

## ВЛИЯНИЕ КАЗЕИНОВЫХ ФОСФОПЕПТИДОВ НА СОЛЮБИЛИЗАЦИЮ ЖЕЛЕЗА В БАКТЕРИАЛЬНОМ КОНЦЕНТРАТЕ

Представлены результаты научно-исследовательской работы по изучению способности казеиновых фосфолипидов солюбилизовать двухвалентное железо в бактериальном концентрате пропионовокислых бактерий. Определены оптимальные технологические параметры выделения казеиновых фосфолипидов. Установлена взаимосвязь между концентрацией железа и степенью солюбилизации. Отмечено, что железо, хелатированное казеиновыми фосфолипидами, сохраняется в двухвалентной форме в течение длительного срока хранения.

Казеиновые фосфолипиды, пропионовокислые бактерии, сульфат железа, солюбилизация.

Концепция оптимального питания предполагает в качестве одного из важнейших условий сохранения здоровья человека адекватную обеспеченность его организма как макро-, так и микронутриентами, в том числе и эссенциальными микроэлементами, в частности железом. Железодефицитные состояния по-прежнему остаются актуальной и во многих отношениях не решенной проблемой современной медицины. Недостаток железа в организме приводит ко многим негативным последствиям. Одним из них является развитие железодефицитной анемии [1].

Учитывая, что в повседневной жизни человек потребляет железо в составе растительных и животных продуктов и наличие аминокислот и пептидов, а также белков животного происхождения способствует лучшему усвоению организмом этого микроэлемента, представляется целесообразным обогащать рационы питания именно органическими формами железа. По нашему мнению, наиболее удобным объектом для биотехнологического получения железа в органической форме являются пропионовокислые бактерии, которые обладают способностью синтезировать значительное количество гемсодержащих ферментов и корриноидов, повышающих усвоение железа [2].

Известно, что железо в организме может всасываться только в виде  $Fe^{2+}$ . Однако двухвалентное железо подвергается быстрому химическому окислению, переходя в нерастворимую, неусвояемую организмом трехвалентную форму. Для сохранения биодоступности железа привлекательной представляется роль хелатирующих «агентов», которые способствуют солюбилизации минералов, сохраняя их в растворимом состоянии. Одним из представителей такого рода хелаторов являются казеиновые фосфолипиды (СРР). СРР – это фосфолированные пептиды, образующиеся из казеинов коровьего молока при их переваривании пищеварительными протеиназами [3]. Следует отметить, что до сих пор казеиновые фосфолипиды недостаточно изучены и как хелатирующие «агенты» для минералов, и как потенциальные нутрицевтики в питании человека. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о влиянии СРР на солюбилизацию железа. Поэтому исследование железосвязывающей способности СРР представляет большой интерес.

Целью настоящей работы являлось исследование способности казеиновых фосфолипидов солюбилизовать двухвалентное железо в бактериальном концентрате пропионовокислых бактерий.

Объектом исследования служили культуры пропионовокислых бактерий (ПБК): штаммы *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* AC-2503, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* AC-2500, *Propionibacterium cyclohexanicum* Kusano AC-2260 и *Propionibacterium cyclohexanicum* Kusano AC-2259, полученные из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (Москва), активизированные уникальным биотехнологическим способом, разработанным в Восточно-Сибирском государственном технологическом университете. Культивирование пропионовокислых бактерий осуществляли на сыровоточной среде с добавлением ростовых факторов [4].

В качестве источника железа использовали двухвалентную соль ( $FeSO_4$ ).

Сульфат железа добавляли в ростовую среду в концентрации 0,25-0,55 мг/мл. Культивирование пропионовокислых бактерий в присутствии сульфата железа осуществляли в течение 24 часов при температуре 30°C.

Известно, что биологический эффект взаимодействия микроорганизмов с металлами определяется концентрацией металла, степенью его токсичности и метаболическим потенциалом микроорганизмов. При проведении экспериментальных исследований нами было отмечено, что сульфат железа до определенной концентрации (0,25 мг/мл для *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* AC-2500 и 0,35 мг/мл для всех остальных штаммов) повышает удельную скорость роста пропионовокислых бактерий, что свидетельствует о необходимости железа для нормального метаболизма клетки [5].

Дальнейшее повышение концентрации  $FeSO_4$  в среде до 0,45 мг/мл и более приводит к изменению окраски концентратов и выпадению осадка, это указывает на образование нерастворимых  $Fe^{3+}$  ионов.

В связи с этим изучали влияние казеиновых фосфолипидов (СРР) на солюбилизацию (хелатирование) железа в бактериальном концентрате пропионовокислых бактерий.

В настоящее время разрабатываются пероральные формы пептидных препаратов с различной направленностью фармакологического действия. Однако созданию таких форм препятствует низкая устойчивость пептидов к действию ферментов желудка и тонкой кишки [6]. В отличие от многих биологически активных пептидов СРР<sub>s</sub> проявляют высокую устойчивость к гидролитическому действию пищеварительных протеиназ и пептидаз, что делает эффективным их пероральное применение.

Казеиновые фосфопептиды являются биологически активными веществами естественного природного происхождения, поэтому более предпочтительны для организма, так как действуют гораздо мягче и более длительно. Их основная биологическая активность (способность обеспечивать коллоидное состояние кальцийфосфатного комплекса в молоке с последующим поддержанием его в растворенном состоянии в полости тонкой кишки) генетически детерминирована для облегчения утилизации организмом Са и Р. Поэтому использование СРР<sub>s</sub> в комплексе с минеральными добавками позволит достаточно легко и быстро восполнить дефицит того или иного минерального элемента [7].

Известно, что металлосвязывающая способность СРР<sub>s</sub> зависит от степени фосфорилирования, которая, в свою очередь, связана с типом казеина и способом ферментативного гидролиза. Высокополярные кислые домены в структуре СРР<sub>s</sub> являются местами связывания минералов. Дефосфорилирование СРР<sub>s</sub> приводит к потере этой способности [8], и наоборот, химическое фосфорилирование  $\alpha_{s1} - \beta - \text{CN}$  повышает их металлосвязывающую емкость [9]. Согласно литературным данным в щелочной зоне казеиновые фосфопептиды могут связывать 24 и 17 молекул Са и Р соответственно [10]. Причем одна молекула СРР<sub>s</sub> способна связывать 40 молекул Са и 6 молекул Zn [11]. Хотя способность СРР<sub>s</sub> связывать минералы обусловлена присутствием в их структуре анионного гидрофильного участка, тем не менее, аминокислотные последовательности до и после этого участка также вносят значительный вклад в аффинность СРР<sub>s</sub> к минералам.

Выделение СРР<sub>s</sub> включает стадию ферментативного гидролиза натриевого казеината панкреатическими протеиназами. Традиционные схемы выделения СРР<sub>s</sub> предлагают проводить такую ферментацию разными протеиназами, что приводит к расхождениям в аминокислотном составе и, как следствие, к различным способностям связывать минералы. С целью получения гидролизата с максимальным содержанием низкомолекулярных фосфорилированных пептидов и свободных аминокислот, способных в дальнейшем образовывать комплексы с железом, нами были уточнены технологические параметры выделения СРР<sub>s</sub>.

При получении казеиновых фосфопептидов применяли схему одностадийного гидролиза казеината Na с использованием пепсина и трипсина при разной продолжительности гидролиза.

Изменение молекулярно-массового распределения пептидных фракций в готовых растворах СРР<sub>s</sub> в зависимости от времени гидролиза и концентрации используемых ферментов представлено в табл. 1.

Из результатов, приведенных в табл. 1, видно, что при гидролизе натриевого казеината 3%-м пепсином уже через 120 мин достигается максимальное содержание низкомолекулярных (10,5-5,1 кД) структур – 18,7%. Дальнейшее увеличение продолжительности гидролиза не приводит к заметному изменению в содержании низкомолекулярных фракций.

Таблица 1

Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций

Время гидролиза, мин	Диапазон молекулярных масс, кД	Содержание фракций (%) в диапазоне молекулярных масс, в зависимости от используемого фермента			
		Пепсин 1%	пепсин 3%	трипсин 1%	трипсин 3%
40	более 138	1,8	1,6	1,7	2,0
	138-10,5	5,4	5,6	3,2	4,0
	10,5-5,1	9,5	10,3	7,8	6,2
60	более 138	2,1	1,8	1,7	2,1
	138-10,5	6,3	5,6	4,2	4,3
	10,5-5,1	9,8	11,0	7,8	6,4
120	более 138	2,2	2,3	2,2	2,1
	138-10,5	7,1	11,2	6,2	6,4
	10,5-5,1	11,9	18,7	10,3	10,8
240	более 138	1,8	1,9	1,7	1,7
	138-10,5	9,5	16,5	10,4	4,5
	10,5-5,1	12,9	18,1	10,9	10,4

Кроме того, полученные данные позволяют утверждать, что проведение гидролиза пепсином существенно эффективнее по сравнению с трипсином. Так, при одной и той же концентрации фермента (3%) низкомолекулярных пептидных фракций при гидролизе пепсином образуется в 1,7 раза больше, чем при гидролизе трипсином.

Таким образом, с учетом определения молекулярно-массового распределения пептидных фракций были выбраны оптимальные технологические параметры выделения казеиновых фосфопептидов. Схема выделения включает одностадийный гидролиз казеината натрия пепсином, удаление непептидного материала, CaCl<sub>2</sub>-агрегацию и фильтрацию.

Предложенная схема выделения СРР<sub>s</sub> может быть использована для разработки схем промышленного получения водного раствора казеиновых фосфопептидов с максимальным содержанием низкомолекулярных соединений.

На следующем этапе исследований в питательную среду вносили различные дозы водного раствора СРР<sub>s</sub> и сульфата железа. За процессом связывания железа следили по количеству образованного хелатированного Fe<sup>2+</sup> (% железа, оставшегося в двухвалентной форме от первоначальной дозы). Результаты исследований (средние показатели по всем изученным штаммам) представлены на рис. 1.

Существует мнение, что искусственные хелатные формы минералов при хранении разрушаются и теряют свою эффективность, поэтому они уступают природным органическим солям этих элементов. В связи с этим исследовали сохранность железа, хелатированного казеиновыми фосфопептидами, в двухвалентной форме в процессе длительного хранения. Результаты исследований представлены в табл. 2.

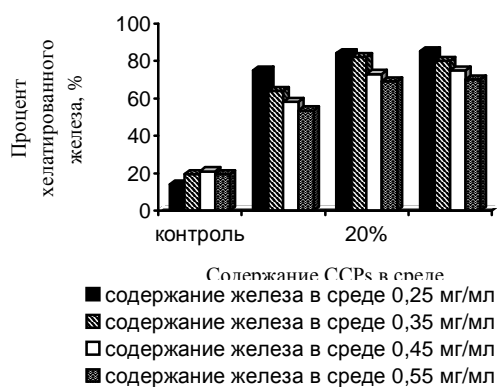


Рис. 1. Зависимость содержания в средах усвояемого (хелатированного)  $Fe^{2+}$  от количества водного раствора казеиновых фосфопептидов

Данные, приведенные в табл. 2, указывают на то, что в процессе хранения количество хелатированного железа в концентратах, содержащих раствор CPPs, практически не изменилось. Тогда как в контроле наблюдалось значительное снижение содержания растворимых ионов  $Fe^{2+}$ . Совокупность полученных данных указывает на то, что казеиновые фосфопептиды являются перспективными хелатирующими агентами для получения новых, биодоступных форм железа.

В результате исследований подобраны оптимальные дозы  $FeSO_4$  и водного раствора CPPs, обеспечивающие максимальное количество солюбилизованного железа.

Таблица 2

Влияние CPPs на процесс солюбилизации железа при хранении

Штамм	Содержание CPPs, %	Содержание $Fe^{2+}$ в среде при хранении (% от первоначальной дозы внесения), сут			
		30	60	90	120
P. freudenreichii subsp. fredenreichii AC-2500	контроль	19,0	19,0	19,5	18,5
	10	58,0	62,0	62,5	60,0
	20	88,0	88,0	88,5	88,0
P. cyclohexanicum Kusano AC-2260	контроль	30,0	29,5	30,0	28,5
	10	69,0	70,5	70,0	69,0
	20	94,5	95,0	95,0	94,5
P. cyclohexanicum Kusano AC-2259	контроль	32,0	32,0	30,5	29,0
	10	60,0	60,5	60,0	59,5
	20	75,0	75,0	75,5	75,0
P. fredenreichii subsp. shermanii AC-2503	контроль	22,0	25,0	25,5	19,0
	10	66,0	67,0	66,0	63,5
	20	95,0	96,0	96,0	95,0

#### Список литературы

1. Авцын А., Жаворонков А., Рош М., Строчкова Л. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина. – 2005. – 496 с.
2. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии. – М.: Изд-во МГУ, 1999. - 300 с.
3. Гаппаров М., Стан Е. Влияние казеиновых фосфопептидов на биодоступность минералов // Вопросы питания. – 2003. – № 6. – С. 40-4.
4. Хамагаева И., Качанина Л., Тумурова С. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий. – Улан-Удэ.: ВСГТУ, 2006. – 172 с.
5. Хамагаева И.С., Кривоносова А.В. Влияние сульфата железа на биохимическую активность пропионовокислых бактерий // Молочная промышленность. – 2007. – № 6. – С.33.
6. Гаппаров М.М., Стан Е.Я. Влияние казеиновых фосфопептидов на биодоступность минералов // Вопросы питания. – 2003. – № 6. – С.40-44.
7. Тутельян В.А. К вопросу коррекции дефицита микронутриентов с целью улучшения питания и здоровья детского и взрослого населения на пороге третьего тысячелетия // Ваше питание. – 2004. – № 4. – С. 25-27.
8. Berracol R., Chanson S., Juillerat M.A. et al // J. Dairy Res. – 1989. – Vol. 56. – № 3. – P. 335-341.
9. Yoshirawa M., Sasari R., Chiba H. // Aric. Biol. Chtm. – 1981. – Vol. 45. – № 4. – P. 909-914.
10. Sato R., Naguchi T., Naito N. // J. nutr. Sci. vitaminol. – 1986. – Vol. 32. – № 1. – P. 67-76.
11. Schlimme E., Meisel H. // Nahrung. – 1995. – Vol. 39. – № 1. – P. 1-20.

ГОУ ВПО «Восточно-сибирский государственный технологический университет»,  
670013, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ

#### SUMMARY

I.S. Khamagaeva, A.V. Krivonosova

#### Influence of caseic phosphopeptides on solubilize ferrous iron in concentrate of biologically active additives

East-Siberian State University of Technology,  
40b, Klutchevskaya Str., Ulan-Ude, Russia, tel/fax 8(3012) 41-72-06, E-mail: [tmmp@esstu.ru](mailto:tmmp@esstu.ru)

In clause the results of research work on study of ability caseic phosphopeptides to solubilize ferrous iron in concentrate of propionate bacteria. Optimum process parameters of excreting of caseic phosphopeptides were determined. It was proved that they have hight ability to solubilize ferrous iron. There was established the interplay between  $Fe^{2+}$

percentage and solubilization level. It was noted that Fe chelated with caseic phosphopeptides persists in the bivalent form during a long period of storage.

Caseic phosphopeptides, propionate bacteria, ferrous sulphate, Fe-solubilization.

