

**МИНСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

**На правах рукописи  
УДК 575.113:633.15**

**КИРИЧЕНКО НИНА ВЛАДИМИРОВНА**

**ТЕМА: СОЗДАНИЕ НОВОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА  
ОБОГАЩЁННОГО СВОБОДНЫМ ВИТАМИНОМ «А» И  
ПРОБИОТИКАМИ**

**Диссертационная работа на соискание академической степени  
магистра по специальности 5А5522907 «Биотехнология пищевых и  
кормовых продуктов».**

**Научный руководитель  
д.х.н., профессор**

**М. С. Ташмухамедов**

**Работа рассмотрена и  
рекомендовано к публичной защите  
на основании решения заседания  
кафедры «Биотехнологии»**

**От «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.**

**Заведующий кафедрой  
д.х.н., профессор**

**М.С. Ташмухамедов**

**Декан факультета «Технологии  
пищевых производств», к.т.н., доц.**

**Ш. Муталов**

**Ташкент - 2011**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. Литературный обзор. Роль витамина "А" и кисломолочных продуктов содержащих пробиотики в поддержании иммунитета.....	8
1.1. Эволюция представлений о роли кишечной микрофлоры.....	8
1.2. Пробиотики: лакто - и бифидобактерии, их роль по восстановлению микрофлоры кишечника.....	11
1.2.1 Пути восстановления и поддержания микробиоценоза кишечника.....	13
1.2.2. Симбиоз человека и полезных бактерий.....	14
1.3. Витамины и их роль в создании иммунитета.....	16
1.3.1. Витамин «А» и его свойства.....	17
1.4. Методика определения витамина «А» высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).....	23
Глава 2. Экспериментальная часть. Материалы и методы.....	30
2.1. Характеристика объектов исследования.....	30
2.1.1. Получение закваски.....	30
2.1.2. Приготовление продукта на основе лактобактерий.....	30
2.1.3. Приготовление продукта на основе бифидобактерий.....	30
2.1.4. Приготовление продукта с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий.....	31
2.2. Разработка методики определения провитамина «А», ретинола пальмитата, ретинола ацетата и свободного витамина «А».....	31
2.2.1 Выделение $\beta$ – каротина из сока моркови.....	31
2.2.2. Выделение $\beta$ – каротина из образца молочного продукта с лактобактериями.....	32
2.3. Разработка методов анализа стандартных образцов $\beta$ – каротина, ретинола, ретинола пальмитата, ретинола ацетата с помощью ВЭЖХ..	32
2.3.1. Разработка методов анализа стандартного образца ретинола и его эфиров на ВЭЖХ.....	32

2.3.2. Метод получения стандартного образца ретинола из ретинол - пальмитата.....	33
2.3.3. Метод получения стандартного образца ретинола из ретинол - ацетата.....	33
2.4. Выделение каротиноидов из приготовленного молочного продукта, а также из сока моркови с помощью ВЭЖХ.....	34
2.4.1. Метод выделения $\beta$ – каротина из экстракта, полученного из сока моркови.....	34
2.4.2. Метод выделения $\beta$ – каротина из экстракта, полученного из молочного продукта с лактобактериями.....	34
2.4.3. Метод выделения $\beta$ – каротина из экстракта, полученного из молочного продукта с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий...34	
Глава 3. Обсуждение результатов.....	35
3.1. Подбор комбинированного состава заквасок содержащего более эффективные пробиотики и дополнительные ингредиенты для разрабатываемого молочного продукта.....	35
3.2. Выделение $\beta$ – каротина из красной моркови.....	38
3.3. Получение стандартного образца ретинола – витамина «А» из ретинола-пальмитата и ретинола-ацетата.....	42
3.4. Разработка способа получения молочного продукта обогащённого витамином «А» и содержащего лакто – и бифидобактерии.....	55
3.5. ВЭЖХ анализ полученного молочного продукта на содержание витамина «А».....	57
Выводы .....	63
Список литературы.....	64

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Проблема иммунитета в последние годы становится очень актуальной для человека. Иммунитет в человеческом организме на 70% обусловлен наличием и полноценным функционированием полезной микрофлоры, находящейся в желудочно-кишечном тракте [1].

Количество полезных для человека микроорганизмов насчитывают около 500 видов. Однако, полная или частичная стерилизация пищевых продуктов и использование консервантов приводит к различным видам дисбактериоза. В результате страдает иммунная система человека [1].

Для решения этой проблемы выпускается большое разнообразие йогуртов, полученных или обогащённых разными видами полезных микроорганизмов. Использование для питания разнообразных йогуртов не всегда даёт результат по восстановлению иммунной системы.

Для решения этой проблемы в настоящей работе предлагается новый молочный продукт обогащённый витамином «А» и содержащий полезные микроорганизмы.

При авитаминозе витамина «А» отмечается повышенная восприимчивость организма к инфекции. Витамин «А» не только влияет на рост человека, но и способствует повышению сопротивляемости к различным видам инфекции. Витамин «А» в нашей иммунной системе борется с вирусами, бактериями и другими возбудителями болезней, а также повышает устойчивость к простудам, ангине, гриппу и бронхиту. Витамин «А» обладает также и рядом важных системных эффектов: необходим для деления и дифференцировки клеток эпителиальных тканей; функционирования органов зрения; оказывает хороший лечебный эффект при гастрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки; способствует быстрому заживлению ран и выздоровлению после оперативных вмешательств. Дефицит витамина «А» снижает активность иммунитета при проникновении в организм инородных белков, но прием этого витамина восстанавливает ее. Поскольку организм обладает

способностью накапливать витамин «А», его бесконтрольный прием иногда приводит к тому, что он начинает оказывать токсическое действие. Однако, если организму нужен витамин «А», он сам может производить его из провитамина  $\beta$  – каротина [2,24,34]. Таким образом, витамин «А» полезен и необходим для жизнедеятельности организма человека.

Большой плюс в повышении, укреплении иммунитета приносят полезные кисломолочные продукты, прежде всего йогурты и кефиры, обогащённые полезными микроорганизмами. Они заселяют желудочно-кишечный тракт «хорошими» бактериями.

Организм человека населяет многообразнейший мир бактерий. Только в полости желудочно-кишечного тракта обитает около 300 их видов, а масса обитающих в организме микробов достигает 4 кг. Многообразие видов бактерий, присутствующих в здоровом организме, находится в относительном равновесии - одни размножаются, другие гибнут. Но в определённых условиях это равновесие нарушается, что приводит к возникновению дисбактериоза. Причиной дисбактериоза является появление патогенных бактерий в организме человека. Другой причиной является длительный приём сильнодействующих антибиотиков, которые убивают всю микрофлору кишечника, в том числе и здоровую. Третья причина – отсутствие ферментов, участвующих в переваривании некоторых продуктов.

При дисбактериозе нарушаются важные обменные процессы организма, например, витаминный и минеральный, а также снижается работа иммунной системы. Для его профилактики и лечения врачами предложены пробиотики – бактерии, нормализующие состав и активность желудочно-кишечного тракта. К ним относятся лакто - и бифидобактерии. Лактобактерии способны бороться с возбудителями инфекций кишечника, обладая антибактериальным действием. Покрывая стенки кишечника и выделение защитных веществ, приводит к появлению непреодолимого барьера для патогенных бактерий. Бифидобактерии – полезные микроорганизмы, густо населяющие толстый кишечник. Количество их видов разнообразно. Отличаются они условиями

размножения, продуктами обмена веществ и т.д. Чем больше их видов, тем полноценней работает кишечник. Чтобы избежать осложнений, вызванных дисбактериозом, совместно с натуральными препаратами, врачи предлагают включать в ежедневный рацион кисломолочные продукты, обогащенные пробиотиками [33].

Проблема сохранения здоровья, поиск путей снижения неблагоприятного воздействия на организм внешней среды являются в настоящее время крайне актуальными для всех людей.

**Цель работы.** Целью настоящей работы является разработка получения кисломолочного продукта с включением в состав закваски пробиотических культур – бифидо - и лактобактерий, а так же природного  $\beta$  - каротина из моркови. Изучение закономерностей удерживания жирорастворимого витамина «А» в условиях изократической обращенно-фазовой ВЭЖХ, оптимизация условий дифференцированного разделения и разработка аналитических методик определения содержания витамина «А» в готовом молочном продукте.

**В соответствии с поставленной целью определены следующие задачи исследований:**

- подбор комбинированного состава заквасок содержащего более эффективные пробиотики и дополнительные ингредиенты для разрабатываемого молочного продукта;
- разработать методику выделения  $\beta$  – каротина из красной моркови;
- разработать методику получения стандартных образцов ретинола – витамина «А» из ретинола-пальмитата и ретинола-ацетата;
- разработать способ получения молочного продукта обогащённого витамином «А» и содержащего лакто – и бифидобактерии;
- анализ полученного молочного продукта на содержание витамина «А» с помощью метода ВЭЖХ.

**Научная новизна.** Изучены свойства штаммов бифидо - и лактобактерий. Установлены закономерности совместного развития бифидо - и

лактобактерий с молочнокислыми бактериями в молоке и определен состав комбинированной закваски, содержащей бифидо - и лактобактерии, для кисломолочного продукта с пробиотическими свойствами. Исследовано влияние комбинированной закваски и технологических факторов (температуры пастеризации, кислотного способа коагуляции) на формирование структуры продукта и определены основные технологические параметры, позволяющие получать продукт с заданными свойствами.

Разработаны стандартные методики ВЭЖХ анализа ретинола, ретинола-пальмитата, ретинола-ацетата и  $\beta$  – каротина. Изучено кинетика щелочного гидролиза ретинола-ацетата и ретинола-пальмитата.

Исследовано хроматографическое поведение витамина «А» при элюировании бинарными и трехкомпонентными водосодержащими подвижными фазами применением различных растворителей.

Разработана стандартная методика определения жирорастворимого витамина «А» в готовом молочном продукте.

**Практическая значимость работы.** Разработанный способ получения молочного продукта с пробиотическими свойствами, а так же обогащённого свободным витамином «А» даёт основу к разработке промышленной технологии и внедрению в молочную промышленность.

Разработанные методики количественного определения ЖРВ и каротиноидов можно применять в научных исследованиях и в производстве.

## **Глава 1.**

### **Обзор литературы.**

Роль витамина "А" и кисломолочных продуктов содержащих пробиотики в поддержании иммунитета.

#### **1.1. Эволюция представлений о роли кишечной микрофлоры**

Учение о роли симбионтной микробной флоры для организма человека связано с именем великого русского ученого, основоположника сравнительной патологии, эволюционной эмбриологии и иммунологии Ильи Ильича Мечникова, лауреата Нобелевской премии за 1908 год. В работе "Этюды оптимизма" (1911г.) И.И. Мечников писал о том, что многочисленные ассоциации микробов, населяющих кишечник человека, в значительной мере определяют его духовное и физическое здоровье, и показал, что кожа и слизистые человека покрыты в виде перчатки биопленкой, состоящей из сотен видов микробов [Metchnikoff I., 1908]. Он считал, что долголетие человека связано с удалением условно-патогенных микроорганизмов из кишечника и предложил проводить с этой целью заселение пищеварительного тракта болгарской молочнокислой палочкой.

Первооткрыватель фагоцитоза - И.И. Мечников был убежден в том, что "дикие и вредные бактерии в кишечнике" могут и должны быть "удалены" при помощи йогурта и содержащихся в нем молочнокислых бактерий [Мечников И.И., 1946, 1950].

Первое промышленное производство йогурта было начато в 1919 году испанцем Исааком Карассо, который приобрел йогуртовую закваску в Пастеровском институте, где работал Мечников. А уже его сын Даниэль (от его имени произошло название компании "Данон") добился признания йогурта во всей Европе [78].

В начале XX века были выработаны два различных терапевтических принципа, в которых учитывалось "хорошее" и "плохое" влияние микроорганизмов на здоровье и заболевания человека:

- принцип иммунотерапии (воздействие на иммунную систему для

профилактики и терапии, для ее тренировки);

- принцип воздействия на микрофлору и использования антагонизма некоторых видов микроорганизмов, чтобы нейтрализовать или удалить патогенные бактерии.

Большую роль в развитии учения о симбионтной кишечной микрофлоре человека сыграли работы Немецкого микробиотического общества. В 1922 году А. Беккер начал опыты по использованию комплексной вакциной из флоры кишечника в лечебных целях. Он полагал, что состав микробной флоры слизистых оболочек человеческого организма различной локализации тесно взаимосвязан.

Совместно с коллегами Х. Кольбом и Х.-П. Рушем им были созданы первые препараты на основе энтерококков и *E. coli*.

Х.-П. Руш считал, что симбиоз бактерий существует у всех видов организмов, как высших, так и низших. То есть, речь идет о симбиозе между одноклеточными и многоклеточными организмами, утрата которого ведет к тем или иным нарушениям здоровья, а большая часть участвующих в процессах жизнедеятельности бактерий имеют физиологический характер. Его современник Х.С. Ланштайн показал, что микробиологическая терапия требует принципиально нового отношения к самому понятию бактерии и в настоящее время накоплены знания, показывающие, что многие бактерии имеют физиологический характер и, за счет своей локализации на слизистых организма-хозяина, образуют внутреннюю среду и по этой причине имеют огромное значение для здоровья. Основатели этого направления воспринимали различные слизистые оболочки, как части одной более крупной системы слизистых оболочек. За десятилетия до того, как возникло понятие ассоциированной со слизистыми оболочками иммунной системы (MALT), существовала концепция о "едином слизистом органе" и "взаимодействии сил" между организмом и микроорганизмами.

Цель терапии была однозначно установлена как "стимуляция собственного иммунитета". Основатели микробиологической терапии наблюдали феномен

снижения иммунитета после антибактериальной терапии. По мнению Х. Кольба, применение антибиотиков создает благоприятную почву для рецидивов и нежелательные последствия антибактериальной терапии можно предотвратить за счет применения пробиотиков. "Пробиотики дают нам возможность проводить биологическую антисептическую обработку, тем более эффективную, чем более поверхностной является воспалительная реакция, вызванная патогенными бактериями" - писал Х.-П. Руш. "Но при этом виде дезинфекции мы имеем, то неоценимое преимущество, что, воздействие оказывается только на патогенные, а не на физиологические организмы. Второе преимущество заключается в том, что при этом не поражаются, а поддерживаются клетки, за счет методов, не ослабляющих, а усиливающих конституцию". Данная методика в противоположность антибактериальной терапии была названа "пробиотическим лечением". Даже само употребление термина "пробиотики" указывает на предвидение современного развития проблематики. В. Коллат, был одним из первых, кто в 1953 году использовал этот термин, понимая под пробиотиками все важные для жизни организмы, в отличие от опасных "антибиотиков". Основатели же направления микробиологической терапии вкладывали в него содержание "культуры симбионтов" или "бактериальные препараты", понимая под этим свои вакцины для перорального и парентерального применения, а также, созданные позже, готовые препараты физиологических бактерий. Лишь много позже противопоставление "пробиотики - антибиотики" стало использоваться в более широком смысле. Эти ученые связали иммунитет с микрофлорой достаточно оригинальным образом, не потеряв при этом из виду главное: в центре внимания всегда оставался пациент, его история болезни, клинические симптомы и их динамика под действием проводимой терапии. Был сделан вывод, что микрофлора на коже и слизистых являются важным компонентом системы симбиоза человека и микроорганизмов. Но они не стали придавать флоре кишечника чрезмерно большое значение. Они весьма четко сформулировали положение, согласно которому цель

микробиологической терапии заключается не в создании "косметики для флоры кишечника", чтобы нормализовать исключительно показатели анализов стула. Иначе говоря, речь не идет о терапии стула. Приведенные выше цитаты показывают, что основное внимание было направлено на иммунную систему, которая являлась предметом медицинского и научного изучения [78,79].

## **1.2. Пробиотики: лакто - и бифидобактерии, их роль по восстановлению микрофлоры кишечника.**

Микрофлора человеческого организма неразрывно связана с организмом хозяина и находится с ним в состоянии симбиоза. Основное место обитания микроорганизмов - желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), поэтому наиболее влияние на организм хозяина оказывают микробы ЖКТ, и с нарушениями в нормофлоре ЖКТ связаны многочисленные заболевания человека. В норме микрофлора толстой кишки взрослого человека на 90 % состоит из анаэробных бактерий (бифидобактерии, бактероиды, различные споровые формы), которые носят название облигатной флоры. К сопутствующей микрофлоре, составляющей около 10 %, относят аэробные бактерии (кишечные палочки, лактобациллы и этерококки). В меньших количествах выделяются другие виды микробов - протеи, клебсиеллы, стафилококки, цитробактер, энтеробактер, дрожжи и клостридии, которые составляют остаточную (транзиторную) флору - от 0.01 до 0.001 % от общего количества микробов [20].

В настоящее время известно около 2 млн. химических соединений, из которых более 30 000 производятся в крупных масштабах. Многие из них потенциально способны вызвать негативные эффекты у человека и животных, например, препараты с установленным антимикробным действием. Степень выраженности микробиологических нарушений зависит от пути введения, дозы и длительности применения химиопрепаратов. Антибиотики широкого спектра вызывают, как правило, более ранний и выраженный дисбаланс нормальной микрофлоры. Кроме антибиотиков, и

другие лекарственные препараты потенциально способны вызывать микрoэкологические нарушения. Это наркoлогические, местноанестезирующие, рвотные, обволакивающие, желчегонные, и другие средства. Потенциально дисбиотическими агентами являются и некоторые психотропные препараты (производные фенотиазина), соли тяжелых металлов, некоторые антигистаминные средства, лекарства, содержащие эфирные масла, красители и другие антисептики. Ряд химических соединений, используемых в качестве добавок к лекарственным препаратам и пищевым продуктам (нитраты, нитриты, некоторые гормоны, противоопухолевые препараты), под влиянием нормальной микрофлоры могут трансформироваться в промутагены или мутагены и канцерогены.

К факторам, способствующим развитию дисбаланса в микробиоценозе и снижению колонизационной резистентности, можно отнести разнообразные стрессовые ситуации, смену географии местожительства, частое употребление солевых и раздражающего действия слабительных, избыточное ультрафиолетовое облучение, операционные вмешательства, бактериальные и вирусные инфекции, гормональные нарушения, возрастные переходы. Нельзя также недооценивать возможные механические повреждения целостности биопленки ЖКТ при различных вмешательствах - представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта живут на слизистых в виде тончайшей биопленки, состоящей из клеточного муцина, бактериального экзополисахарида и заключенных внутри этого матрикса микроколоний бактерий [31].

Большое влияние на функционирование нормофлоры оказывает питание. Переход на принципиально новый пищевой рацион, голодание, несбалансированное питание с резким увеличением доли углеводов, ежедневное потребление продуктов, содержащих консерванты и другие добавки, отрицательно влияющие на деятельность ЖКТ, приводят к нарушению состава и функций нормофлоры кишечника и формированию дисбактериоза [31].

### **1.2.1 Пути восстановления и поддержания микробиоценоза кишечника**

При снижении активности и количества облигатной микрофлоры возникает возможность быстрого развития в толстой кишке условно-патогенных микроорганизмов с возникновением локального воспаления (энтерита, колита) и дисбактериозов. Дисбактериоз редко исчезает сам по себе и требует специального лечения. Подход к лечению и профилактики патологических состояний, связанных с дисбактериозом, должен быть комплексным, однако обязательными компонентами восстановительной терапии являются пробиотики - живые микробные пищевые добавки, благотворно влияющие на организм хозяина, улучшая его микробный баланс. Пробиотики - это бактериальные препараты из живых микробных культур, предназначенные для коррекции микрофлоры и лечения ряда заболеваний [20]. Основоположником концепции пробиотиков является И.И. Мечников, который еще в 1903 году предложил практическое использование микробных культур-антагонистов для борьбы с болезнетворными бактериями. Исследования современной биологической и медицинской науки позволили разработать и внедрить в практику многие пробиотики, основу которых составляют живые микробные культуры. Понятие пробиотик определяется как антоним антибиотиков, т.е. "промотор жизни". Пробиотики, в отличие от антибиотиков, не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, поэтому их широко применяют для профилактики и лечения дисбактериозов. В то же время эти биопрепараты характеризуются выраженным клиническим эффектом при лечении ряда острых кишечных инфекций. Важной особенностью пробиотиков является их способность повышать противоинфекционную устойчивость организма, оказывать в ряде случаев противоаллергенное действие, регулировать и стимулировать пищеварение. В настоящее время в медицине уже широко используют гастрофарм, лактобактерин, бифидум-бактерин, колибактерин, бификол, ацилакт и другие. Преимущества пробиотиков по отношению к другим препаратам. В первую очередь - это их безвредность для организма человека

даже в концентрациях, значительно превышающих рекомендуемые для применения, а также способность ряда штаммов существенно повышать неспецифическую резистентность макроорганизма. Важнейшими свойствами некоторых штаммов бацилл являются их антагонистическая активность ко многим патогенным и условно патогенным микроорганизмам; высокая ферментативная активность, позволяющая существенно регулировать и стимулировать пищеварение; противоаллергенное и антитоксическое действия и ряд других. Задача микрофлоры – не только защищать человека от вредных вирусов и бактерий, но и участвовать в важнейших процессах жизнедеятельности человека:

- с помощью микрофлоры происходит всасывание всех витаминов и микроэлементов, поступающих из пищи;
- полезные бактерии, составляющие микрофлору, сами производят для человека до 50% суточной потребности витаминов, аминокислот и органических кислот;
- иммунитет человека вырабатывается благодаря бактериям микрофлоры кишечника, именно они выделяют интерфероностимулирующие и иммуномодулирующие вещества, а в случае гиперактивности иммунитета защищают организм от аутоиммунных заболеваний;
- микрофлора обезвреживает 50% токсинов, защищая печень;
- организм человека получает тепло от жизнедеятельности микрофлоры [20,31].

### **1.2.2. Симбиоз человека и полезных бактерий.**

Совместное проживание и ведение хозяйства человека и бифидо- и лактобактерий должно строиться на взаимовыгодной основе. Бактерии смогут хорошо выполнять свои обязанности в отношении человека, если он, в свою очередь, позаботится об условиях их существования. Ведь бактерии – это живые существа, которые, так же как человек, дышат, питаются, размножаются и боятся стрессов. Кроме того, организм человека – это большой дом, в котором живут разные жильцы, не только полезные, но и

условно-патогенные и патогенные микроорганизмы. Защитным бактериям приходится постоянно конкурировать с болезнетворными бактериями и вирусами за жилплощадь и питательные вещества, которых в организме ограниченное количество [47].

Если по какой-то причине численность бифидо - и лактобактерий сокращается, то патогенная (болезнетворная) микрофлора начинает размножаться, подавляя и вытесняя защитную микрофлору. Чем обычно вызывается такой перекокс? Если мы едим слишком много мяса, жиров и консервированной пищи, часто находимся в состоянии стресса и принимаем антибиотики, мы создаем все условия для процветания патогенной микрофлоры. Возрастные изменения и агрессивное влияние окружающей среды увеличивают шансы появления дисбактериоза. Между прочим, во время внутриутробной жизни ребенок имеет абсолютно стерильный кишечник. И только после появления на свет в его организм попадают бактерии. Грудное молоко содержит уникальные вещества, помогающие сформировать полноценную микрофлору кишечника новорожденного. Поэтому ранний переход на искусственное кормление замедляет процесс заселения кишечника полезными бактериями и способствует появлению нежелательной микрофлоры. Кстати, именно дисбактериоз, приобретённый в раннем детстве, может привести к хроническим последствиям взрослого человека. Специалисты считают, что детский дисбактериоз особенно нуждается в коррекции. Успешное лечение ребенка обычно снимает все побочные проявления дисбактериоза. Лактобактерии - одна групп полезных микроорганизмов, без участия которых нельзя представить нормальную жизнедеятельность организма. Например, лактобациллы (ацидофилус) и молочнокислые бактерии обеспечивают своевременное опорожнение кишечника, оберегают нас от аллергических реакций и запоров [31].

### **1.3. Витамины и их роль в создании иммунитета.**

Существует множество путей повышения иммунитета. Одним из более важных путей повышения иммунитета, является употребление витаминов. Витамины крайне необходимы для сохранения здоровья и нормального функционирования организма. Они влияют на усвоение организмом питательных веществ, способствуют нормальному росту клеток, стимулируют реакции обмена, протекающие в организме, активно участвуют в образовании ферментов, определяют их нормальную функцию и активность, т.е. выступают в роли кофакторов или коферментов. Недостаток, а тем более отсутствие в питании какого-либо витамина приводит к нарушению обмена веществ, снижению иммунитета [2,15].

Витамины — низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, абсолютно необходимые для нормальной жизнедеятельности организмов. Являются незаменимыми веществами, так как за исключением никотиновой кислоты они не синтезируются организмом человека и поступают главным образом в составе продуктов питания. Некоторые витамины могут продуцироваться нормальной микрофлорой кишечника. В отличие от всех других жизненно важных пищевых веществ (незаменимых аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот и т.д.) витамины не обладают пластическими свойствами и не используются организмом в качестве источника энергии. Участвуя в разнообразных химических превращениях, они оказывают регулирующее влияние на обмен веществ и тем самым обеспечивают нормальное течение практически всех биохимических и физиологических процессов в организме [6].

Химическое строение всех известных витаминов полностью установлено. Выяснены и исследованы их свойства и специфические функции в организме. Вместе с тем имеющиеся данные о механизме действия ряда витаминов не являются исчерпывающими. Специфические функции многих витаминов определяются их связью с различными ферментами. Витамин «А»

в форме ретиналя является простетической группой зрительного белка родопсина, участвующего в процессе фоторецепции; в форме ретинилфосфата он играет роль кофермента — переносчика остатков сахаров в биосинтезе гликопротеидов клеточных мембран. Витамин К осуществляет коферментные функции при биосинтезе ряда белков, связывающих кальций (в частности, протромбина), участвующих в процессе свертывания крови. Функции витаминов, не являющимися предшественниками образования коферментов и простетических групп ферментов, весьма разнообразны и связаны с осуществлением и регуляцией различных биохимических и физиологических процессов [5,10].

Снижение или полная потеря биологического эффекта витаминов может быть вызвана так называемыми антивитаминами — веществами, имеющими структурное сходство с витаминами или вызывающими модификацию их химической природы. Действие структуроподобных антивитаминов основано на конкурентных взаимоотношениях с витаминами (в частности, в биосинтезе коферментов, их взаимодействия с апоферментами) заняв место витаминов в структуре фермента, антивитамины не выполняют их специфических функций, в связи с чем развиваются различные расстройства процессов метаболизма [8].

### **1.3.1. Витамин «А» и его свойства.**

Дефицит витамина «А» снижает активность иммунитета при проникновении в организм инородных белков, но прием этого витамина восстанавливает ее. Поскольку организм обладает способностью накапливать витамин «А», его бесконтрольный прием иногда приводит к тому, что он начинает оказывать токсическое действие. Однако, если организму нужен витамин «А», он сам может производить его из провитамина  $\beta$  – каротина [7].

Витамин «А», или ретинол, - это жирорастворимое вещество, содержащееся в печени (особенно в печени рыб), а также в яичном желтке и в молочных продуктах. Каротиноиды - потенциальные предшественники провитамина «А», которые могут превращаться в ретинол в стенках

пищеварительного тракта, - присутствуют в зелени, красном пальмовом масле, окрашенных в желтый цвет фруктах и тому подобных пищевых продуктах. Относительную биологическую ценность этих различных веществ раньше выражали в международных единицах (МЕ) активности витамина «А» где 1 МЕ эквивалентна 0,3 мкг ретинола, 0,55 мкг ретинола пальмитата, 0,6 мкг  $\beta$  - каротина и 1,2 мкг других каротиноидов провитамина «А». Сами каротиноиды не только биологически менее активны, чем ретинол, но и их пищевые источники также менее эффективно обрабатываются и абсорбируются из пищеварительного тракта. Так, для получения одинакового эффекта необходимо проглотить приблизительно в 6 раз больше провитамина «А» —  $\beta$  - каротина (по массе), чем ретинола [11,16,24].

Каротаноиды - это изопреноидные соединения, синтезирующиеся многими пигментными микроорганизмами из рода *Aleuria*, *Blakeslea*, *Corynebacterium*, *Flexibacter*, *Fusarium*, *Halobacterium*, *Phycomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Sarcina*, *Sporobolomyces* и др. Всего описано около 500 каротиноидов.

Из одной молекулы  $\beta$  - каротина при гидролизе образуются две молекулы витамина А. Это имеет место, например, в кишечнике человека.

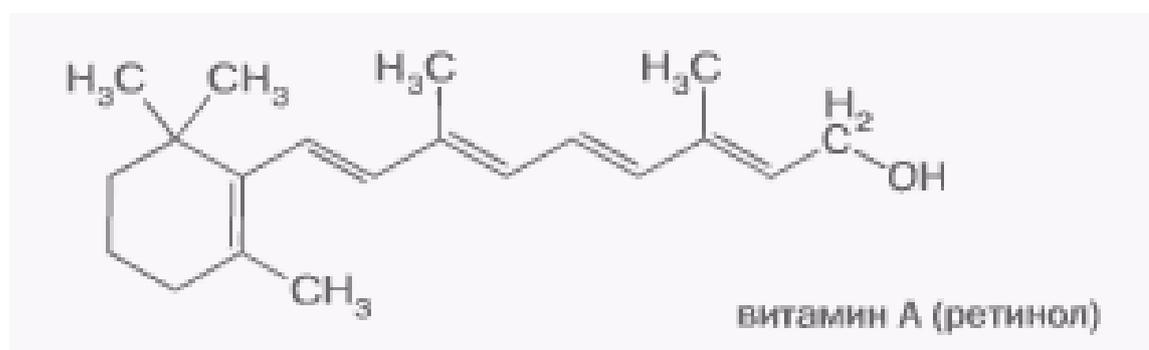
Каротиноиды локализируются в виде сложных эфиров и гликозидов в клеточной мембране микроорганизмов, либо в свободном состоянии - в липидных гранулах в цитоплазме. Каротиноид "ретиаль" у галофильного вида - *Halobacterium halobium* - соединен с белком через остаток лизина (опсиноподобный белок); он участвует в синтезе АТФ благодаря генерации транс - мембранного потенциала. В целом, основная функция каротиноидов - защитная. Их биосинтезу в клетках способствует свет [35,43].

Также витамин «А» необходим для обеспечения процессов зрения, роста, а также нормального состояния кожных и слизистых покровов. Существует мнение, что этот витамин участвует в регуляции процессов синтеза белка, а также входит в состав светочувствительного вещества в сетчатки глаз.

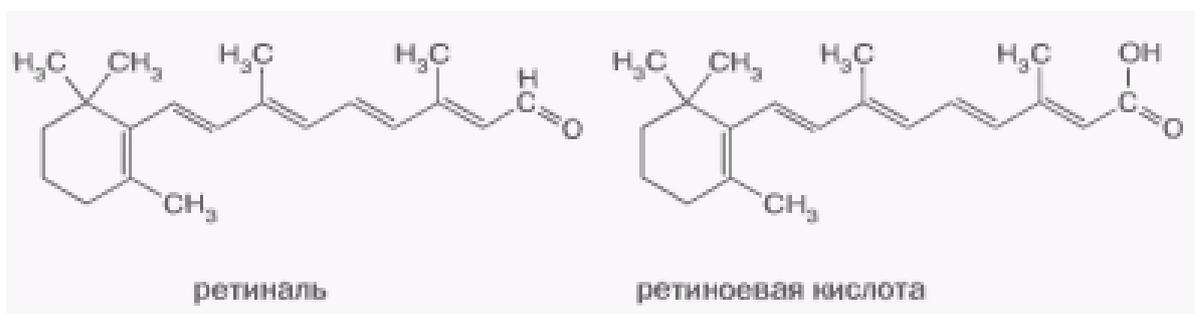
Поэтому одним из ранних признаков недостаточности витамина «А», является нарушение сумеречного зрения. При гиповитаминозе «А» человек в сумерках быстро теряет ориентировку, нечётко видит предметы, зрительные реакции его замедлены. При выраженных гиповитаминозах «А» возникают также нарушения со стороны слизистой глаза, кожных покровов: появление чувства неприятной сухости, а затем воспаления роговой оболочки глаз, что в наиболее запущенных случаях обычно может привести к полной потере зрения. У детей недостаточность витамина «А» вызывает отставание в росте.

Химическое строение и свойства. Витамин «А» был открыт в 1940 г. и назван фактором роста, так как с его удалением при экстракции корма грызунов жирорастворителями наблюдалась остановка роста и гибель мышей-отъемышей [24,26].

Жирорастворимый витамин «А» представляет собой циклический непредельный одноатомный спирт, состоящий из  $\beta$  - ионного кольца и боковой цепи из 2-х остатков изопрена и первичной спиртовой группы.



Спиртовая форма витамина «А», ретинол, в организме окисляется до ретиналя (альдегид витамина «А») и ретиноевой кислоты (вместо спиртовой группы образуется карбоксильная). Депонируется витамин «А» в печени в форме эфиров пальмитиновой и уксусной кислот (ретинилпальмитата и ретинилацетата), а также в виде ретинилфосфата [5].



Метаболизм. Витамин «А» может образовываться в слизистой кишечника и печени из провитаминов —  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -каротинов под воздействием каротиноксигеназы. Наибольшей активностью обладает  $\beta$  - каротин (из него образуются две молекулы ретинола, из других — по одной) [21].

Всасывание витамина и его провитаминов происходит в составе мицелл, затем в энтероцитах они включаются в состав хиломикронов. В крови витамин «А» связывается с ретинол связывающим белком (один из белков фракции  $\alpha$ -глобулинов). Ретинол связывающий белок обеспечивает растворимость ретинола, его защиту от окисления, транспорт и доставку в различные ткани. В сетчатке глаза ретинол превращается в ретиналь, в печени — в ретиналь и затем в ретиноевую кислоту, которая выводится с желчью в виде глюкуронидов [25].

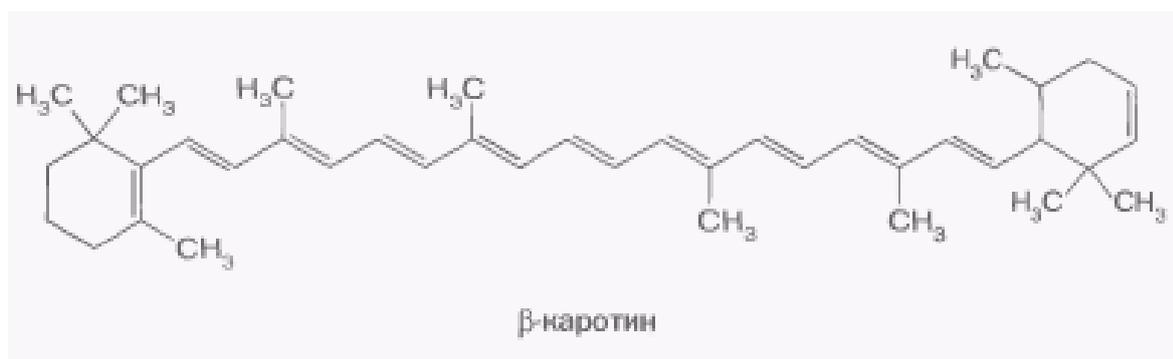
Биохимические функции. Роль витамина «А» заключается в следующем:

- Ретинол является структурным компонентом клеточных мембран.
- Регулирует рост, дифференцировку клеток эмбриона и молодого организма, а также деление и дифференцировку быстро пролиферирующей тканей, в первую очередь, эпителиальных, хряща и костной ткани. Он контролирует синтез белков цитоскелета, реакции распада и синтеза гликопротеинов. Синтез последних осуществляется в аппарате Гольджи. Недостаток витамина «А» приводит к нарушению синтеза гликопротеинов (точнее, реакций гликозилирования, т. е. присоединения углеводного компонента к белку), что проявляется потерей защитных свойств слизистых оболочек.

- Участвует в фотохимическом акте зрения.
- Является важнейшим компонентом антиоксидантной защиты организма.

- Витамин «А» и ретиноиды стимулируют реакции клеточного иммунитета, в частности, увеличивают активность Т-киллеров.
- Витамин «А» является антиканцерогеном, так как при его недостатке в организме увеличивается заболеваемость раком легкого и раком других локализаций.

Каротины (провитамины «А»), химическое строение и свойства. Каротины являются изопреноидами и образуются в растениях при фотосинтезе. Известны 3 типа каротинов:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -каротины.



Впервые каротины были выделены из моркови, отсюда и их название (*caroia* — морковь),  $\alpha$ -,  $\gamma$ -каротины содержат по одному  $\beta$ -иононовому кольцу и при их окислительном распаде образуется одна молекула витамина А. в молекуле ( $\beta$ -каротин — два  $\beta$ -иононовых кольца и он обладает большей биологической активностью, поскольку из него образуются 2 молекулы ретинола:



Реакция катализируется двумя ферментами: каротиндиоксигеназой, расщепляющей молекулу  $\beta$ -каротина в центральной его части, и редуктазой с участием коферментов NADH-H<sup>+</sup> либо NADPH-H<sup>+</sup>. Одновременный прием с пищей антиоксидантов, препятствующих окислению каротина по периферическим двойным связям, а также витамина В<sub>12</sub>, повышающего активность каротиндиоксигеназы, увеличивает количество молекул каротина, расщепляющегося по центру, и эффективность синтеза витамина «А» вследствие этого возрастает в 1,5—2 раза. Усвоению каротина способствуют также флавоноиды [29,38-39].

Главным местом превращения каротина в витамин «А» является стенка кишечника. Поскольку каротины являются жирорастворимыми соединениями, их усвоение происходит вместе с липидами.

Каротины легко окисляются кислородом воздуха, чувствительны к свету. Процесс их окисления идет аутокаталитически с образованием свободных радикалов. Витамин Е способен предохранять двойные связи в молекуле  $\beta$ -каротина от окисления.

Биохимические функции: Наличие сопряженных двойных связей в молекуле витамина «А» и каротинов обуславливает их высокую реакционную способность при взаимодействии со свободными радикалами различных типов. В молекуле  $\beta$ -каротина 11 ненасыщенных двойных связей, константа скорости реакции со свободными радикалами у него в 5 раз больше, чем у ретинола,  $\beta$ -каротин способен быть перехватчиком свободных радикалов благодаря стабилизации в его молекуле неспаренного электрона. Таким образом, каротиноиды выполняют роль антиоксидантов, перехватывая синглетный кислород и другие активные формы кислорода ( $O_2$ ,  $OH$ ,  $H_2O_2$ ). В-каротин является наиболее важным гасителем синглетного кислорода. Поскольку облучение и канцерогенез имеют свободнорадикальную природу,  $\beta$ -каротин по праву считается радиозащитным соединением и антиканцерогеном. Он обладает также антимуtagenными свойствами. Установлена обратная корреляция между содержанием в диете  $\beta$ -каротинов и частотой заболеваемости раком [43.46,63].

При избыточном потреблении каротинов у человека возможно пожелтение ладоней, подошв стоп и слизистых, однако даже в таких крайних случаях выраженных симптомов интоксикации не отмечалось. У животных более чем 100-кратное превышение дозировки  $\beta$ -каротинов увеличивало интенсивность реакций ПОЛ в тканях (прооксидантный эффект). Этого не наблюдалось в присутствии витаминов Е и С (защита молекулы каротина от окислительной деструкции).

Суточная потребность. Пищевые источники. Наибольшее количество  $\beta$  - каротинов содержится в моркови, но в различных сортах моркови их концентрация может резко варьировать (от 8 до 25 мг на 100 г сырого веса). Хорошим источником каротинов являются красный перец, зеленый лук, салат, тыква и томаты.

Суточная потребность в  $\beta$  - каротинах составляет 5 мг. [30].

#### **1.4. Методика определения витамина «А» высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC).**

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, англ. HPLC, High performance liquid chromatography) — один из эффективных методов разделения сложных смесей веществ, широко применяемый как в аналитической химии, так и в химической технологии. Основой хроматографического разделения является участие компонентов разделяемой смеси в сложной системе Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (преимущественно межмолекулярных) на границе раздела фаз. Как способ анализа, ВЭЖХ входит в состав группы методов, которая, ввиду сложности исследуемых объектов, включает предварительное разделение исходной сложной смеси на относительно простые. Полученные простые смеси анализируются затем обычными физико-химическими методами или специальными методами, созданными для хроматографии [19].

Принцип жидкостной хроматографии состоит в разделении компонентов смеси, основанном на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна [28].

Отличительной особенностью ВЭЖХ является использование высокого давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (обычно 3—5 мкм, сейчас до 1,8 мкм). Это позволяет разделять сложные смеси веществ быстро и полно (среднее время анализа от 3 до 30 мин).

Метод ВЭЖХ находит широкое применение в таких областях, как химия, нефтехимия, биология, биотехнология, медицина, пищевая промышленность,

охрана окружающей среды, производство лекарственных препаратов и во многих других.

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, лигандообменную и другие [23].

Следует иметь в виду, что в практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, эксклюзионное разделение бывает осложнено адсорбционными эффектами, адсорбционное — распределительными, и наоборот. При этом чем больше различие веществ в пробе по степени ионизации, основности или кислотности, по молекулярной массе, поляризуемости и другим параметрам, тем больше вероятность проявления другого механизма разделения для таких веществ [40].

В области изучения витаминов накоплен громадный и разнообразный материал, и он свидетельствует о том, что витамины являются органическими соединениями разной химической природы, необходимыми для обеспечения обмена веществ, лежащего в основе всех жизненных процессов. В связи с этим интерес к витаминам со временем не ослабевает, а возрастает еще больше. Особенно важной является разработка методов определения витаминов в различных объектах с целью контроля за их содержанием в продуктах питания, косметических средствах, лекарственных препаратах. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) используется в качестве стандартного метода определения ряда витаминов [49].

Задача разделения решается при помощи хроматографической колонки, которая представляет собой трубку, заполненную сорбентом. При проведении анализа через хроматографическую колонку подают жидкость (элюент) определенного состава с постоянной скоростью. В этот поток вводят точно отмеренную дозу пробы.

Компоненты пробы, введенной в хроматографическую колонку, из-за их разного сродства к сорбенту колонки двигаются по ней с различными скоростями и достигают детектора последовательно в разные моменты времени.

Таким образом, хроматографическая колонка отвечает за селективность и эффективность разделения компонентов. Подбирая различные типы колонок, можно управлять степенью разделения анализируемых веществ. Идентификация соединений осуществляется по их времени удерживания. Количественное определение каждого из компонентов рассчитывают, исходя из величины аналитического сигнала, измеренного с помощью детектора, подключенного к выходу хроматографической колонки [45,54,70].

При анализе соединений с низкими ПДК (биогенные амины, полиароматические углеводороды, гормоны, токсины) из-за трудоемкости подготовки реальных проб особенно важной характеристикой становится чувствительность и селективность метода ВЭЖХ. Применение флуориметрического детектора позволяет не только снизить пределы обнаружения, но и селективно выделить анализируемые вещества на фоне матричных и сопутствующих компонентов пробы [64].

В хроматографической системе с использованием метода ВЭЖХ могут применяться различные типы детекторов, например: Флюорат-02-2М (спектральная селекция осуществляется фильтрами) или Флюорат-02 Панорама (спектральная селекция осуществляется монохроматорами) [53].

В зависимости от природы подвижной (ПФ) и неподвижной (НФ) фазы различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографию. В нормально-фазовой ВЭЖХ НФ – полярная (чаще всего силикагель), а ПФ – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.) [41].

Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. Разделения компонентов достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы, которая

зависит от энергии взаимодействия компонентов ПФ с поверхностью НФ. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность ПФ увеличивается с ростом ее полярности. В обращенно-фазовой хроматографии

неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами С8 , С18); ПФ – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Наименьшей элюирующей способностью обладает вода, а для повышения элюирующей способности в ПФ вводят ацетонитрил, метанол и другие растворители.

Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы. Подвижная фаза, прежде всего, должна растворять разделяемые компоненты. Основными характеристиками подвижных фаз являются ее элюирующая способность и селективность. Элюирующая способность подвижной фазы – это ее способность вступать в межмолекулярные взаимодействия с разделяемыми соединениями и группами на поверхности сорбента. Эти взаимодействия способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон [41,44].

Многokратное увеличение гибкости метода ВЭЖХ достигается за счет применения в качестве подвижных фаз смесей растворителей. Принцип составления таких смесей прост. Необходимо взять два индивидуальных растворителя, один из которых имеет заведомо недостаточную элюирующую силу, а другой – заведомо избыточную, варьируя соотношение растворителей, можно получить нужную элюирующую способность. Под этим обычно имеют в виду, что на данном сорбенте данный сорбат будет иметь приемлемое значение фактора удерживания. Помимо элюирующей способности подвижная фаза должна обладать селективностью по отношению к компонентам разделяемой смеси.

Селективность подвижных фаз связана с их способностью к специфическим взаимодействиям с сорбатами, определяемыми их структурными признаками. Благодаря разному характеру взаимодействий значение элюирующей способности по отношению к сорбатам различного строения будет отличаться, что и позволит их разделить. Селективность, как и элюирующая способность, определяется в первую очередь природой более сильного компонента смеси [51].

Элюотропные ряды являются простейшей формой оценки силы индивидуальных растворителей. Они дают количественную оценку адсорбционной способности растворителей в тех или иных вариантах хроматографического разделения. Элюотропный ряд – это перечень растворителей расположенных в порядке возрастания элюирующей способности, которая может быть охарактеризована различными параметрами. В качестве таких параметров используют:

- параметр адсорбционной силы растворителя  $\epsilon^\circ$ , который представляет собой относительную энергию взаимодействия молекул подвижной фазы с поверхностью адсорбента;
- параметр  $R$  (параметр Снайдера), который рассчитывают как сумму логарифмов коэффициентов распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем;
- параметр  $S$ , который отражает чувствительность величин удерживания к изменению состава подвижной фазы. Эта величина предложена для ОФ ВЭЖХ [45].

Основой всех способов классификации селективности является различная способность растворителей вступать в межмолекулярные взаимодействия различных типов, представление интегрального параметра элюирующей силы в виде суммы парциальных величин, характеризующих протонодонорные, протоноакцепторные, диполь-дипольные и некоторые другие свойства растворителей [41].

Обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) имеет ряд преимуществ перед другими вариантами жидкостной хроматографии:

- это очень гибкий метод, так как, изменяя состав водно-органических смесей, используемых в качестве подвижной фазы, можно на одной колонке обеспечить разделение соединений различной природы;
- селективность данного метода почти всегда значительно выше, чем других вариантов хроматографии для всех соединений, кроме сильнополярных;
- при использовании гидрофобизированных силикагелей быстро устанавливается равновесие между подвижной и неподвижной фазой, эти сорбенты отличаются высокой эффективностью разделения;
- можно осуществлять разделение соединений, растворимых как в воде, так и в органических растворителях;
- возможность использования в подвижной фазе буферных растворов может улучшить селективность и эффективность разделения ионогенных соединений.

В качестве подвижной фазы обычно используют смеси растворителей, т.к. это позволяет улучшить селективность и эффективность разделения и уменьшить время необходимое для его проведения.

Меняя состав подвижной фазы в ОФЖХ, можно изменять удерживание в очень широких пределах. Почти для всех анализируемых соединений удерживание в некоторых чистых растворителях (метанол, тетрагидрофуран) пренебрежимо мало, а в чистой воде чрезвычайно велико. Поэтому, чтобы добиться приемлемого времени удерживания, обычно необходимо использовать смеси воды с органическим растворителем – так называемым модификатором.

Эти соотношения полезны как при подборе состава подвижной фазы, так при разделении, так и для идентификации компонентов смеси. Для решения каждой конкретной задачи состав как подвижной, так и неподвижной фазы должен быть тщательно подобран с точки зрения как физических, так и химических свойств ее компонентов [28,40,45].

Система для проведения разделения методом ВЭЖХ состоит из нескольких блоков: насоса, дозатора, колонки, детектора и регистрирующего устройства [65].

Целью данной работы является исследование хроматографического поведения витамина «А» при элюировании бинарными и трехкомпонентными водосодержащими подвижными фазами с применением различных растворителей.

Разработать стандартные методики ВЭЖХ анализа ретинола, ретинола-пальмитата, ретинола-ацетата и  $\beta$  – каротина. Изучено кинетика щелочного гидролиза ретинола-ацетата. А так же методики выделения  $\beta$  – каротина из сока красной моркови и выделение  $\beta$  – каротина из образцов молочного продукта.

## **Глава 2. Экспериментальная часть. Материалы и методы.**

### **2.1. Характеристика объектов исследования.**

Для приготовления испытуемого продукта использовали: цельное молоко, препараты «Бификол PL сухой» и «Лактобактерин – Ором» на основе штамма бактерий *bifidobacterium longum* полученный из ООО «Orom Biopreparat», и в качестве источника провитамина «А» - красную морковь, т.к. содержание в ней  $\beta$  – каротина составляет 10-15 мг/%.

#### **2.1.1. Получение закваски.**

Для получения закваски по методу Мусаева Ш.М. и Огай Д.К. [33] смесь содержащую препараты «Бификол PL сухой» и «Лактобактерин – Ором» в количестве по 5 доз, разведённые при температуре 30-35°C в 6 мл молока, помещали в термостат для заквашивания при температуре 35°C. По нашим наблюдениям заквашивание молока с лактобактериями происходило в течение 4 ч., а заквашивание с бифидобактериями за 8ч.

#### **2.1.2. Приготовление продукта на основе лактобактерий.**

Для приготовления основного кисломолочного продукта брали 300 мл пресного молока и сок моркови в соотношении 10% к количеству молока, смешивали и пастеризовали на водяной бане при температуре 80-85° С в течении 10 минут. После охлаждения смеси до 30-35° С, в смесь вносили готовую закваску с лактобактериями. Смесь, тщательно перемешивали и помещали в термостат при той же температуре, как для закваски, на определённое время. Как было указано выше для лактобактерий заквашивание происходит в течение 4 ч. После заквашивания продукт ставили на созревание в холодильник.

#### **2.1.3. Приготовление продукта на основе бифидобактерий.**

Приготовление продукта происходило по той же методике как на основе лактобактерий, но после охлаждения готовой смеси вносили закваску с бифидобактериями. А заквашивание происходило в течение 8 ч. Также после заквашивания продукт ставили на созревание в холодильник.

#### **2.1.4. Приготовление продукта с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий.**

Для приготовления кисломолочного продукта так же брали 300 мл пресного молока и сок моркови в соотношении 20% к количеству молока. Дальнейшее приготовление продукта происходило так же, как в предыдущих опытах, только с добавлением двух видов заквасок, т.е. лакто - и бифидобактерий. Заквашивание длилось в течение 6 ч. После заквашивания продукт также ставили на созревание в холодильник.

#### **2.2. Разработка методики определения провитамина «А», ретинола пальмитата, ретинола ацетата и свободного витамина «А».**

##### **2.2.1 Выделение $\beta$ – каротина из сока моркови.**

Для выделения  $\beta$  – каротина из сока моркови применяли метод экстрагирования [13]. 100 гр. моркови, измельчили и гомогенизировали на гомогенизаторе. Полученное пюре отфильтровывали и получили сок в количестве 45 мл, а так же сухой остаток мезги 54,2 гр. Полученный сок нагревали на водяной бане при температуре 70-75° С в течении 1,5 ч. до выпадения осадка – коагулянта белков моркови с  $\beta$  – каротином. Осадок отцентрифугировали при 8000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 и осадок отделили от жидкости. С помощью делительной воронки осадок перенесли в круглодонную колбу и заморозили с помощью жидкого азота. Затем леофильно высушивали до состояния сухого остатка с содержанием влаги не более 15%. Сушка длилась в течение 17 ч. Полученный материал экстрагировали  $CCl_4$  (в соотношении осадок с  $CCl_4$  1:4) в течение 2 ч. на аппарате Сокслет. Затем экстрагированную массу отцентрифугировали, и осадок отделили от экстракта. Далее экстракт упаривали на роторном испарителе при температуре 35°С. до получения концентрата  $\beta$  – каротина и белков. Дальнейшим этапом эксперимента является омыление полученного концентрата 10% раствором *КОН* (едкого калия). Соотношение 10% *КОН* с концентратом 1:9. Полученный раствор подогревали до 50° С и оставили при комнатной температуре до полного омыления на 15 ч. Затем в омыленную

массу добавили  $\text{CCl}_4$  в соотношении 1:1 и экстрагировали свободный  $\beta$  - каротин в течении 1,5 часа. Далее с помощью сепаратора взяли нижнюю часть раствора содержащий свободный  $\beta$  - каротин и перенесли в другую пробирку для дальнейшего испарения. Полученный экстракт так же упаривали на ротаторном испарителе при температуре  $35^\circ \text{C}$  до сухого состояния.

### **2.2.2. Выделение $\beta$ – каротина из образца молочного продукта с лактобактериями.**

С молочного продукта отобрали верхнюю часть, т. к. в верхней части собралось большее количество молочного жира, в котором максимально растворён  $\beta$  – каротин. Затем отобранную массу заморозили в холодильнике при температуре  $-20^\circ \text{C}$  в течении 2 ч. и леофильно высушивали. Дальнейший этап эксперимента проходил по той же методике, как для выделения  $\beta$  – каротина из сока моркови.

Для образцов молочного продукта с бифидобактериями и с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий выделение  $\beta$  – каротина происходило по такой же методике.

### **2.3. Разработка методов анализа стандартных образцов $\beta$ – каротина, ретинола, ретинола пальмитата, ретинола ацетата с помощью ВЭЖХ.**

#### **2.3.1. Разработка методов анализа стандартного образца ретинола и его эфиров на ВЭЖХ.**

Для разработки метода анализа применяли различные условия хроматографирования: температура, давление колонки, концентрация растворителей. Применяли различные способы хроматографирования: изократическое, градиентное разделение. В результате применения различных условий хроматографирования остановились на самом оптимальном условии, заключающемся:

Разделение проводили в изократическом режиме:

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером  $4,6 \times 250$  мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);

- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

Следует отметить, что для возбуждающей длины волны флуоресцентного детектирования принимали 280 нм, а для экстинкции 360 нм. [19].

### **2.3.2. Метод получения стандартного образца ретинола из ретинол - пальмитата.**

Для получения стандартного образца использовали медицинский препарат Solution Retinol palpitates (Vitamin A) oleos' 100000 ME in capsules. Для этого взяли одну капсулу препарата, перенесли содержимое капсулы в бюкс, затем туда добавили метанол в количестве 1мл, экстрагировали в течение 30 мин. Далее с помощью сэмплера экстракт аккуратно перенесли в пенцевирку без пузырьков жира. Дальнейшим этапом эксперимента является гидролиз экстракта 0,1 М раствором NaOH. Соотношение 0,1 М раствора NaOH и экстракта 1:1. Гидролиз проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем раствор отцентрифугировали при 6000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 15 мин. Затем в этот раствор в соотношении 1:1 добавили АСН (ацетонитрил) для полного растворения осадка получившегося при гидролизе. Далее полученный раствор ретинола анализировали на ВЭЖХ.

### **2.3.3. Метод получения стандартного образца ретинола из ретинол - ацетата.**

Для получения стандартного образца использовали медицинский препарат Ретинола Ацетат 33000 ME. Для этого взяли одну капсулу препарата, перенесли содержимое капсулы в бюкс, затем туда добавили метанол в количестве 1мл, экстрагировали в течение 30 мин. Далее с помощью сэмплера экстракт аккуратно перенесли в пенцевирку без пузырьков жира. Полученный экстракт ретинол-ацетата анализировали на ВЭЖХ.

Дальнейшим этапом эксперимента является гидролиз экстракта 0,1 М раствором NaOH с целью получения свободного ретинола стандарта. Для

этого в отдельную пенцевирку взяли 100 мкл экстракта ретинола-ацетата, добавили 100 мкл 0,1 М раствор NaOH. Гидролиз проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем раствор отцентрифугировали при 4000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 15 мин. Затем в этот раствор в соотношении 1:1 добавили ACN (ацетонитрил) для полного растворения осадка получившегося при гидролизе. Далее полученный раствор ретинола анализировали на ВЭЖХ. С целью изучения кинетики гидролиза ретинол-ацетата, продукт хроматографировали через каждые 30 мин.

#### **2.4. Выделение каротиноидов из приготовленного молочного продукта, а также из сока моркови с помощью ВЭЖХ.**

##### **2.4.1. Метод выделения $\beta$ - каротина из экстракта, полученного из сока моркови.**

В сухой экстракт, полученный из сока моркови добавили 1 мл ACN (ацетонитрил), затем раствор отцентрифугировали при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 5 мин, для полного растворения осадка. Далее раствор анализировали на ВЭЖХ.

##### **2.4.2. Метод выделения $\beta$ - каротина из экстракта, полученного из молочного продукта с лактобактериями.**

В сухой экстракт, полученный из молочного продукта с лактобактериями добавили 1 мл ACN (ацетонитрил), затем раствор отцентрифугировали при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 5 мин, для полного растворения осадка. Далее раствор анализировали на ВЭЖХ

##### **2.4.3. Метод выделения $\beta$ - каротина из экстракта, полученного из молочного продукта с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий.**

В сухой экстракт, полученный из молочного продукта с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий добавили 1 мл ACN (ацетонитрил), затем раствор отцентрифугировали при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 5 мин, для полного растворения осадка. Далее раствор анализировали на ВЭЖХ.

### **Глава 3. Обсуждение результатов.**

#### **3.1. Подбор комбинированного состава заквасок содержащего более эффективные пробиотики и дополнительные ингредиенты для разрабатываемого молочного продукта.**

Влияние вредных экологических факторов, загрязнённость окружающей среды, почвы, воды – все эти факторы вследствие длительного воздействия вызывают снижение иммунного статуса людей, особенно детей, поэтому губительно действует на микрофлору кишечника, являясь причиной расстройства функции желудочно-кишечного тракта.

Все кисломолочные продукты, бактериальные препараты обладают высоким терапевтическим и пролонгированным действием на возбудителей заболеваний желудочно-кишечного тракта [31], они пользуются большим спросом среди населения Узбекистана.

На сегодняшний день предпочтение отдаётся жидким продуктам, содержащим пробиотики, т.к. в них микроорганизмы более активны и начинают мгновенно действовать после попадания продукта в желудок [48].

В настоящее время в производстве молочных продуктов обогащённых пробиотиками, используют большое количество различных штаммов для заквашивания молока, таких как: болгарская и ацидофильная палочки, молочнокислые бактерии, сычужные ферменты, лакто – и бифидобактерии и многие другие. К примеру, у нас в стране на предприятии ООО «Orom Biopreparat» выпускается большое количество заквасок и биопрепаратов из местных штаммов микроорганизмов (Ором-1, Ором-2, Биолакта, Бифилон М, Бифилон КМ и др.), а на их основе лечебно-диетические кисломолочные продукты [33].

В связи с этим, были изучены штаммы микроорганизмов, которые наиболее обладают положительным эффектом для организма человека. В ходе изучения было установлено, что наиболее эффективными группами микроорганизмов являются лакто – и бифидобактерии.

Лактобактерии и бифидобактерии для организма человека являются основными и наиболее физиологичными группами микроорганизмов, которые поступят в организм человека при употреблении кисломолочных продуктов и препаратов биологического происхождения, тем самым осуществляя защитную функцию организма. Лактобактерии способны бороться с возбудителями инфекций кишечника, обладая антибактериальным действием. Покрывая стенки кишечника, они становятся непреодолимым барьером для патогенных бактерий. А бифидобактерии в свою очередь способствуют ферментативному расщеплению белков и углеводов, участвуют в метаболизме желчных кислот. Обладая антагонистической активностью по отношению к болезнетворным бактериям, они сохраняют равновесие бактериальной флоры кишечника, улучшают обменные процессы, препятствуют формированию затяжных форм кишечных заболеваний и укрепляют иммунитет.

Лакто – и бифидобактерии стали основой для разработки множества новых молочных и биологически активных продуктов, используемых в пищу. Также учитывается тот факт, что бактериальные препараты и продукты не обладают побочным, вредным для здоровья человека действием, производство и использование бакпрепаратов безопасно как для людей, так и для окружающей среды [20].

В настоящей работе разрабатывали новый молочный продукт, содержащий лакто – и бифидобактерии, а так же обогащённый свободным витамином «А». Для приготовления молочного продукта использовали препараты « Бификол РL сухой» и «Лактобактерин – Ором» на основе штамма бактерий *bifidobacterium longum* полученный из ООО «Orom Biopreparat», и в качестве источника провитамина «А» - красную морковь.

Новизна работы состоит в особенности биологических свойств штаммов микроорганизмов, заключающееся, в накоплении ценных для организма человека продуктов метаболизма, таких, как незаменимых аминокислот,

витаминов и других. А также добавление в молочный продукт природный предшественник витамина «А»  $\beta$  – каротин.

Местные штаммы также отличаются высокой резистентностью к желчи, что связано с активной деструкцией желчных кислот, находящихся в кишечнике, тем самым бактерии способствуют активизации гепатоциркулярной системы, снижению процесса опухолеобразования в организме человека.

Совокупность этих производственно-ценных свойств, характерных для местных штаммов микроорганизмов, обуславливает уникальность приготовленных на их основе биопрепаратов и молочных продуктов. Показана возможность и необходимость практического использования в качестве защитного барьера при нарушении нормофлоры кишечника человека, введение микроорганизмов в состав заквасок, продуктов питания и препаратов, позволит целенаправленно применять препараты и продукты в лечебно-профилактических целях при различной патологии желудочно-кишечного тракта, включая и онкологические заболевания [33].

Как было указано ранее, для приготовления молочного продукта в качестве источника провитамина «А» использовали красную морковь, т.к. содержание в ней  $\beta$  – каротина составляет 10-15 мг/%.

Как известно в составе растительных объектов, в том числе в составе моркови витамин «А» содержится в связанном виде, т.е. в виде провитамина  $\beta$  – каротина соединённого сложноэфирной связью. Под действием оксиредуктаз продуцируемые *bifidobaktrium longum*  $\beta$  – каротин выделяется в виде свободного каротина. Витамин «А» в больших дозах может привести к недомоганию или даже к повреждению органов, тогда как  $\beta$  – каротин практически безвреден, даже если употреблять его в больших количествах. В организме каротин окисляется с помощью диоксигеназы и превращается в витамин «А» в необходимых количествах для организма [7].

Витамин «А», как и полезные микроорганизмы, в организме человека играет не маловажную роль. Витамин «А» влияет на рост человека,

способствует повышению сопротивляемости к различным видам инфекции. В нашей иммунной системе он борется с вирусами, бактериями и другими возбудителями болезней, поддерживает молодость и здоровье тела человека, улучшает остроту зрения, а также повышает устойчивость к простудным заболеваниям [2,24]. Таким образом, витамин «А» полезен и необходим для жизнедеятельности организма человека.

Поэтому для разработки нового молочного продукта мы использовали именно морковь, а также лакто – и бифидобактерии.

### **3.2. Выделение $\beta$ – каротина из красной моркови.**

В качестве источника  $\beta$  – каротина мы использовали красную морковь, т. к. содержание в ней  $\beta$  – каротина по количеству самое наибольшее, чем в других растительных источниках. Для выделения  $\beta$  – каротина из моркови нам необходимо было получить коагулянт белков моркови с  $\beta$  – каротином. Для этого мы получили сок моркови, который нагревали на водяной бане при температуре 70-75° С до выпадения осадка – коагулянта белков моркови с  $\beta$  – каротином. Затем осадок отцентрифугировали, отделили от жидкости с помощью делительной воронки и перенесли в круглодонную колбу, далее осадок заморозили с помощью жидкого азота и леофильно высушивали до состояния сухого остатка с содержанием влаги не более 15%.

Для выделения  $\beta$  – каротина в индивидуальном виде применяли метод экстрагирования с хлорированными углеводородами [13]. Потому что растворимость  $\beta$  – каротина наивысшая, чем другие органические растворители. Поэтому полученный материал экстрагировали  $CCl_4$  при комнатной температуре (в соотношении осадок с  $CCl_4$  1:4) в течение 2 ч. на аппарате Сокслет. Затем экстрагированную массу отцентрифугировали, и осадок отделили от экстракта. Далее экстракт упаривали на роторном испарителе при температуре 35°С. до получения концентрата  $\beta$  – каротина и белков. Дальнейшим этапом эксперимента является омыление полученного концентрата 10% раствором *КОН* (едкого калия). Соотношение 10% *КОН* с

концентратом 1:9. Полученный раствор подогрели до 50° С и оставили при комнатной температуре до полного омыления на 15 ч. Затем в омыленную массу добавили  $\text{CCl}_4$  в соотношении 1:1 и экстрагировали свободный  $\beta$  - каротин в течении 1,5 часа. Далее с помощью самплера взяли нижнюю часть раствора содержащий свободный  $\beta$  – каротин и перенесли в другую пробирку для дальнейшего испарения. Полученный экстракт так же упаривали на роторном испарителе при температуре 35° С до сухого состояния. В итоге у нас получился сухой экстракт, содержащий свободный  $\beta$  – каротин.

Далее в сухой экстракт, полученный из сока моркови добавили 1 мл АСН (ацетонитрил), затем раствор отцентрифугировали при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 5 мин, для полного растворения осадка. Затем раствор анализировали на ВЭЖХ (Рис 1, 2).

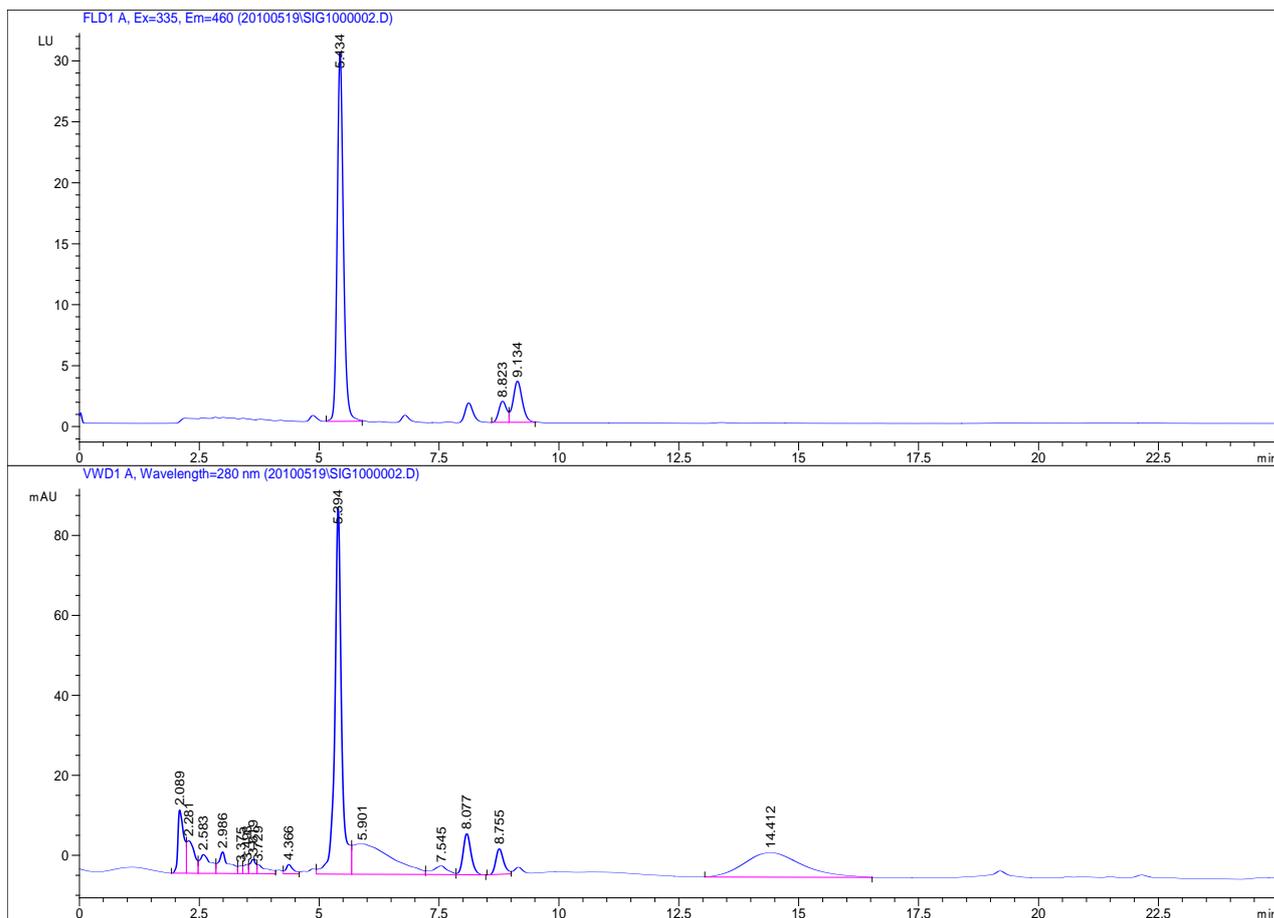


Рис 1. ВЭЖХ анализ полученного экстракта - каротина из сока моркови.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

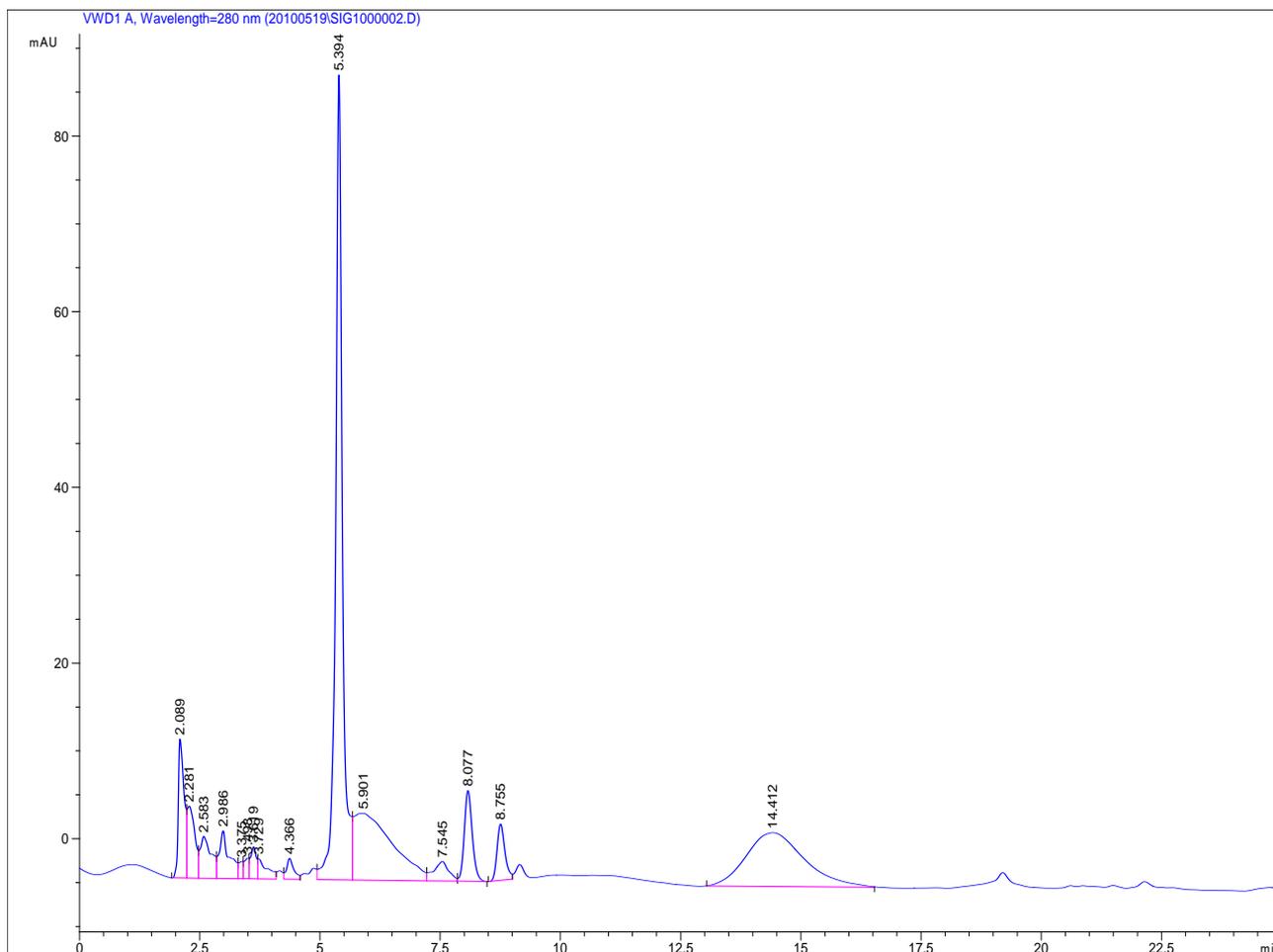


Рис 2. ВЭЖХ анализ полученного экстракта каротина из сока моркови на VWD-детекторе.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

Таким образом, нами разработана новая методика выделения  $\beta$  – каротина из красной моркови.

### **3.3. Получение стандартного образца ретинола – витамина «А» из ретинола-пальмитата и ретинола-ацетата.**

Для разработки методики получения стандартных образцов ретинола – витамина «А» из ретинола-пальмитата и ретинола-ацетата использовали медицинские препараты Solution Retinol palpitates (Vitamin A) oleos' 100000 ME in capsules и Ретинол - Ацетат 33000 ME (капсулы). Т.к. в них содержится большое количество ретинола, что позволяет получить стандартные образцы, с помощью которых в дальнейших анализах можно легко будет определить содержание ретинола в испытуемых образцах молочного продукта.

Для получения стандартного образца из ретинола-пальмитата, использовали медицинский препарат Solution Retinol palpitates (Vitamin A) oleos' 100000 ME in capsules. Для этого взяли одну капсулу препарата, перенесли содержимое капсулы в бюкс, затем применяли метод экстрагирования, для того чтобы максимально выделить ретинол-пальмитат из маслянистой массы. Добавили метанол в количестве 1мл, экстрагировали в течение 30 мин. Далее с помощью сепаратора экстракт аккуратно перенесли в пенцевирку без пузырьков жира. Дальнейшим этапом эксперимента является гидролиз экстракта 0,1 М раствором NaOH. Соотношение 0,1 М раствора NaOH и экстракта 1:1. Гидролиз проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Раствор отцентрифугировали при 6000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 15 мин. Затем в этот раствор в соотношении 1:1 добавили АСН (ацетонитрил) для полного растворения осадка получившегося при гидролизе. Далее полученный раствор ретинола анализировали на ВЭЖХ (Рис 3).

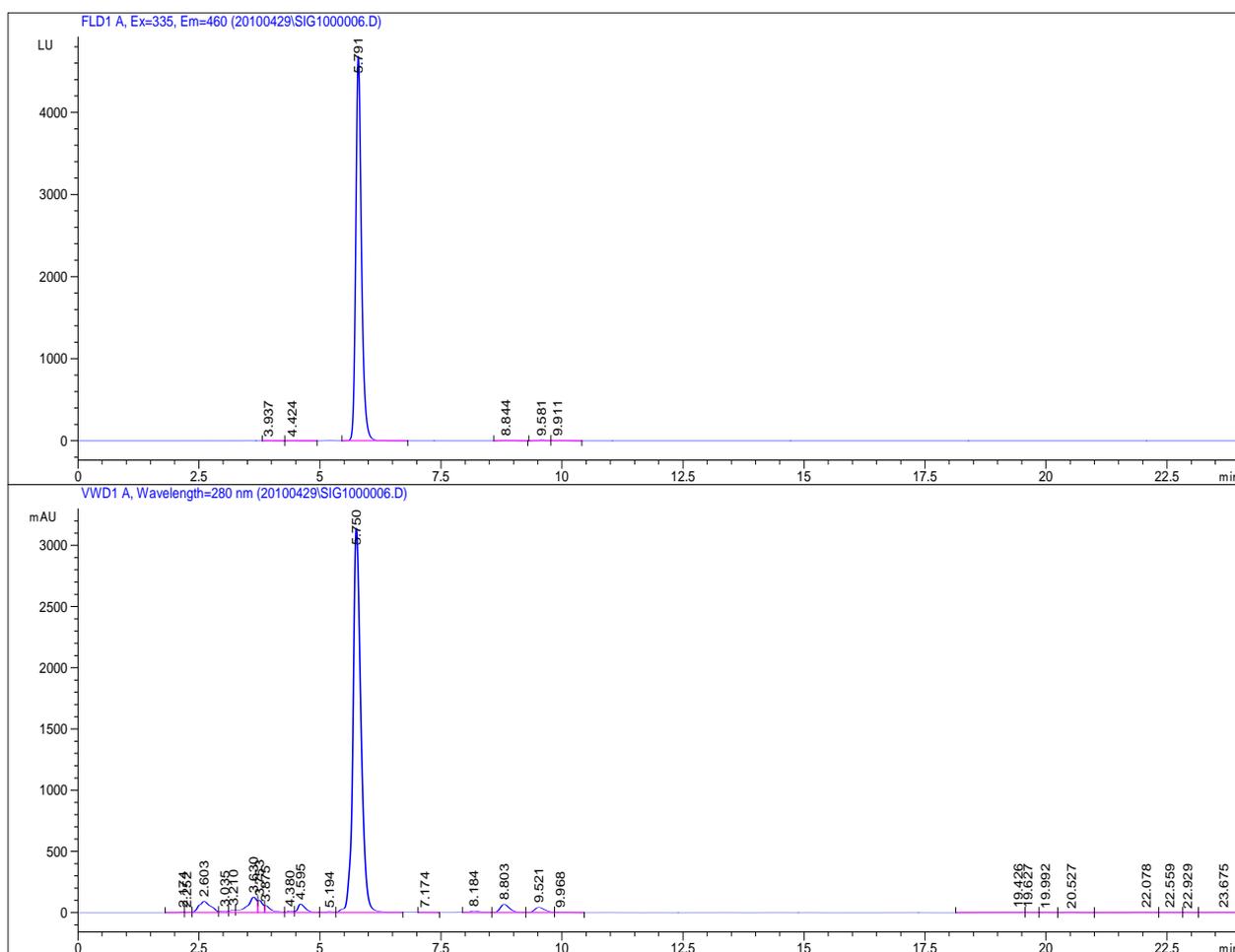


Рис 3. ВЭЖХ анализ стандартного образца ретинола из ретинол - пальмитата.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

Для получения стандартного образца из ретинола – ацетата использовали медицинский препарат Ретинол - Ацетат 33000 МЕ. Для этого взяли одну капсулу препарата, перенесли содержимое капсулы в бюкс, также применяли метод экстрагирования. Добавили метанол в количестве 1мл, экстрагировали в течение 30 мин. Далее с помощью сеплера экстракт аккуратно перенесли в пенцевирку без пузырьков жира. Полученный экстракт ретинол-ацетата анализировали на ВЭЖХ (Рис 4).

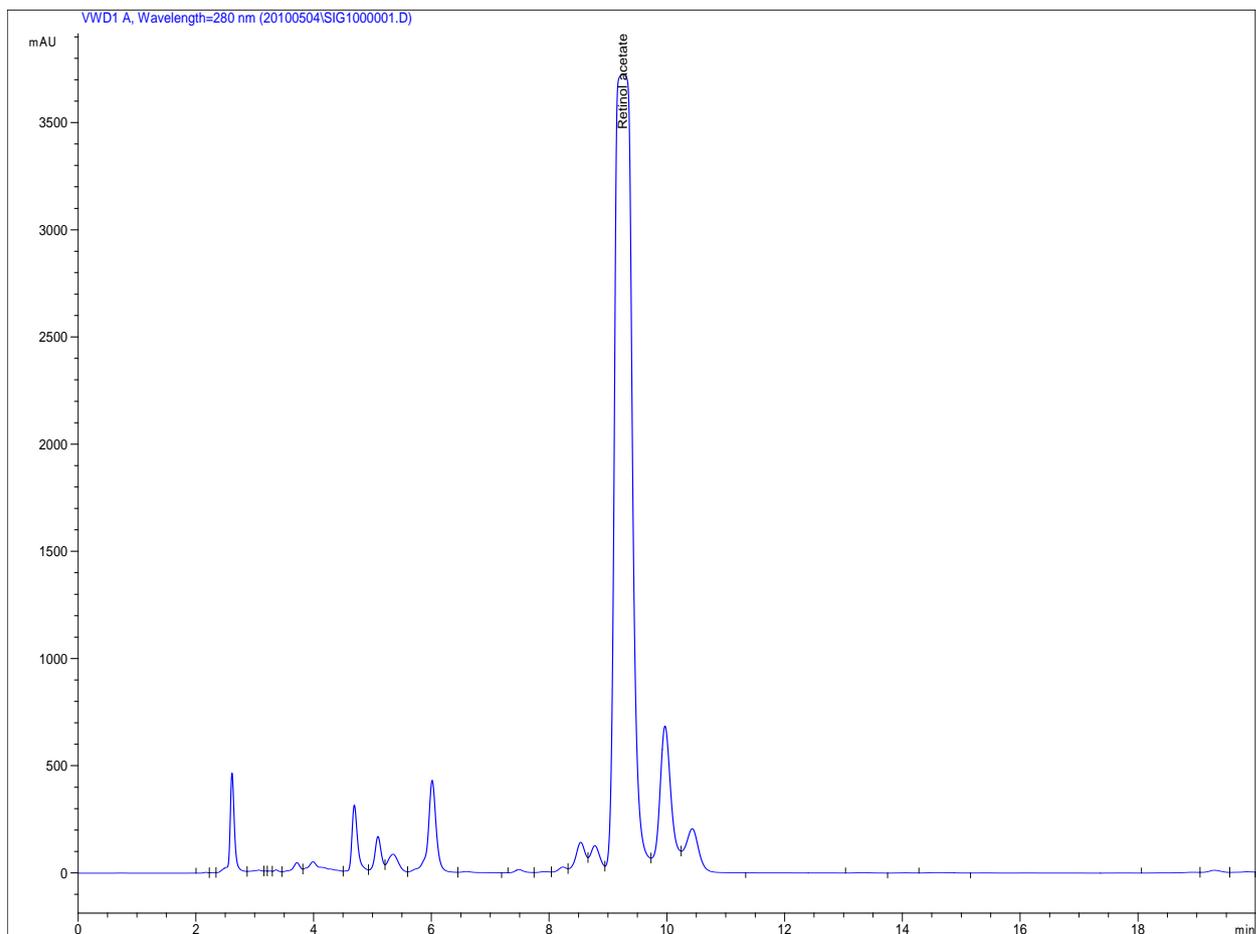


Рис 4. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата до гидролиза.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

Дальнейшим этапом эксперимента является гидролиз экстракта 0,1 М раствором NaOH с целью получения свободного ретинола стандарта. Для этого в отдельную пенцевирку взяли 100 мкл экстракта ретинола-ацетата, добавили 100 мкл 0,1 М раствор NaOH. Гидролиз проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем раствор отцентрифугировали при 4000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 15 мин. Затем в этот раствор в соотношении 1:1 добавили ACN (ацетонитрил) для полного растворения осадка получившегося при гидролизе. Далее полученный раствор ретинола анализировали на ВЭЖХ (Рис 5).

С целью изучения кинетики гидролиза ретинол-ацетата, продукт гидролиза хроматографировали через каждые 30 мин (Рис 6-11).

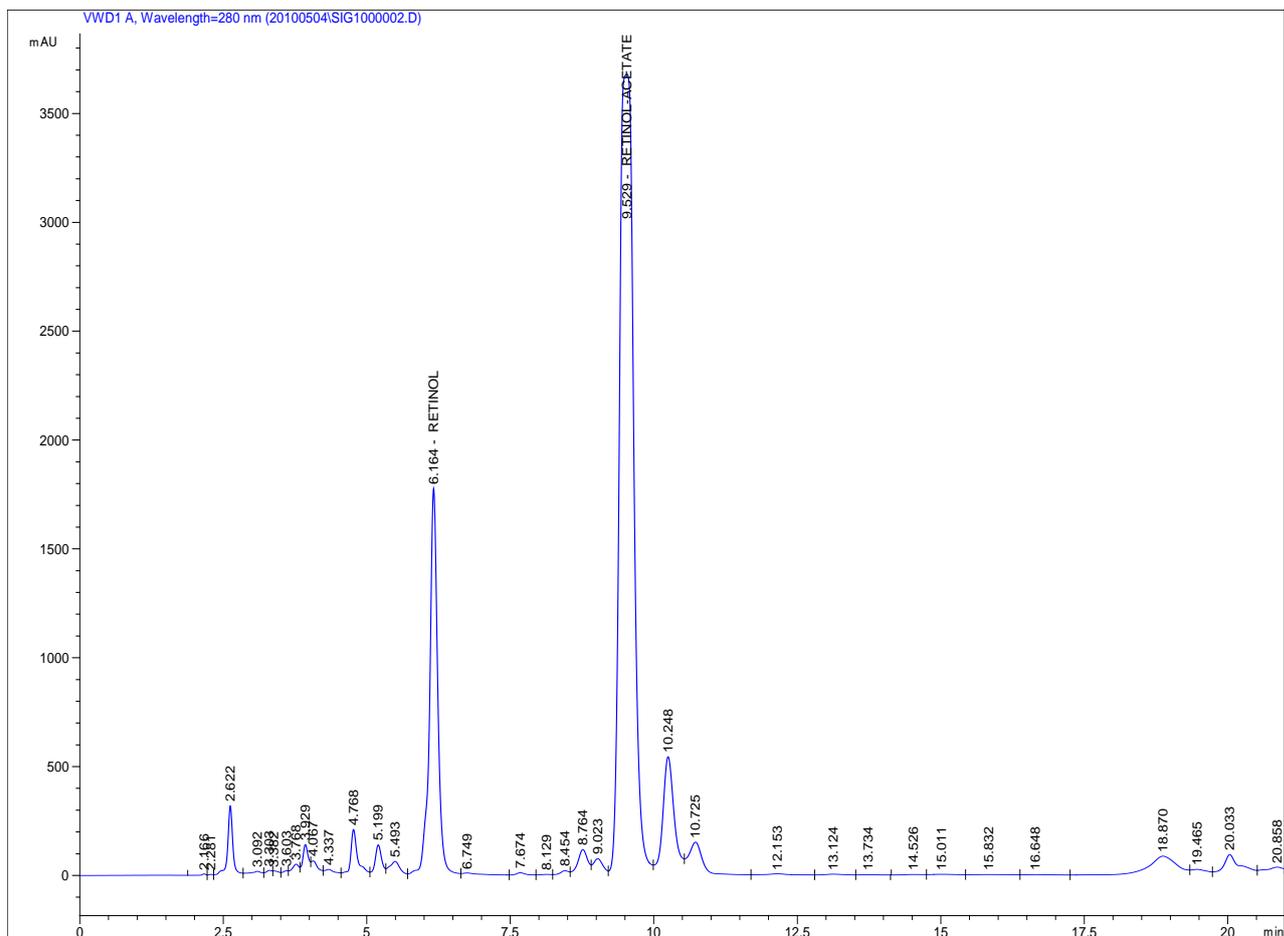


Рис 5. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата после гидролиза.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

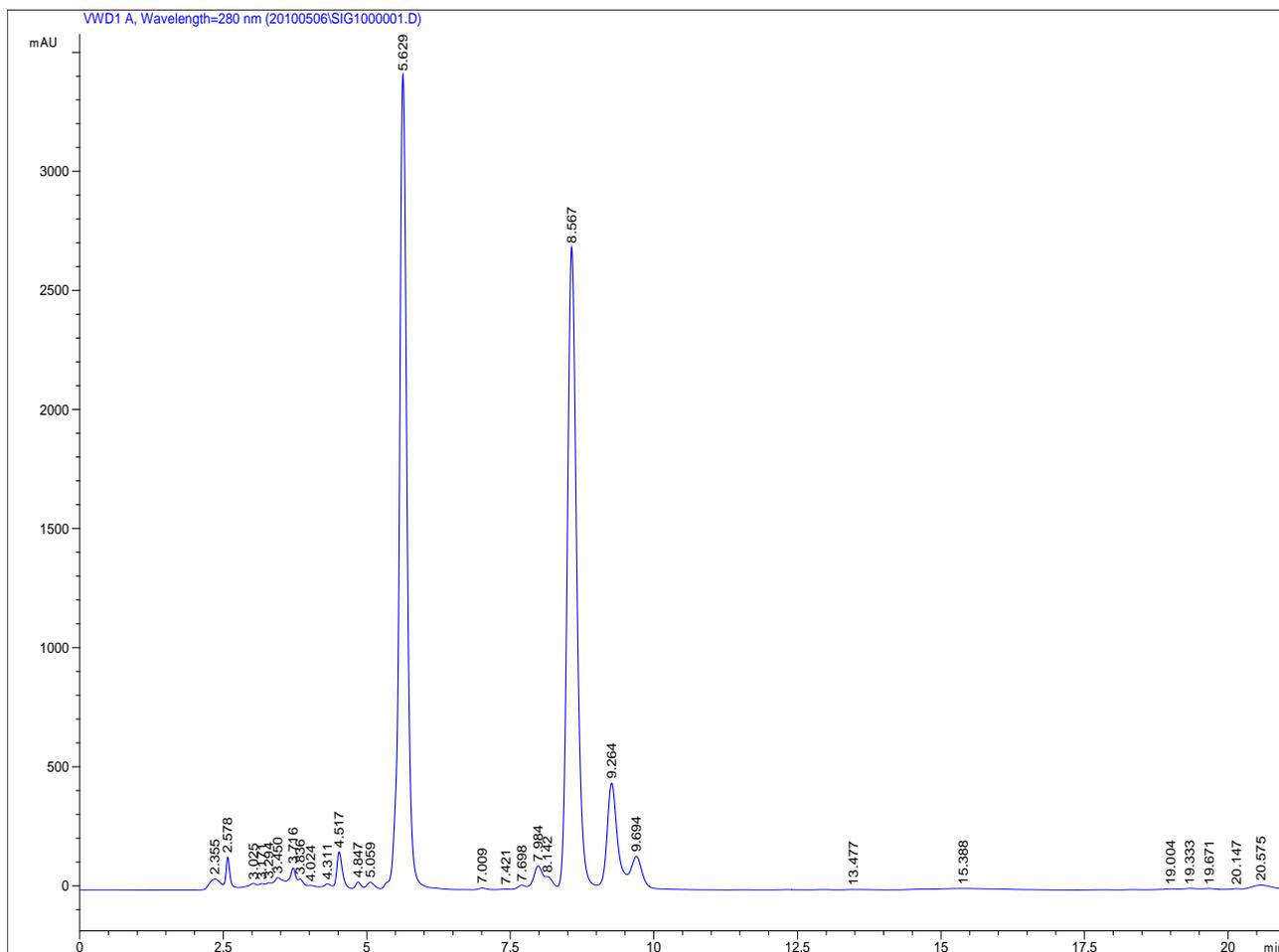


Рис 6. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата после гидролиза (через 30 мин).

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

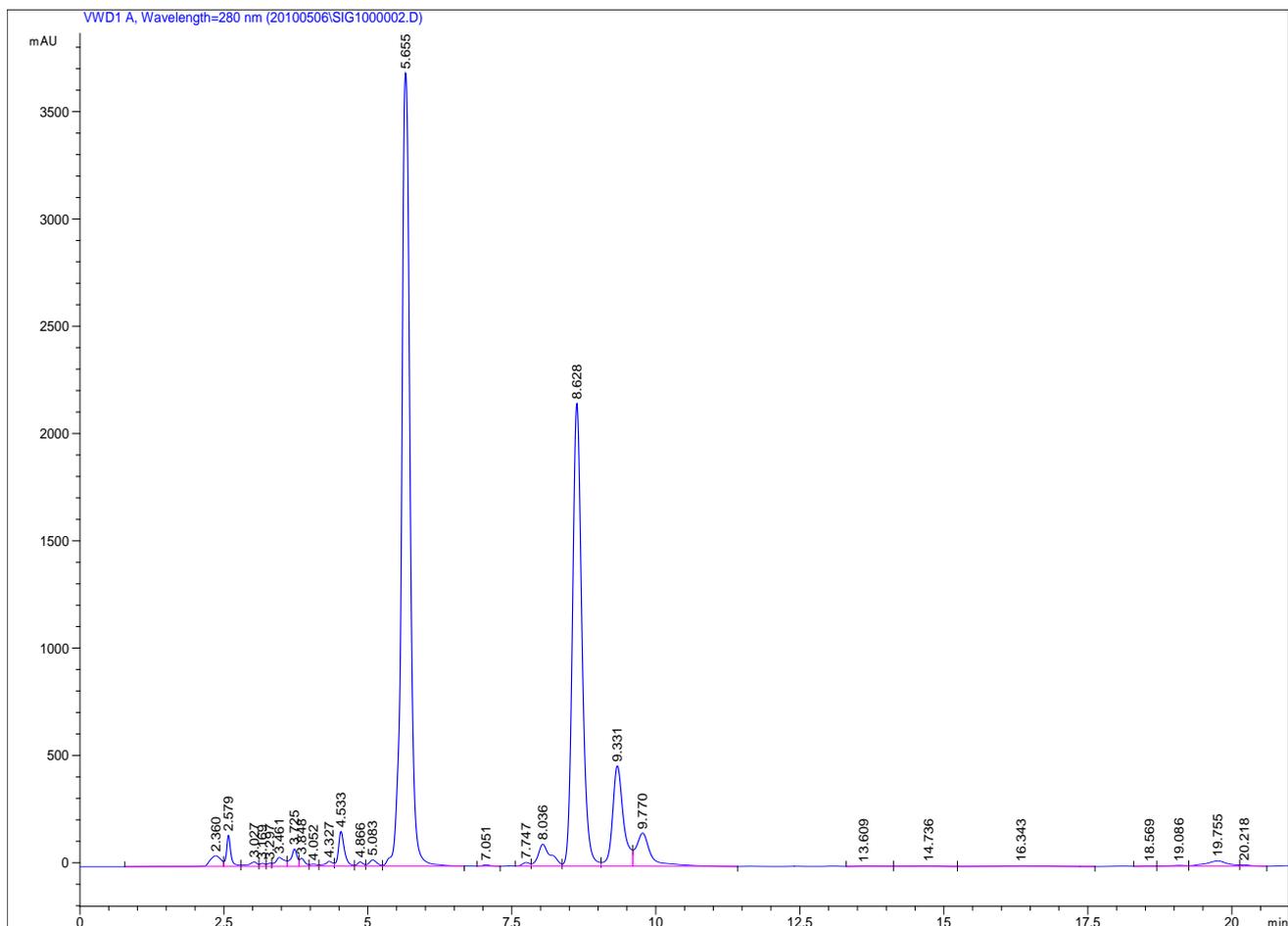


Рис 7. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата (через 1 час).

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

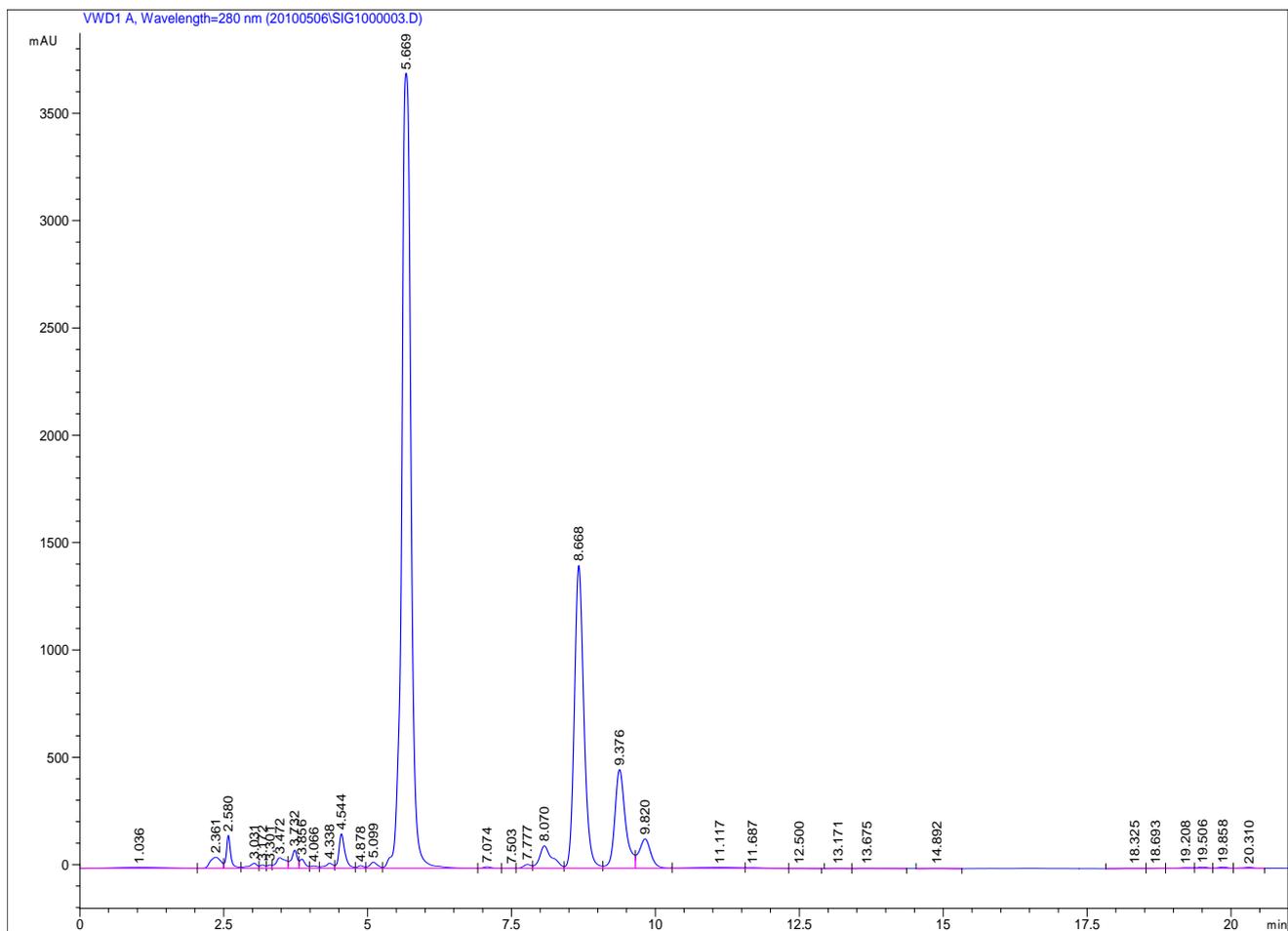


Рис 8. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата (через 1 час 30 мин).

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

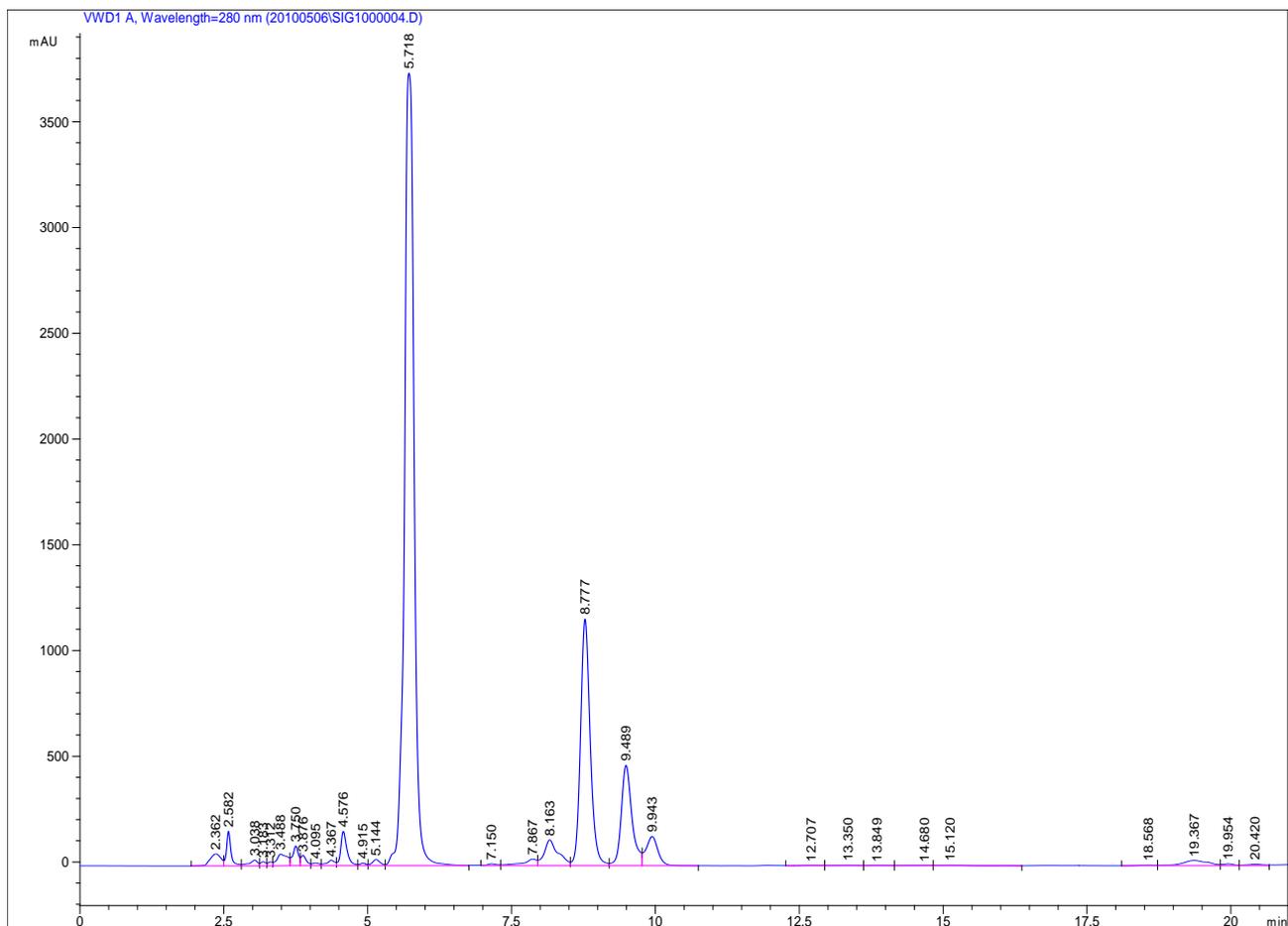


Рис 9. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата (через 2 часа).

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

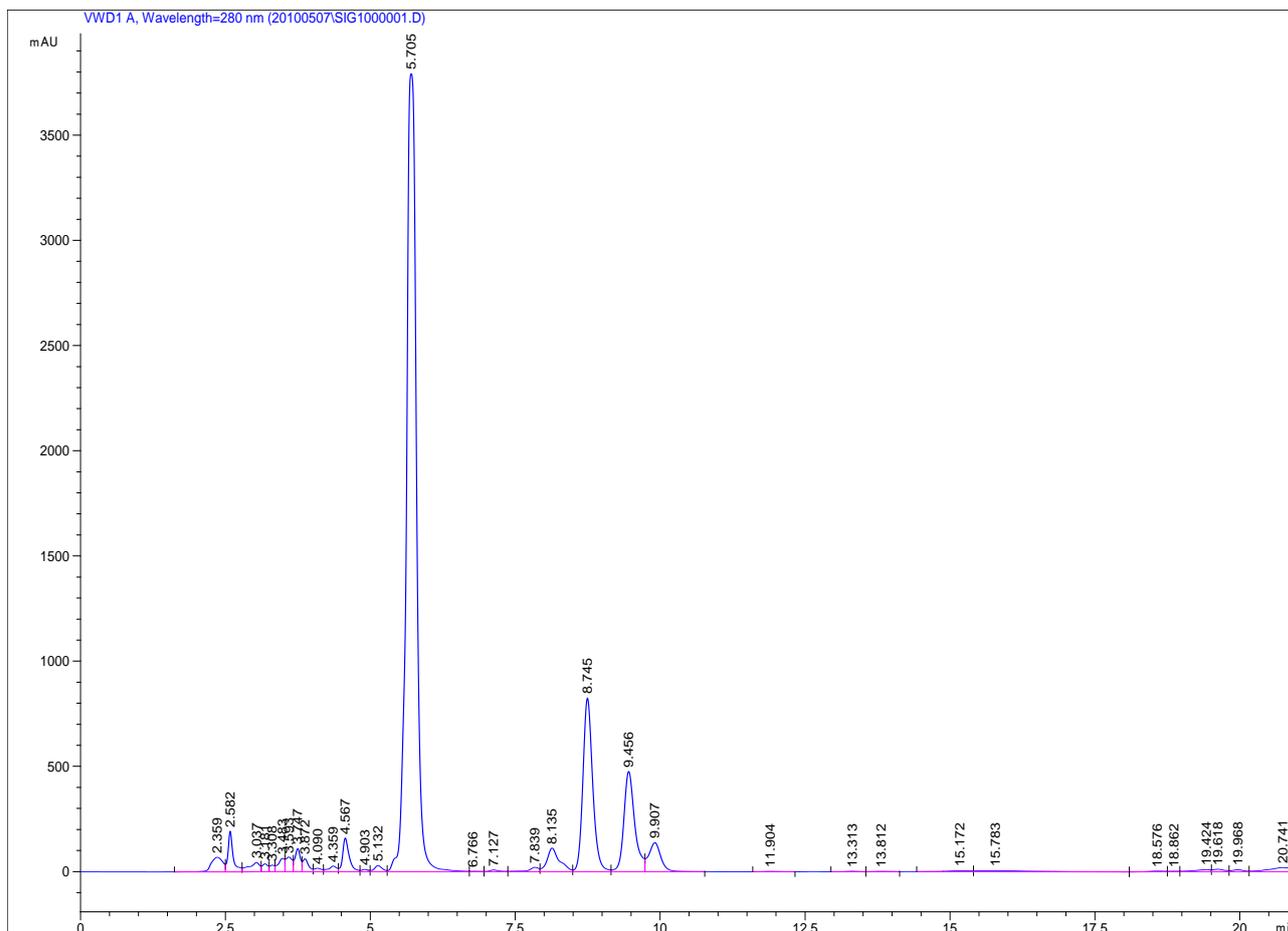


Рис 10. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата (через 2 часа 30 мин).

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

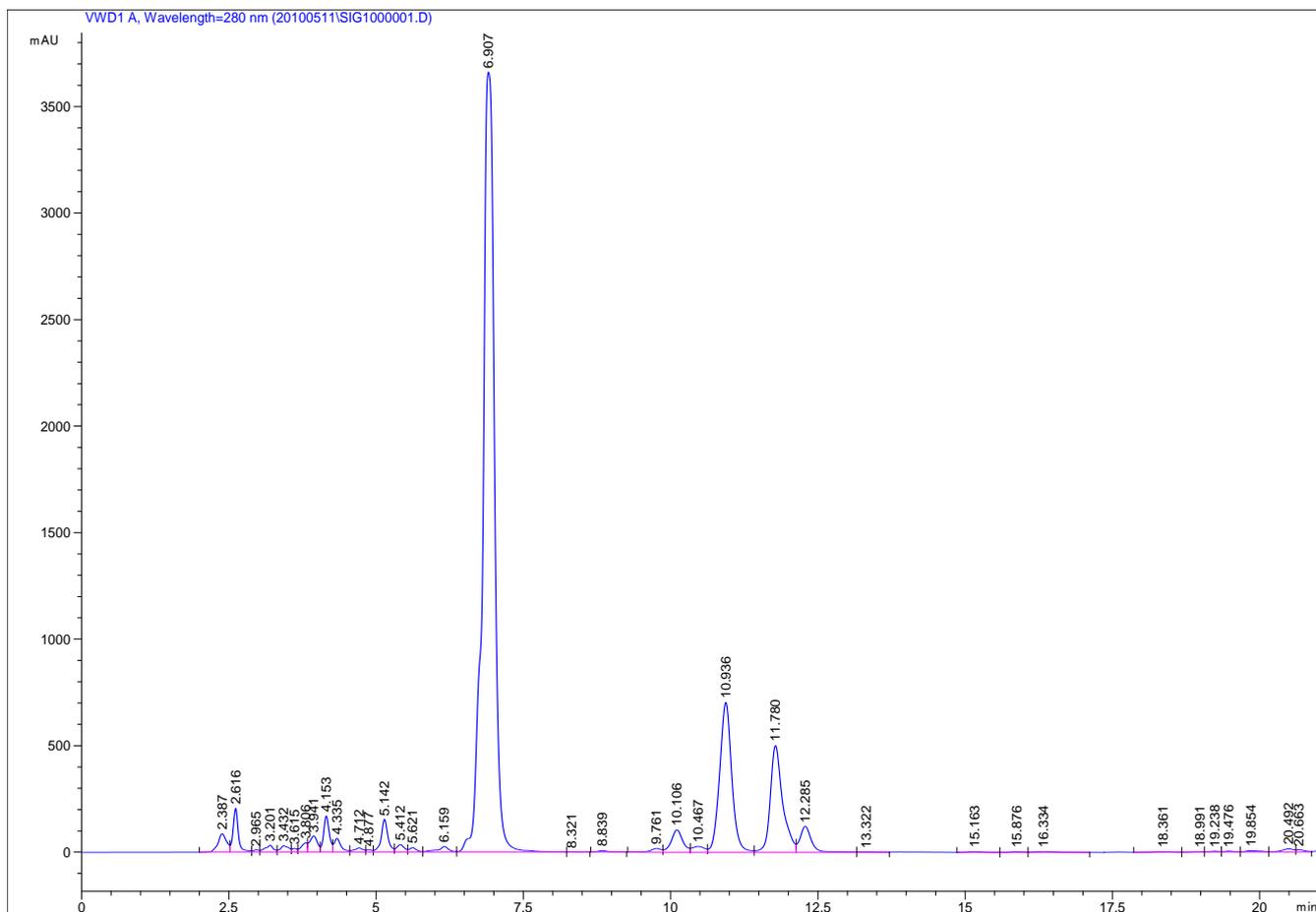


Рис 11. ВЭЖХ анализ экстракта стандартного образца ретинола из ретинол-ацетата (через 1 день).

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

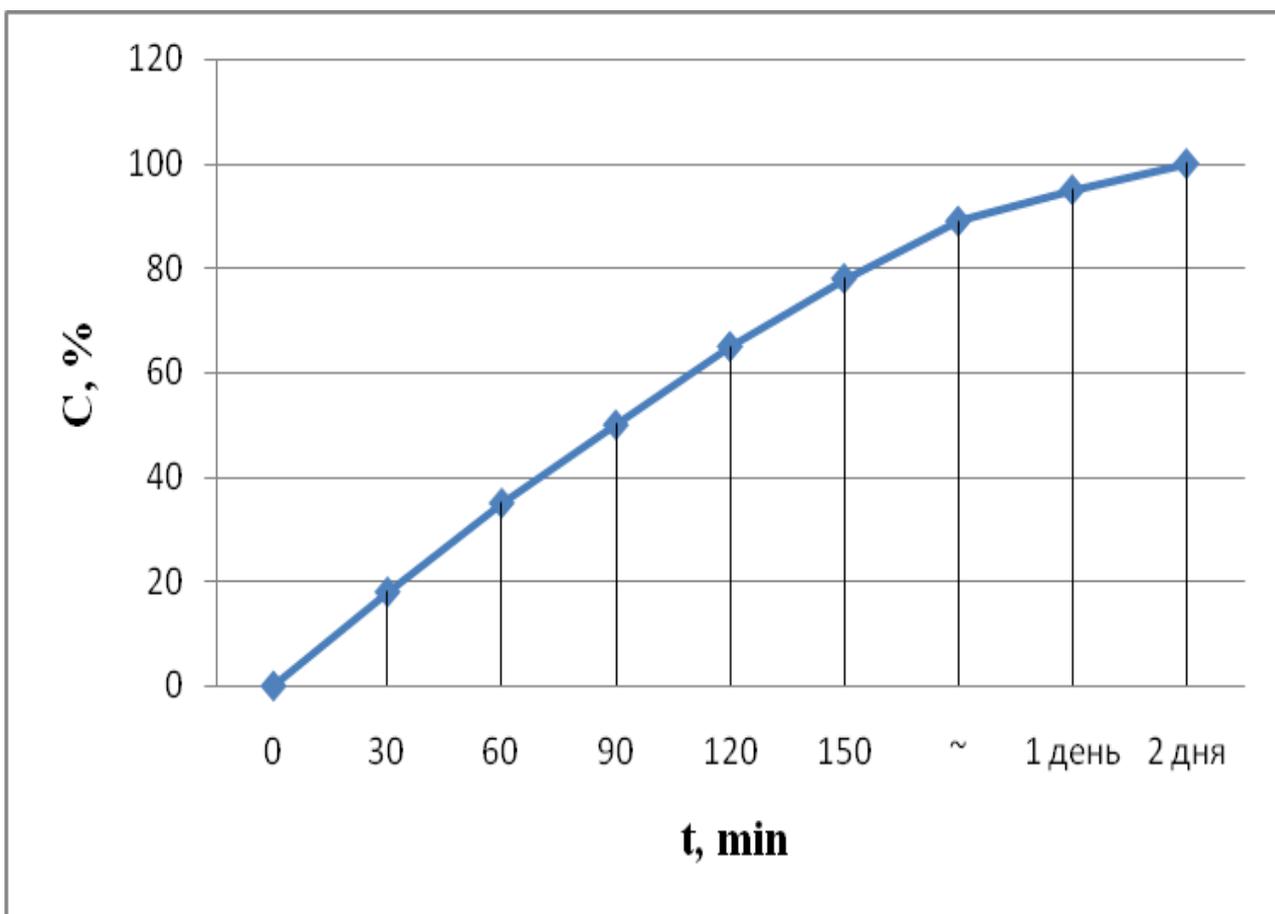


Рис 12. Кинетика образования ретинола из щелочного гидролиза ретинол – ацетата.

Как видно из рисунков (6-11) полный гидролиз экстракта с 0,1 М раствором NaOH завершится в течение 2 дней. Это показано на графике (Рис 12).

Таким образом, нами разработана методика получения стандартного образца ретинола из ретинол – пальмитата и ретинол – ацетата. А также изучена кинетика образования свободного ретинола и его соответствующих эфиров.

#### **3.4. Разработка способа получения молочного продукта обогащённого витамином «А» и содержащего лакто – и бифидобактерии.**

Как было указано выше, наиболее эффективными группами микроорганизмов для приготовления молочного продукта являются лакто – и бифидобактерии. Поэтому для приготовления нового молочного продукта использовали препараты «Бификол РL сухой» и «Лактобактерин – Ором» на основе штамма бактерий *bifidobacterium longum* полученный из ООО «Orom Biopreparat», а также цельное молоко и красную морковь.

Для приготовления молочного продукта необходимо было получить закваску содержащую лактобактерии и бифидобактерии. Для этого использовали выше указанные препараты в количестве по 5 доз. Заквашивание бактерий (каждый вид бактерий по отдельности) в небольшом количестве молока проводили при температуре 30-35° С, т.к. эта температура является самой оптимальной для заквашивания молочных продуктов. Если же температура заквашиваемого продукта, будет ниже либо выше указанной, то это может привести к неполному развитию бактерий при заквашивании. По нашим наблюдениям заквашивание молока с лактобактериями происходило в течение 4 ч., а заквашивание с бифидобактериями за 8ч.

Дальнейшим этапом эксперимента было приготовление основного молочного продукта. Приготовили три образца с различным соотношением цельного молока и сока моркови, а также с добавлением разных видов заквасок:

- Первый образец приготовили с добавлением закваски с лактобактериями и с содержанием сока моркови 10% к количеству молока. Заквашивание проводили при той же температуре как для закваски, и длилось в течение 4 ч.
- Второй образец приготовили с добавлением закваски с бифидобактериями и также с содержанием сока моркови 10% к количеству молока. Заквашивание проводили при тех же параметрах, только время получения кисломолочного продукта составило 8 ч.
- Третий образец приготовили с добавлением смеси заквасок лакто – и бифидобактерий и с содержанием сока моркови 20% к количеству молока. Заквашивание также проводили при температуре 30-35° С в течение 6 ч.

После заквашивания все три образца поставили в холодильник для созревания на 5 дней, для полного выделения каротиноидов из сока моркови в жировую часть продукта.

При приготовлении основного молочного продукта мы использовали различное соотношение цельного молока и сока моркови, для того чтобы, при анализе полученного молочного продукта на ВЭЖХ, выяснить выход свободного каротина и какое количество сока моркови более оптимально подходит для его приготовления. А также использовали различные виды заквасок и их смеси, для получения лучшего результата.

После созревания молочного продукта нам необходимо было подготовить образцы всех трёх видов продукта для анализа на ВЭЖХ.

Для этого с каждого вида продукта мы собрали верхнюю жировую часть, т.к. в ней собралось наибольшее количество молочного жира, в котором максимально растворён  $\beta$  – каротин. Затем отобранную массу заморозили в холодильнике при температуре -20° С в течении 2 ч. и леофильно высушивали. Дальнейший этап эксперимента проходил по той же методике, как для выделения  $\beta$  – каротина из сока моркови.

Таким образом, нами разработана новая методика выделения  $\beta$  – каротина из молочного продукта.

### **3.5. ВЭЖХ анализ полученного молочного продукта на содержание витамина «А».**

Завершающим этапом эксперимента является анализ полученных образцов молочного продукта с помощью метода ВЭЖХ.

1. В сухой экстракт, полученный из молочного продукта с лактобактериями добавили 1 мл АСН (ацетонитрил), затем раствор отцентрифугировали при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 5 мин, для полного растворения осадка. Далее раствор анализировали на ВЭЖХ (рис 13-14).

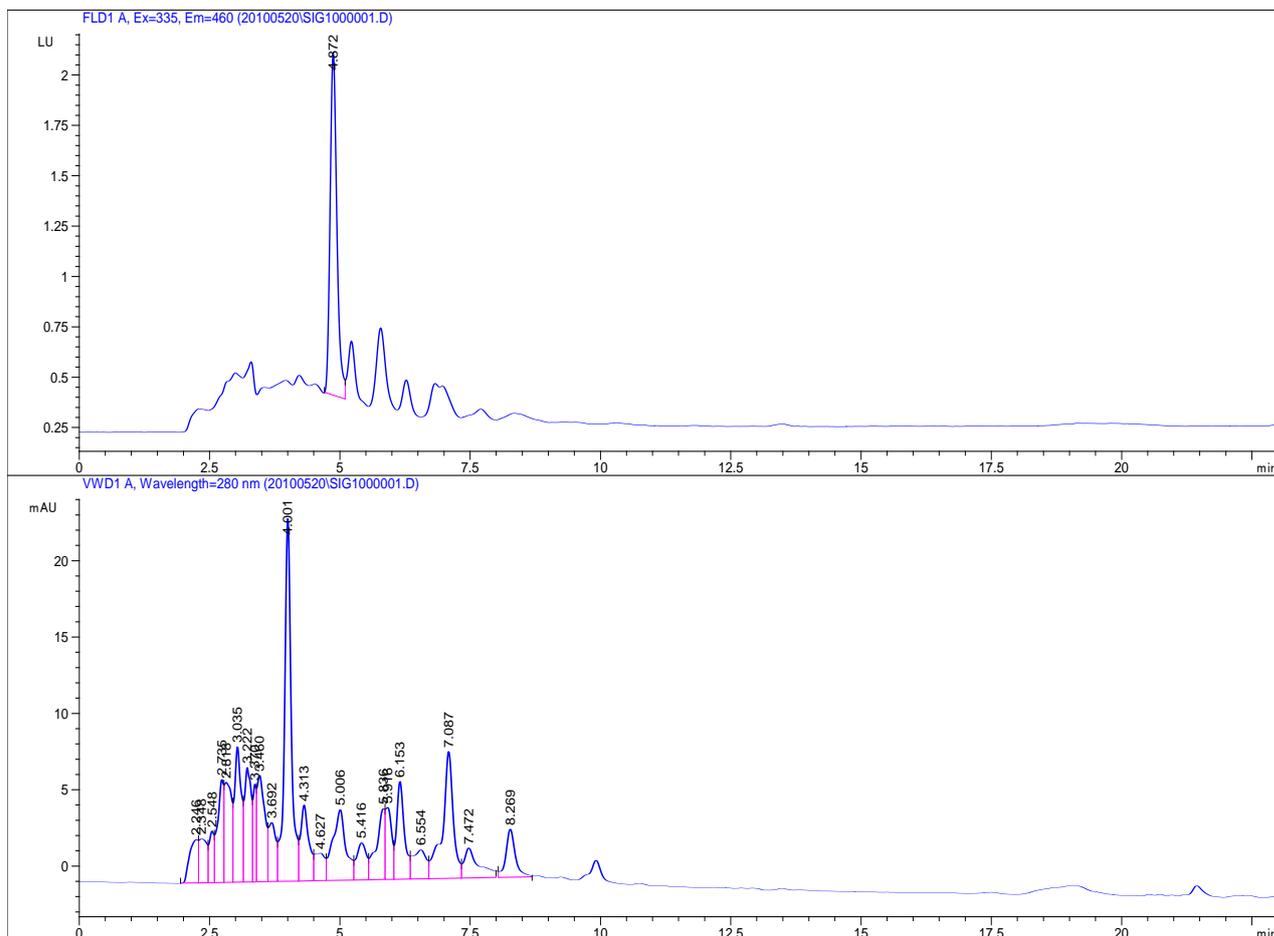


Рис 13. ВЭЖХ анализ полученного экстракта  $\beta$  - каротина из молочного продукта с лактобактериями.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

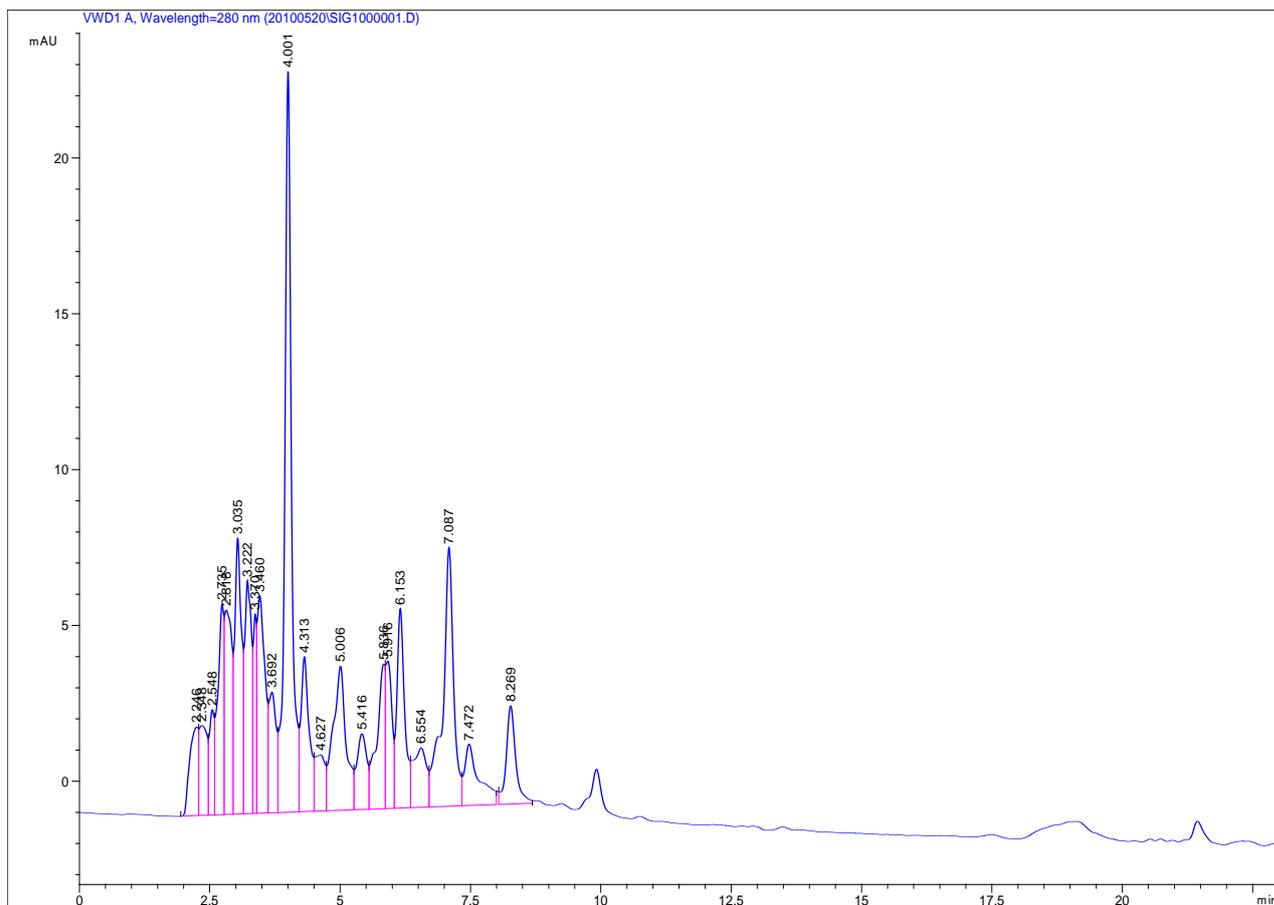


Рис 14. ВЭЖХ анализ полученного экстракта  $\beta$  - каротина из молочного продукта с лактобактериями VWD-детекторе.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

2. В сухой экстракт, полученный из молочного продукта с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий добавили 1 мл АСН (ацетонитрил), затем раствор отцентрифугировали при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН-8 в течение 5 мин, для полного растворения осадка. Далее раствор анализировали на ВЭЖХ (рис 15).

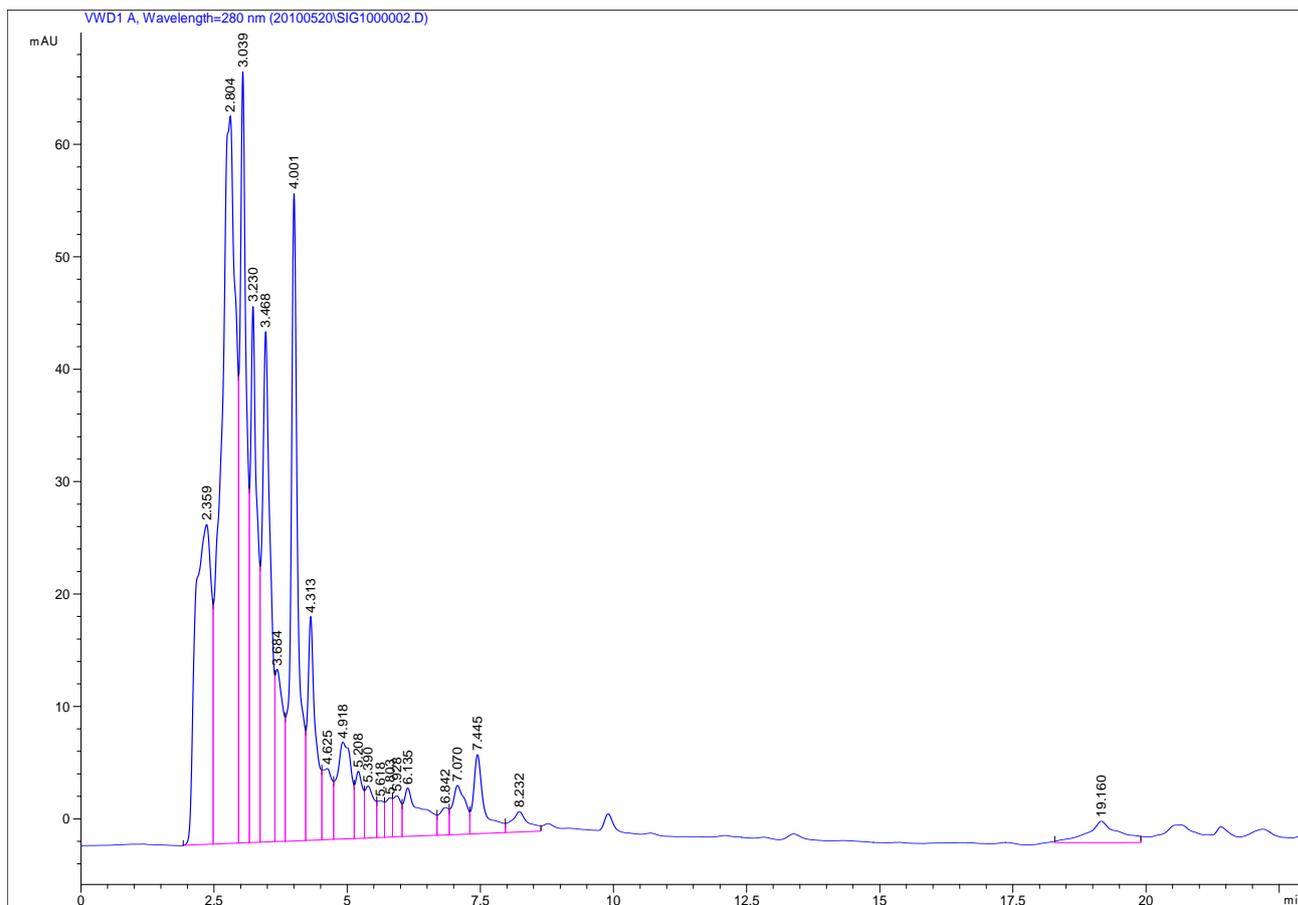


Рис 15. ВЭЖХ анализ полученного экстракта  $\beta$  - каротина из молочного продукта с добавлением смеси лакто - и бифидобактерий.

- колонка HP Eclipse XDB-C18 (PN 990967-902) размером 4,6×250 мм (LN B06043) с размером частиц 5 мкм (SN USNH010489);
- подвижная фаза: метанол-вода в соотношении 95:5 (по объёму);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- время анализа - 21 мин;
- температура колонки - +50°C.

Как видно из рисунка в хроматографии имеется наряду с пиком  $\beta$  - каротина, также и пик индивидуального ретинола. Это объясняется тем, что штаммы лакто – и бифидобактерий продуцируют кроме многочисленных ферментов, также ферменты оксиредуктазы.  $\beta$  – каротин под действием оксиредуктаз распадается ретинол – витамин «А».

## ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения кисломолочного продукта с включением в состав закваски пробиотических культур и природного  $\beta$  - каротина из моркови. Установлено, что наиболее эффективными группами микроорганизмов являются лакто – и бифидобактерии.
2. Получены закономерности совместного развития бифидо - и лактобактерий с молочнокислыми бактериями в молоке и определен состав комбинированной закваски, содержащей бифидо - и лактобактерии, а также применение сока моркови в качестве источника  $\beta$  – каротина.
3. Исследовано влияние комбинированной закваски и технологических факторов (температуры пастеризации, кислотного способа коагуляции) на формирование структуры продукта и определены основные технологические параметры, позволяющие получать продукт с заданными свойствами.
4. Разработаны стандартные методики ВЭЖХ анализа ретинола, ретинола-пальмитата, ретинола-ацетата и  $\beta$  – каротина. Изучено кинетика щелочного гидролиза ретинола-ацетата. А так же были разработаны методики выделения  $\beta$  – каротина из сока красной моркови и выделение  $\beta$  – каротина из образцов молочного продукта.
5. Исследовано хроматографическое поведение витамина «А» при элюировании бинарными и трехкомпонентными водосодержащими подвижными фазами с применением различных растворителей.
6. Разработана стандартная методика определения жирорастворимого витамина «А» в готовом молочном продукте.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные вопросы клинической витаминологии. Самарканд: 1985 – 49с.
2. А. Соммер. Недостаточность витамина «А» и её последствия. Женева: 1995 – 93с.
3. Асатурян В.И. Теория планирования эксперимента. М.: 1983. - 248 с.
4. Ахназарова Л., Кафаров В.В. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии: Учеб. пособие для хим.-технол. спец. вузов. 2-е изд., перераб. и доп.- М.: Высш. школа, 1985. 327 с.
5. Березовский В.М. Химия витаминов. Изд. 2-е, М., «Пищевая промышленность», 1973г. 626с.
6. Букин В. Н. Витамины. М., Пищепромиздат, 1940. с. 16—108.
7. Букин Ю.В. Бета-каротин фактор здоровья. - М., 1995. - 27 с.
8. Бреженер С. М. Витамины, М., Медгиз, 1959, с. 7.
9. Беэр А. А., Рубцов И. А. Синтез витаминов, М., Пищепромиздат, 1956, с- 36.
10. Витамины /Под ред. М.И. Смирнова. Т. 8. М.: Наука, 1988. 5-8.
11. Взаимоотношение водорастворимых витаминов и участие их в обмене веществ при патологических процессах. Сборник научных трудов. Гродно; 1983 – 60с.
12. Вечер А.С. Получение кристаллического каротина и каротинового масла из каротиновых концентратов //Технология и применение витамина А и каротина, Краснодар, 1956. 135 с.
13. Влияние различных физико-химических факторов на устойчивость каротина в растворе / Шнайман Л.О., Дульчина Б.М. Павлова А.М. //Труды Всесоюзн. научно-исслед. ин-т витаминов, 1954. -Т.5. — С.51-64.
14. Влияние масляной основы на стабильность препаратов содержащих растворенный бета-каротин. / А.Б. Гагарина, Н.М. Евтеева, Л.А. Смурова, С.М. Бобнева// 4 Конф. «Биоантиоксидант»: Москва, 2-4 июня, 1992 г.: Тез докл. М., 1993.- Т.1.-С.171-172.

15. Волгарев М.Н., Спиричев В.Б. Обеспеченность организма человека витаминами и пути ее улучшения // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. М., 1984 . - С.36-41.
16. Душейко А.А. Витамин А, обмен и функции. Киев, 1989. - 53 с.
17. Ефремов В. В. Применение витаминов в медицине. М., Медгиз, 1946, с. 80.
18. Е.М. Лукьянова, М.Л. Тараховский, М.Ф. Денисова и др. Витамины в педиатрии. К: 1984 – 128с.
19. Замуруев О.В. "Нормально-фазовая изократическая ВЭЖХ жирорастворимых витаминов: закономерности удерживания, оптимизация состава подвижной фазы и разработка аналитических методик". Дисс....канд. хим. наук. М. 2003. 197 с.
20. И.Г. Швиденко, И.О. Лунева, Р.М. Аронс, А.Ю. Томников. Микрофлора человека и окружающей среды. Методы изучения. 16 стр., 1994 г.
21. Картленд Б. Витамины - ваша жизненная энергия. М., Центрполиграф, 2000 г., 144 с.
22. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов: М., Наука, 1988.-240 с.
23. Киселев А.В., Яшин Я.И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М.: Химия, 1979. 288 с.
24. Клегер К. Витамины - источник здоровья. М.,1997 г., 159 с.
25. Кудряшов Б.А. Витамины, их физиологическое и биохимическое значение. Московское общество испытателей природы, 1953, с. 41-43, 68-72.
26. Кожанова Л.А., Федорова Г.А., Барам Г.И. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. - 2002. Т. 57-№1.-С.49-54.
27. К.Г. Федосеев. Физические основы и аппаратура микробного синтеза биологически активных соединений. М.; 1986 – 105с.

28. Ланин С.Н., Никитин Ю.С. Прогнозирование удерживания в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Межмолекулярные взаимодействия в подвижной фазе // Журн. аналит. химии. - 1991.- Т. 46.-№.

29. Леутский К.М. Витамин А. Черновцы, 1959.

30. Леутский К.М. Каротин /БМЭ- 1979. Т. 10 . - С. 177-178. М., 1992.-С. 137-138.

31. Литусов Н.В., Сергеев А.Г., Григорьева Ю.В., Иштутинова В.Г. Микрофлора окружающей среды и тела человека. Изд.: Уральская гос. мед. акад. 2008г. – 28 с.

32. Лоу К. Всё о витаминах (пер. с англ. Е.М. Незлобиной). М.; КРОН-ПРЕСС, 1995 – 320с.

33. Мусаев Ш.М., Огай Д.К., Фимушкина З.И. Способ получения закваски,используемой для приготовления кисломолочных продуктов. Патент № 854, приоритет 19.06.80.

34. Морозкина Т. С., Мойсеенок А. Г. Витамины. Краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей. М., Асар, 2002 г., 112 с.

35. Михайловина А.А. Исследование некоторых превращений каротина и его устойчивости /Автореф. .канд. техн. наук. Киев, 1952. 29 с.

36. Михайловина А.А., Савинов Б.Г. Растворимость бета-каротина в органических растворителях //Украинский химический журнал, 1949, вып. 15. С.285-287.

37. Михайловина А.А., Савинов Б.Г. Растворимость каротина в растительных маслах //Украинский химический журнал, 1950. Вып. 16. - С.183-186.

38. Миндел Э. Справочник по витаминам и минеральным веществам. Пер. с англ. М.: Медицина и питание, 2000. 432 с.

39. Методы определения витаминов (химические и биологические). Под ред. В.А. Девяткина. М: Пищепромиздат, 1954. с.

40. Перри С, Амос Р., Брюер П. Практическое руководство по жидкостной хроматографии: Пер. с англ. М.: Мир, 1974. 132-188.
41. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии. - М.: Мир, 1991.-763 с.
42. Разработка способа стабилизации масляных растворов бета-каротина /Денисюк, В.М. Воробьева, Н.А. Бекетова, В.Б. Спиричев и др. // Хранение и перераб. сельхозсырья. 1998. - № 1. - С. 36-37.
43. Савинов Б.Г. Каротин (провитамин А) и получение его препаратов. Киев: Изд. АН УССР, 1948.-425 с.
44. Сакодынский К.И. Современные сорбенты для хроматографии // Журн. ВХО им. Д.И/Менделеева. - 1983. Т. 28,-№ 1. - 34-43.
45. Стыскин Е.А., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 288 с.
46. Савинов Б. Г. Каротин. Киев, изд-во АН УССР, 1948, 230с.
47. Савинов Б. Г. Каротиноидный состав основных витаминных культур и хроматография каротиноидов. — В сб.: Технология и применение витамина А и каротина, М., Пищепромиздат, 1956. с. 46—53.
48. С. О. Чебаева. Пробиотики. Незаменимые помощники вашему организму. Изд. - Рипол Классик: ISBN: 978-5-386-02089-7, 2010 г. – 64 с.
49. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение токоферола и ретинола в биологических субстратах с использованием обращенно-фазовой хроматографии // 5 Всес. Симп. по молекул, жидкост. хроматогр.: Тез.докл., Юрмала, 1990. - Рига. Зинатне - 1990. - 210.
50. Способ получения кристаллического бета-каротина из природного источника: Заявка РСТ/ЕР 97/03961; С07С 403/24, С123 23/00 /Sibeyn M., De Pater R.-Заявл. 18.06.97; Опубл. 29.01.98.
51. Стронова Л.А., Суранова Н.П. и др. Современные методы анализа фармацевтических препаратов. Всесоюзный НИИ фармации. Т. XXVI. Москва, 1988. 32-34.

52. Торможение процесса окисления бета-каротина в растворах /I 136. Э.В. Алексеев, А.Б. Гагарина, Л.В. Вакулова и др. //Изв. АН СССР. Сер. хим. 1972. - №2. - С.312-316.

53. Филимонов В.Н., Балятинская Л.Н., Колосова И.Ф. Методы исследования жирорастворимых витаминов // Деп. В ВИНТИ, 1987. - № 3079. - 50 с.

54. Хроматография. Практическое приложение метода. В 2-х ч. 4.1. Пер. с англ./ Под ред Э. Хефтмана.-М.: Мир, 1986. 262-265.

55. Химический энциклопедический словарь. Под ред. И.Л. Кнунянца. М.: Сов. Энциклопедия, 1982. 792 с.

56. Херхагер М., Партоль Х. Mathcad 2000: полное руководство. - К.: ВНУ, 2000.-416 с.

57. Шнайдман Л. О. Усовершенствование технологии производства каротина. М., Пищепромиздат, 1956, с. 30—34.

58. Шнайдман Л. О. Производство витаминов из животного и растительного сырья. М., Пищепромиздат, 1950. с. 134.

59. Шнайдман Л.О. Производство витаминов. Издательство «Пищевая промышленность», 1973г. 433с.

60. Шилов П. И., Яковлев Т. Н. Основы клинической витаминологии. М., «Медицина», 1946, с. ПО.

61. Шнайдман Л. О. Значение витаминов в питании человека. — В сб. «Труды Всесоюзного совещания по витаминам», Уфа, Башиздат, 1963, с. 11—25.

62. Экстракция каротиноидов из растительного сырья /Михайлова Е.В., Ибрагимова Р.Р.// Матер. 46 научно-техн. конф. студ., аспирантов и мол. учен. Уфимского Гос. нефт. техн. ун-та. Уфа. 1995. - С. 172.

63. Ю.В. Хмелёвский, Н.Б. Поберезнина. Витамины и возраст человека. Киев; 1990 – 168с.

64. Янак Я.Л. Роль хроматографии в современной аналитической химии // Журн. ВХО им. Д. И. Менделеева. - 1983. Т. 28.-№ 1. - 3-7.

65. Andreoli R., Careri M., Manini P., Mori G., Musci M. HPLC analysis of fat-soluble vitamins on standard narrow bore columns with UV, Electrochemical and particle beam MS detection // *Chromatographia*. - 1997. - V. 44. - № 11-12. - P. 605-612.

66. Biegansowska M., Soczewinski E. Retention parameters and eluent composition in thin-layer and high-performance liquid chromatography of aromatic nitro compounds in reversed-phase systems // *J. Chromatogr.* - 1981. - V. 205. - № 2. -P. 451-465.

67. Collins Clyde A., Chow Ching K. Determination of vitamin A and vitamin A acetate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr.* - 1984. - V. 317. - P. 349-354.

68. Chen B.P. Vitamin A and beta-carotene on horse feed // *J. Dairy Sci.* 1987. - 70. - P.2732-2743.

69. Hurthi T.N., Devdharma V.D., Jacob George. Determination of vitamin A in vanaspathi by high-pressure liquid chromatographic method using UV detector// *J. Food sci and Techn'*- 1990. - № 27. - P. 1-3.

70. Rippahhn J., Halpaap H. Quantitation in high-performance microthin-layer chromatography // *J. Chromatogr.* - 1975. - V. 112. - P. 81-96.

71. Scheffer J.J.C., Koedam A., Baerheim Svendsen A. Improved gas chromatographic analysis of naturally occurring monoterpene hydrocarbons following pre-fractionation by liquid-solid chromatography/ *Sci. Pharm.* - 1976. - V. 44. - P. 119.

72. Thorpe V.A. Liquid chromatography and fluorescence detection of vitamin A in animal feeds, and premixes // *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* - 1990. - V. 73. - № 3. -P.463-466.

73. Thompson J.N., Natina G., Maxwell W.B/ High performance liquid chromatographic determination of vitamin A in margarin, milk, partially skimmed milk // *J. Assoc. Anal. Chem.* - 1980. - V. 63. - № 4. - P. 894-898.

74. Van Schaik F., van Schoonhoven J., Schrijver J. Simultaneous HPLC of several retinoids, carotenoids and E vitamins // 18th Int. Symp. Chromatogr.,

Amsterdam, 1990. Vol. 1.. - Amsterdam. - 1990. - МоР/077. Цит по РЖХ, 1991, 16Г242.

75. Willett W.C. et al. Relation of serum vitamins A and E and carotenoids to the risk of cancer/Willett W.C., Polk B.F., Underwood B.A. et al. // N. Engl. J. Med. 1984. - 310. P. - 430-434.

76. <http://www.myjane.ru/articles/text/?id=2350>

77. <http://ru.wikipedia.org/wiki/Ретинол>

78. <http://medarticle30.moslek.ru/articles/10917.htm>

79. <http://smed.ru/guides/158/#article>



# **БАРКАМОЛ АВЛОД ИЛМ-ФАН ТАРАҚҚИЁТИ ТАЯНЧИ**

**ЁШ ОЛИМЛАР ИЛМИЙ-ТЕХНИКАВИЙ КОНФЕРЕНЦИЯСИНИ  
МАҚОЛАЛАР ТЎПЛАМИ**

**«Баркамол авлод йили» га бағишланади**

**ТРУДЫ  
НАУЧНО- ТЕХНИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ**

**ГАРМОНИЧНО РАЗВИТОЕ ПОКОЛЕНИЕ  
ДВИЖУЩАЯ СИЛА НАУКИ**

**ТОШКЕНТ 2010**

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ  
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ  
ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

**БАРКАМОЛ АВЛОД ИЛМ-ФАН**

**ТАРАҚҚИЁТИ ТАЯНЧИ**

ЁШ ОЛИМЛАР ИЛМИЙ-ТЕХНИКАВИЙ КОНФЕРЕНЦИЯСИНИ  
МАҚОЛАЛАР ТЎПЛАМИ

**«Баркамол авлод йили»га бағишланади**

ТРУДЫ НАУЧНО- ТЕХНИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

# ГАРМОНИЧНО РАЗВИТОЕ ПОКОЛЕНИЕ ДВИЖУЩАЯ СИЛА НАУКИ

Посвящается «Году гармонично развитого поколения»

ТОШКЕНТ 2010

УДК 62:66+37(08)

ТКТИ Илмий Кенгаши қарори  
билан нашрга рухсат

этилган

қув  
қиту

ққ и

қола

қари  
қия  
қари  
қато

ҳит

ҳ

ҳсу

ғишланган.

Сборник трудов научно-технической конференции молодых ученых «Гармонично развитое поколение» отражает результаты исследований молодых ученых ряда высших учебных заведений Республики: докторантов, аспирантов, научных сотрудников и студентов бакалавриата и магистратуры по проблемам получения эффективных материалов на основе органических и неорганических веществ, создания новых информационных технологий, а также посвящен проблемам охраны окружающей среды, получению экологически чистых пищевых продуктов, менеджмента и маркетинга, проблем образования, педагогики и ряда других проблем.

**Тахририят хайъати:**  
**д.т.н., проф. Туробжонов С.М.**  
**д.т.н., проф. Икрамов А.А.**  
**д.т.н. проф. Мансуров Ю.Н.**  
**к.т.н. Кадырова Д.С.**



институти.

Ташкент кимё-технология

# ПРИГОТОВЛЕНИЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ОБОГАЩЕННЫХ СВОБОДНЫМ ВИТАМИНОМ А

**Научный руководитель: проф. Ташмухамедов М. С.  
Магистр 2-курса гр. М21-09 Кириченко Нина.**

Проблема сохранения здоровья, поиск путей снижения неблагоприятного воздействия на организм внешней средой являются в настоящее время крайне актуальными. Образ жизни современного человека (стрессы, быстрый ритм, неправильное питание) часто приводит к различным расстройствам организма. По данным исследований учёных у большинства жителей нашей страны наблюдается дисбактериоз. Дисбактериоз – широко распространённое явление на сегодняшний день. В настоящее время одним из наиболее доступных и эффективных способов его профилактики и лечения являются пробиотики - бактерии, биологически активные добавки и фармацевтические препараты на основе полезных микроорганизмов, прежде всего, лакто- и бифидобактерий, оказывающих многофакторное регулирующее и стимулирующее воздействие на организм человека, укрепляющих иммунную систему, защищающих от болезнетворных бактерий. Лактобактерии способны бороться с возбудителями инфекций кишечника, обладая антибактериальным действием. Покрывая стенки кишечника, они становятся непреодолимым барьером для патогенных бактерий. Бифидобактерии – полезные микроорганизмы, густо населяющие толстый кишечник. Количество их разнообразно. Отличаются они условиями размножения, продуктами обмена веществ и т.д. Лакто- и бифидобактерии стали основой для разработки множества новых продуктов, используемых как пищевые добавки. Для организма человека они являются основными и наиболее физиологичными группами микроорганизмов, которые поступают в организм человека при употреблении кисломолочных продуктов и препаратов биологического происхождения, тем самым, осуществляя защитную функцию организма. Благодаря пробиотикам в организме регулируются обменные процессы, усваиваются витамины и микроэлементы.

Однако, использование для питания разнообразных молочнокислых продуктов не всегда даёт результат по восстановлению иммунной системы. Одним из основных факторов этого процесса, является Витамин «А» - Ретинол [1-3]. Витамин «А» не только влияет на рост человека, но и способствует повышению сопротивляемости к различным видам инфекции. Витамин «А» в нашей иммунной системе борется с вирусами, бактериями и другими возбудителями болезней, поддерживает молодость и здоровье нашего тела, улучшает остроту зрения, а также повышает устойчивость к простудным заболеваниям. Он обладает также и рядом важных системных эффектов: необходим для деления и дифференцировки клеток эпителиальных тканей; функционирования органов зрения; оказывает хороший лечебный эффект при гастрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки; способствует быстрому заживлению ран и выздоровлению после оперативных вмешательств. Таким образом, витамин «А» полезен и необходим для жизнедеятельности организма человека.

В связи с этим, нами проведены экспериментальные работы по разработке нового кисломолочного пищевого продукта, содержащего полезные микроорганизмы и растительный витамин «А».

Для его приготовления нами использовано: цельное молоко, препараты «Бификол РL сухой» и «Лактобактерин - Ором» на основе штамма бактерий *bifidobacterium longum* полученный из ООО “Orom Biopreparat”, и в качестве источника витамина «А» – морковь.

Как известно в составе растительных объектов, в том числе в составе моркови витамин «А» содержится в связанном виде, т.е. в виде провитамина  $\beta$  – каротина

соединённого сложноэфирной связью. Под действием липаз *bifidobacterium longum*  $\beta$  – каротин выделяется в виде свободного каротина. Витамин А в больших дозах может привести к недомоганию или даже к повреждению органов, тогда как  $\beta$  – каротин практически безвреден, даже если есть его в больших количествах.[4] В организме каротин окисляется с помощью оксидаз и превращается в витамин А в необходимых количествах для организма. Большое преимущество  $\beta$  – каротина – его низкая токсичность. Также как и не достаток витамина А тоже отрицательно влияет на организм человека, все его преимущества указаны выше. Суточная потребность взрослого человека в витамине А ( в пересчёте на ретинол) – 1 мг, беременных и кормящих женщин – 1,25-1,5 мг, детей первого года жизни – 0,4 мг.[5]

Для получения закваски по методу Мусаева Ш.М. и Огай Д.К.[1] смесь содержащую полезные микроорганизмы разведенные при температуре 30-35°C в небольшом количестве молока, помещали в термостат для заквашивания при температуре 35°C. По нашим наблюдениям заквашивание молока с лактобактериями происходило в течение 4 ч., а заквашивание с бифидобактериями за 8 ч.

Для приготовления основного кисломолочного продукта с обогащённым витамином «А» брали 500мл пресного молока и натёртую морковь в соотношении 10% к количеству молока, смешивали и пастеризовали при температуре 80-85°C в течение 20 мин. После охлаждения смеси до 30-35°C вносили готовую закваску и помещали в термостат при той же температуре, как для закваски, на определённое время. После заквашивания продукт ставили на созревание в холодильник на 8 ч. Готовый продукт, по наблюдениям, заквашенный бифидобактериями имел оранжевую окраску, в то время как продукт заквашенный лактобактериями практически не наблюдалось выделение оранжевого пигмента.

Дегустационные испытания полученного продукта показали, что молоко заквашенное бифидум бактримо приобрело специфический запах. При заквашивании бифидум бактериями молока совместно с морковью в конечном продукте исчез неприятный запах. Полученный продукт применим для нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта и для профилактики витаминной недостаточности у людей и детей раннего возраста.

### Литература

1. Мусаев Ш.М., Огай Д.К., Фимушкина З.И. Способ получения закваски, используемой для приготовления кисломолочных продуктов. Патент № 854, приоритет 19.06.80.
2. Картленд Б. Витамины - ваша жизненная энергия. М., Центрполиграф, 2000 г., 144 с.
3. Клегер К. Витамины - источник здоровья. М., 1997 г., 159 с.
4. Морозкина Т. С., Мойсеенок А. Г. Витамины. Краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей. М., Асар, 2002 г., 112 с.
5. Лоу К. , Всё о витаминах. Перевод с английского Е. И. Незлобиной. – М.: КРОН-ПРЕСС, 1995г., - 320с.

