На правах рукописи

Асташкина Анна Павловна

ХРОНОКОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИФИДО-, ЛАКТОСОДЕРЖАЩИХ И ДРОЖЖЕВЫХ ПРЕПАРАТАХ

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск–2010

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» на кафедре физической и аналитической химии

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Бакибаев Абдигали Абдиманапович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Темерев Сергей Васильевич

кандидат химических наук
Хустенко Лариса Анатольевна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Казанский государственный технологический университет

Защита состоится **9 февраля 2011 г. в 16^{30} час.** на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.269.04 при ГОУ ВПО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30, корпус 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ГОУ ВПО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан ___ декабря 2010 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
кандидат химических наук, доцент Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ухудшение экологической обстановки, стрессы, нарушение питания привело к разработке и практической реализации концепции «пробиотики и функциональное питание», разработанной в последнее десятилетие XX века. В настоящее время производится огромное количество новых биопрепаратов и продуктов питания для человека, регулирующих равновесие кишечной микрофлоры, созданных на основе живых микроорганизмов (лактобактерии, бифидобактерии, дрожжи) и продуктов их жизнедеятельности. Ассортимент таких препаратов представлен достаточно широко, контроль качества которых необходимо проводить на всех технологических стадиях их производства. Основными критериями качества препаратов является анализ на активность и количество живых клеток в препарате, которое регламентируется нормативными документами и санитарными нормами качества.

В основном преобладают микробиологические методы, которые требуют больших затрат времени, и позволяют проводить лишь качественный или полуколичественный анализ. Широко распространенные оптические методы анализа трудоемки и требуют использование дорогостоящих реактивов.

Электроаналитические методы относятся к наиболее мощным и распространенным в России методам аналитической химии. Эти методы играют значительную роль в создании детекторов для хроматографических и родственных методов, а также очень важны для разработки химических сенсоров и биосенсоров. Популярность электрохимических методов в различных областях, обусловлена простотой в приборном оформлении, низкой стоимостью, оперативностью и легкостью автоматизации. Потенциометрические и вольтамперометрические методы используются для определения ферментативной активности (кислотообразующей активности и метаболической активности). Ограничение электрохимических методов обусловлено сложностью пробоподготовки объектов анализа.

Кондуктометрический метод анализа пока не нашел широкого применения в области определения активности по сравнению с другими физико-химическими

методами, но широко применяется для контроля роста микробной биомассы в селективных питательных средах. Это связано с высокой чувствительностью метода, экспрессностью и относительно низкой стоимостью анализа.

Поэтому поиск новых вариантов электрохимических методов для определения активности микроорганизмов и разработка экспрессных и высокочувствительных методик количественного определения активности микроорганизмов в препаратах для контроля качества является актуальным и имеет большую практическую значимость.

Исследования, положенные в основу диссертационной работы, выполнялись в рамках программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К.) (2008–2010 гг.), номер государственного контракта № 8846 и в рамках федеральной целевой программы «Проведение научных исследований научными группами под руководством целевого аспиранта» (2010-2011гг), номер государственного контракта П54 от 02.04.2010г.

Цель работы: хронокондуктометрическое исследование закономерностей ферментативных превращений субстратов бифидо-, лактобактериями и дрожжевыми клетками и разработка способа определения их суммарной ферментативной активности *(СФА)*.

Для достижения цели поставлены следующие основные задачи:

1. Разработать основные положения и кинетическую модель субстратного способа определения СФА микроорганизмов.
2. Разработать принципы методов определения СФА микробных суспензий субстратным способом с использованием хронокондуктомерии и хроно-pH-метрии.
3. Определить значения СФА микроорганизмов в некоторых пребиотических препаратах хронокондуктометрическим методом, используемых для контроля качества препаратов.
4. Провести исследование влияния температуры и природы субстратов с целью разработки теста на соответствия препарата.

5. Разработать методологию создания макета прибора «Анализатор метаболической активности биокатализаторов» для проведения экспресс измерения суммарной ферментативной активности микробных суспензий.

Научная новизна данной работы заключается в следующем:

- Впервые предложен субстратный способ количественного определения СФА микроорганизмов.

- Впервые проведено количественное определение СФА в препаратах, содержащих пробиотические микроорганизмы штаммов *L.Plantarum 8P-A3*, *Bifidumbacterium bifidum* и *Bifidum adolescentis* и дрожжевые культуры рас *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* хронондуктометрическим и хроно-pH-метрическим методами.

- Впервые показано, что совокупность значений СФА по определенному набору субстратов микроорганизмов в препарате является качественной характеристикой препарата.

- Впервые показано, что температурная зависимость СФА микроорганизмов по субстрату в исследованных препаратах являются качественной характеристикой препарата.

Практическая значимость. Разработан субстратный способ количественного определения активности (суммарной ферментативной) микроорганизмов хронондуктометрическим и хроно-pH-метрическим методом, характеризующийся простотой в исполнении, относительно низкой стоимостью анализа, экспрессностью, настройкой на любой препарат, содержащий живые клетки микроорганизмов.

Определены значения СФА микроорганизмов в препаратах, содержащих пробиотические микроорганизмы штаммов *L.Plantarum 8P-A3, Bifidumbacterium bifidum* и *Bifidum adolescentis* и дрожжевые культуры рас *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis,* хронондуктометрическим и хроно-pH-метрическим методом и предложено использовать значение СФА микроорганизма по субстрату в качестве параметра контроля качества препарата.

Предложено использовать температурные зависимости СФА по субстрату и совокупности СФА препаратов по различным субстратам как параметр соответствия при контроле качества препарата.

Обоснована целесообразность применения кондуктометрического метода для контроля стационарной фазы роста микробной биомассы пробиотических микроорганизмов (лакто- и бифидобактерий) в технологическом процессе. Предлагаемый метод позволяет более точно определить технологически важный момент перехода экспоненциальной в стационарную фазы кривой роста микробной суспензии по сравнению с используемыми.

Разработанный алгоритм определения СФА микробных суспензий хронокондуктометрическим методом реализован в макете прибора[1] «Анализатор метаболической активности биокатализаторов» (Патент на полезную модель РФ № 76340 от 11.04.2008), который прошел апробацию на действующих производствах предприятий г. Томска (филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Томск ФГУП НПО «Вирион» и ОАО «Томское пиво») для контроля биотехнологических процессов.

На защиту выносятся:

1. Основные положения субстратного способа определения активности микробных суспензий;
2. Алгоритм методик количественного определения СФА микробных суспензий в препаратах субстратным способом с использованием методов кондуктометрии и pH-метрии).
3. Значения СФА некоторых пребиотических препаратов по субстрату для экспрессной оценки активности препаратов.
4. Совокупность значений СФА некоторых пребиотических препаратов по определенному набору субстратов как параметр качества препарата в тесте на соответствие.
5. Температурные зависимости СФА некоторых пребиотических препаратов по субстрату как параметр качества препарата в тесте на соответствие

[1] Макет прибора изготовлен ООО « НПП ИТМ» г. Томск

Апробация работы. Основные результаты работы представлены устными и стендовыми докладами на конференции «Биотехнология XXI века: проблемы и перспективы» (Москва, 2007), Региональной научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве» (Томск, 2007), Международном форуме «Аналитика и Аналитики» (Воронеж, 2008), VIII Научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Томск, 2008), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009), X Юбилейной всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2009), III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биотехнология и биомедицинская инженерия» (Курск, 2010), III Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (Бийск, 2010), Евразийском симпозиуме по инновациям в катализе и электрохимии (Алматы, 2010).

По материалам диссертации опубликовано 6 статей, 1 патент на полезную модель и 10 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 121 странице, содержит 9 таблиц, 33 рисунка и библиографию из 140 наименований. Работа состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и приложения.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе приведен обзор литературы, в котором описана современная классификация пробиотических препаратов. Обобщены и классифицированы существующие методы определения ферментативной активности живых клеток, способы и параметры контроля качества продуктов, содержащих дрожжевые и пробиотические клетки.

Во второй главе приведены теоретические основы ферментативного катализа, сформулированы основные положения предлагаемого субстратного способа, разработана кинетическая модель субстратного способа и предложен математический аппарат для обработки хронокондуктометрических и хроно-pH-метрических данных.

В третьей главе описаны условия проведения экспериментов, способы приготовления растворов, технические характеристики используемого аналитического оборудования.

В четвертой главе приведены значения СФА бифидо-, лактосодержащих и дрожжевых продуктов, результаты исследования влияния на СФА концентрации клеток, температуры, природы субстрата. Приведены результаты кондуктометрического исследования прироста пробиотических культур в процессах промышленного производства.

Основное содержание работы

Для определения суммарной ферментативной активности микроорганизмов пребиотических препаратов впервые предложен субстратный способ, основанный на превращении внесенного определенного субстрата ферментами живых клеток в условиях их голодания в продукт (метаболит) и определении его количества. Изменение концентрации метаболита регистрируется подходящим электрохимическим методом.

Основные положения субстратного способа определения СФА живых клеток

Процесс превращения субстрата (S) в основной продукт (P) при участии ферментативных комплексов живых клеток с концентрацией ($C_{кл}$) при определенной температуре (t) может быть представлен следующей схемой:

$$S \xrightarrow{C_{кл},\ k} P$$

Суммарную скорость всех последовательно и параллельных реакций (w) можно описать кинетическим уравнением (1) и определить по скорости образования основного продукта реакции:

$$w = dC_P/d\tau = k` C_{кл} \cdot C_S \qquad (1)$$

где C_S и $C_{кл}$ - текущие концентрации субстрата и живых клеток, C_P –концентрация продукта, k` - константа скорости реакции второго порядка, τ – время измерения.

Для упрощения модели формулируем условия проведения анализа:

1. концентрация субстрата C_S должна быть достаточно высокой, чтобы за время измерения ее расход был малозначительным (C_S=const);
2. в анализируемом образце должны отсутствовать дополнительные источники питания микроорганизмов ($\Sigma C_{Si} = 0$) для размножения микроорганизмов ($C_{кл}$=const);
3. в анализируемом образце должны отсутствовать ингибиторы ($C_I = 0$) и яды приводящие к гибели клеток и деструкции ферментных комплектов живых клеток;
4. скорость образования и расходования всех промежуточных продуктов (веществ) одинаковы в течение всего времени протекания процесса в стационарном режиме, то C_i = const; $dC_i/d\tau = 0$.

Тогда скорость утилизации субстрата C_S ферментами живых клеток $C_{кл}$ будет пропорциональна изменению концентрации метаболитов C_P при соблюдении вышеуказанных условий ($C_{кл}C_S$ = const) и равна константе скорости нулевого порядка:

$$w = dC_P/d\tau = k \qquad (2)$$

где $k = k` C_{кл} \cdot C_S$ – константа скорости нулевого порядка.

После интегрирования (2) получаем уравнение прямой, тангенс угла наклона которой равен константе скорости реакции (k):

$$C_P = C_{Po} + k\tau, \qquad (3)$$

где C_{Po} –концентрация продукта в начальный момент времени ($\tau = 0$).

Константа скорости не является относительным параметром, поэтому впервые введено понятие суммарной ферментативной активности по субстрату (a^S), характеризующее активность 1 клетки.

Отношение константы скорости реакции (k) к количеству клеток ($C_{кл}$) (или концентрации ферментов) определяем как удельную суммарную ферментативную

активность (СФА) микроорганизма по отношению к субстрату (S) при анализируемой температуре:

$$a^S = k/C_{кл} \qquad (4)$$

где a^S– показатель суммарной ферментативной активности по субстрату, k – константа скорости нулевого порядка.

При выполнении всех вышеперечисленных условий субстратный способ характеризует анализируемый объект по определенному субстрату.

Методологически объект исследования разводится в дистиллированной воде, вносится субстрат и определяется скорость образования основного продукта по изменению удельной электрической проводимости или показателя кислотности.

Природа и содержание продуктов, образующихся в условиях анализа, определены на основании литературных данных, данных хромато-масс-спектрометрического и титрометрического методов. В частности, для дрожжей в аэробных условиях основным электропроводящим продуктом является угольная кислота, образующаяся в результате гидролиза углекислого газа, для лактобактерий и бифидобактерий – молочная кислота.

Для пересчета удельной электропроводности (мСм/м) слабодиссоциирующего электролита в его концентрацию теоретически получено выражение, при условии что $1-\alpha \approx 1$ (4) и рассчитаны коэффициенты А степенной (n=2) зависимости для основных метаболитов:

$$C_P = \frac{\kappa^2}{\lambda_\infty^2 K_a 10^4} = A \cdot \kappa^2, \qquad (4)$$

где Cp – концентрация основного метаболита, моль/дм^3, λ_∞ - молярная электрическая проводимость при бесконечном разбавлении, См·см^2/моль; K_a - константой диссоциации кислоты, моль/дм^3, κ – значение удельной проводимости раствора метаболита, мСм/м, при этом: для углекислоты – A=1,45*10^{-3}, для молочной кислоты – A=5,97*10^{-6}.

Степенная зависимость концентрации основного диссоциирующего продукта в анализируемой среде от ее электропроводности подтверждена экспериментально (5):

$$C_P = A \cdot (\kappa_t - \kappa_0)^i, \qquad (5)$$

где А – множитель при степенной функции, κ_0 и κ_t - значение начальной и текущей удельной электропроводности и (мСм/м), i – показатель степени.

Из экспериментальных данных вычислены параметры зависимости концентрации угольной и молочной кислот от электропроводности, которые составили A = $8 \cdot 10^{-4}$, i=1,997 (R = 0,998), молочной - A = $2 \cdot 10^{-5}$, i=1,733 (R = 0,998) при 20 ºС, соответственно.

Выражение (5) использовано для перевода экспериментальных данных электропроводности в единицы концентрации основного метаболита.

1. Определение СФА хронокндуктометрическим методом

1.1. Значения СФА дрожжевых препаратов

Из литературных данных известно, что ферментативная активность дрожжевых препаратов обычно определяется по зимазной и мальтазной активности с использованием газометрического метода (выделение CO_2), продолжительность анализа при этом составляет не менее 60 минут.

Нами предложен экспрессный (15 минут) хронокондуктометрический субстратный способ определения ферментативной активности препаратов. Способ основан на регистрации изменения электропроводности анализируемой среды дрожжей в результате ферментативного превращения внесенного субстрата. В качестве субстратов выбраны углеводы (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза), которые расщепляются до углекислоты и воды (основные метаболиты). Зависимости изменения электропроводности и концентрации углекислоты от времени в результате ферментативного превращения субстратов представлены на рис. 1-2. Концентрацию углекислоты рассчитывали по выражению (5).

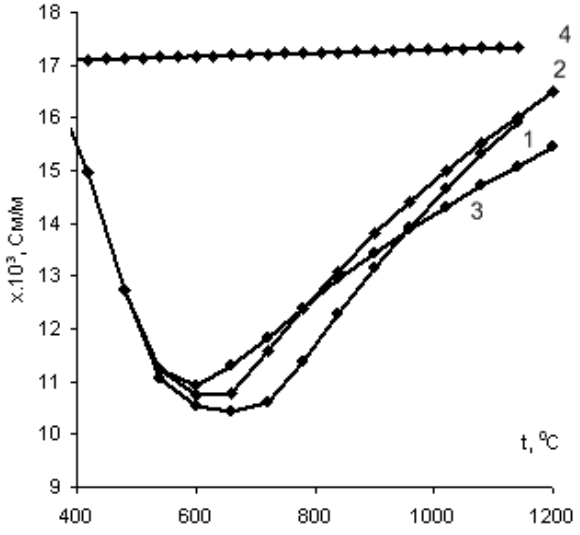

Рис. 1. Изменение проводимости анализируемой среды (прессованные дрожжи) с внесением субстратов: 1-глюкозы (k = 0.0125), 2 – фруктоза (k = 0.0106), 3- сахароза (k = 0.0077), 4- без внесения субстрата (k = 0.0003) t = 20ºC.

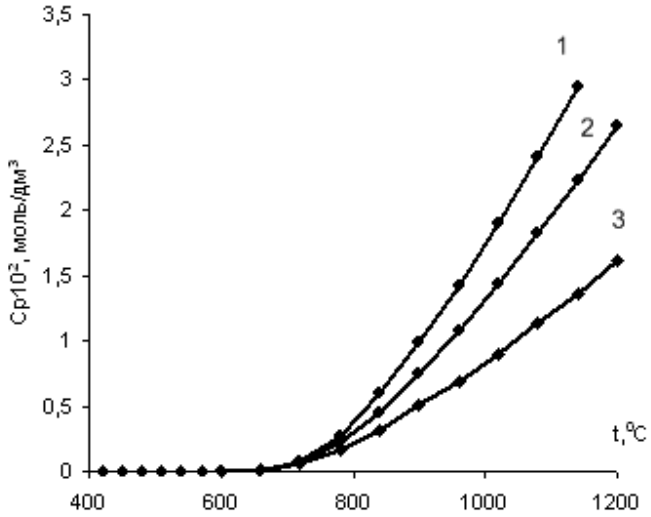

Рис. 2. Изменение концентрации углекислоты в анализируемой среде (прессованные дрожжи) при внесении субстратов: 1-глюкозы (k = $7\cdot10^{-5}$), 2 – фруктоза (k = $6\cdot10^{-5}$), 3- сахароза (k = $3\cdot10^{-5}$) t = 20ºC.

Из рис. 1-2 видно, что временная зависимость от концентрации основного метаболита имеет более выраженный линейный характер. Константа скорости ферментативных реакций равна тангенсу угла наклона регрессионной прямой.

Тангенс угла наклона линейного участка на графике зависимости концентрации основного метаболита от времени равен константе скорости нулевого порядка [моль/(дм^3·с)]. Тогда СФА, выраженная в единицах концентрации [моль/(с кл.)], показывает количество молей основного метаболита, образовавшееся за секунду при расщеплении субстрата одной клеткой, и пригодна для сравнительного анализа.

Каждый из субстратов расщепляется с определенной скоростью и характеризуется константой скорости реакции расщепления (ферментации). Значения СФА дрожжевых препаратов по различным субстратам (a^S) в единицах концентрации (выражение 4) представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Значения СФА дрожжей в анализируемых препаратах по углеводным субстратам при t = 20^0C.

$a^{S}\cdot 10^{13}$ моль/(с кл.)			
Субстрат	препарат		
	Пивоваренные низовые дрожжи Saccharomyces carlsbergensis	Сухие хлебопекарные дрожжи «Сафт-момент	Прессованные хлебопекарные дрожжи
Глюкоза	0,14±0,02	3,0±0,5	2,1±0,3
Фруктоза	1,1±0,2	0,8±0,1	1,9±0,3
Сахароза	0,27±0,04	1,7±0,3	1,6±0,2
Мальтоза	0,8±0,1	1,5±0,2	1,1±0,2

Значения СФА хлебопекарных дрожжей по мальтозе и глюкозе, найденные предлагаемым способом, хорошо согласуются со значениями СФА, рассчитанными по нормативам газометрического метода определения мальтазной и зимазной активности хлебопекарных дрожжей - 1,54 10^{-13} моль/(с·кл.) и 2,2 10^{-13} моль/(с·кл.), соответственно. Кроме того, субстратный способ определения СФА в три раза менее продолжительный (10 мин), чем газометрический (не менее 60 мин).

Оценено влияние потерь углекислого газа в атмосферу при определении СФА дрожжевых препаратов, которые составляют 0,1% от образовавшегося во время анализа, что как минимум на порядок ниже погрешности метода (2%), поэтому потерями углекислого газа во время анализа можно пренебречь.

Установлено, что значение СФА в условиях эксперимента в диапазоне концентраций клеток от 10^5 до $4\cdot10^8$ кл./см^3 остается постоянным.

Предложенный субстратный способ хронондуктометрического определения СФА препаратов имеет высокую чувствительность и экспрессность и рекомендован для разработки теста для определения качества дрожжесодержащих препаратов.

1.2.Значения СФА лакто- и бифидосодержащих препаратов

Известно, что активность (специфическая) большинства пробиотических препаратов традиционно определяют по количеству жизнеспособных клеток в

препарате и кислотообразующей способности, выраженной в градусах Тернера, продолжительность анализа при этом составляет 72 часа.

Нами впервые предложено использовать для контроля качества пробиотических препаратов значение СФА. Хронокондуктометрическим субстратным способом определено значение СФА бифидо- и лактосодержащих препаратов. В качестве субстратов выбраны углеводы (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза), которые ферментируются до молочной 90% и уксусной 10% кислот (основные метаболиты). Значения СФА пробиотических препаратов в единицах концентрации представлены в таблице 2. Концентрацию основных метаболитов рассчитывали по выражению (5).

Таблица 2.

СФА пробиотических микроорганизмов (лакто- и бифидобактерий) по углеводным субстратам в пробиотиках при t = 20 ^{0}C.

препарат	$a^{S\cdot}\cdot 10^{14}$ моль/(кл. с)				
	Глюкоза	Фруктоза	Лактоза	Мальтоза	Сахароза
Бифидобактерин	2,1±0,3	4,2±0,6	0,006±0,001	4,9±0,7	0,7±0,1
Бифидогум	1,3±0,2	1,7±0,3	0,013±0,002	10,2±1,5	1,3±0,2
Лактобактерин	0,08±0,01	0,09±0,01	0,02±0,003	0,04±0,01	0,04±0,01
Ацидогум	0,020±0,001	0,020±0,003	0,022±0,003	-	0,04±0,01
Лактогум	0,013±0,002	0,010±0,001	0,021±0,001	-	0,04±0,01

Как видно, из табл.2, микроорганизмы препаратов характеризуются различными значениями суммарной ферментативной активности. Различия микроорганизмов по субстратной специфичности обусловлено биохимическими особенностями лакто-, и бифидобактерий и технологией изготовления препарата.

2. Определение СФА хроно-pH-метрическим методом

Субстратный способ также впервые реализован в хроно-pH-метрическом методе. Альтернативный метод определения СФА микроорганизма по субстрату основан на регистрации изменения кислотности среды, с последующим пересчетом в концентрацию основного метаболита (выражение 6).

$$C_P = \hat{A}\cdot(10^{-\delta\acute{I}} - 10^{-pH_0})^2, \qquad (6)$$

где C_P – концентрация основного метаболита (углекислота для дрожжей или молочная кислота для пробиотических микроорганизмов), моль/дм^3, B – экспериментально найденный множитель степенной функции, pH – текущий показатель кислотности анализируемой среды, pH_0 – начальный показатель кислотности среды.

Из экспериментальных данных вычислены параметры зависимости концентрации угольной кислоты и молочной кислоты от электропроводности, которые составили для угольной кислоты $B = 3 \cdot 10^{-9}$, (R = 0,9987), молочной - $B = 2 \cdot 10^{-10}$, (R = 0,998) при 20^0C.

Значение СФА вычислено по выражению 3, в котором константа скорости ферментативной реакции определена из временной зависимости концентрации основного метаболита. В таблице 4 представлены значения одновременного определения СФА препаратов по глюкозе хрононкондуктометрическим и хроно-pH-метрическим методами.

Таблица 4.

Значение СФА микроорганизмов в анализируемых препаратах по глюкозе, полученные двумя методами при t = 20^0C (в условиях повторяемости, n = 9).

Препарат	$a^{S\cdot} \cdot 10^{14}$моль/(с кл.)	
	Хрононкондуктометрический метод	Хроно-pH-метрический
Сухие хлебопекарные дрожжи «Сафт-момент	30±5	25±3
Прессованные хлебопекарные дрожжи	21±3	22±4
Пивоваренные дрожжи	1,4±0,2	1,1±0,3
Лактобактерин	0,08±0,01	0,05±0,01
Бифидобактерин	3,1±0,4	3,0±0,6
Бифидогум	1,3±0,2	1,0±0,2

Полученные данные практически совпадают по значениям для двух методов. Несмотря на простоту аппаратурного оборудования pH-метра, на точность его измерения влияет много факторов (стабильность электрода сравнения, чувствительность к электрическим шумам). Поэтому случайная погрешность

измерений хроно-рН-метрическим методом заметно выше хрононкондуктометрических.

3. Влияние температуры на значение СФА микроорганизмов

Важным фактором при определении активности микробных суспензий, оказывающим влияние на скорость ферментативного процесса и константу скорости, является температура.

Исследовано влияние температуры на СФА бифидо-, лактосодержащих препаратов и дрожжей в диапазоне от 4 ^{0}C до 55 ^{0}C по углеводным субстратам. Зависимость значения СФА микробных суспензий от температуры имеет сложный характер, что обусловлено генотипом и физиологическим состоянием культуры, изменением растворимости и степени диссоциации метаболитов и подвижностью ионов в анализируемой среде. Характер зависимости СФА дрожжей в единицах электропроводности по глюкозе представлен на рисунке 3.

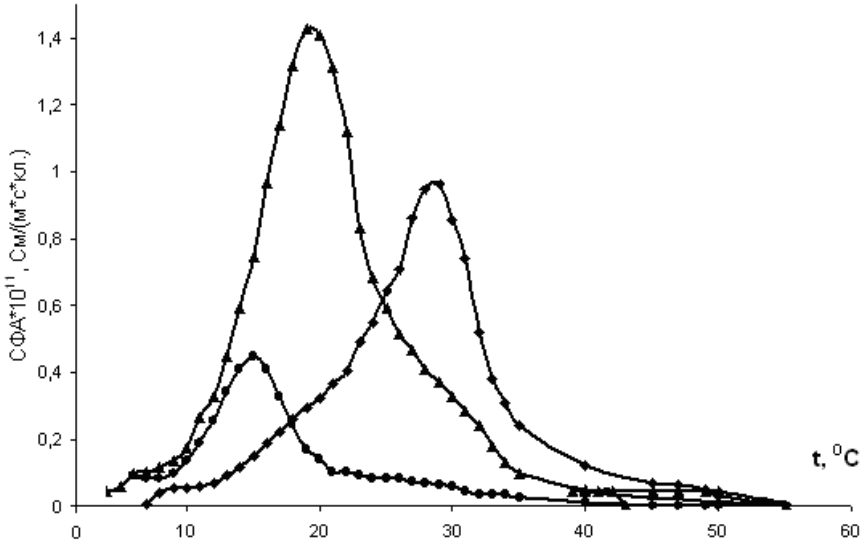

Рис. 3. Зависимость СФА дрожжевых клеток по глюкозе от температуры: ♦- прессованные хлебопекарные дрожжи, ■ - пивоваренные дрожжи, ▲ - сухие хлебопекарные дрожжи.

Из рис. 3 видно, что каждый препарат дрожжевых клеток характеризуется активностью выше среднего в диапазоне температур: для хлебопекарных сухих – 15-25^{0}C, прессованных – 23-33^{0}C, пивных 12-18^{0}C. Найденные диапазоны можно использовать в технологических процессах с участием данных микроорганизмов с максимальной эффективностью. Полученные зависимости также позволяют устанавливать температурные условия хранения препаратов.

Для пробиотических препаратов исследовано влияние температуры на значение СФА$^{(S)}$ микробных суспензий. Максимальные значения СФА исследованных препаратов представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Температура максимального значения СФА микроорганизмов в пробиотических и дрожжевых препаратах по углеводным субстратам хрононкондуктометрическим методом (в условиях повторяемости, n = 9).

препарат	мальтоза		глюкоза		фруктоза		сахароза	
	t, ^{0}C	$a^{S\cdot}\cdot10^{11}$ См/(м·с·кл.)	t, ^{0}C	$a^{S\cdot}\cdot10^{11}$ См/(м·с·кл.)	t, ^{0}C	$a^{S\cdot}\cdot10^{11}$ См/(м·с·кл.)	t, ^{0}C	$a^{S\cdot}\cdot10^{11}$ См/(м·с·кл.)
Бифидо-бактерин	22	3,9±0,6	13	16,3±2,4	12	16,5±2,5	15	3,6±0,5
Бифидогум	17	12,0±1,4	12	2,5±0,4	10	6,5±0,8	14	1,6±0,2
Лакто-бактерин	30	0,22±0,03	18	0,11±0,02	30	0,09±0,02	30	0,20±0,03
Хлебопекарские дрожжи								
Прессованные	35	0,28±0,04	30	1,9±0,3	20	0,9±0,1	20	0,9±0,3
Сухие «Сафт-момент»	30	0,51±0,08	20	1,5±0,2	20	0,14±0,02	25	0,23±0,03

Следует отметить, что температура максимальной активности исследованных препаратов по различным углеводным субстратам различается.

Различие температурных зависимостей СФА исследованных культур в препаратах по субстратам обусловлено биохимическими особенностями штаммов и предлагается использовать в качестве параметра теста на соответствие при контроле качества препарата

4. Влияние природы субстрата

Известно, что скорость утилизации субстрата живыми клетками культуры зависит от биохимических свойств культуры и природы субстратов. Нами показано, что СФА различных исследованных культур по одному и тому же субстрату отличается, также как отличается и СФА препарата по различным субстратам. Поскольку трудно установить основной продукт (метаболит) с субстратами неуглеводного типа, в таблице 4 приведены значения СФА в единицах проводимости.

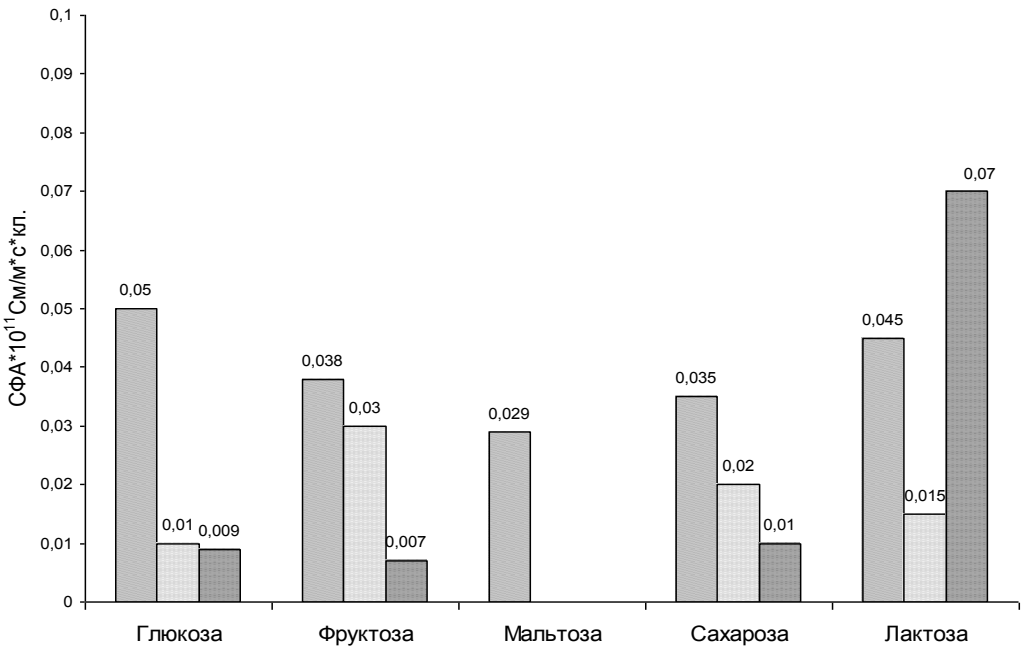

Рис. 4. Совокупность a^S лактосодержащих препаратов: ▨ - «Лактобактерин», ⬚ - «Ацидогум», ▩ - «Лактогум» по различным субстратам при t = 20ºС.

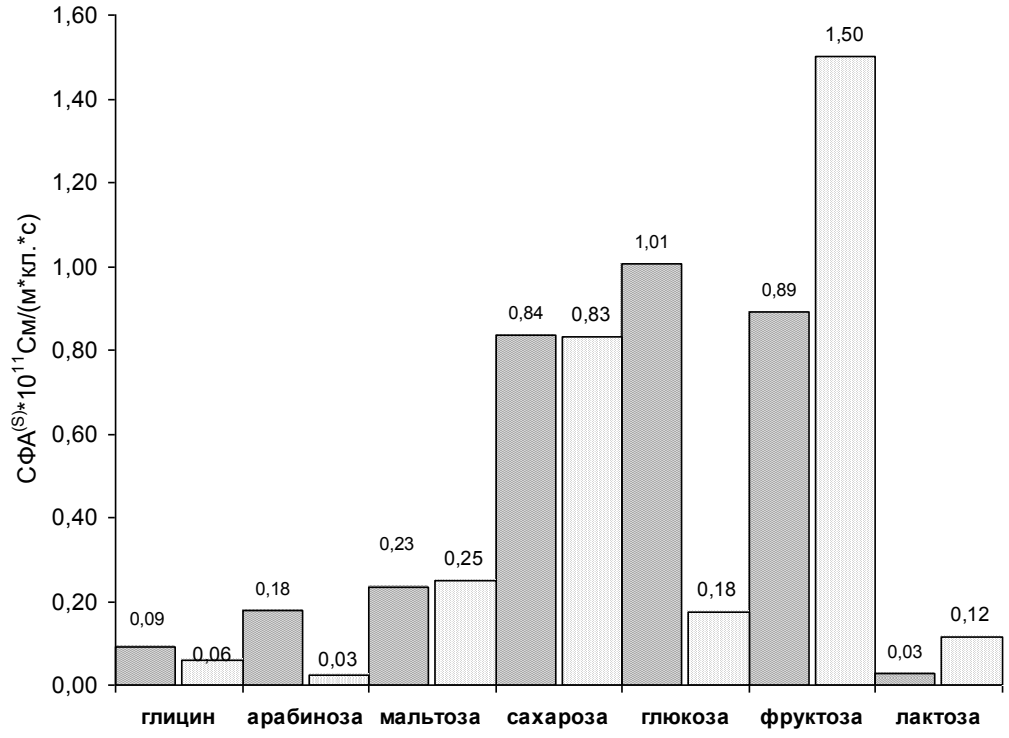

Рис. 5. Совокупность a^S хлебопекарных препаратов по различным субстратам: ⬚ - прессованные дрожжи, ▨ - сухие дрожжи «Сафт-момент» при t = 20ºС.

Следует отметить, что совокупность СФА анализируемых культур по различным субстратам (рис. 4, 5) может быть использована для контроля качества препарата в тесте на соответствие.

Установлено, что в условиях одного эксперимента концентрация клеток постоянна, следовательно, значения СФА микробной суспензии можно использовать для определения количества клеток в препарате (выражение 4).

Исследовано количество живых клеток в пробиотических препаратах до и после сублимации в различных сублиматорах субстратным хронокондуктометрическим методом. Установлено, что после сублимации (1 сутки) количество живых клеток в препарате, определенное как микроскопическим, так и хронокондуктометрическим методом, уменьшается на порядок за счет гибели и повреждения клеток.

Таким образом, субстратный способ хронокондуктометрического определения активности микроорганизмов имеет ряд преимуществ по сравнению с уже известными методами контроля качества пребиотических препаратов (табл.4).

Таблица 4.

Сравнение способов определения ферментативной активности микроорганизмов в препаратах

Параметр	Микробиологический ФСП (специфическая актвисноть)	Газометрический (бродильная активность)	Субстратный хронокондуктометрический	
			Лакто и бифидобактерии	дрожжи
Время анализа	2- 3 суток	120 минут	10-15 минут	
Используемые реактивы	Питательные среды Блаурокка	Дистиллированная вода	Дистиллированная вода	
Используемое оборудование	Пробирки, термотат	Аппарат Ельницкого	Хронокодуктометрический анализатор	

Хронокондуктометрический субстратный способ прост в исполнении, характеризуется экспрессностью, минимальным расходом реактивов, настройкой на любой препарат, содержащий живые клетки микроорганизмов, низкой

величиной стоимости приборов и может быть рекомендован для разработки методик определения ферментативной активности микроорганизмов в препаратах и проведения теста на соответствие.

Результаты исследования СФА препаратов хронокондуктометрическим субстратным методом использованы для разработки макета прибора «Экспресс-анализатор метаболической активности биокатализаторов» (экспресс-анализатор МАБ). Макет прибора содержит три независимых аналитических ячейки, каждая из которых оснащена кондуктометрическим датчиком и термодатчиком. Реализовано два варианта перемешивания содержимого ячейки (вибрация, барботирование). Для макета прибора разработано специальное программное обеспечение[2], позволяющее проводить анализ и обработку экспериментальных данных, настраивать на новый объект. Разработанный макет экспресс-анализатора прошел апробацию на биотехнологических предприятиях Томска: филиала ФГУП НПО «Микроген» в г. Томск НПО «Вирион» и ОАО «Томское пиво». Экспресс-анализатор «МАБ» можно использовать для экспресс-контроля качества полупродуктов, продуктов и сред в биотехнологических производствах, микробиологических и экологических лабораториях.

[2] Программное обеспечение разработано программистом ИДО НИ ТПУ Голодниковым В.В.

Таблица 3

Значение СФА микроорганизмов в пребиотических препаратах по субстратам при t = 20^0C (в условиях повторяемости, n=9)

Препарат		$a^{S\cdot}\cdot10^{11}$ (См/м·с Кл) по субстратам							
		Глюкоза	Фруктоза	Арабиноза	Мальтоза	Сахароза	Лактоза	Аспарагиновая кислота	Мочевина
Дрожжевые препараты	Пивоваренные дрожжи S, carlsbergensis	0,42±0,06	0,7±0,1	0,05±0,01	0,15±0,02	0,14±0,02	0,04±0,01	-	-
	Прессованные дрожжи	1,0±0,2	0,9±0,1	0,18±0,03	0,23±0,04	0,9±0,1	0,030±0,004	0,072±0,004	0,05±0,01
	Сухие дрожжи «Сафт-момент»	1,5±0,2	0,12±0,02	0,25±0,04	0,8±0,1	0,08±0,01	0,017±0,003	0,06±0,01	0,08±0,01
	Сухие дрожжи «Приправыч»	0,9±0,1	0,35±0,05	0,23±0,03	0,08±0,01	0,07±0,01	0,01±0,003	0,06±0,01	0,06±0,01
Пробиотические препараты	Лактобактерин	0,05±0,01	0,04±0,01	-	0,029±0,004	0,04±0,01	0,05±0,01	0,50±0,08	-
	Ацидогум	0,011±0,003	0,032±0,005	-	-	0,020±0,003	0,030±0,003	-	-
	Лактогум	0,009±0,001	0,007±0,001	-	-	0,011±0,002	0,07±0,01	-	-
	Бифидобактерин	1,6±0,2	1,9±0,3	0,50±0,07	2,6±0,4	0,22±0,03	0,003±0,0005	4,0±0,6	-
	Бифидогум	0,45±0,09	1,2±0,2	-	5,9±0,9	0,61±0,08	0,0030±0,0005	6,2±0,9	-
	Бифидум	0,61±0,09	1,0±0,2	0,62±0,09	0,8±0,1	0,8±0,1	-	-	-
	Бифишка	1,4±0,9	10,9±1,6	-	2,9±0,4	11,5±1,7	-	-	-
	Биовестин-бифидо	6±1	8,1±1,2	-	-	10,6±1,6	-	-	-
	Биовестин-лакто	2,2±0,3	0,9±0,1	-	-	4,8±0,7	1,3±0,2	-	-
	Наринэ-форте	1,8±0,3	2,6±0,4	-	-	3,1±0,5	1,3±0,2	-	-

Выводы

1. Впервые сформулированы основные положения субстратного способа определения СФА микроорганизмов, основанного на превращении внесенного определенного субстрата живыми клетками в метаболит в условиях их голодания, и определении электропроводящего метаболита электрохимическим методом. Впервые введен показатель СФА препарата по субстрату как параметр качества препарата.
2. Впервые разработан экспрессный принцип методики определения СФА микроорганизмов по субстрату с использованием метода хронокондуктометрии, включающий регистрацию изменения удельной электрической проводимости с дальнейшим пересчетом ее на концентрацию основного метаболита. Разработанный алгоритм определения СФА реализован в макете прибора «Анализатор метаболической активности биокатализаторов».
3. Впервые разработан экспрессный принцип метод определения СФА микроорганизмов по субстрату с использованием метода хроно-pH-метрии, включающий регистрацию изменения кислотности среды с дальнейшим пересчетом ее на концентрацию основного метаболита.
4. Впервые определены значения СФА препаратов, содержащих дрожжевые клетки рас *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* и пробиотические микроорганизмы штаммов *L.Plantarum 8P-A3* и *Bifidobacterium bifidum*, по углеводным субстратам и предложено использовать для контроля качества препаратов.
5. Установлена функциональная зависимость СФА пребиотических препаратов от температуры, позволяющая использовать их в тесте на соответствие при контроле качества препаратов. Установлено, что совокупность СФА микроорганизмов в препаратах по различным субстратам, можно использовать как параметр качества препарата.
6. Впервые предложено использовать показатель СФА препарата в качестве альтернативного, экспрессного способа определения количества клеток в препарате.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Патент на полезную модель №76340 МПК (2006.01) C12 M1/00, C12 M1/34; C12 M1/18; C12 M1/04; C12 M1/02 от 14. 04. 2008 Анализатор метаболической активности биокатализаторов Бакибаев А.А., Яговкин А. Ю., **Асташкина А.П.,** Медведев Д. М., и др.
2. **Асташкина А.П.**, Яговкин А.Ю., Жук В.В., Бакибаев А.А., и др. Экспресс-анализатор микробной активности в культуральных средах // Биотехнология XXI века: проблемы и перспективы – 2007. – г. Москва. – Инноватика, 2007. – С. 145-146.
3. **Асташкина А.П.**, Яговкин А. Ю., Бакибаев А. А. Кондуктометрический метод определения метаболической активности биокатализаторов // Электрохимические методы анализа в контроле и производстве: Материалы региональной научно-практ. конф., посвященной 70-летию со дня рождения А.А. Каплина – г. Томск, 29–30 октября 2007. – Томск: Изд. ТПУ, 2007. – С. 50–51.
4. **Асташкина А.П.**,. Яговкин А.Ю, Бакибаев А.А.. Электрохимический способ определения метаболической активности микроорганизмов// Аналитика и Аналитики: Рефераты докладов II Международного форума г. Воронеж, 15-21 ноября 2008.– Воронеж: Изд. ВГТА, 2008. – Т. 2. – С.501.
5. **Асташкина А.П.**, Яговкин А.Ю., Бакибаев А.А.. Электрохимический способ определения метаболической активности клеток // Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2008: Материалы VIII научной конф. – г. Томск, 13–18 октября 2008. – Томск: Изд. ТПУ, 2008. – С. 178.
6. **Асташкина А.П**., Яговкин А.Ю., Бакибаев А.А. Субстратный способ определения СФА дрожжевых клеток // Вестник Казанского технологического университета. Серия: Прикладная химия и технология. – 2009. – №2. – С.96–102.
7. **Асташкина А.П.**, Бакибаев А.А., Яговкин А.Ю., Шарахова О.В. Субстратный способ определения суммарной ферментативной активности лактобактерий //Сибирский медицинский журнал. Серия: Медицина.– 2009.– № 3. – С.46–48.
8. **Асташкина А.П**., Бакибаев А.А., Яговкин А.Ю., Шарахова О.В. Кондуктометрический субстратный способ определения суммарной ферментативной активности препаратов, содержащих бифидобактерии // Сибирский медицинский журнал. Серия: Медицина. – 2009. – № 3. – С.48–50.
9. **Асташкина А.П.**, Асташкина М.П. Субстратный метод для оценки жизнеспособности клеток суспензионных и каллусных культур // Материалы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» / Отв. ред. И.А. Алешковский, П.Н. Костылев, А.И. Андреев. М.: Изд-во МГУ. – 2009. –С.2–3.
10. **Асташкина А.П.** Исследование процесса старения прессованных дрожжей субстратным способом // Химия и химическая технология в XXI веке: Материалы X Юбилейной всероссийской конференции студентов и аспирантов – г. Томск, ТПУ, 13-15 мая 2009. – Томск: Изд. ТПУ, 2009. – С.145.
11. **Асташкина А.П.**, Яговкин А.Ю., Бакибаев А.А. Температурные зависимости суммарных ферментативных активностей суспензий пробиотиков // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2010.– Т. 53. – № 2. – С.114–116.
12. **Асташкина А.П.**, Яговкин А.Ю., Бакибаев А.А. Субстратный способ определения суммарной ферментативной активности микроорганизмов // Евразийский симпозиум по инновациям в катализе и электрохимии: Материалы международного научно-

практ. симпоз., посвященного 100-летию академика Д.В. Сокольского. – Алматы, 26-30 мая 2010. – Алматы, 2010. – С.99.
13. **Асташкина А.П.**, Яговкин А.Ю., Бакибаев А.А. Хронокондуктометрический способ и прибор для определения показателя суммарной ферментативной активности при контроле процесса производства дрожжей и пробиотиков» // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы III Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых – г. Бийск, 28-30 апреля 2010.– Бийск: Изд. Наукоград, 2010. – С.29–30.
14. **Асташкина, А.П**. Современные взгляды на биологическую роль бифидо- и лактобактерий А.П.Асташкина // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: химия, биология, фармация – 2010.– № 1.–С.133–139.
15. **Асташкина А.П.**, Яговкин А.Ю., Демешева М.И., Бакибаев А.А Экспрессный субстратный способ контроля биотехнологических процессов и продуктов. // Биотехнология и биомедицинская инженерия: Материалы III Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 75-летию Курского государственного медицинского университета, с международным участием – г. Курс, 7-8 июня 2010. –: Курск: Изд. КГМУ Росздрава, 2010. – С.29–30.
16. **Асташкина А.П.,** Медведев Д.М., Тартынова М.И., Бакибаев А.А. Хронокондуктометрический субстратный способ определения суммарной ферментативной активности бифидо-, лактосодержащих биопрепаратов //Теоретическая и экспериментальная химия: IV-я Международная конференция, посвященная М.И. Бакиеву – Караганда, 4-5 октября 2010. – Караганда: КарГУ, 2010. – С.17-21.
17. **Асташкина А.П.,** Тартынова М.И, Медведев Д.М., Бакибаев А.А. Хронокондуктометрический субстратный способ определения активности дрожжей // Вестник Казахского нац. университета. Серия химическая – 2010. – Т. 60 – № 4. – С.221–225.

Автор выражает благодарность консультанту – к.х.н., Яговкину А.Ю. за всестороннюю помощь при подготовке и написании диссертационной работы, д.х.н., профессору, заведующему каф. ЭБЖ ИНК Романенко С.В. за помощь в постановке ряда экспериментов, инженеру каф. ФАХ Медведеву Д.М. за консультативную помощь при написании диссертационной работы, также хочется поблагодарить за внимательное отношение и конструктивные предложения по работе д.х.н., проф. каф ФАХ Колпаковой Н.А., к.х.н., доценту каф. ФАХ Пикуле Н.П., к.х.н., доценту каф. ФАХ Михеевой Е.В., к.х.н., доценту каф. ФАХ Тартыновой М.И.