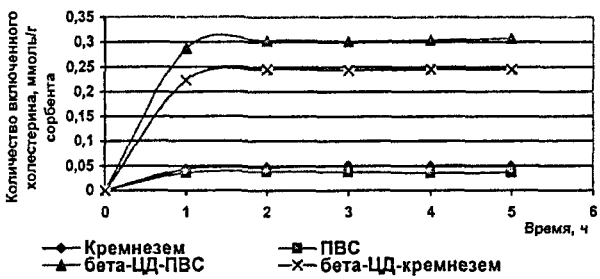


Рис 1 Динамика образования комплексов включения холестерина с сорбентами

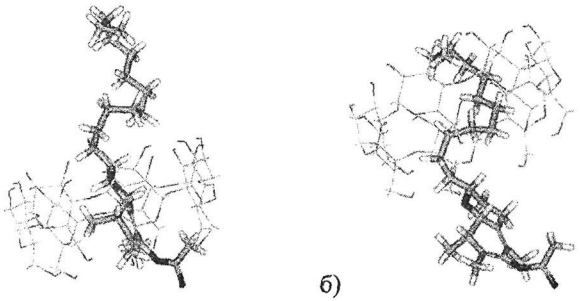
Анализируя полученные данные по динамике образования комплексов включения холестерина с сорбентами, можно сделать вывод, что максимальное связывание холестерина с сорбентом и образование комплекса происходит уже через 1,5 часа Наилучшие результаты были получены для нового производного β-ЦД–ПВС связывание 0,3 ммоль (0,11 г) холестерина с 1 г сорбента.

Таким образом, экспериментально показана возможность использования полученного сорбента β-ЦД–ПВС для удаления холестерина из водных или водно-органических растворов

3.2.5. Получение комплексов включения витамина Е с β-ЦД

Для изучения возможности создания комплекса β-ЦД с альфа-токоферол ацетатом (витамином Е) использовали молекулярное моделирование комплекса в программе DS Viewer 6,0 Pro и программу Hyperchem 7.5 для оптимизации геометрии молекул.

Построенные молекулярные модели веществ (рис.2) подтверждают возможность образования комплекса между альфа-токоферол ацетатом и β-ЦД. Пространственная «вытянутость» молекулы витамина Е не исключает образования комплексов «витамин Е:β-ЦД» со стехиометрией как 1:1, так и 1:2, 1:3.



а) б)

Рис.2. Возможные молекулярные модели комплекса альфа-токоферол ацетата с β-ЦД: а) за счет проникновения хроманового кольца витамина в полость β-ЦД, б) за счет проникновения изопреноидной боковой цепи витамина в полость β-ЦД.

Для получения комплексов включения витамина Е с β-ЦД использовались методы: соосаждения (ЦД растворяют в воде, молекула-гость добавляется при перемешивании, комплекс осаждается и отфильтровывается), соосаждения с использованием ультразвуковой обработки раствора и комплексообразование в пасте («растирание в пасте»).

Наилучшие результаты были получены при использовании метода получения комплексов «растирание в пасте». Смесь витамина Е и β-ЦД увлажняли небольшим количеством воды и растирали в течение 2-3 ч с последующим высушиванием продукта в вакуум-сушильном шкафу при t°=45±2°С. Процесс комплексообразования контролировали, используя микроскопирование комплексов: по отсутствию масляных включений – свободного витамина Е, и по исчезновению кристаллов β-ЦД (смена на аморфоподобную массу).

Установлено, что комплексы включения витамина Е с β-ЦД могут быть получены при молярном соотношении компонентов в системе от 1.5 до 1 1 соответственно

Характеристика витамина Е в комплексе с β-ЦД

Степень включения витамина Е в полость β-ЦД оценивалась после центрифугирования (n=10000 об/мин) водных растворов комплексов с молярным соотношением витамин Е β-ЦД, равным 1 1, 1 2 и 1:3, и определения содержания витамина в растворе до и после центрифугирования (в осадке и надосадочной жидкости) спектрофотометрическим методом (λ=285,5 нм) Результаты исследования представлены в табл 3

Таблица 3

Характеристика процесса комплексообразования витамина Е с β-ЦД после центрифугирования

Анализируемая проба в комплексе	Содержание витамина Е, % в комплексах «витамин Е β-ЦД» при соотношении компонентов		
	1 1	1 2	1 3
1 Исходный раствор	100	100	100
2 Центрифугат	23	9	5
3 Осадок	26	47	80
4 Свободный витамин Е	51	44	15

Исследования показали, что в препаратах комплекса с соотношением компонентов 1·1 и 1 2 витамина Е включается в полость ЦД менее чем 50%, тогда как в комплексе 1 3 около 85% витамина находится в виде стабильного комплекса включения

Изучение стабильности водных растворов комплексов

Одним из свойств ЦД является изменение физико-химических характеристик веществ в процессе комплексообразования, например увеличивается их растворимость Поэтому проверяли стабильность водных растворов полученных комплексов включения в течение 24 ч при t=22±2 °С по остаточному содержанию витамина Е в растворе

Результаты исследования показали, что уже через 1-2 ч выдерживания концентрация витамина Е в растворе резко снижается за счет перехода его в осадок, но в течение последующих 22 ч практически не изменяется Для комплексов с соотношением компонентов 1 3, 1 3,8 и 1:5 через 24 ч содержание витамина Е в рас-

творах снизилось на 47,8, 48,0 и 54,8% и составило 25,9, 21,7 и 10,8 мг/100 $см^3$ соответственно

Таким образом, несмотря на то, что большая часть витамина уже через 1-2 ч переходит в осадок, небольшое количество витамина Е в виде комплекса включения с β-ЦД все же переходит в водорастворимую форму

Хранение витамина Е и его комплексов включения с β-ЦД

Для выявления чувствительности витамина Е и его комплексов с β-ЦД к свету и кислороду воздуха, образцы комплексов «витамин Е β-ЦД» и чистый витамин Е оставляли на 12 дней при комнатной температуре на свету По окончании хранения *проводили снятие спектров экстрактов витамина Е из комплексов с β-ЦД и* чистого витамина при длинах волн 260-330 нм (максимум поглощения для DL-α-токоферол ацетата при λ=285,5 нм)

Из представленных спектрограмм (рис. 4) видно, что после хранения в течение 12 дней чистый витамин Е и комплекс включения «витамин Е β-ЦД» 1 1 не дают четкого пика

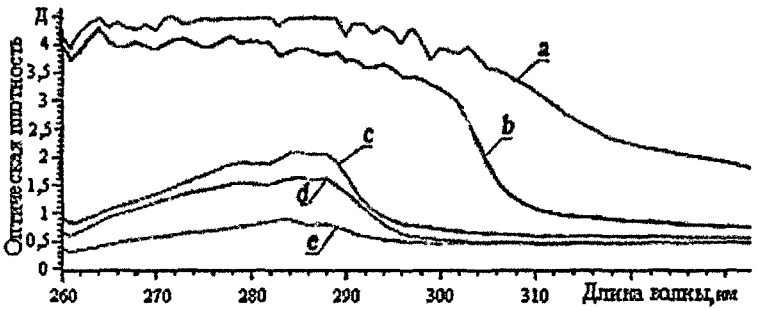


Рис 4 Спектрограмма комплексов и чистого витамина Е. a) витамин Е; b) комплекс витамина Е с β-ЦД 1 1; c) комплекс витамина Е с β-ЦД 1·2; d) комплекс витамина Е с β-ЦД 1 3, e) комплекс витамина Е с β-ЦД1 5

Из рис 4 следует, что чистый витамин Е и витамин Е в комплексе 1 1 разрушаются, окисляясь под действием дневного света и кислорода воздуха Комплексы β-ЦД и витамина Е в соотношениях 1·2, 1·3 и 1·5 дают четко выраженные пики, характерные для витамина Е, что свидетельствует о стойкости витамина в виде комплекса с β-ЦД к внешним факторам (кислороду и дневному свету)

Термический анализ комплексов витамин Е: β-ЦД

Термический анализ – один из вариантов исследования веществ и материалов Варьируемый здесь параметр – температура, а измеряемыми величинами могут быть вес образца, выделяемое или поглощаемое им тепло, объем или линейные размеры образца и т д Термический анализ позволяет идентифицировать вещество, определить его химический и фазовый состав, а также получить информацию о его свойствах

В настоящих исследованиях термическому анализу на термоанализаторе ТА-4000 были подвергнуты три образца 1 – контроль (чистый β-ЦД), 2 и 3 – комплексы витамина Е с β-ЦД в соотношении 1 5 и 1 3

На дифференциальной термогравиметрической кривой (ДТГ-кривой) чистого β-ЦД (рис 5) можно выделить три зоны интенсивной потери массы в области температур ≈80 °С, 310 °С и 510 °С Первая зона отвечает потере воды, вторая – деструкции циклодекстринового кольца, третья – окислению продуктов, образовавшихся при деструкции циклодекстринового кольца Обращает на себя внимание наличие небольшого «плеча» на ДТГ-кривой чистого циклодекстрина в области 340-350 °С Это «плечо» исчезает на термограммах образцов – комплексов β-ЦД с витамином Е (рис. 6, 7), но появляется новое «плечо» в области 260-280 °С Интенсивность этого «плеча» увеличивается с ростом концентрации витамина Е в комплексе

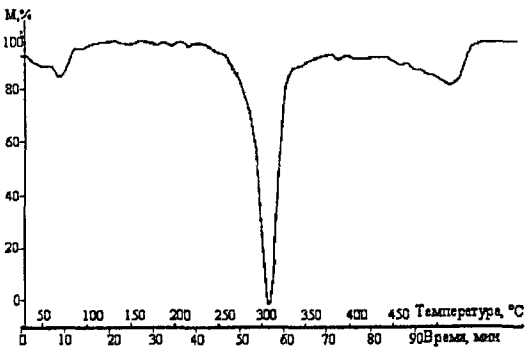


Рис 5 ДТГ-кривая чистого β-ЦД

Появление «плеча» на термограмме чистого циклодекстрина может быть обусловлено образованием термостабильных соединений – фрагментов деградации циклодекстринового кольца – вероятнее всего протекающим за счет радикальных

процессов Ингибитором этих радикальных процессов выступает витамин Е, поэтому на термограммах ДТГ-кривых (рис 6 и 7) это «плечо» практически отсутствует Появление «плеча» в области меньших температур у основного пика ДТГ на термограммах комплексов витамина Е с β-ЦД вероятнее всего следует отнести к витамину Е, поскольку размер «плеча» увеличивается с ростом его концентрации

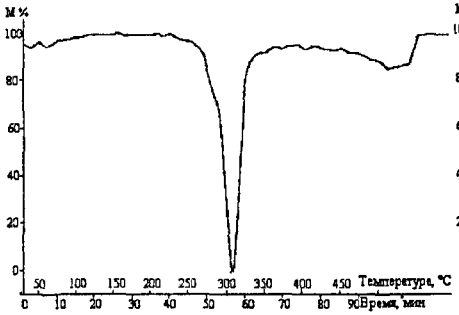


Рис 6 ДТГ-кривая комплекса витамин Е β-ЦД с молярным соотношением компонентов 1 3

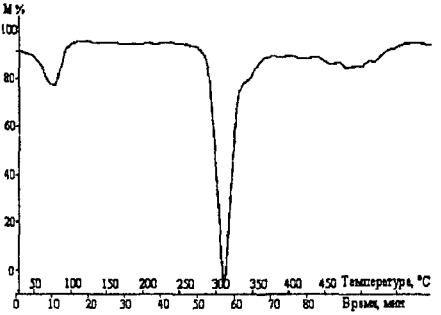


Рис 7 ДТГ-кривая комплекса витамин Е β-ЦД с молярным соотношением компонентов 1 5

Проведенный расчет энергии активации реакции термоокислительной деструкции по методу Бройдо показал, что энергия активации для первого пика на термограммах падает с введением в ЦД витамина Е, составляя 50 кДж/моль для чистого β-ЦД, и 41 и 28 кДж/моль для комплексов с витамином, и свидетельствует о снижении не только содержания свободной воды, но и прочности водородных связей с гидроксильными группами циклодекстринов

Энергия активации реакции термоокислительной деструкции второго пика (292 кДж/моль для чистого β-ЦД, 168 и 185 кДж/моль для комплексов с витамином) говорит о том, что происходит изменение конформации циклодекстрина при образовании комплекса с витамином Е При малых концентрациях витамина Е энергия активации минимальна, а с ростом концентрации энергия активации начинает увеличиваться, что может свидетельствовать не только о конформационных изменениях в структуре циклодекстринов в результате образования комплекса с витамином Е и об ингибировании радикальных реакций витамином Е.

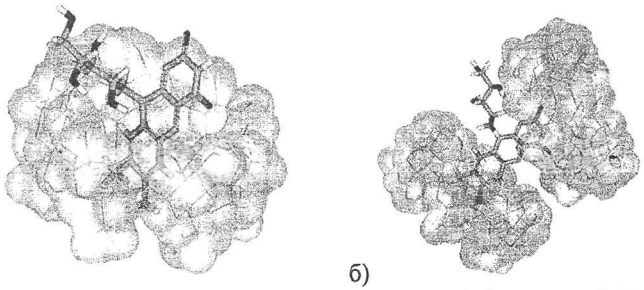
Таким образом, на основании термического анализа соединений включения «витамин Е·β-ЦД» и чистого ЦД можно сделать вывод об образовании комплекса между витамином Е и β-ЦД. При включении в полость ЦД витамин Е не теряет своих антиокислительных свойств, приобретая устойчивость к воздействию света

и кислорода воздуха. Метод «растирание в пасте» эффективен для получения порошкообразной формы витамина Е в виде комплекса включения с β-ЦД. Такую форму витамина Е можно получить даже при молярном соотношении витамин Е:β-ЦД 1:1, что соответствует содержанию витамина Е в комплексе 26%. Однако оптимальными соотношениями витамина Е:β-ЦД в комплексе являются 1:3 моль/моль и более.

3.2.6. Получение комплексов включения витамина B_2 с β-ЦД

Рибофлавин (витамин B_2) относится к числу биологически активных веществ, входящих в состав медицинских, кормовых препаратов, и ряда пищевых продуктов. Использование данного витамина осложняется тем, что у него низкая растворимость в воде, неустойчивость к воздействию света и кислорода воздуха. Комплекс витамина B_2 с ЦД способен устранить эти недостатки.

Существование комплекса витамина B_2 с β-ЦД возможно, исходя из пространственного строения витамина B_2, гидрофобности и степени поляризации его отдельных частей. Наименее полярной (и наиболее гидрофобной) частью молекулы рибофлавина являются метильные группы изоаллоксазинового кольца – эта часть молекулы витамина является наиболее выгодной для образования комплекса с β-ЦД (рис. 8, а). Часть изоаллоксазинового кольца, содержащая кислород, также способна на комплексообразование с циклодекстрином (рис. 8, б). Остаток D-рибита в молекуле рибофлавина является наиболее гидрофильной частью молекулы, и включение в гидрофобную полость β-ЦД наименее вероятно.



а) б)

Рис. 8. Возможные молекулярные модели комплекса рибофлавина с β-ЦД:
а) рибофлавин: β-ЦД, 1:1; б) рибофлавин: β-ЦД, 1:2.

Для получения стабильного комплекса β-ЦД с витамином B_2 и определения оптимального молярного соотношения компонентов при образовании данного

комплекса были приготовлены комплексы включения B_2 β-ЦД с молярным соотношением компонентов от 1.1 до 1·5 с использованием 2-х методов. «растирание в пасте» и соосаждения с дополнительной обработкой растворов ультразвуком в течение 15 мин (использовали ультразвуковую установку ПСБ-1335-05 с рабочей частотой 35кГц) Оба метода оказались приемлемыми для получения комплексов витамина B_2 с β-ЦД, но при небольших объемах работ предпочтительнее методика «растирание в пасте», т к выход комплекса при этом выше – 89-98%, а при осаждении 71-73%

Влажность полученных комплексов варьировала в пределах 7,55-11,40 % При увеличении количества включенного витамина B_2 в полость β-ЦД наблюдалась тенденция к уменьшению влажности готового комплекса после высушивания По-видимому, это связано с тем, что витамин B_2, включаясь в полость β-ЦД, вытесняет из нее кристаллическую воду, которая всегда присутствует в циклодекстринах (влажность чистого β-ЦД 13-14%)

Изменение растворимости комплексов витамина B_2 с β-ЦД в зависимости от температуры

Растворимость витамина B_2 в воде невелика и составляет 0,12 мг/см^3 при температуре 27 °С, 0,19 мг/см^3 при 40 °С и 2,3 мг/см^{3}при 100 °С Увеличение растворимости витамина B_2 в комплексе с β-ЦД имеет большое прикладное значение Экспериментальные данные по выявленной зависимости растворимости витамина B_2, β-ЦД и комплексов включения на их основе от температуры представлены на рис 9

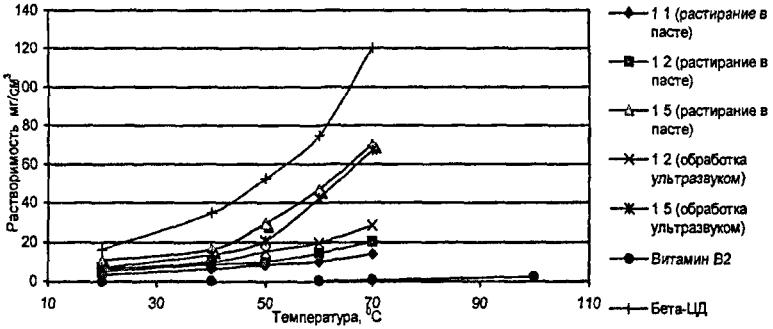


Рис 9 Влияние температуры на растворимость β-ЦД, витамина B_2 и комплексов B_2·β-ЦД (1.1, 1 2, 1 5).

Растворимость комплексов B_2 β-ЦД возрастает при увеличении доли β-ЦД в комплексе от 1.1 до 1:5 моль/моль Комплексообразование витамина B_2 с β-ЦД увеличивает растворимость самого витамина более чем в 6 раз при комнатной температуре

Воздействие дневного света на витамин B_2 и его комплексы с β-ЦД

Под воздействием света, особенно прямого солнечного, витамин B_2 переходит в свои неактивные формы (*люмихром, люмифлавин*), что ведет к изменениям в его спектре Водные растворы комплексов и чистого витамина B_2 хранили в течение 14 дней на свету По окончании хранения проводили снятие спектров растворов витамина B_2 (рис 10) и его комплексов с β-ЦД при 220-500 нм

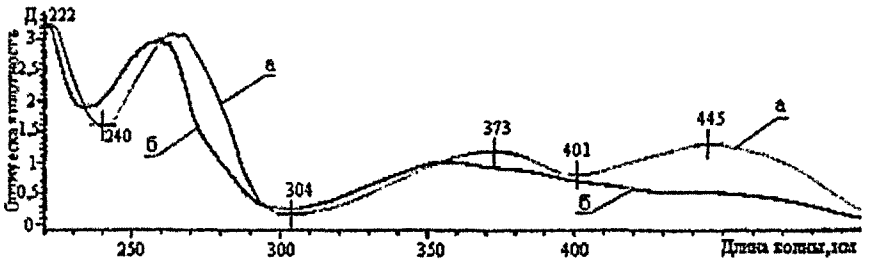


Рис 10 Спектры чистого витамина B_2· а) свежий раствор витамина B_2, б) раствор витамина B_2 после хранения в течение 10 дней на свету.

При комплексообразовании витамина B_2 с β-ЦД в любом молярном соотношении B_2 к β-ЦД изменений в спектре витамина не происходит, следовательно, витамин в комплексе не подвергается или подвергается меньшему воздействию дневного света, тем самым сохраняя свою первоначальную форму и витаминные свойства (рис 11)

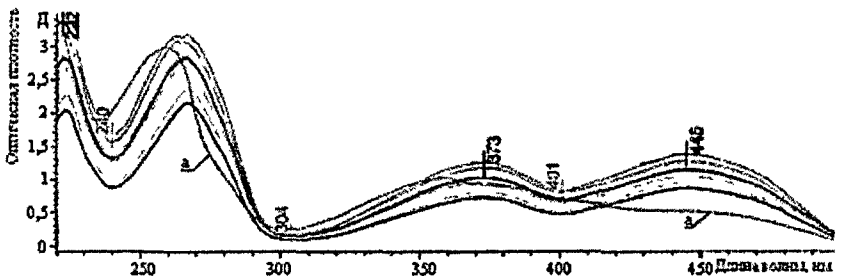


Рис 11. Спектры растворов чистого витамина B_2 и в комплексе с β-ЦД после хранения в *течение 10 дней на свету* а) витамин B_2; остальные спектры относятся к комплексам B_2 β-ЦД

Далее проводили экстракцию люмифлавина хлороформом из растворов, снимали спектры экстрактов Люмифлавин, в отличие от витамина B_2, растворим в хлороформе, и по наличию спектров люмифлавина после экстракции исследуемых растворов хлороформом можно судить о степени разложении витамина (рис 12) При хранении полученных комплексов в течение 10 дней образуется небольшое количество люмифлавина, при этом для всех комплексов оно является приблизительно одинаковым, и по сравнению с чистым витамином B_2 степень фоторазложения снижается более чем в 10 раз.

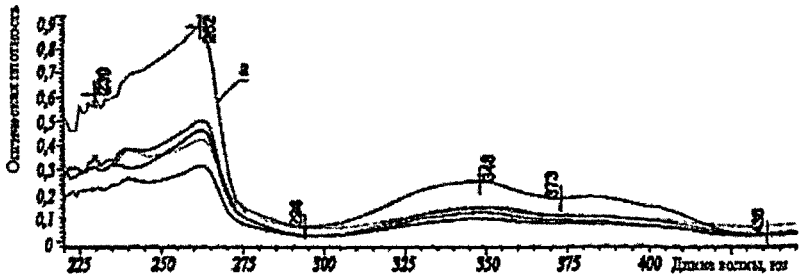


Рис 12. Спектры растворов после экстракции люмифлавина хлороформом а) витамин B_2 (разведение пробы в 3 раза), остальные спектры относятся к комплексам B_2 β-ЦД

Образование люмифлавина при хранении витамина B_2 в комплексе с β-ЦД возможно связано с неполным включением рибофлавина в полость циклодекстрина или включением в полость той части молекулы витамина, которая не отвечает за его окисление

Анализ процесса комплексообразования витамина B_2 с β-ЦД с помощью флуориметрического метода

Комплексообразование с ЦД может влиять на спектрофотометрические свойства вещества, в т.ч. и флуоресценцию, при этом интенсивность флуоресценции может как возрастать, так и затухать В нейтральных водных растворах рибофлавин флуоресцирует жѐлто-зеленым светом (515-615 нм с максимумом при 530 нм). С целью анализа влияния β-ЦД на флуоресценцию витамина B_2 готовили водные растворы с одинаковой концентрацией рибофлавина, в которые вводили различные количества β-ЦД, соответствующие определенным молярным соотношениям витамина и β-ЦД (от 10.1 до 1.10), далее проводили определение интенсивности флуоресценции в растворах при λ=530 нм на мультиканальном

флуориметре Пик возрастания интенсивности флуоресценции соответствовал молярным соотношениям компонентов комплекса B_2 β-ЦД 1·2 или 2.3 (рис. 13)

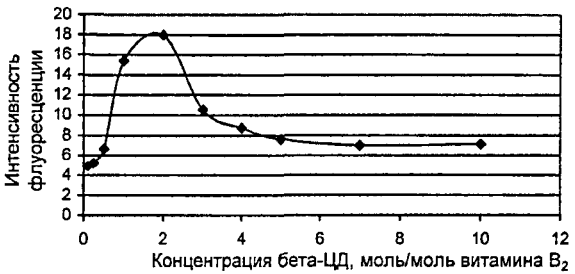


Рис 13 Влияние концентрации β-ЦД на интенсивность флуоресценции витамина B_2 в водных растворах

Таким образом, экспериментальные данные флуориметрического анализа водных растворов витамина B_2 с различной концентрацией β-ЦД так же могут являться подтверждением образования стабильных комплексов витамина B_2 с β-ЦД

Термический анализ комплексов витамин B_2: β-ЦД

Используя термический метод анализа, были исследованы семь образцов чистый β-ЦД, чистый витамин B_2 и комплексы витамина B_2 с β-ЦД, полученные методами «растирания в пасте» и ультразвуковой обработки водных растворов, в возрастающей концентрации содержания витамина в комплексе от 1 5 до 1 1 моль/моль

На дифференциальной кривой чистого витамина B_2 (рис. 14) можно выделить только две зоны интенсивной потери массы в области температур 296 °С и 523 °С, отсутствует пик, отвечающий потере воды. Первая зона отвечает деструкции самого витамина, вторая зона – окислению продуктов, образовавшихся при его деструкции

На дифференциальных кривых комплексов включения витамина B_2 с β-ЦД отсутствуют пики, соответствующие разрушению чистого витамина B_2 и продуктов его термодеструкции (рис 15), что свидетельствует об образовании комплексов включения На ДТГ-кривых появляются новые пики в области температур 75-82 °С (дегидратация комплекса), 305-310 °С (разрушение комплекса) и 490-510 °С (окисление продуктов деструкции комплексов)

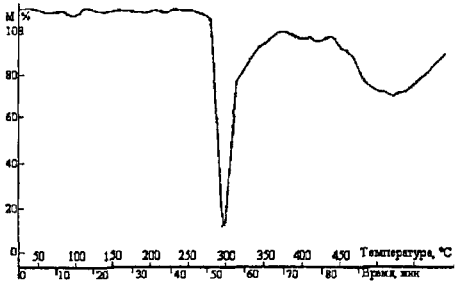


Рис 14 ДТГ-кривая чистого витамина B_2

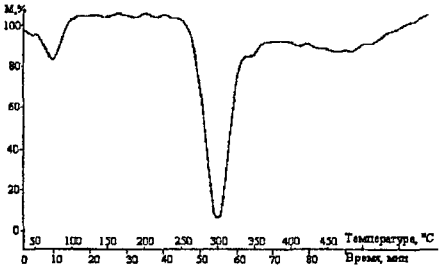


Рис 15 ДТГ-кривая комплекса витамин B_2 с β-ЦД с молярным соотношением компонентов 1 1, полученного методом «растирание в пасте»

Обращает на себя внимание зона деструкции самого комплекса в отличие от зон деструкции как чистого β-ЦД (275-340 °С) (рис 5), так и чистого витамина B_2 (280-320 °С) (рис. 14), разрушение комплексов начинается уже при 250-260 °С и заканчивается при 335-340 °С. Расширение температурного интервала у основного пика на ДТГ-кривых комплексов включений витамина B_2 с β-ЦД также свидетельствует о комплексообразовании, поскольку его увеличение происходит с ростом концентрации витамина B_2 в комплексе Доказательством комплексообразования может служить отсутствие зоны интенсивной потери массы на ДТГ-кривых комплексов, соответствующих окислению продуктов, образовавшихся при деструкции витамина B_2 при ≈523 °С

Расчет энергии активации реакции термоокислительной деструкции по методу Бройдо показал, что энергия активации для первого пика на термограмме β-ЦД равна 59 кДж/моль Энергия активации первого пика на термограммах комплексов падает при увеличении концентрации витамина B_2 и свидетельствует о том, что введение в β-ЦД витамина B_2 снижает прочность водородных связей гидроксильных групп в молекуле циклодекстрина

Энергия активации реакции термоокислительной деструкции самого β-ЦД составляет 317 кДж/моль, комплексообразование β-ЦД с витамином B_2 приводит к ее снижению, т е при образовании соединения включения с витамином B_2 происходит изменение конформации самого циклодекстрина Самая низкая энергия активации характерна для комплекса витамин B_2 β-ЦД 1.2, полученного методом «растирания в пасте» (203 кДж/моль), что может быть обусловлено наиболее оп-

тимальной конформацией комплекса, молярным соотношением компонентов и выбранным методом получения комплекса.

Таким образом, термический анализ комплексов включения «витамин B_2·β-ЦД», чистого β-ЦД и витамина B_2 подтверждает образование комплекса между витамином B_2 и β-ЦД как при использовании метода ультразвуковой обработки водных растворов компонентов, так и метода «растирание в пасте» Причем получить комплекс возможно даже при молярном соотношении витамина B_2 и β-ЦД 1 1, их оптимальным соотношением в комплексе является 1 2 моль/моль.

3.2.7. Апробация полученных комплексов β-ЦД с витаминами при изготовлении кондитерских изделий

Одним из направлений производства функциональных пищевых продуктов является обогащение их теми витаминами и минеральными веществами, дефицит которых наиболее распространен и опасен. Внесение витаминов в продукты осуществляют в количествах, соответствующих степени этого дефицита, т е 30-50 % средней суточной потребности на 100 г изделия Именно такой подход чаще всего используют при обогащении продуктов массового потребления, адресуемых самым широким слоям населения (мука, хлеб, молоко, напитки, кондитерские изделия и т. п). Одними из наиболее распространенных массовых сортов конфет являются помадные конфеты и мармелад

Для повышения пищевой ценности кондитерских изделий комплекс «витамин Е β-ЦД, 1 5» вводился в рецептуру сахарной помадки, а комплекс «витамин B_2·β-ЦД, 1 3» в рецептуру желейного мармелада В этом случае содержание витамина Е в 100 г готового продукта составляло 50% от суточной нормы потребления витамина, а содержание витамина B_2 составило 25% от суточной нормы потребления витамина.

Применяемые комплексы не требуют изменения технологического процесса, не оказывают негативного влияния на форму, структуру и консистенцию кондитерских изделий, не влияют на вкус и аромат продукции, вместе с тем повышают пищевую ценность продуктов, обогащая их витаминами

Характеристики сахарной помады и мармелада при хранении

Анализ содержания витамина Е в сахарной помадке и витамина B_2 в мармеладе проводили непосредственно после приготовления изделий и далее после хра-

нения в течение двух месяцев при комнатных условиях (t=22±2 °С, относительная влажность воздуха 60%)

Содержание витамина Е в помадке непосредственно после приготовления практически совпало с количеством витамина, внесенного с комплексом «витамин Е β-ЦД» и составило 99,3 % от теоретически возможного, что говорит о равномерном распределении комплекса в помадной массе Содержание витамина Е по истечении двух месяцев составило 23,26 мг на 400 г изделия (96,3 % от теоретически возможного), что подтверждает стабильность витамина Е в сахарной помадке при хранении

Содержание витамина B_2 в свежеприготовленном мармеладе составило 1,5 мг в 400 г продукта, что совпадает с внесенным количеством в рецептуру витамина с комплексом «витамин B_2 β-ЦД» По истечении срока хранения опытных образцов мармелада содержание витамина B_2 было 1,47 мг на 400 г продукта (98,1 % от внесенного количества), что подтверждает стабильность витамина B_2 в мармеладе при хранении

Выводы

1 Проведен скрининг микроорганизмов, выделенных из различных видов растительных и почвенных образцов, отобранных из разных районов средней полосы России В результате выделено 27 бактериальных штаммов с преимущественно β-ЦГТ-азной активностью не менее 2 ед/см^3 КЖ Наиболее продуктивным по β-ЦГТ-азе оказался штамм 16b с β-ЦГТ-азной активностью 6,7 ед/см^3 КЖ и β-ЦГТ-специфичностью 79,13 %

2 На основании совокупности исследованных морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и филогенетических характеристик исследуемой культуры новый продуцент β-ЦГТ-азы идентифицирован как *Bacillus circulans* штамм 16b

3 На основе нового штамма по традиционным технологиям получен препарат β-ЦГТ-азы Г10Х с выходом 4,5 г /дм^3 (активность β-ЦГТ-азы 856,4 ед/г) и β-ЦД (выход целевого продукта составил 28% от использованного субстрата)

4 Впервые синтезированы иммобилизованные β-ЦД на основе поливинилового спирта и кремнезема Показана эффективность данных сорбентов для удаления холестерина из водных или водно-органических растворов

5 Разработан новый метод получения порошкообразной стабильной формы витамина Е в виде комплекса включения с β-ЦД с молярным соотношением витамина Е к β-ЦД от 1 2

6 Комплексообразование витамина Е с β-ЦД позволяет перевести витамин в водорастворимую форму Достигнутая максимальная растворимость витамина Е составила 25,9 мг/100 $см^3$ воды для комплекса 1.3

7 Разработаны методы получения стабильных комплексов включения витамина B_2 с β-ЦД при их молярном соотношении 1 1, 1.2 и 1 5 соответственно.

8 Установлено, что комплексообразование с β-ЦД увеличивает растворимость витамина B_2 в 6 раз по сравнению с чистым витамином, а так же повышает его устойчивость к воздействию дневного и ультрафиолетового света

9 Выявлена зависимость между увеличением количества включаемых витаминов Е и B_2 и снижением конечной влажности комплексов, что также подтверждено термическим методом анализа

10 Введение в рецептуру кондитерских изделий – сахарной помады и мармелада – комплексов витамина Е и B_2 с β-ЦД не требует изменения технологических процессов, при этом повышая пищевую ценность продуктов, обогащая их витаминами

Список публикаций

1 Грачева И М , Комбарова С П , **Шагина С.Е.** «Циклодекстрины, их производные и комплексы включения» // Сборник докладов молодых ученых МГУПП III Юбилейная международная выставка-конференция «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации» Часть I – М. МГУПП, 2005 – с. 123-127

2 **Шагина С.Е.**, Банникова Г Е , Грачева И М , Иванова Л А., Варламов В П «Изучение возможности связывания холестерина хитозаном, сшитым окисленным β-циклодекстрином». // Сборник докладов Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности, Щелково, 2006 – с 114-117

3 **Шагина С.Е.**, Грачева И М , Комбарова С П., Варламов В П. «Производные β-циклодекстрина на основе органических и неорганических сорбентов» // Сборник материалов IV международной конференции-выставки «Высокоэффективные

пищевые технологии, методы и средства для их реализации» Часть III – М МГУПП, 2006 – с 92-95

4 **Шагина С.Е.**, Грачева И М «Комплексообразование β-циклодекстрина с жирорастворимым витамином» // Сборник материалов V юбилейной школы-конференции с международным участием «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации» – М МГУПП, 2007 – с 225-229

5 **Шагина С.Е.**, Комбарова С П , Терехова Е.А., Черепанова И С. «Получение комплексов включения β-циклодекстрина с витаминами» // Сборник материалов V Международной научно-практической конференции «Технологии и продукты здорового питания» Часть 2 – М МГУПП, 2007 – с 380-385

6 Банникова Г Е , **Шагина С.Е.**, Поляков К Ю , Варламов В.П , Грачева И М , Иванова Л А , Тихонов В Е «Способ получения иммобилизованного бета-циклодекстрина». Патент РФ на изобретение №2295539 от 20 03 2007 Бюл №8

7 Кузнецова О В , **Шагина С.Е.**, Иванова Л А «Разработка условий химико-ферментативной конверсии крахмала в альфа-циклодекстрины». // Хранение и переработка сельхозсырья, №1, 2008 – с.17-19

8 **Шагина С.Е.**, Войно Л И «Поиск новых продуцентов β-циклодекстринглюканотрансферазы». // Естественные и технические науки, №1 (33), 2008. – с 318-320

9 **Шагина С.Е.**, Войно Л И «Циклодекстрины и комплексы включения, их свойства и возможность использования». // Естественные и технические науки, №1 (33), 2008 – с 321-323

10 **Шагина С.Е.**, Малахова Э А , Кузнецова О В , Шостак Л М , Леонтьев В Н., Варламов В П «Комплекс включения витамина Е с β-циклодекстрином» // Хранение и переработка сельхозсырья, №3, 2008. – с 53-56

Сокращения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДТГ-кривая – дифференциальная термогравиметрическая кривая; КЖ – культуральная жидкость, ПВС – поливиниловый спирт, ЦА – циклодекстринглюканотрансферазная активность; ЦГТ-аза – циклодекстринглюканотрансфераза; ЦД – циклодекстрин

Заказ № 524. Объем 1 п.л. Тираж 100 экз.
Отпечатано в ООО «Петроруш».
г. Москва, ул. Палиха-2а, тел. 250-92-06
www.postator.ru