

На правах рукописи



Леонова Виктория Александровна

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ КИСЛОМОЛОЧНОГО
ПРОДУКТА С МЕТАБОЛИТНЫМ КОМПЛЕКСОМ *L. HELVETICUS***

4.3.3 – Пищевые системы

4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

МОСКВА, 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Научный руководитель: **Рожкова Ирина Владимировна**
кандидат технических наук

Официальные оппоненты: **Свириденко Галина Михайловна**
доктор технических наук, главный научный сотрудник направления микробиологических исследований молока и молочных продуктов ВНИИМС – филиала ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Волкова Галина Сергеевна
доктор технических наук, заведующая отделом биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и БАД ВНИИПБТ – филиала ФГБУН «ФИЦ питания, и биотехнологии»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет»

Защита состоится «23» сентября 2025 г. в 10 часов 00 минут на заседании объединенного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 99.0.092.02 при ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» по адресу 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11, корп. А, Зал А-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». Полный текст диссертации размещен в сети Интернет на официальном сайте ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» <http://www.mgupp.ru>.

С авторефератом можно ознакомиться на официальных сайтах ВАК Минобрнауки РФ (<http://vak.ed.gov.ru>) и ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» (<http://www.mgupp.ru>).

Автореферат разослан « » 2025 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета 99.0.092.02,
кандидат технических наук, доцент



Ю.В. Николаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Производство безопасных и качественных продуктов, в том числе с функциональными свойствами, является базовой задачей Стратегии научно-технического развития Российской Федерации, а развитие производства пищевых ингредиентов является одним из направлений государственной политики, представленных в Доктрине продовольственной безопасности Российской Федерации. Перспективным направлением решения проблемы здорового питания является создание и внедрение технологий пищевых ингредиентов и продуктов питания, обладающих доказанной физиологической активностью в отношении профилактики и уменьшения последствий основных видов социально значимых заболеваний. Многочисленные исследования и клинические испытания показывают, что продукты с пробиотическими микроорганизмами обладают доказанными иммуномодулирующими, антиоксидантными, гипохолестеринемическими, гипотензивными и др. свойствами. К ним относятся кисломолочные продукты и напитки.

Положительное влияние пробиотических микроорганизмов обусловлено, в том числе, продуктами бактериального биосинтеза (метаболитами). Данные компоненты, также известные как постбиотики и метабиотики, синтезируются естественным образом при производстве бактериальных препаратов. Супернатанты, получаемые при отделении бактериальной массы от культуральной жидкости, являются неперерабатываемыми отходами. Однако супернатанты содержат органические кислоты, витамины, аминокислоты и другие биологически активные соединения и могут рассматриваться как метаболитные комплексы.

Метаболитные комплексы молочнокислых бактерий обладают высокой биодоступностью, являются высокоактивными агентами, и потенциально могут использоваться в составе пищевых продуктов, в том числе кисломолочных, для придания им функциональных свойств.

Ранее учеными ФГАНУ «ВНИМИ» были исследованы пробиотические молочнокислые бактерии различных таксономических групп и их пробиотические свойства. В частности, *Lactobacillus helveticus* характеризуются высокой кислотообразующей активностью, антиоксидантными и антимикробными свойствами, что позволяет рассматривать их как потенциальных продуцентов метаболитных комплексов. В связи с вышеизложенным разработка кисломолочного продукта, содержащего метаболитный комплекс *L. helveticus*, является актуальной.

Степень разработанности темы. Теоретические и практические основы разработки кисломолочных и ферментированных продуктов питания заложили отечественные ученые Ганина В.И., Зобкова З.С., Свириденко Г.М., Свириденко Ю.Я. Семенихина В.Ф., Сорокина Н.П., Рожкова И.В., Рябцева С.А. Перспективам использования метаболитов МКБ в медицинской и пищевой промышленности посвящены работы Вахитова Т.Я., Волковой Г.С., Нечисляева В.А., Полянской И.С., Шендерова Б.А., Moradi M., Rad A.H., Salminen S., Sawada D., Sadighbathi S. и др. Научно-практические решения, предложенные учеными, стали основой для развития технологий глубокой переработки пищевого сырья и расширения ассортимента специализированной продукции.

Цель и задачи исследования. Цель работы – разработать биотехнологию кисломолочного продукта, содержащего метаболитный комплекс *L. helveticus*. В

соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи исследования:

1. провести анализ научно-технической литературы по теме исследований в части систематизации материала по технологическим аспектам производства, качественным характеристикам и перспективным направлениям применения метаболитного комплекса;
2. подобрать штамм *L. helveticus* для получения метаболитного комплекса на основании данных о биохимической активности, антимикробных свойствах, ферментативной активности;
3. исследовать динамику роста выбранного штамма *L. helveticus* на разных питательных средах и обосновать параметры его культивирования для получения метаболитного комплекса, изучить влияние условий культивирования на состав и свойства метаболитного комплекса;
4. исследовать влияние режимов и вида сушки на свойства и состав метаболитного комплекса *L. helveticus*;
5. разработать биотехнологию продукта с метаболитным комплексом *L. helveticus* и исследовать его пробиотические свойства;
6. разработать комплект документов по стандартизации на метаболитный комплекс и кисломолочный продукт с его использованием.

Научная новизна.

Показана дифференцированная способность исследуемого штамма *L. helveticus* к синтезу органических кислот при культивировании на разных питательных средах.

Исследованы зависимости изменения состава и свойств метаболитного комплекса от условий культивирования исследуемого штамма. В условиях *in vitro* доказаны пробиотические свойства метаболитного комплекса *L. helveticus*.

Доказано увеличение антимикробных, бифидогенных и антиоксидантных свойств кисломолочного продукта, содержащего метаболитный комплекс *L. helveticus*.

Теоретическая и практическая значимость заключалась в создании доказательной базы технологической целесообразности переработки культуральных жидкостей, образующихся при производстве бактериальных препаратов, в метаболитные комплексы для их применения в составе пищевой продукции. Разработан кисломолочный продукт с метаболитным комплексом *L. helveticus*, обоснованы и экспериментально подтверждены его пробиотические свойства.

Установлены зависимости состава и комплекса свойств метаболитного комплекса от параметров культивирования *L. helveticus*. Разработаны и внедрены на производство СТО 00419785-081.1-2024 «Метаболитный комплекс *L. helveticus*» и СТО 00419785-081.1/1-2024 «Продукт кисломолочный с метаболитным комплексом».

Методология и методы исследования. В рамках разработки кисломолочного продукта выдвинута гипотеза о целесообразности и рациональности переработки культуральной жидкости, получаемой при производстве бактериальных препаратов, для получения МК.

Исследования проведены во ФГАНУ «ВНИМИ» в рамках выполнения работ по Государственному заданию FNSS-2022-006. Методология работы построена на выполнении следующих этапов: ретроспективный поиск и формализация проблемы, анализ научно-технического материала предметного поля, формулирование научной

концепции и гипотезы, постановка цели и задач, проведение исследований, обработка полученного материала и оформление выводов по результатам работы. Апробация технологических решений осуществлена на базе экспериментального цеха ФГАНУ «ВНИМИ» и на предприятиях ООО «НОВАЯ ИЗИДА», ООО «Итальянские традиции».

При выполнении работы применяли стандартизованные и общепринятые методы исследований, используемые при контроле физико-химических, микробиологических и органолептических показателей молочных продуктов с соответствующей статистической обработкой.

Положения, выносимые на защиту:

1. Биотехнология кисломолочного продукта, содержащего метаболитный комплекс *L. helveticus*.
2. Данные о влиянии параметров культивирования *L. helveticus* на биологическую активность МК.
3. Данные о составе МК *L. helveticus*.
4. Наукоёмкая технология пищевой добавки на основе МК *L. helveticus*.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность теоретических и экспериментальных данных подтверждается тщательно спланированной программой исследований, соразмерной выборкой объектов, применением современной научно-методической и приборной базы, а также методов статистической обработки массивов данных.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были предметом докладов на научных конференциях, форумах, конгрессах: II Всероссийский научно-практический конгресс с международным участием «Биотехнология и устойчивое развитие», XII Всероссийская (национальная) научная конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. (Кемерово, 2024 г), XI Всероссийская (национальная) научная конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2023 г), конференция "Кишечный микробиом: профилактика нарушений и пути коррекции"(Москва, 2024).

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Непосредственный вклад автора состоит в рассмотрении источников научной литературы, разработке дизайна исследования, формулировании цели и задач исследования, проведении экспериментов, анализе результатов и формулировании выводов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует пунктам 5 «Технология мясной, молочной и рыбной продукции и холодильных производств» и 13 «Технология функциональных и специализированных продуктов, пищевых добавок и ингредиентов» паспорта специальности 4.3.3 «Пищевые системы» и пунктам 3 «Микробиология пищевых систем» и 13 «Технологии микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, продуктов метаболизма и других продуктов» паспорта специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 статей, из них 5 статей – в журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ К1.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, объектов и методов исследований, экспериментальной части,

выводов, перечня использованных литературных источников и приложений. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы и 23 рисунка. Список литературы включает 148 источников, из них 36 отечественных и 112 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы концепция, цель и задачи исследования, изложены научная новизна, практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, представлены степень достоверности, методология, результаты публикационной активности, апробации и данные по структуре и объему диссертации.

В первой главе представлен анализ научно-технической литературы по теме исследования. Проведен анализ тенденций в производстве специализированных продуктов питания, описаны основные биологически активные метаболиты МКБ и их свойства. Представлены базовые технологические приемы, используемые при получении метаболитов МКБ и приведены аспекты их использования.

На основании литературных данных подтверждена актуальность выбранной темы диссертационной работы и необходимость разработки технологии кисломолочного продукта с использованием МК *L. helveticus*.

Во второй главе «Организация работы, объекты и методы исследований» приведена организация работы, описаны объекты и методы, представлена схема проведения исследований (рис. 1). Объектами исследований служили:

- штаммы *Lactobacillus helveticus* 20Т, *Lactobacillus helveticus* АВ, *Lactobacillus helveticus* Н9 из коллекции молочнокислых и пробиотических микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ»;

- МК *L. helveticus*;

- кисломолочный продукт, содержащий МК *L. helveticus*.

При проведении экспериментальной части исследований были использованы стандартизованные и общепринятые микробиологические, физико-химические, математические и другие методы. Обработку результатов, полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью пакета программ «Microsoft Office» по результатам 3-5 повторностей.

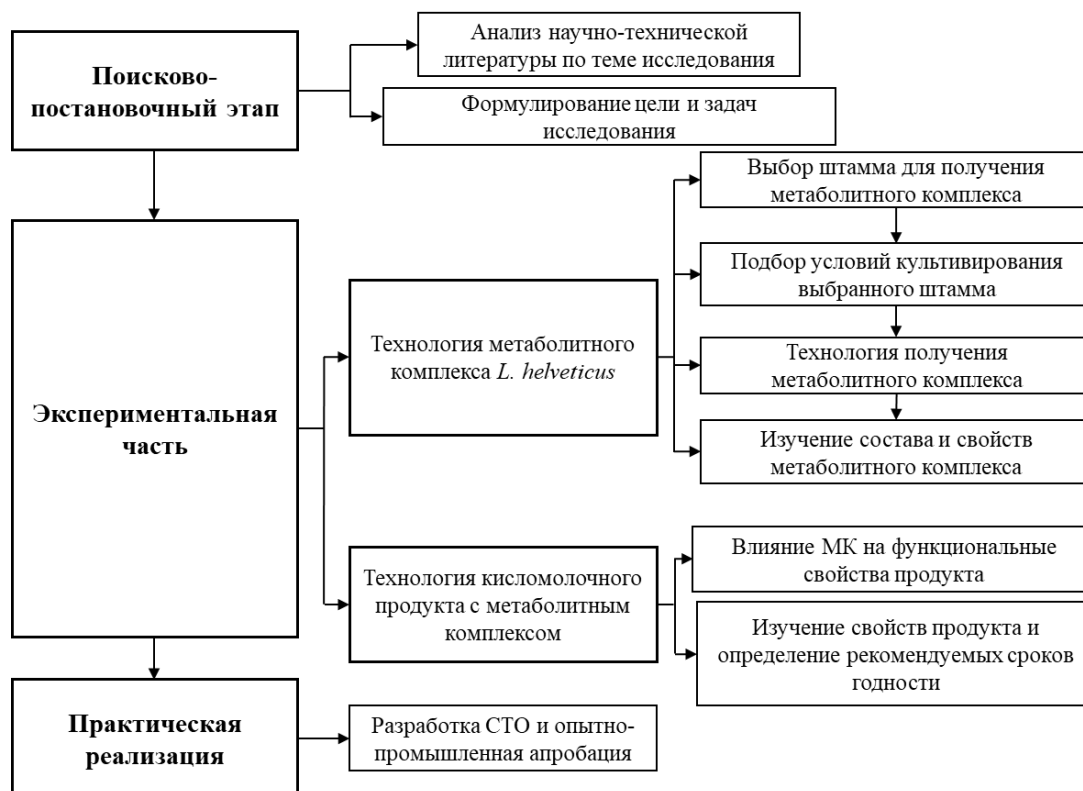


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

В третьей главе «Экспериментальная часть» приведены результаты разработки технологии МК *L. helveticus* и биотехнологии кисломолочного продукта с его использованием.

На первом этапе исследования проводилась сравнительная оценка свойств (биохимические профили, ферментативная активность, способность синтезировать ЭПС, антимикробная активность) штаммов *L. helveticus* 20Т, *L. helveticus* Н9 и *L. helveticus* АВ с целью выбора пробиотического штамма для получения МК. Также проведена оценка устойчивости штаммов *L. helveticus* к АБП различных групп. Профили метаболизма углеводов штаммами *L. helveticus* 20Т, *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* Н-9, полученные с использованием системы API 50 CHL (Biomerieux, Франция) представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Биохимические профили *L. helveticus*

Соединение	Биохимическая реакция			Соединение	Биохимическая реакция		
	АВ	20Т	Н9		АВ	20Т	Н9
Д-галактоза	+	+	+	Д-лактоза	+	+	+
Д-глюкоза	+	+	+	Д-трегалоза	+	-	+
Д-фруктоза	+	-	-	Д-раффиноза	-	-	-
Д-манноза	-	+	-	Н-ацетилглюкозамин	+	+	-

Согласно результатам исследований биохимической активности, штаммы *L. helveticus* 20Т, *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* Н-9 ферментируют Д- галактозу, Д-лактозу и Д-глюкозу. Штамм *L. helveticus* АВ метаболизирует Д-фруктозу, Н-ацетилглюкозамин и Д-трегалозу. Штамм *L. helveticus* 20Т метаболизирует Д-маннозу, Н-ацетилглюкозамин. Штамм *L. helveticus* Н-9 метаболизирует Д-глюкозу, Д-лактозу, Д-трегалозу. Ферментативные профили штаммов *L. helveticus*,

полученные с использованием системы API®ZYM Biomerieux, Франция), представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Ферментативные профили штаммов *L. helveticus*

Фермент	Активность, у.е.			Фермент	Активность, у.е.		
	H9	20T	AB		H9	20T	AB
Лейцин ариламидаза	4,0	3,5	5,0	Кислая фосфатаза	1,5	0	1,0
Валин ариламидаза	0	0	4,0	Нафтол-AS-BI-фосфогидролаза	4,0	3,0	3,0
Цистин ариламидаза	3,0	0	4,0	β -галактозидаза	4,0	3,0	4,0

У исследуемых штаммов *L. helveticus* выявлена высокая активность β -галактозидазы, и нафтол-AS-BI-гидролазы. Исследуемые штаммы также проявляли лейцин и цистин ариламидазную активность. Штаммы *L. helveticus* 20T и *L. helveticus* AB проявляли активность валин ариламидазы.

При исследовании устойчивости штаммов *L. helveticus* к АБП не выявлено резистентности к клинически значимым препаратам, что позволяет сделать вывод о безопасности данных штаммов с точки зрения распространения антибиотикорезистентности (табл. 3).

Таблица 3 – Устойчивость штаммов *L. helveticus* к АБП

№ п/п	Антибактериальный препарат	Количество вещества на диске, мкг	Диаметр зоны задержки роста, мм		
			<i>L. helveticus</i> 20 T	<i>L. helveticus</i> H-9	<i>L. helveticus</i> AB
1	Аминогликозиды (гентамицин)	10	S	S	S
2	Пенициллины (ампициллин)	10	S	S	S
3	Тетрациклин	30	S	S	S
4	Макролиды-азалиды (азитромицин)	15	S	S	S
5	Линкомицин	15	S	S	S
6	Левомецетин	30	S	S	S

Примечание: S – чувствительный, I – промежуточно-чувствительный, R – устойчивый

Согласно полученным данным, исследуемые штаммы имеют способность синтезировать ЭПС. При культивировании на среде с рутениевым красным колонии исследуемых штаммов *L. helveticus* имели белую окраску, что свидетельствует о синтезе ЭПС (рис. 2).



L. helveticus 20T



L. helveticus H-9



L. helveticus AB

Рисунок 2 – Рост штаммов *L. helveticus* на среде с рутением красным

Антимикробную активность по отношению к патогенным тест-культурам определяли методом совместно развивающихся смешанных популяций по МУ 2.3.2.2789-10 (рис. 3–5).

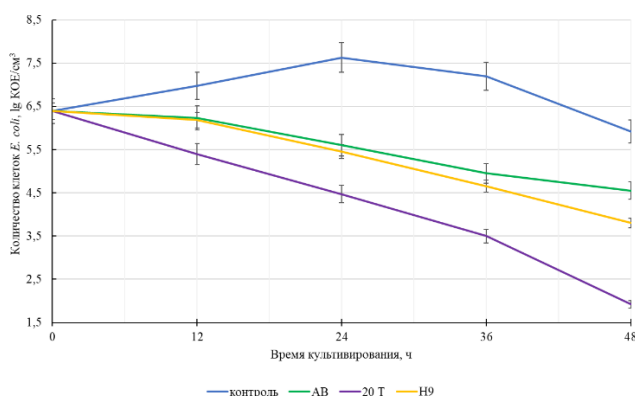


Рисунок 3 – Антимикробная активность штаммов *L. helveticus* по отношению к *E. coli* ATCC 25922

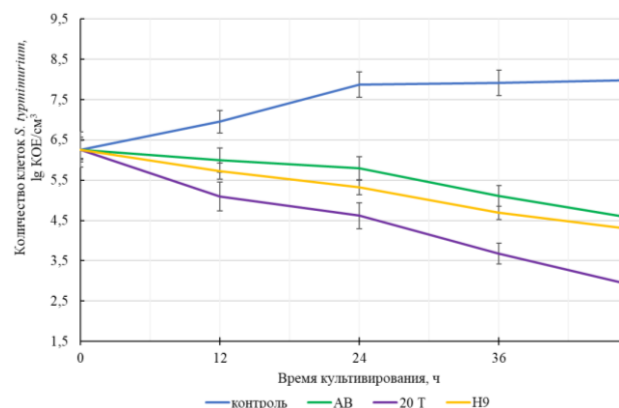


Рисунок 4 – Антимикробная активность штаммов *L. helveticus* по отношению к *S. typhimurium* ATCC 14028

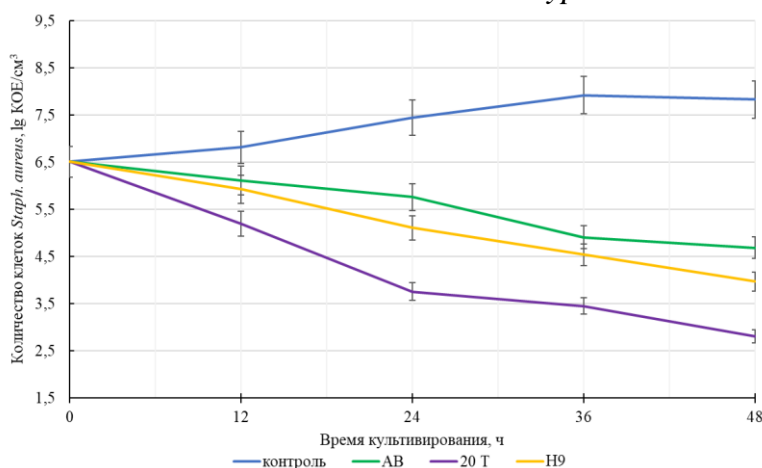


Рисунок 5 – Антимикробная активность штаммов *L. helveticus* по отношению к *Staph. aureus* ATCC 6538

В контрольном образце количество клеток *E. coli* через 24 ч культивирования составляло $4,3 \times 10^7$ КОЕ/см³, через 48 ч - $8,5 \times 10^5$ КОЕ/см³.

При совместном культивировании *E. coli* ATCC 25922 и штамма *L. helveticus* AB количество клеток *E. coli* через 24 ч культивирования составило $4,0 \times 10^5$ КОЕ/см³, через 48 ч количество клеток *E. coli* снизилось до $3,6 \times 10^4$ КОЕ/см³.

При совместном культивировании *E. coli* ATCC 25922 и штамма *L. helveticus* H9 клеток *E. coli* через 24 ч сокультивирования составило $2,8 \times 10^5$ КОЕ/см³, через 48 ч количество клеток патогена снизилось до $6,5 \times 10^3$ КОЕ/см³. Наибольшее антимикробное действие на *E. coli* ATCC 25922 оказывал штамм *L. helveticus* 20T. Через 24 ч количество клеток *E. coli* составило $3,0 \times 10^4$ КОЕ/см³, через 48 ч - $8,5 \times 10^1$ КОЕ/см³.

Штаммы *L. helveticus* AB и *L. helveticus* H9 проявляли схожее антимикробное действие на тест-культуру *S. typhimurium* ATCC 14028. При сокультивировании количество клеток *S. typhimurium* через 24 ч составляло $6,2 \times 10^5$ и $2,0 \times 10^5$ КОЕ/см³ соответственно. Через 48 ч сокультивирования количество клеток *S. typhimurium*

снижалось до $3,5 \times 10^4$ КОЕ/см³ и $1,8 \times 10^4$ КОЕ/см³ для штаммов *L. helveticus* АВ и *L. helveticus* Н9 соответственно. В контрольном образце количество клеток *S. typhimurium* через 24 ч культивирования составляло $7,5 \times 10^7$ КОЕ/см³, через 48 ч – $9,6 \times 10^7$ КОЕ/см³.

При сокультивировании *S. typhimurium* ATCC 14028 со штаммом *L. helveticus* 20Т через 24 ч количество клеток патогена составило $4,2 \times 10^4$ КОЕ/см³, через 48 ч количество клеток *S. typhimurium* снизилось до $7,0 \times 10^2$ КОЕ/см³.

В контроле количество клеток *Staph. aureus* через 24 ч культивирования составило $2,8 \times 10^7$ КОЕ/см³, через 48 ч культивирования количество клеток возросло до $6,8 \times 10^7$ КОЕ/см³. При совместном культивировании *Staph. aureus* ATCC 6538 и *L. helveticus* АВ количество клеток *Staph. aureus* через 24 ч составило $5,7 \times 10^5$ КОЕ/см³, через 48 ч сокультивирования количество клеток *Staph. aureus* снизилось до $5,0 \times 10^4$ КОЕ/см³. При совместном культивировании *S. aureus* ATCC 6538 и *L. helveticus* Н9 количество клеток *Staph. aureus* составило $1,3 \times 10^5$ КОЕ/см³ и $9,5 \times 10^3$ КОЕ/см³ через 24 ч и 48 ч культивирования соответственно. При совместном культивировании *Staph. aureus* ATCC 6538 и *L. helveticus* 20Т количество клеток патогена через 24 ч составило $5,8 \times 10^3$ КОЕ/см³, через 48 ч количество клеток *S. aureus* снизилось до $6,5 \times 10^2$ КОЕ/см³.

Согласно полученным данным, штаммы *L. helveticus* Н9, *L. helveticus* АВ и *L. helveticus* 20Т проявляли схожую биохимическую и ферментативную активность, все три штамма продемонстрировали способность к синтезу ЭПС. Однако, для исследуемых штаммов наблюдались различия в антимикробной активности по отношению к патогенным микроорганизмам. Наибольшую антимикробную активность проявлял штамм *L. helveticus* 20Т, исходя из этого данный штамм был выбран для получения МК.

На следующем этапе исследований проводилась оценка влияния параметров культивирования (ПС, доза инокулята и продолжительность культивирования) на рост выбранного штамма *L. helveticus* 20 Т и его кислотообразующую активность (рис. 6 и 7).

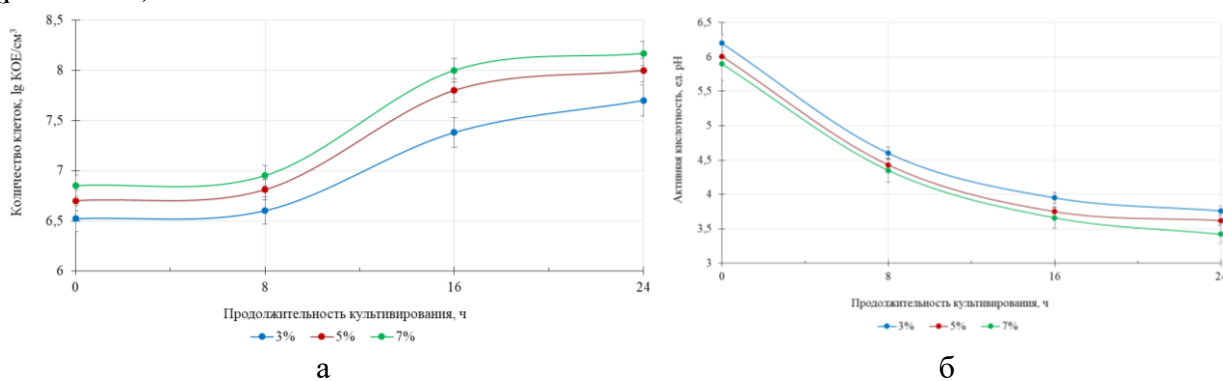
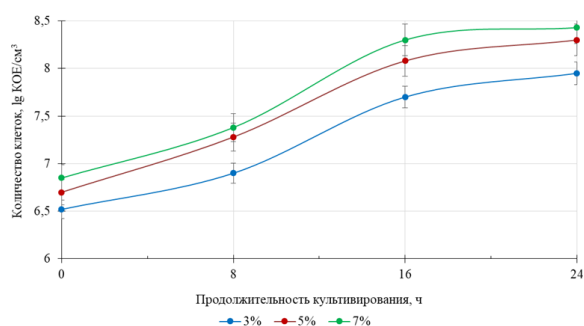
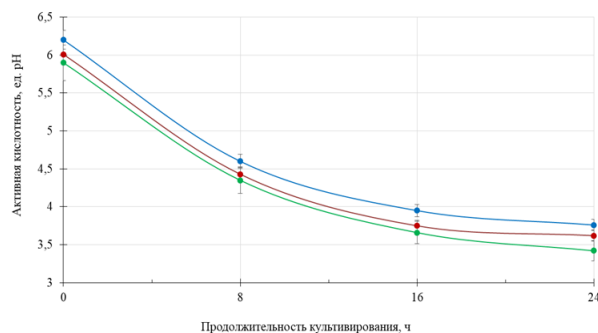


Рисунок 6 – Изменение количества клеток *L. helveticus* 20Т (а) и активной кислотности среды (б) при культивировании на среде MRS-бульон



а



б

Рисунок 7 – Изменение количества клеток *L. helveticus* 20Т (а) и активной кислотности среды (б) при культивировании на стерильном обезжиренном молоке

Показано, что скорость роста *L. helveticus* 20Т на стерильном обезжиренном молоке была несколько выше, чем на среде MRS-бульоне. Увеличение дозы инокулята с 3% до 5% способствовало более интенсивному росту клеток, а увеличение дозы инокулята с 5% до 7% не оказывало значимого влияния на скорость роста. Доза инокулята не оказывала значительного влияния на кислотообразующую активность *L. helveticus* 20Т. Поэтому для подбора режима культивирования дополнительно проведена оценка влияния продолжительности культивирования и дозы инокулята на антимикробную активность КЖ *L. helveticus* 20Т. Антимикробную активность определяли методом луночной диффузии в агар. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Антимикробная активность КЖ *L. helveticus* 20Т

Образец		Диаметр зоны ингибирования роста тест-культуры, мм					
		MRS-бульон			Стерильное обезжиренное молоко		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538
Контроль		отс.	отс.	отс.	отс.	отс.	отс.
3%	8 ч	9,0±0,5	9,5±0,8	отс.	9,0±0,5	9,5±1,0	отс.
	16 ч	12,0±1,2	11,5±1,2	10±0,7	10,0±0,8	11,5±0,5	11,0±1
	24 ч	13,0±0,6	13,0±0,9	12,0±0,7	13,0±0,5	12,5±1,0	13,0±1,0
5%	8 ч	10,0±0,7	9,0±0,5	отс.	10,0±0,6	9,5±0,8	9,0±0,5
	16 ч	12,0±0,6	11,0±1,0	11,0±0,8	12,5±0,6	12,0±0,5	11,0±0,7
	24 ч	14,0±1,3	15,0±0,6	14,0±1,0	16,0±1,2	15,5±1,0	14,5±1,3
7%	8 ч	9,5±1,0	10,0±1,0	отс.	10,0±1,0	9,5±1,0	отс.
	16 ч	12,0±0,7	11,0±0,7	12,0±0,7	12,0±1,0	11,0±0,7	12,5±1,2
	24 ч	15,0±1,0	15,0±1,0	14,5±1,0	15,0±1,0	16,0±0,7	15,0±0,7

При увеличении продолжительности культивирования наблюдалось усиление антимикробной активности КЖ. Так же антимикробное действие КЖ возрастало при увеличении дозы инокулята с 3% до 5%. Антимикробное действие КЖ, полученных при использовании 5% и 7% инокулята было сопоставимым. Исходя из полученных данных, подобраны оптимальные параметры культивирования *L. helveticus* 20Т при (37±2) °С: доза инокулята 5%, продолжительность 24ч.

В технологии получения биологически активных метаболитов МКБ необходимо обеспечить наиболее полное отделение клеток микроорганизма от КЖ.

Для этого применяли центрифугирование. Зависимость остаточного количества клеток от скорости центрифугирования представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Влияние скорости центрифугирования на количество клеток *L. helveticus* 20Т в МК

№ п/п	Скорость вращения центрифуги, об/мин	Относительное ускорение центрифуги, g	Остаточное количество клеток КОЕ/см ³	
			МК молоко	МК MRS
1	2000	447,2	$5,6 \times 10^5$	$9,5 \times 10^4$
2	4000	1788,8	$8,0 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$
3	6000	4024,8	$2,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
4	8000	7155,0	$2,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$

Согласно полученным результатам, при увеличении частоты вращения центрифуги остаточное количество клеток продуцента в супернатантах снижалось. Поскольку в полученных МК содержалось остаточное количество клеток *L. helveticus*, потребовалось введение дополнительной операции стерилизации фильтрацией через фильтр 0,2 мкм (Sartorius, Германия).

На следующем этапе исследований проводилась оценка содержания органических кислот в МК *L. helveticus* 20Т, полученных при культивировании данного штамма на разных ПС. Контрольные образцы перед проведением исследований также подвергались центрифугированию со скоростью 8000 об/мин в течение 15 мин. Данные по содержанию органических кислот в нативных МК *L. helveticus* 20Т представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Содержание органических кислот в МК *L. helveticus* 20Т

№ п/п	Органическая кислота	Концентрация, мг/100 см ³			
		Контроль (MRS-бульон)	МК MRS	Контроль (Молоко)	МК молоко
1	Молочная	<0,1	1357,3±40,7	33,0±3,1	2715,1±67,9
2	Уксусная	211,1±12	215,2±10	9,0±0,4	32,1±2,1
3	Лимонная	227,5±15	221,6±14,2	<0,1	<0,1

По результатам исследований подтверждено, что молочная кислота является основным метаболитом *L. helveticus* 20Т, синтезируемым при сбраживании углеводов. В МК *L. helveticus* 20Т также содержится уксусная кислота. В МК, полученном при культивировании на MRS-бульоне, содержание уксусной и лимонной кислот сопоставимо с контролем. Антимикробная активность МК представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Антимикробная активность МК в зависимости от используемой ПС

Образец	Диаметр зоны ингибирования роста тест-культуры, мм		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538
Контроль MRS-бульон	отс.	отс.	отс.
Контроль молоко	отс.	отс.	отс.
МК MRS	12,5±0,5	9,0±0,5	9,0±0,5
МК Молоко	14,5±1,0	13,0±0,8	12,5±1,2

МК, полученные при культивировании на обезжиренном молоке, проявляли большую антимикробную активность по отношению к исследуемым тест-культурам. Результаты исследования бифидогенной активности МК представлены на рисунке 8.

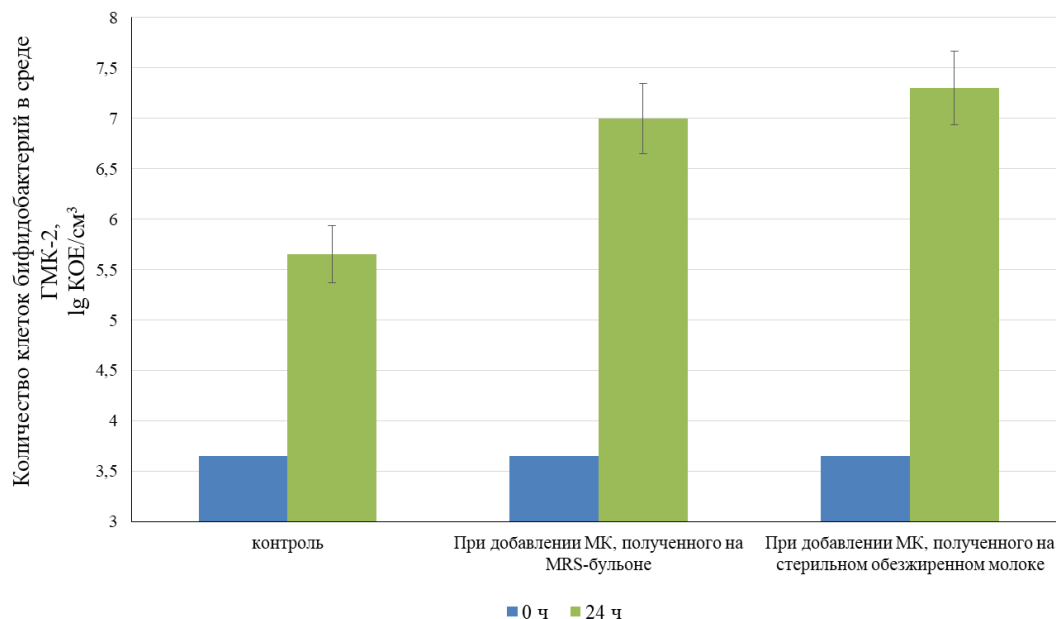


Рисунок 8 – Бифидогенная активность МК

Бифидогенную активность определяли *in vitro* по способности исследуемых образцов стимулировать рост бифидобактерий при добавлении в среду ГМК-2. По результатам исследований, МК *L. helveticus* 20Т оказывали стимулирующий эффект на рост бифидобактерий.

В контрольном образце начальное содержание *B. adolescentis* MC-42 составило $4,5 \times 10^3$ КОЕ/см³, через 24 ч культивирования количество бифидобактерий возросло до $4,5 \times 10^5$ КОЕ/см³. При добавлении МК, полученного на среде MRS-бульон, количество клеток *B. adolescentis* MC-42 через 24 ч культивирования составило $1,0 \times 10^7$ КОЕ/см³, при добавлении МК, полученного на стерильном обезжиренном молоке, – $2,0 \times 10^7$ КОЕ/см³.

Показано, что МК, полученные при культивировании на стерильном обезжиренном молоке, характеризуются более высокой антимикробной активностью и более высоким содержанием органических кислот. При этом бифидогенная активность МК была, полученных на разных ПС, сопоставима. Исходя из этого, для дальнейшей работы выбраны следующие параметры накопления МК: среда культивирования – стерильное обезжиренное молоко, доза инокулята 5%; продолжительность культивирования – 24 ч.

На следующем этапе исследований проводили выбор способа сушки МК. Представляло интерес сравнительное исследование использования сублимационной и распылительной сушки МК *L. helveticus* 20 Т. Перед сублимационной сушкой МК замораживали при температуре минус (35 ± 5) °С в течение 5 ч, затем высушивали при следующем режиме: температура коллектора минус (55 ± 5) °С; остаточное давление (0,3–1,3) Па; продолжительность сушки 48 ч. Массовая доля влаги сублимационно высушенного МК составила (4,5–4,7) %.

Температурные режимы распылительной сушки варьировались:

1. температура на входе (185 ± 5) °С, на выходе – (70 ± 5) °С;
2. температура на входе (175 ± 5) °С, на выходе – (70 ± 5) °С;

3. температура на входе (175 ± 5) °C, на выходе – (60 ± 5) °C;
4. температура на входе (175 ± 5) °C, на выходе – (25 ± 5) °C;
5. температура на входе (175 ± 5) °C, на выходе – (40 ± 5) °C.

В процессе распылительной сушки при температурных режимах №1 – №3 наблюдалось налипание МК на стенки оборудования, что предположительно связано с высоким содержанием органических кислот. В МК, высушенном при температурных режимах №4 и №5 массовая доля влаги составила (10,2–10,5) %, что может быть связано с низкой температурой воздуха на выходе.

Чтобы обеспечить высушивание МК и предотвратить налипание препарата предложен способ разделения потоков горячего воздуха, при этом температура воздуха на входе составила (175 ± 5) °C, на выходе - (60 ± 5) °C. Массовая доля влаги в полученном сухом МК была ниже, чем в сублимационно высушенном МК, и составила (3,7– 3,9) %.

На следующем этапе исследовали состав полученных сухих МК *L. helveticus* 20 Т. Результаты исследования количества органических кислот в сухих МК представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Содержание органических кислот в сухих МК *L. helveticus* 20Т

Образец	Содержание органических кислот, мг/100г			
	Молочная	Уксусная	Лимонная	Янтарная
Сублимационно высушенный МК	26901 \pm 125	231 \pm 11	1041 \pm 35	216 \pm 10
Распылительно высушенный МК	26572 \pm 114	192 \pm 15	956 \pm 42	189 \pm 17

Согласно представленным результатам, содержание органических кислот в распылительно высушенном и сублимационно высушенном МК *L. helveticus* 20Т было сопоставимо.

Результаты исследования аминокислотного состава сухих МК *L. helveticus* представлены на рисунке 9.

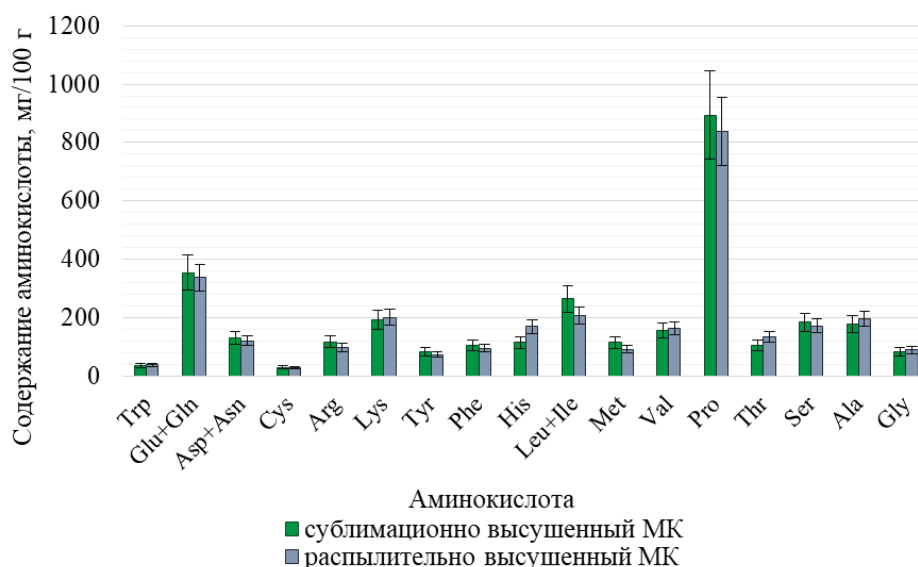


Рисунок 9 – Аминокислотный состав МК

Аминокислотный состав полученных МК практически не отличался. В частности, содержание пролина в сублимационно высушенном МК составило 893,6 мг/100г, в распылительно высушенном – 837,6 мг/100г, содержание глутамина и глутаминовой кислоты составило 353,6 мг/100г и 336,13 мг/100г в сублимационно

высушенном МК и распылительно высушенном МК соответственно. Содержание лизина в сублимационно высушенном МК составило 193,4 мг/100г, в распылительно высушенном МК – 200,6 мг/100г. Результаты исследования содержания витаминов группы В в высушенных МК представлены на рисунке 10.

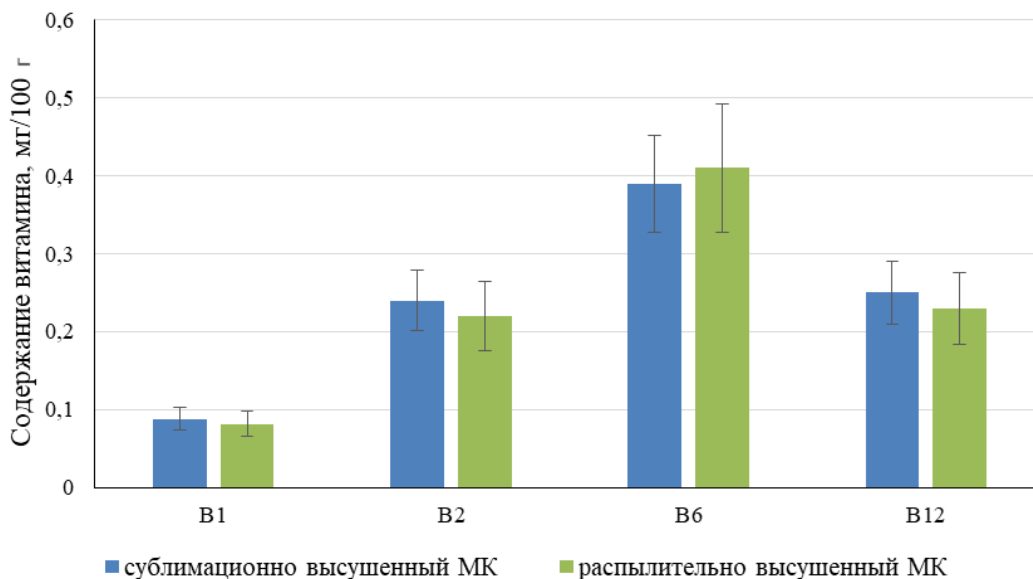


Рисунок 10 – Содержание витаминов группы В в сухих МК

В сухом МК выявлено содержание витаминов В₁, В₂, В₆ и В₁₂, при этом содержание витаминов в МК, высушенных разными способами, было сопоставимо, что свидетельствует об отсутствии влияния способа сушки на содержание витаминов в МК.

В сухих МК исследована антимикробная активность (таблица 9). Для проведения исследования 0,1 г навески МК растворяли в 100 мкл стерильной дистиллированной воды.

Таблица 9 – Антимикробная активность сухих МК

Образец	Диаметр зоны ингибирования роста тест-культуры, мм		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538
Контроль молоко	отс.	отс.	отс.
Сублимационно высушенный МК	20,5±1,2	21,0±1,0	18,0±1,2
Распылительно высушенный МК	21,0±1	21,0±1,4	17,5±0,8

Из полученных данных следует, что предложенный способ сушки существенно не влияет на антимикробную активность МК. По результатам исследований для получения МК подобран способ распылительной сушки, обеспечивающий более низкое содержание влаги в сравнении с сублимированным МК при сопоставимом составе и антимикробной активности.

На основе проведенных исследований разработана технология производства МК *L. helveticus* 20Т и разработан СТО 00419785-081/1-2024 «Метаболитный комплекс *L. helveticus*». МК предназначен для использования в составе пищевых продуктов, в том числе, специализированной продукции. Принципиальная технологическая схема производства МК представлена на рисунке 11.

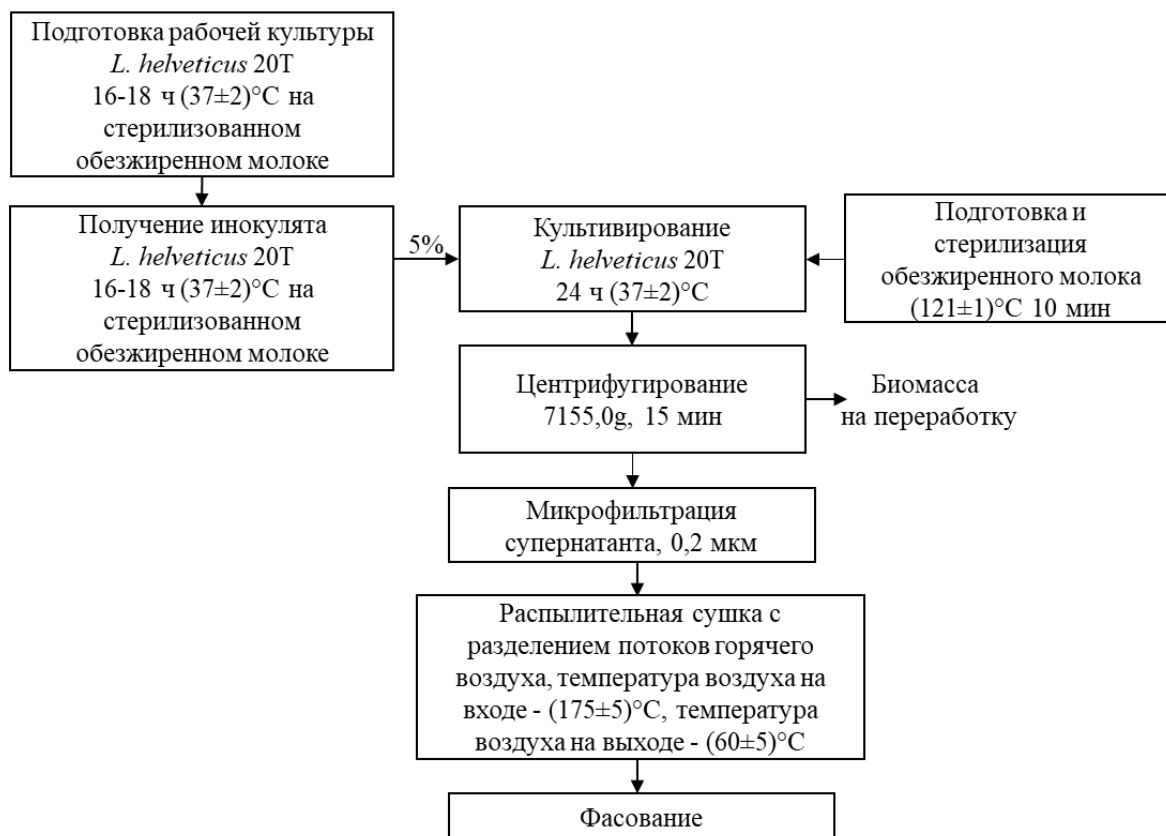


Рисунок 11 – Принципиальная технологическая схема производства МК *L. helveticus*

Полученный МК использовался для разработки кисломолочного продукта. Для этого использовали закваску ProdLine®St1/Lb3 (ФГАНУ «ВНИМИ»), содержащую культуры *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, вносимую в пастеризованное молоко в количестве 3%. МК вносили в количестве 1% одновременно с закваской. Перед внесением в молочную основу 10 г сухой навески МК растворяли в 10 см³ дистиллированной воды и пастеризовали при температуре (87±2) °C 15 мин. Сбраживание осуществляли при температуре (42±2) °C до образования сгустка. Полученные образцы кисломолочного продукта исследовали по физико-химическим, микробиологическим и органолептическим характеристикам (таблица 10). В качестве контроля использовался кисломолочный продукт, полученный при тех же технологических режимах, но без внесения МК.

Таблица 10 – Показатели готового продукта

Наименование показателя	Значение показателя	
	Контроль	Опыт
Кислотность, °Т	82±2	85±3
Активная кислотность, ед. рН	4,63±0,03	4,59±0,02
Время сквашивания, ч	5,0	5,5
Количество МКБ, КОЕ/см ³	1,2×10 ⁹	1,4×10 ⁹
Витамин В ₆ мкг/100г	1,12±0,09	5,32±0,07
Массовая доля белка, %	2,8±0,08	2,9±0,06
Массовая доля жира, %	3,2±0,1	3,2±0,1
Массовая доля СОМО, %	7,8±0,02	7,8±0,03

Наименование показателя	Значение показателя	
	Контроль	Опыт
Вкус и запах	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	
Цвет	Молочно-белый, равномерный по всей массе	
Внешний вид и консистенция	Однородная с нарушенным сгустком	

Дегустаторы отметили приятную вкусоароматическую гамму и отсутствие посторонних привкусов. Исследованы функциональные свойства кисломолочного продукта (антимикробная, бифидогенная и антиоксидантная активность). В качестве контроля использовался кисломолочный продукт, полученный путем сквашивания пастеризованного молока 3% закваски, содержащей *S. thermophilus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Результаты исследования антимикробной активности представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Антимикробная активность продукта

Образец	Диаметр зоны подавления роста индикаторного тест-штамма, мм		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538
контроль	10,0±0,7	10,0±0,7	10,0±0,7
опыт	11,5±0,5	12,5±1	14,0±0,8

Показано, что внесение МК *L. helveticus* 20Т в молочную основу при получении кисломолочного продукта усиливает антимикробную активность микроорганизмов закваски. Результаты исследования бифидогенной активности *in vitro* на среде ГМК-2 представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Изменение содержания клеток бифидобактерий при экспозиции

Образец	Количество клеток <i>B. adolescentis</i> MC-42, КОЕ/см ³			
	0 ч	8 ч	16 ч	24 ч
Контроль	1,7×10 ⁴	9,5×10 ⁴	2,2×10 ⁶	3,4×10 ⁷
Опыт	1,7×10 ⁴	1,5×10 ⁶	5,2×10 ⁷	3,8×10 ⁸

Из представленных данных следует, что кисломолочный продукт с МК *L. helveticus* 20 Т обладает способностью стимулировать рост бифидобактерий.

Результаты исследования антиоксидантной активности (АОА) продукта представлены в таблице 13. Антиоксидантную активность определяли *in vitro* по отношению к катион-радикалу АБТС (ABTS•) с использованием микропланшетного фотометра-флуориметра Synergy 2 (BioTek, США). Стандартом для оценки антиоксидантной активности служил тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) – водорастворимый аналог витамина Е.

Таблица 13 – Антиоксидантная активность продукта

Образец	ТЕАС ТЭ, мкмоль/л
контроль	483±33
опыт	2216±168

Согласно результатам исследований, внесение МК способствовало значительному увеличению АОА продукта: АОА в опытном образце была в 4,5 раза выше, чем в контроле. Для определения рекомендуемого срока годности были

выработаны три партии продукта и заложены на хранение при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ на 26 суток (предполагаемый срок годности 20 суток). Для выработки образцов использовали пастеризованное молоко жирностью 3,2%. Динамики изменения титруемой кислотности и количества МКБ в процессе хранения продукта представлены на рисунках 12 и 13.

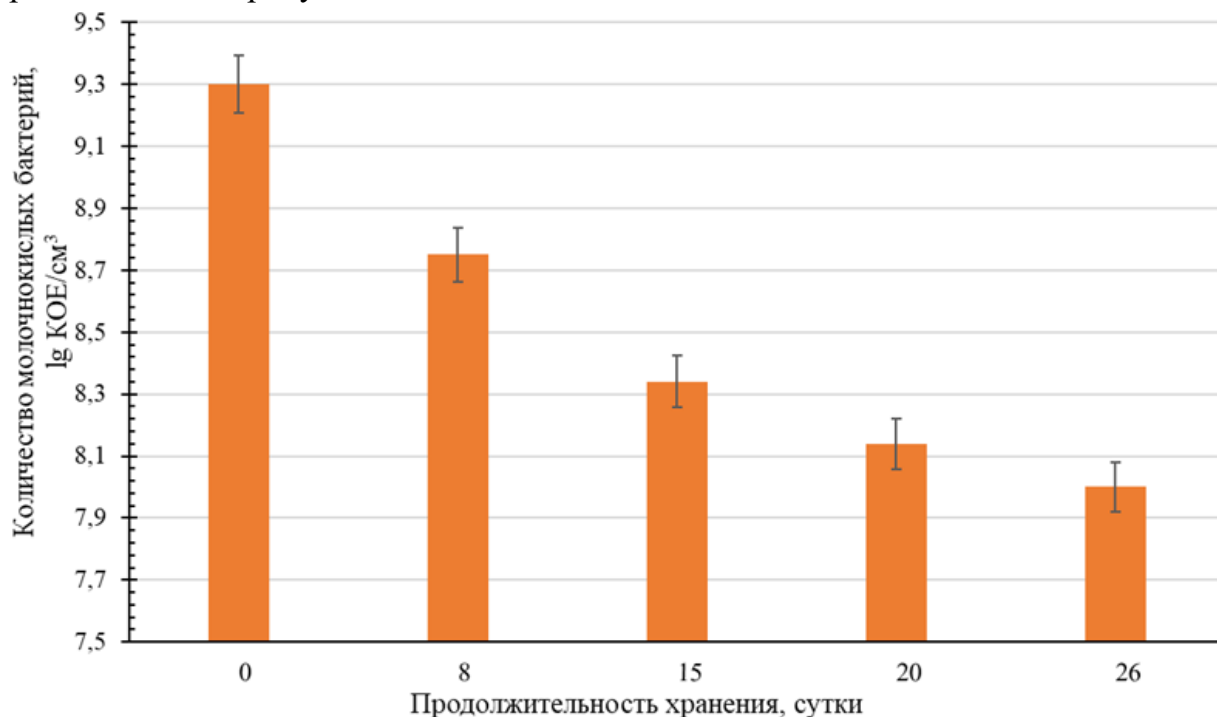


Рисунок 12 – Изменение количества МКБ в продукте в процессе хранения

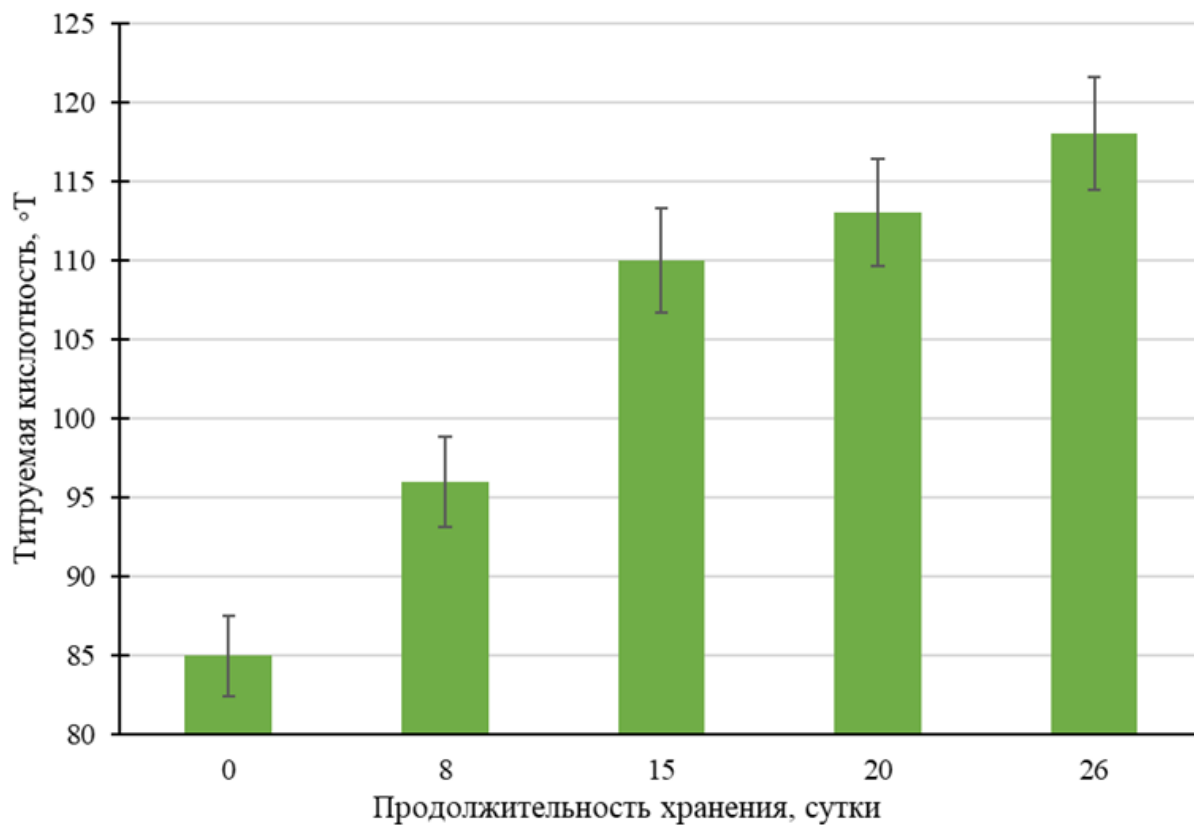


Рисунок 13 – Изменение титруемой кислотности продукта в процессе хранения

Количество МКБ на протяжении всего срока хранения соответствовало нормам, представленным в ТР ТС 033/2013. На 26 сутки количество МКБ составило $1,0 \times 10^8$ КОЕ/см³. На протяжении всего срока хранения наблюдалось возрастание титруемой кислотности. На 26 сутки титруемая кислотность составила 118°Т. Органолептические и физико-химические характеристики продукта оставались неизменными на протяжении всего срока хранения, за исключением незначительного отделения сыворотки в образцах на 20 и 26 сутки. По показателям безопасности продукт соответствовал требованиям ТР ТС 033/2013 на протяжении всего срока хранения. Содержание витамина В₆ на конец срока хранения составило 5,26 мкг/100г.

По результатам работы разработан СТО 00419785-081/1.1-2024 «Продукт кисломолочный с метаболитным комплексом». Принципиальная технологическая схема производства продукта представлена на рисунке 14.



Рисунок 14 – Принципиальная технологическая схема производства продукта кисломолочного с МК

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. В процессе работы проведен анализ научно-технической литературы по теме исследования. Систематизирован материал по технологическим аспектам производства, качественным характеристикам и направлениям использования метаболитных комплексов пробиотических микроорганизмов.

2. Подобран штамм *L. helveticus* для получения МК на основании данных о биохимической активности, антимикробных свойствах и ферментативной активности. По результатам исследований, штаммы *L. helveticus* Н9, *L. helveticus* АВ и *L. helveticus* 20Т проявляли схожую биохимическую и ферментативную активность, все три штамма продемонстрировали способность к синтезу ЭПС. Наибольшую антимикробную активность проявлял штамм *L. helveticus* 20Т. Исходя

из данных результатов, для накопления метаболитного комплекса был выбран штамм *L. helveticus* 20Т.

3. Исследована динамику роста штамма *L. helveticus* 20Т на разных питательных средах и обоснованы параметры его культивирования. Оптимальные параметры культивирования при температуре (37 ± 2) °С: среда культивирования – обезжиренное молоко, доза инокулята – 5%, время культивирования – 24 ч.

4. Исследовано влияние режимов и вида сушки на состав и антимикробные свойства метаболитного комплекса *L. helveticus* 20Т. Подобран режим распылительной сушки (температура воздуха на входе (175 ± 5) °С, на выходе – (60 ± 5) °С при разделении потоков горячего воздуха). Распылительно высушенный метаболитный комплекс проявлял антимикробную активность по отношению к патогенным микроорганизмам разных групп. Содержание молочной кислоты в сухом метаболитном комплексе составило 26572,0 мг/100 г, уксусной – 192,8 мг/100 г, лимонной – 956,0 мг/100 г. При исследовании аминокислотного состава выявлено высокое содержание пролина – 893,6 мг/100г.

5. Разработана технология кисломолочного продукта, содержащего метаболитный комплекс *L. helveticus*. Показано, что продукт обладает комплексом свойств: антимикробными, антиоксидантными, бифидогенными. Внесение 1% метаболитного комплекса в молочную основу способствовало увеличению АОА в готовом продукте в 4,5 раза в сравнении с контролем и усилению антимикробной активности микроорганизмов закваски. Содержание витамина В₆ в продукте составило 5,32 мкг/100 г. Рекомендуемый срок годности кисломолочного продукта составляет 26 суток. Содержание витамина В₆ на конец срока годности составило 5,26 мкг/100г.

6. Разработаны СТО 00419785-081/1-2024 «Метаболитный комплекс *L. helveticus*» и СТО 00419785-081/1.1-2024 «Продукт кисломолочный с метаболитным комплексом».

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

Статьи в изданиях, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ (К1 и К2)

1. **Леонова, В. А.** Бифидогенные свойства кисломолочного продукта с добавлением метаболитного комплекса *Lactobacillus helveticus* / В. А. Леонова // Вопросы питания. – 2024. – Т. 93, № 3(553). – С. 84. – DOI 10.33029/0042-8833-2024-93-3s-028.
2. **Леонова, В. А.** Биологические свойства штаммов *L. helveticus* / В. А. Леонова, А. В. Бегунова // Молочная промышленность. – 2023. – № 5. – С. 38-40. – DOI 10.21603/1019-8946-2023-5-9.
3. **Леонова, В. А.** Методы получения постбиотиков / В. А. Леонова, И. В. Рожкова // Молочная промышленность. – 2022. – № 4. – С. 24-25. – DOI 10.31515/1019-8946-2022-04-24-25.
4. Рожкова, И. В. Постбиотики как потенциальные компоненты кисломолочных продуктов с функциональными свойствами / И. В. Рожкова, **В. А. Леонова**, А. В. Бегунова // Молочная промышленность. – 2022. – № 3. – С. 16-18. – DOI 10.31515/1019-8946-2022-03-16-18.

5. **Леонова, В. А.** Потенциальные пробиотические свойства и профили органических кислот метаболитного комплекса *L. helveticus* / В. А. Леонова // Пищевая промышленность. – 2024. – № 1. – С. 78-82. – DOI 10.52653/PPI.2024.1.1.015.

Статьи в сборниках трудов и материалах конференций

6. **Леонова, В. А.** Антимикробная активность кисломолочного продукта с добавлением метаболитного комплекса *L. helveticus* / В. А. Леонова // Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов XII Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 16 мая 2024 года. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2024. – С. 330-332.

7. **Леонова, В. А.** Антимикробная активность метаболитных комплексов *L. helveticus* / В. А. Леонова // Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 18 мая 2023 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2023. – С. 401-403.

8. **Леонова, В. А.** Способы инактивации клеток при получении постбиотиков / В. А. Леонова, А. В. Бегунова // Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов X Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 17 мая 2022 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2022. – С. 266-267.

Перечень сокращений и условных обозначений:

АБП – антибактериальные препараты;

АОА – антиоксидантная активность;

АТСС – американская коллекция типовых культур;

КЖ – культуральная жидкость;

КОЕ – колониеобразующая единица;

МКБ – молочнокислые бактерии;

МК – метаболитный комплекс;

ЭПС – экзополисахариды;

СОМО – сухой обезжиренный молочный остаток;

СТО – стандарт организации;

ТР ТС – Технический регламент Таможенного союза

АБТС (ABTS) – 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат);

ПС – питательная среда.

Перечень вводимых терминов

Метаболитный комплекс – бесклеточный супернатант, содержащий экзометаболические, синтезируемые молочнокислыми бактериями при росте на питательной среде.