

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель:  
кандидат технических наук  
Рожкова И. В.

Москва, 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	11
Введение в литературный обзор .....	11
1.1 Анализ современных тенденций в производстве продуктов направленного действия .....	13
1.2 Биологически активные метаболиты пробиотических микроорганизмов, их свойства .....	17
1.3 Технологические приемы получения биологически активных метаболитов пробиотических бактерий .....	23
1.4 Аспекты использования метаболитов пробиотических микроорганизмов .....	30
Заключение к литературному обзору .....	34
ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	36
2.1 Структура, организация и схема проведения исследований .....	36
2.2 Объекты исследований .....	37
2.3 Методы исследований .....	38
ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	50
3.1 Выбор пробиотического штамма .....	50
3.1.1 Исследование биохимического профиля .....	50
3.1.2 Определение ферментативных профилей .....	51
3.1.3 Исследование устойчивости к антибактериальным препаратам .....	52
3.1.4 Определение способности синтезировать экзополисахариды .....	53
3.1.4 Определение антимикробной активности .....	54

3.2 Подбор питательной среды и условий культивирования выбранного штамма.....	58
3.2.1 Параметры отделения клеток продуцента для получения метаболитных комплексов .....	62
3.2.2 Зависимость состава метаболитных комплексов от используемой питательной среды .....	63
3.2.3 Зависимость биологической активности метаболитных комплексов от среды культивирования .....	64
3.3.2 Выбор способа и параметров сушки .....	66
3.3.2.1 Влияние способа сушки на состав и свойства МК .....	68
3.5 Разработка технической документации и опытно-промышленная апробация метаболитного комплекса <i>L. helveticus</i> .....	71
3.5 Экономический расчет себестоимости производства МК <i>L. helveticus</i> ....	73
3.6 Разработка технологии кисломолочного продукта, содержащего МК <i>L. helveticus</i> .....	75
3.7 Исследование функциональных свойств кисломолочного продукта.....	76
3.8 Определение рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта .....	78
3.8 Разработка технической документации и опытно-промышленная апробация продукта кисломолочного с метаболитным комплексом .....	81
ВЫВОДЫ.....	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	86
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	103
Приложение А Титульные листы документов по стандартизации.....	104
Приложение Б Акты внедрения.....	106
Приложение В Дипломы .....	113

Список используемых сокращений .....	114
--------------------------------------	-----

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 перерабатываемыми 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 исследований**

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 работы**

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 работы** 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.

Научно обоснованы и 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, общепринятые и оригинальные 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. Научноёмкая 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:

1. II Всероссийский научно-практический конгресс с международным участием «Биотехнология и устойчивое развитие».

2. XI Всероссийская (национальная) научная конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2023 г).

3. XII Всероссийская (национальная) научная конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. (Кемерово, 2024 г).

4. 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 исследований, формулирований цели и задач исследования, проведении исследования, формулировании итоговых 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, методологии 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.

## ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### Введение в литературный обзор

Одним из перспективных направлений развития пищевой промышленности является разработка биотехнологий производства заквасок на основе молочнокислых микроорганизмов и биологически активных соединений для пищевых ингредиентов. При этом больше внимание уделяется разработке бактериальных концентратов пробиотических культур и консорциумов микроорганизмов [1].

Ведущую позицию по использованию бактериальных препаратов занимает молочная отрасль. Закваски и бактериальные концентраты молочнокислых, в том числе пробиотических, бактерий применяются для производства кисломолочных продуктов. В России объем рынка заквасок молочнокислых бактерий к 2021 г составил 750 т. Около 20% этого объема производятся отечественными предприятиями. К 2025 году ожидается увеличение доли российских производителей на рынке заквасок [2, 3].

Заквасочные молочнокислые бактерии в процессе сквашивания осуществляют биохимические реакции, формирующие физико-химические, органолептические характеристики готового продукта, подавляют рост технически вредных микроорганизмов, придают продукту пробиотические свойства [4, 5]. Это обусловлено синтезом широкого спектра биологически активных метаболитов, таких как ферменты, органические кислоты, экзополисахариды, витамины, бактериоцины. Данные метаболиты, вырабатываемые пробиотическими микроорганизмами в процессе культивирования называются «постбиотики». В некоторых литературных источниках также используется термин «метабиотики». Понятие постбиотики так же включает в себя инактивированные пробиотические микроорганизмы и метаболиты, выделяемые в процессе разрушения клеток продуцента [6, 7, 8].

Согласно результатам исследований, постбиотики проявляют различные виды биологической активности: антимикробную, бифидогенную, антиоксидантную, и могут использоваться в качестве пищевых ингредиентов [9, 10]. В работах Полянской И.С. продемонстрированы антимикробные свойства метаболитов молочнокислых бактерий [11, 12].

На данный момент рынок постбиотиков развивается. Коммерчески доступен ряд лекарственных препаратов на основе постбиотиков, а также детские смеси, содержащие постбиотики [9, 13, 14, 15]. В ряде работ предлагается потенциальное применение постбиотиков в пищевых продуктах. Сазановой С.Н. и Рябцевой С.А. разработана технология обогащенного мороженого, содержащего постбиотики *Saccharomyces Boulardii* [16, 17]. В исследовании [18] разработан йогурт, содержащий постбиотики *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus acidophilus*. В публикации [19] представлены данные о напитке, обогащенном постбиотиком *Lactobacillus gasseri* CP2305. В работе [20] внесение постбиотика *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* в йогурт способствовало увеличению антиоксидантной активности готового продукта.

Постбиотики, содержащие вещества с антимикробной активностью, могут применяться в пищевой промышленности в качестве биоконсервантов [21]. В исследовании [22] постбиотик, полученный при культивировании *L. acidophilus* LA-5 и *Bifidobacterium animalis* BB-12 на питательной среде, содержащей подсырную сыворотку, использовался в качестве консерванта сыра моцарелла. Согласно результатам исследования, постбиотики способствовали увеличению срока годности полученного продукта за счет подавления роста психротрофных и мезофильных микроорганизмов.

Постбиотики являются побочными продуктами культивирования микроорганизмов и синтезируются естественным образом при росте микробной популяции, в том числе в процессе получения биомассы для пробиотических бактериальных препаратов [23].

## **1.1 Анализ современных тенденций в производстве продуктов направленного действия**

Одним из факторов, влияющих на организм человека, является питание. Различные вещества, поступающие с пищей, не только служат источником энергии для функционирования организма, но и модулируют физиологические реакции. Употребление специализированных продуктов и продуктов направленного действия, содержащих биологически активные компоненты, оказывает благоприятное воздействие на состояние здоровья [24, 25].

Специализированные продукты – это продукты питания, для которых установлены требования к содержанию или соотношению отдельных веществ или изменено содержание или соотношение отдельных компонентов относительно их естественного содержания в данном виде пищевой продукции. К такой продукции относятся продукты диетического профилактического питания, предназначенные для коррекции углеводного, белкового или витаминного обмена веществ в организме человека. Данная продукция в дополнение к питательной ценности способствует профилактике возникновения заболеваний, связанных с питанием, и, как правило, содержит вещества или компоненты, отсутствующие в ней изначально [25, 26].

В Российской Федерации по данным на 2022 год зарегистрировано более 3000 видов специализированной продукции. Около половины данных видов продукции производится на отечественных производствах. При этом значительно распространена продукция для диетического и лечебного питания [27].

При получении продуктов направленного действия используется ряд компонентов с известными физико-химическими характеристиками, способствующих коррекции функциональных нарушений различных органов и систем организма. К таким компонентам относятся: витамины, аминокислоты, растворимые и нерастворимые пищевые волокна, минеральные вещества и комплексы, полиненасыщенные жирные кислоты,

пребиотики, пробиотические микроорганизмы, биоактивные пептиды, антиоксиданты и др. Выбор ингредиента должен определяться видом получаемой продукции, при этом внесение конкретного компонента в продукцию должно быть обосновано [24, 26, 27].

При внесении в состав продуктов питания обогащающих компонентов, доза вносимого компонента должна составлять не менее 15% от рекомендуемой суточной дозы [28]. При этом необходимо учитывать совместимость вносимых ингредиентов с пищевой матрицей, поскольку они могут оказывать влияние на внешний вид, текстуру, запах вкусовые качества и стабильность готовой продукции [26].

За счет своего состава и свойств молоко является отличной основой для создания специализированных продуктов. При разработке технологии производства специализированных молочных продуктов следует учитывать стадию и режимы внесения ингредиентов. Стадия внесения должна выбираться таким образом, чтобы избежать инактивации или деструкции вносимых ингредиентов. Ряд биологически активных веществ, характеризуется высокой термолабильностью. К примеру, потери витаминов в ходе термической обработки могут достигать 80%. Поэтому обогащающие ингредиенты рекомендуется вносить на конечной стадии производства. Режимы внесения ингредиентов также должны обеспечивать их наибольшую сохранность [27].

Наиболее распространенной группой продуктов направленного действия являются молочные продукты, при этом особое значение имеют кисломолочные продукты, обогащенные пробиотическими микроорганизмами [29]. Согласно определению, представленному в техническом регламенте Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" № 033/2013, пробиотические микроорганизмы – это непатогенные, нетоксигенные микроорганизмы, поступающие в кишечник с пищей, благотворно воздействующие на организм человека. Наиболее часто

используемыми пробиотическими бактериями являются представители родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* [30, 31].

К пробиотическим свойствам микроорганизмов относятся:

- антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам;
- иммуностимулирующее действие;
- снижение уровня холестерина в организме;
- улучшение усвоения лактозы;
- антиоксидантная активность;
- антиконцерогенные свойства [30].

Исследователи отмечают, что употребление пробиотических микроорганизмов в составе кисломолочных продуктов более эффективно, чем прием пробиотиков в виде лекарственных форм. Это обусловлено тем, что пробиотические микроорганизмы, поступающие в организм с пищей, лучше адаптируются к условиям желудочно-кишечного тракта [32, 33, 34].

Среди кисломолочных продуктов широкое распространение получил йогурт. Данный продукт производят с использованием заквасочных культур *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* [35].

Кисломолочные продукты на основе *L. acidophilus*, такие как «Ацидолакт» и «Ацидофилин» широко используются для коррекции дисбиотических состояний ЖКТ, в том числе у детей. В нашей стране успешно развивается производство кисломолочных продуктов, обогащенных бифидобактериями, являющимися представителями нормальной кишечной микробиоты человека. В ФГАНУ «ВНИМИ» разработаны продукты «Биокефир», «Биосметана», «Биоряженка», «Бифилин», содержащие бифидобактерии [30].

Исследования ряда ученых направлены на разработку пробиотических продуктов, содержащих *L. helveticus*. *L. helveticus* традиционно применяется в качестве заквасочной культуры при производстве сыров, однако спектр ее

применения расширяется на кисломолочные продукты с функциональными свойствами. Кисломолочные продукты, содержащие *L. helveticus* оказывают положительное воздействие на кровеносную и иммунную системы, способствуют снижению уровня холестерина в крови. Данные эффекты обусловлены высвобождением биологически активных пептидов при гидролизе молочного белка протеолитическими ферментами *L. helveticus* [36, 37].

По результатам исследований, проводимых ранее учеными ФГАНУ «ВНИМИ», представители *L. helveticus* являются активными кислотообразователями и проявляют высокую антимикробную активность по отношению к патогенным микроорганизмам по сравнению с другими представителями рода *Lactobacillus*. В том числе, выявлена антимикробная активность по отношению к патогенным микроорганизмам с множественной лекарственной устойчивостью к антибактериальным препаратам [38, 39, 40]. Штаммы *L. helveticus* из коллекции ФГАНУ «ВНИМИ» также проявляли высокую гипохолестеринемическую активность [41].

Для коррекции состояния ЖКТ в состав продуктов питания могут вводиться пребиотики или синбиотики. Пребиотики – неперевариваемые пищевые ингредиенты, избирательно стимулирующие рост резидентных микроорганизмов ЖКТ. К таким компонентам относятся лактулоза, фруктоолигосахариды (в частности, инулин), а также экзополисахариды, синтезируемые пробиотическими молочнокислыми бактериями. Последние кроме пробиотического действия могут выполнять функцию стабилизаторов и эмульгаторов [42, 43, 44, 45, 46, 47].

Существует два механизма действия пребиотиков: прямой, при котором пребиотики служат источником питательных веществ для полезных микроорганизмов ЖКТ, и непрямой, при котором пребиотик ингибирует развитие патогенных микроорганизмов, снижает уровень холестерина, проявляет иммуномодулирующий эффект [48].



Синбиотики представляют собой комбинацию пробиотиков и пребиотиков. При этом каждый компонент, входящий в состав синбиотика должен оказывать положительное воздействие на микрофлору ЖКТ. Одной из целей сочетания пробиотиков и пребиотиков является улучшение выживаемости пробиотических микроорганизмов в ЖКТ. Наиболее часто в синбиотических продуктах используют бифидо- или лактобактерии в сочетании с олигосахаридами [49, 50]. Примером синбиотического кисломолочного продукта может служить йогурт, обогащенный пробиотиком *L. acidophilus* и пребиотическими ксилоолигосахаридами [51].

В последнее время растет интерес к постбиотикам, как потенциальным пищевым ингредиентам. Согласно определению, предложенному Международной научной ассоциацией пробиотиков и пребиотиков (ISAPP), к постбиотикам относятся метаболиты, вырабатываемые микроорганизмами в процессе культивирования, а также компоненты клеточных стенок, оказывающие положительное воздействие на организм человека [7].

В состав постбиотиков входят экзополисахариды, короткоцепочечные жирные кислоты, бактериоцины, витамины, пептиды и другие биологически активные соединения [23, 24]. Постбиотики естественным образом синтезируются микроорганизмами при производстве бактериальных заквасок, однако обычно их состав и количество не контролируются. Поэтому для использования постбиотиков в качестве пищевых ингредиентов целесообразно их производство контролируемым способом [23].

## **1.2 Биологически активные метаболиты пробиотических микроорганизмов, их свойства**

Исследования последних лет были направлены на изучение молекулярных механизмов, опосредующих пробиотические свойства микроорганизмов [31]. Положительное влияние пробиотических бактерий опосредовано, в том числе, продуктами бактериального биосинтеза

(метаболитами). Метаболиты, обладающие различными физическими и химическими свойствами, способны оказывать влияние на межклеточные взаимодействия и взаимодействовать с окружающей средой [52, 53]. Основные биологически активные метаболиты пробиотических бактерий представлены на рисунке 1.1.

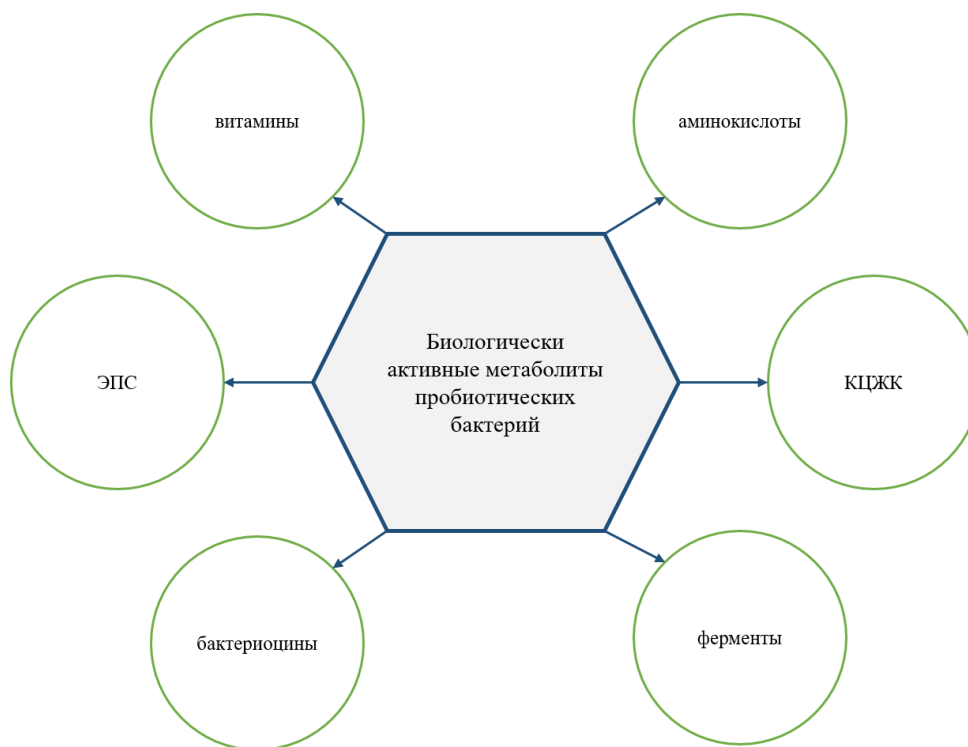


Рисунок 1.1 – Биологически активные метаболиты пробиотических бактерий [52]

К биологически активным метаболитам пробиотических бактерий относятся витамины, бактериоцины, органические кислоты, в том числе короткоцепочечные жирные кислоты, ферменты, поли- и олигосахариды и другие соединения [52, 54, 55].

Основными антимикробными метаболитами, синтезируемыми пробиотическими бактериями, являются **органические кислоты**, в том числе молочная, уксусная и пропионовая [56, 57]. Органические кислоты синтезируются молочнокислыми бактериями в процессе сбраживания лактозы. В зависимости от механизма сбраживания лактозы, молочнокислые бактерии делятся на две группы: гомоферментативные и гетероферментативные. Гомоферментативные МКБ гидролизуют лактозу на

глюкозу и галактозу, затем ферментируют глюкозу в пировиноградную кислоту, которая под действие лактатдегидрогеназы восстанавливается до молочной кислоты. При этом теоретически из 1 моля глюкозы получается 2 моля молочной кислоты. Гетероферментативные МКБ в процессе брожения кроме молочной кислоты образуют другие органические кислоты, этанол, углекислый газ [58, 59].

Однако некоторые гомоферментативные молочнокислые бактерии МКБ могут осуществлять смешанную кислотную ферментацию при ограничении источников углерода, повышенном pH среды или пониженной температуре культивирования [60]. Также отмечается, что ряд МКБ, в частности *L. helveticus*, при наличии в питательной среде цитратов, могут метаболизировать цитраты в уксусную и янтарную кислоту [59, 61].

Органические кислоты, синтезируемые микроорганизмами в процессе жизнедеятельности, широко используются в качестве антимикробных агентов в пищевой промышленности. Механизм антимикробного действия органических кислот хорошо изучен. Органические кислоты снижают ингибируют транспорт веществ через клеточную мембрану и различные метаболические реакции, что приводит к гибели клеток [56, 62]. Молочная кислота, являющаяся основным метаболитом МКБ, оказывает антимикробное действие на патогенные микроорганизмы родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* [63].

Молочная, пропионовая, масляная, изовалериановая, валериановая, изокапроновая, капроновая кислоты и уксусная кислоты относятся к короткоцепочечным жирным кислотам (КЦЖК) ("short chain fatty acids" (SCFA)) – монокарбоновым кислотам с длиной цепи до 8 углеродных атомов. КЦЖК выполняют ряд важных функций в организме человека: являются источниками энергии для естественной микробиоты кишечника, регулируют работу клеточного иммунитета, поддерживают электролитный баланс в ЖКТ, обеспечивают питание и рост кишечного эпителия [51, 52, 64]. В литературе представлены данные, доказывающие, что молочная кислота в ЖКТ усиливает

фагоцитарную активность макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов. Кроме того, молочная кислота и лактат в ЖКТ могут быть далее преобразованы в бутират, основной источник углерода для резидентных микроорганизмов [65, 66].

Антагонистическая активность пробиотических бактерий, в том числе молочнокислых, обусловлена также синтезом бактериоцинов. **Бактериоцины** – это рибосомно-синтезируемые пептиды, обладающие антимикробным действием. В естественных условиях способность микроорганизмов синтезировать бактериоцины является одним из факторов формирования микробных популяций. При этом бактериоциногенные штаммы подавляют развитие бактерий, имеющих схожие пищевые потребности, в борьбе за питательные вещества [52, 67]. Бактериоцины МКБ, как правило, эффективны против грамположительных бактерий, в том числе патогенных и токсигенных [59, 67]. Различные виды МКБ синтезируют широкий спектр бактериоцинов: курвацин, лактококцин, низин, плантацин и др. [66]. Антимикробное действие бактериоцинов обусловлено нарушением проницаемости и целостности цитоплазматических мембран, что приводит к утечке внутриклеточных субстратов и гибели клеток [64, 67, 68, 69].

Предложены различные классификации бактериоцинов МКБ в зависимости от молекулярной массы и первичной структуры. Но, как правило, выделяют два основных класса: класс I- лантибиотики (тип. А и тип В) и класс II- нелантибиотики [70, 71]. Лантибиотики представляют собой небольшие пептиды (<5 кДа), содержащие лантионин или 3-метиллантионин. Наиболее изученным представителем лантибиотиков является низин, синтезируемый *L. lactis* и применяемый в пищевой промышленности в качестве консерванта. Бактериоцины II класса – небольшие (<10 кДа) пептиды, не содержащие лантионин [69, 70].

Согласно данным исследований МКБ синтезируют различные **витамины**, такие как рибофлавин, фолиевая кислота, кобаламин, пиридоксаль. Рибофлавин является предшественником коферментов,

играющих центральную роль в окислительно-восстановительных реакциях в организме [72]. Фолиевая кислота в качестве кофермента принимает участие в реакциях биосинтеза нуклеотидов и белков. Стоит отметить, что у человека отсутствуют гены, связанные с синтезом фолиевой кислоты. В организм человека она поступает с пищей или в результате синтеза кишечной микробиотой [59].

Согласно литературным данным, некоторые виды МКБ, в частности, *Limosilactobacillus reuteri* могут продуцировать кобаламин. Кобаламин необходим для метаболизма жирных кислот, аминокислот и нуклеиновых кислот. Данный витамин не синтезируется организмом человека, его дефицит может вызвать патологические нарушения сердечно-сосудистой и нервной системы [73].

Использование штаммов МКБ, продуцирующих витамины, при производстве обогащенных витаминами продуктов может устранить необходимость использования синтетических форм витаминов (таких как фолиевая кислота), которые, как было показано, вызывают нежелательные побочные эффекты. Кроме того, такой способ обогащения является экономически выгодным в сравнении с химическим синтезом витаминов [72, 74].

Различные штаммы МКБ в процессе жизнедеятельности синтезируют внеклеточные полимеры, образованные моносахаридными остатками, соединенным  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозидными связями. Данные полимеры известны как **экзополисахариды (ЭПС)**. Физиологическая роль, которую ЭПС играют в жизнедеятельности клеток МКБ, полностью не изучена. Считается, что ЭПС защищают клетку от воздействия неблагоприятных условий окружающей среды, таких как осмотический стресс, фагоцитоз, воздействие бактериофагов. ЭПС также связаны с адгезией клеток и формированием биопленок [75, 76, 77, 78, 79].

ЭПС, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами, различаются молекулярной массой, моносахаридным составом, наличием

боковых цепей. ЭПС классифицируются как гомополисахариды и гетерополисахариды. Гомополисахариды имеют разветвленные или неразветвленные цепи и состоят из повторяющихся остатков глюкозы (декстран, мутан, альтернан и рейтеран) или фруктозы (леван, инулин). Гетерополисахариды состоят из остатков глюкозы, галактозы и других сахаров, таких как рамноза, манноза, арабиноза, фукоза. К гетерополисахаридам относятся кефиран, ксантан и геллан [75].

МКБ синтезируют большое количество азотсодержащих соединений, в числе которых свободные **аминокислоты** и их производные, олигопептиды [80, 81]. Аминокислоты являются мономерами белков, необходимых для функционирования организма. Для человека незаменимыми считаются следующие аминокислоты: фенилаланин, валин, треонин, триптофан, изолейцин, метионин, лейцин и лизин, а маленькие дети дополнительно нуждаются в цистеине, тирозине, гистидине и аргинине. Данные аминокислоты не синтезируются в организме и должны поступать в организм с пищей. Дефицит любой из данных аминокислот может привести к серьезным нарушениям [81, 82].

Молочнокислые бактерии синтезируют ряд **ферментов**, в том числе промышленно-значимых. Ферментативная активность молочнокислых бактерий является видо- и штаммоспецифичной. К основным ферментам МКБ относятся  $\beta$ -галактозидаза и протеолитические ферменты.  $\beta$ -галактозидаза катализирует гидролиз лактозы до глюкозы и галактозы. Данный фермент широко используется в медицинских целях, а также для гидролиза лактозы при производстве молочных продуктов для питания людей, страдающих от непереносимости лактозы [83].

Протеолитические ферменты — ферменты класса гидролаз, катализирующие распад пептидных связей в белковых молекулах. Протеолитические ферменты принимают участие в гидролизе казеина и обеспечении клеток МКБ аминокислотами при росте в молоке [83, 84, 85].

К протеолитической системе МКБ относятся протеиназы и пептидазы. Протеиназы гидролизуют белки до пептидов, затем пептидазы катализируют распад пептидов до более мелких пептидов и свободных аминокислот [85]. Под действием протеолитических ферментов пробиотических бактерий могут высвобождаться пептиды с различными видами биологической активности, включая антиоксидантную, антимикробную, иммуномодулирующую, противовоспалительную [86].

### **1.3 Технологические приемы получения биологически активных метаболитов пробиотических бактерий**

Биологически активные метаболиты пробиотических культур образуются в процессе их роста, в том числе при сквашивании кисломолочных продуктов и при получении биомассы для бактериальных концентратов. При этом качественный и количественный состав метаболитных комплексов зависит от условий культивирования микроорганизма, состава сырья [23]. Процесс получения МК включает в себя этапы культивирования микроорганизма-продуцента, отделение биомассы клеток от супернатанта, содержащего метаболиты, стерилизацию супернатанта и его сушку. Схема получения МК представлена на рисунке 1.2.

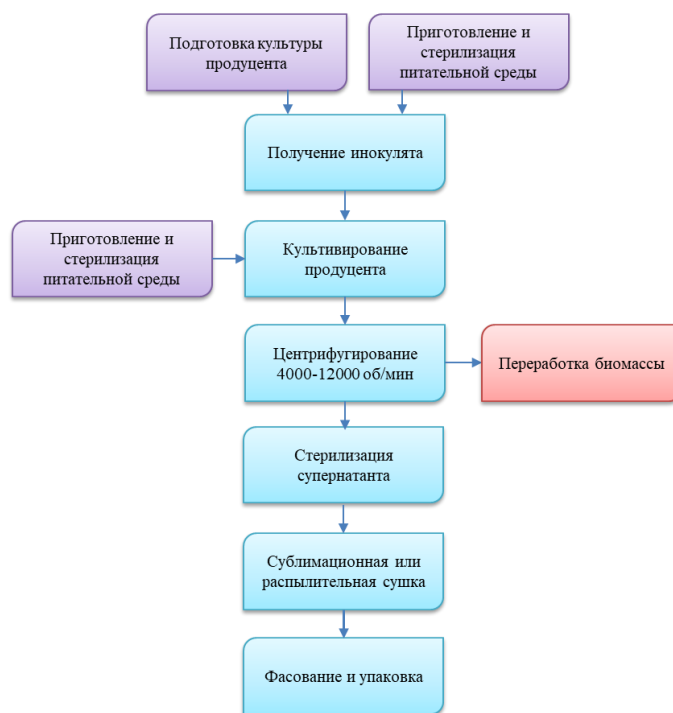


Рисунок 1.2 – Схема получения метаболитных комплексов МКБ

Культивирование клеток продуцента с целью получения биологически активных метаболитов проводят в оптимальных для используемого штамма условиях на питательных средах различного состава. Для культивирования МКБ, как правило, используют обезжиренное молоко, MRS-бульон, а также среды, содержащие побочные продукты молочной промышленности [87]. К примеру, в работе [88] штаммы *L. acidophilus* A9, *Lacticaseibacillus paracasei* A13 и *Lacticaseibacillus casei* S культивировали на питательной среде, содержащей пахту с добавлением 0,3% дрожжевого экстракта и 1% глюкозы.

При подборе состава питательных сред для культивирования микроорганизмов необходимо учитывать характеристику отдельных компонентов. Большое влияние на синтез биологически активных веществ оказывают используемые микроорганизмами источники азота. Как правило, в синтетических средах в качестве источников азота используют соли азотной кислоты, аммонийные соли органических кислот, аминокислоты, белковые гидролизаты. В качестве источников углерода в состав питательных сред включают дисахариды и полисахариды, при этом источник углерода также оказывает влияние на синтез биологически активных веществ. Для роста



микроорганизмов и синтеза метаболитов необходимы фосфорсодержащие соединения, например, фосфаты [89].

Для синтеза некоторых метаболитов необходимо внесение в питательную среду дополнительных компонентов. К примеру, для синтеза антимикробного соединения реутерина ( $\beta$ -ОН-пропионовый альдегид) *L. reuteri* необходимо присутствие в питательной среде глицерина. В литературе также сообщалось, что добавление в состав питательной среды полисорбата – 80 (Твин 80) влияет на выработку бактериоцинов молочнокислыми бактериями [89, 90].

При использовании представителей родов *Lactobacillus* и *Propionibacterium* для микробиологического синтеза витамин В<sub>12</sub> необходимо внесение его предшественника – 5,6-диметилбензимидазола (DMB), необходимого для синтеза кобаламина, или его предшественников. Это обусловлено тем, что данные микроорганизмы не способны его синтезировать или синтезируют в количестве недостаточном для последующего синтеза витамина В<sub>12</sub> [91, 92].

Кроме состава питательной среды и условий культивирования на выход метаболитов влияет фаза роста микроорганизма продуцента. Известно, что рост микробной популяции проходит через несколько фаз: лаг фазу, фазу экспоненциального роста (экспоненциальную), стационарную, фазу замедления роста и фазу отмирания [93, 94, 95]. Кривая роста микробной популяции при периодическом культивировании представлена на рисунке 1.3.

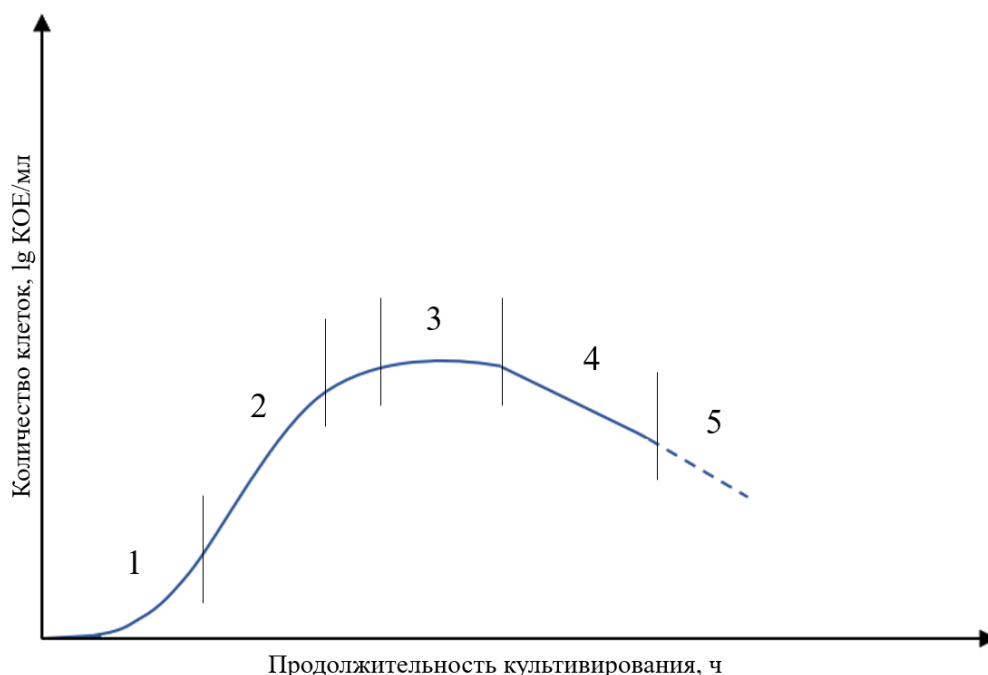


Рисунок 1.3 – кривая роста микробной популяции при периодическом культивировании [94]

**Примечание:** 1 – лаг фаза, 2 – фаза экспоненциального роста, 3 – стационарная фаза, 4 – фаза замедления роста, 5 – фаза отмирания

В экспоненциальную фазу роста плотность микробной популяции достигает максимальных значений, а метаболиты накапливаются медленно. Максимальный синтез биологически активных метаболитов, в том числе бактериоцинов и органических кислот наблюдается в конце экспоненциальной и начале стационарной фазы роста [93, 95, 96].

Длительность каждой фазы индивидуальна для каждого штамма [95]. Однако интервал продукции метаболитов можно увеличить путем регулирования pH в процессе культивирования. Поддержание pH на уровне, оптимальном для используемого штамма, позволяет увеличить удельную скорость роста микроорганизмов и продлить экспоненциальную фазу роста при наличии достаточного количества питательных веществ в среде, что приводит к увеличению количества биомассы и более высокой продукции биологически активных веществ [97].

Основные факторы, влияющие на выход биологически активных метаболитов представлены на рисунке 1.4.



Рисунок 1.4 – Факторы, влияющие на накопление биологически активных метаболитов пробиотическими микроорганизмами

Получаемая в процессе роста микроорганизмов культуральная жидкость является гетерофазной системой, содержащей клетки продуцента и синтезируемые ими во внеклеточную среду метаболиты. Для отделения клеток продуцента от метаболитной фракции используют центрифугирование и/или мембранные процессы (микрофильтрация, ультрафильтрация) [87]. При мембранной фильтрации исходная жидкость разделяется под действием перепада давления при прохождении через полупроницаемую мембрану [98]. Мембрана позволяет разделить жидкость на две фракции:

- пермеат, который проходит через мембрану и содержит растворитель (как правило, воду) и соединения, чья молекулярная масса ниже, чем молекулярная масса отсечки мембраны (MWCO);
- ретентант, содержащий компоненты, отброшенные от мембраны и имеющие молекулярную массу выше MWCO [99].

Мембраны классифицируются по размеру пор. Микрофильтрационные мембраны имеют размер пор (0,1–10) мкм, для ультрафильтрационных мембран характерен размер пор (0,001 – 0,1) мкм [100].

Как правило, при получении метаболитных комплексов применяют центрифугирование при (4000-12000) об/мин в течение 10–15 мин с последующей микрофильтрацией через мембрану с диаметром пор (0,2–0,45) мкм [24, 79, 87]. В работе [101] супернатант *Lactobacillus brevis* CD2 обрабатывался на ультрафильтрационной мембране 10 кДа. Полученный пермеат содержал 46 г/л молочной кислоты и проявлял выраженную антимикробную активность по отношению к *Salmonella typhimurium*.

В технологиях получения метаболитных комплексов могут так же применяться различные методы инактивации/дезинтеграции клеток продуцента: термическая обработка, обработка ультразвуком, ферментативный гидролиз клеточной стенки, обработка высоким давлением. При этом происходит разрушение клеточной стенки, и внутриклеточные метаболиты высвобождаются в культуральную жидкость [23, 24, 87].

Для стерилизации полученного супернатанта, как правило используют стерилизующую фильтрацию через фильтры с диаметром пор 0,22 или 0,45 мкм [23, 79, 87, 101, 102]. В работе [103] бесклеточные супернатанты *Lactobacillus gasseri* 1A-TV, *Lactobacillus fermentum* 18A-TV, and *Lactobacillus crispatus* 35A-TV подвергали термической обработке при 70°C и 100 °C в течение 30 минут, а также при 121 °C в течение 15 минут. Данные режимы тепловой обработки не оказали влияния на антимикробные свойства полученных супернатантов и потенциально могут применяться для стерилизации антимикробных метаболитных комплексов.

Для выделения отдельных биологически активных веществ из метаболитных комплексов необходима дополнительная обработка полученных супернатантов. Дальнейшие процессы получения продуктов микробиологического синтеза могут проходить в несколько стадий и включать различные методы выделения и очистки, включая экстракцию растворителем, диализ, хроматографическую очистку [24, 53, 87, 104, 105]. К примеру, процесс выделения ЭПС включает стадии центрифугирования,

деградацию белков кислотой, осаждение ЭПС этанолом, фильтрацию и диализ [53].

Препараты на основе биологически активных веществ МКБ могут выпускаться в жидком и сухом виде. Сухие препараты имеют преимущества в сравнении с жидкими. Удаление воды позволяет увеличить срок годности препарата, а снижение веса и объема продукта позволяет снизить расходы на упаковку и транспортировку [106, 107]. Для этих целей может применяться распылительное или сублимационное (лиофильное) высушивание [87].

При сублимационной сушке продукт обезвоживается из замороженного состояния под вакуумом путем возгонки льда. При этом вода переходит из твердого состояния в газообразное минуя жидкую фазу. Процесс сублимации включает в себя этапы предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки [108]. Во время предварительного замораживания часть воды замерзает и сублимируется во время первичной сушки, оставшаяся часть воды удаляется посредством десорбции при вторичной сушке. Сублимационная сушка позволяет сохранить биологическую активность продукта, однако данный метод требует значительных энергозатрат для обеспечения низких температуры и давления. Кроме того, процесс сублимации характеризуется высокой длительностью (более 24 часов) и низкой производительностью [108, 109, 110, 111].

При распылительной сушке сырье распыляется в потоке горячего газа (чаще всего воздуха), что приводит к испарению влаги. При этом жидкость, подаваемая в сушильную камеру, распыляется на капли размером (2–600) мкм [112, 113]. Распылительная сушка удобна для получения сыпучего порошка, имеет высокую производительность [111, 112].

При выборе метода сушки необходимо учитывать влияние данных способов обработки на состав и биологическую активность метаболитных комплексов. Например, лиофилизация способствует удалению перекиси водорода, являющейся антимикробным компонентом, а при распылительном высушивании из раствора удаляются летучие метаболиты, например, этанол

[87]. При распылительной сушке метаболитных комплексов, содержащих органические кислоты может наблюдаться прилипание конечного продукта к стенкам оборудования [115]. Органические кислоты характеризуются низкой температурой стеклования, высокой гигроскопичностью и термопластичностью. За счет этого под действием высоких температур образуются мягкие частицы с липкой поверхностью, что приводит к липкости порошка и формированию пастообразной структуры готового продукта [106]. Решение данной проблемы возможно путем добавления вспомогательных компонентов с высокой молекулярной массой (мальтодекстрин, крахмал), позволяющих увеличить температуру стеклования продукта, или путем снижения температуры сушки [113, 116]. В исследовании [117] отмечено, что увеличение разницы между температурой на входе и температурой на выходе, способствует предотвращению стеклования органических кислот и увеличивает выход продукта.

#### **1.4 Аспекты использования метаболитов пробиотических микроорганизмов**

Накопленные знания о метаболизме и физиологии пробиотических микроорганизмов позволили использовать их в качестве продуцентов различных компонентов, используемых в пищевой промышленности, таких как биоконсерванты, стабилизаторы, витаминные добавки и др. [23, 52, 118].

Метаболиты пробиотических микроорганизмов нашли свое применение в технологии специализированных продуктов питания. В частности, коммерчески доступны детские смеси, содержащие постбиотики пробиотических штаммов *Bifidobacterium breve* C50 и *S. thermophilus* 065 (короткоцепочечные галактоолигосахариды и длинноцепочечные фруктоолигосахариды). Согласно результатам клинических исследований, применение смеси, содержащей постбиотики способствовало снижению частоты возникновения колик у младенцев [15, 119].

Антимикробные соединения, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами могут применяться в качестве биоконсервантов, с целью предотвращения порчи продуктов питания и продления сроков их годности. К таким соединениям относятся органические кислоты и бактериоцины [62, 120]. Наиболее коммерчески успешным консервантом на основе бактериоцинов является низин, синтезируемый *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Механизм действия низина заключается в формировании небольших пор в цитоплазматической мембране грамположительных бактерий, что приводит к повреждению клеток и их гибели. Низин оказывает антагонистическое действие только на грамположительные бактерии и не подавляет грамотрицательные бактерии, дрожжи и плесневые грибы. К воздействию низина чувствительны представители родов *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*. Низин используется в составе консервированных супов, детских смесей, сыров для предотвращения их порчи [23, 55, 121, 122].

Для предотвращения развития в продуктах питания дрожжей и плесневых грибов применяют препараты на основе фунгицидных метаболитов пробиотических бактерий. В работах [123, 124] продемонстрировано фунгицидное действие фильтратов КЖ *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* и *Propionibacterium shermanii* по отношению к *Penicillium* sp. и *Aspergillus fumigatus*. Согласно литературным данным, наиболее выраженным фунгицидным действием обладает фенилмолочная кислота [23, 125]. По результатам исследования [126] постбиотики молочнокислых и пропионовокислых бактерий, добавленные в полутвердый сыр, подавляли рост плесневых грибов.

В работе [127] добавление постбиотиков *Lactobacillus salivarius* в мясной фарш в концентрации 35 мг/см<sup>3</sup> подавляло образование биопленок *Listeria monocytogenes* в процессе хранения продукта при 4 °С. Кроме того, постбиотическая добавка подавляла рост психротрофных микроорганизмов, вызывающих порчу.

Одним из способов снижения рисков порчи пищевых продуктов является введение биоконсервантов в активные упаковочные материалы. Для этих целей могут использоваться постбиотики с антимикробными свойствами. При этом постбиотики могут непосредственно включаться в полимерную матрицу упаковочного материала или адсорбироваться на ее поверхности [128, 129].

В работе [129] описаны активные упаковочные пленки с добавлением постбиотика *L. NRRL B-442* в концентрациях 6, 12 и 18 мг/см<sup>3</sup>. Согласно опубликованным данным, пленка, содержащая постбиотик в концентрации 18 мг/см<sup>3</sup>, проявляла антимикробную активность против *S. typhimurium*, *Escherichia coli*, *L. monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*. При этом внесение постбиотика не оказывало влияния на другие свойства упаковочного материала.

ЭПС пробиотических бактерий применяются в пищевой промышленности в качестве стабилизаторов и эмульгаторов [79]. Это обусловлено их физико-химическими характеристиками: ЭПС обладают сильной водосвязывающей и влагоудерживающей способностью, а также способностью к набуханию и гелеобразованию. При этом, в отличие от синтетических полимеров, ЭПС являются биоразлагаемыми, нетоксичными и имеют статус GRAS, что делает их привлекательным компонентом в пищевой и фармацевтической промышленности [76].

ЭПС, выделенные из различных штаммов молочнокислых бактерий, демонстрировали высокую термостабильность, что позволяет использовать их в составе продуктов, подвергающихся тепловой обработке. К примеру, очищенные ЭПС, выделенные из *Leuconostoc mesenteroides* -TMS, *Pediococcus pentosaceus*-DPS и *Leuconostoc pseudomesenteroides*-CM, имели температуру плавления выше 200 °C [75].

Значительный интерес вызывает возможность использования ЭПС в качестве добавок при получении продуктов питания с функциональными свойствами. Это обусловлено иммуномодулирующими свойствами ЭПС.



Кроме того, ЭПС некоторых представителей рода *Lactobacillus* обладают антиоксидантными свойствами [23]. На данный момент в пищевой промышленности используется ряд микробных экзополисахаридов, в том числе, декстран, ксантан, пуллулан [53].

В настоящее время пищевые продукты не всегда содержат достаточное количество аминокислот для удовлетворения потребностей человека. Для восполнения дефицита продукты обогащают добавками, содержащими незаменимые и заменимые аминокислоты. В настоящее время для получения аминокислот для пищевых целей используют технологии, основанные на микробном синтезе, что обусловлено экономическими преимуществами и экологичностью данных методов в сравнении с химическим синтезом. В качестве продуцентов, как правило, используют генно-модифицированные штаммы *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*. Однако использование данных видов микроорганизмов вызывает споры относительно их безопасности, что подталкивает к поиску новых продуцентов аминокислот. Молочнокислые бактерии могут рассматриваться как альтернативный источник для микробиологического синтеза аминокислот в пищевых целях [130].

При добавлении постбиотиков в рецептуры пищевых продуктов необходимо учитывать их совместимость с пищевой матрицей. Некоторые компоненты пищевых продуктов могут взаимодействовать с веществами, входящими в состав постбиотиков, тем самым оказывая влияние на их свойства [120]. На активность постбиотиков также влияют технологические режимы, используемые при выработке продукции. В частности, длительное нагревание может снижать антимикробную активность постбиотиков, что связано с инактивацией бактериоцинов под действием высоких температур [120, 131].

Некоторые вещества, входящие в состав постбиотиков, также могут оказывать влияние на компоненты пищевой матрицы. К примеру, если раствор метаболитных комплексов содержит протеолитические или липолитические

ферменты, внесение постбиотиков может спровоцировать протеолиз или липолиз пищевых продуктов. Такие нежелательные эффекты можно устранить при корректировке вносимой дозировки постбиотика или путем инактивации ферментов, входящих в его состав [132].

Кроме того, постбиотики могут оказывать влияние на органолептические показатели готового продукта. К примеру, постбиотики, полученные на среде MRS-бульон, могут изменять цвет, вкус и запах молочных продуктов. Чтобы исключить влияние на сенсорные характеристики готовой продукции, для получения постбиотиков можно использовать питательные среды на основе молочного сыря [120, 132].

В зависимости от вида вырабатываемой продукции постбиотики можно вносить в пищевую матрицу различными способами: прямым внесением, распылением, нанесением на поверхность. Для молочных продуктов, мясного фарша и хлебобулочных изделий удобно внесение сухих постбиотиков в основу с последующим перемешиванием. Для овощей и фруктов удобно распыление по поверхности, при этом для получения постбиотиков рекомендуется выбирать штаммы, продуцирующие большое количество экзополисахаридов [132].

Метаболитные комплексы пробиотических метаболитов имеют большие перспективы для использования в пищевой промышленности. Однако на данный момент плохо изучены закономерности взаимодействия постбиотиков с пищевыми матрицами и не установлены закономерности получаемых биологических эффектов от вносимой дозировки постбиотика [133].

### **Заключение к литературному обзору**

Из обзора литературных данных следует, что необходимо интенсифицировать разработку отечественных пищевых ингредиентов на основе пробиотических микроорганизмов. В литературном обзоре проведен анализ тенденций в производстве продуктов питания направленного действия,

представлена характеристика основных биологически активных метаболитов МКБ. Описаны базовые технологические приемы, используемые при получении препаратов на основе метаболитов МКБ и приведены аспекты их использования в пищевой промышленности.

Пробиотические микроорганизмы оказывают благотворное воздействие на организм человека, придают кисломолочным продуктам необходимые технологические свойства, а также подавляют развитие технически вредной микрофлоры. Данные эффекты обусловлены синтезом различных биологически активных метаболитов: органических кислот, ферментов, бактериоцинов, витаминов, экзополисахаридов.

Данные компоненты образуются естественным образом в процессе культивирования микроорганизмов. При этом метаболиты молочнокислых бактерий потенциально могут использоваться в качестве пищевых ингредиентов, в том числе в составе специализированных продуктов.

Однако в приведенной литературе недостаточно данных об использовании МК *L. helveticus* в составе кисломолочных продуктов для усиления пробиотических свойств. В связи с этим сформулированы цели и задачи, направленные на разработку технологии метаболитного комплекса *L. helveticus* и биотехнологии кисломолочного продукта с его использованием.

## ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Структура, организация и схема проведения исследований

Экспериментальная часть работы выполнялась на базе лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»).

Общая схема проведения исследований представлена на рисунке 2.1.

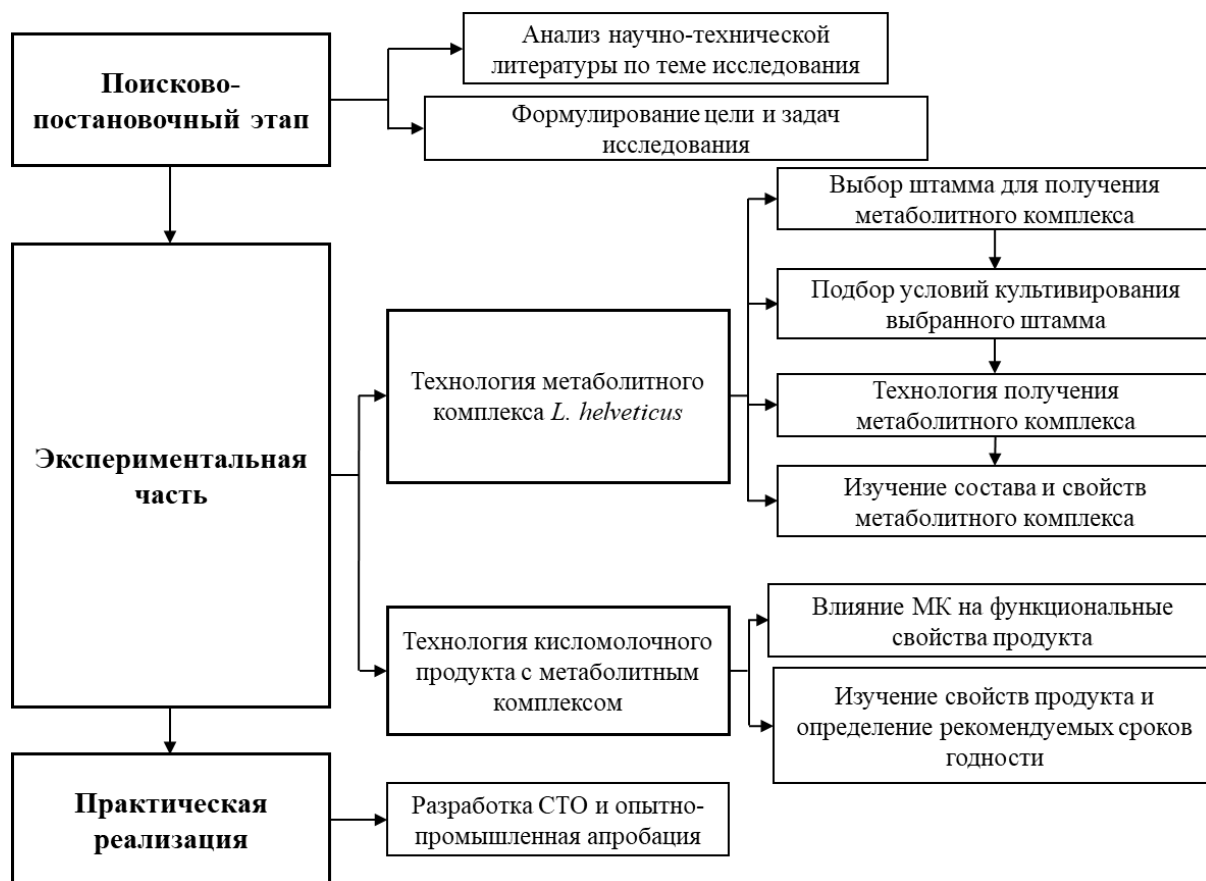


Рисунок 2.1 – Схема проведения исследований

Проведение исследований включало в себя 3 этапа: поисково-постановочный этап, экспериментальная часть и практическая реализация.

На первом этапе выполнения научной работы был проведен анализ научно-технической литературы. В ходе анализа научной литературы изучены современные тенденции в производстве продуктов питания направленного

действия, систематизированы теоретические знания об основных биологически активных метаболитах пробиотических микроорганизмов и технологических приемах их получения.

В ходе экспериментальной работы выбран пробиотический штамм, исходя из его пробиотических свойств, определены основные его метаболиты, подобрана питательная среда и условия культивирования штамма для накопления метаболитных комплексов, определены свойства и состав метаболитного комплекса в зависимости от продолжительности культивирования штамма и состава питательной среды. Подобран способ и режим сушки метаболитного комплекса.

Разработанный метаболитный комплекс использовали для получения кисломолочного продукта. В процессе работы исследовано влияние внесения МК на показатели готового продукта и его функциональные свойства, установлен рекомендуемый срок годности разработанного кисломолочного продукта.

## 2.2 Объекты исследований

Объектами исследования являлись:

- 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*.

Коллекционные штаммы хранились в замороженном состоянии при температуре минус 80 °С в растворе, содержащем 6% обезжиренного сухого молока и 10% глицерина. Восстановление культур проводили в стерильном обезжиренном молоке при (37±1) °С в течение 24 ч до сквашивания молока.

### 2.3 Методы исследований

Все микробиологические питательные среды, используемые в данной работе, готовили и стерилизовали в соответствии с методическими указаниями и инструкциями производителей по их приготовлению. Все работы, связанные с восстановлением культур, приготовлением инокулята, внесением инокулята в питательную среду проводили с соблюдением правил асептики в микробиологическом боксе «Lamsystem» (ЗАО "Ламинарные системы", Россия) II класса защиты. Инокулят готовили на питательной среде MRS-бульон (ООО «НПЦ Биокомпас-С», Россия) путем добавления в питательную среду 0,1% восстановленной коллекционной культуры с последующей инкубацией при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 16 часов.

Биохимическую активность *L. helveticus* определяли с использованием тест-системы API 50 CHL (Biomerieux, Франция). Перед проведением исследований восстановленные культуры высевали на поверхность агаризованной среды MRS (MRS-агар) (ООО «НПЦ Биокомпас-С», Россия) и инкубировали в анаэробных условиях с использованием анаэроостата OXOID с атмосферой, содержащей 10% CO<sub>2</sub>, генерируемой газ-пакетами («Анаэрогаз», ООО «ИНКО», Россия) при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Из культур, полученных на MRS-агаре, готовили суспензии мутностью 2 ед. по MacFarland в среде API 50 CHL Medium. Мутность суспензий оценивали визуально с использованием стандартов мутности McFarland Standard (Biomerieux, Франция). Приготовленные суспензии вносили по 0,1 см<sup>3</sup> в лунки стрипов API 50 CH, содержащие различные углеводные субстраты. После чего стрипы помещали в термостат и инкубировали при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. После инкубации оценивали изменение окраски индикатора в лунках стрипов. В случае утилизации расположенных в лунках углеводов, цвет индикаторов в лунках меняется с фиолетового на желтый. Полученные данные вносились в программное обеспечение «APIWEB» для идентификации штамма и составления его биохимического профиля.

Для определения ферментативного профиля *L. helveticus* использовали тест-системы API®ZYM («BioMérieux», Франция), позволяющие определять алкалинную фосфатазу, эстеразу, эстеразную липазу, липазу, лейциновую, валиновую и цистеиновую ариламидазы, трипсин,  $\alpha$ -химотрипсин, кислую фосфатазу, нафтол-AS-BI-фосфогидролазу,  $\alpha$ -галактозидазу,  $\beta$ -галактозидазу,  $\beta$ -глюкуронидазу,  $\alpha$ -глюкозидазу,  $\beta$ -глюкозидазу, N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидазу,  $\alpha$ -маннозидазу и  $\alpha$ -фукозидазу. При проведении исследования из культур, выращенных на MRS-агаре, готовили суспензии мутностью 5-6 ед. по MacFarland в среде API Suspension Medium. По 65 мкл полученных суспензий вносили в лунки стрипов API ZYM, стрипы выдерживали в термостате при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 4 ч. После инкубации в каждую лунку стрипа вносили по 1 капле реагента ZYM A и 1 капле реагента ZYM B и оставляли стрипы при комнатной температуре на 5 минут для проявления окраски. Через 5 минут проводили визуальную оценку изменения окраски субстрата в лунках в соответствии с инструкцией производителя.

Устойчивость культур к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом по МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания, по санитарно-эпидемиологической оценке, безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов» и МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Из культур, полученных на MRS-агаре, готовили суспензии в 0,9% растворе натрия хлористого мутностью 0,5 ед. по МакФарланду, что соответствует  $1,0 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

На поверхность питательной среды MRS-агар наносили 1 см<sup>3</sup> суспензии исследуемой культуры и равномерно распределяли по поверхности питательной среды шпателем Дригальского. После инокуляции на поверхность питательной среды стерильным пинцетом наносили диски (ФБУН НИИЭМ имени Пастера, Россия) с антибактериальными препаратами

(АБП). После аппликации дисков чашки Петри помещали дном вверх в анаэроостат с атмосферой, содержащей 10% CO<sub>2</sub>, генерируемой газ-пакетами («Анаэрогаз», ООО «ИНКО», Россия). Анаэроостат с чашками Петри помещали в термостат и инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 24 ч. После инкубации измеряли зоны полного подавления видимого роста культур и определяли класс чувствительности штамма.

*Способность L. helveticus синтезировать экзополисахариды* оценивали по характеру роста на среде с добавлением рутения красного. Восстановленные культуры пересевали петлей на поверхность среды, содержащей 10% обезжиренного молока, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% сахарозы, 1,5% агара и 0,08 г/л рутения красного. Чашки с посевами инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 24 ч. Способность исследуемых штаммов синтезировать ЭПС оценивали по цвету выросших колоний. Колонии микроорганизмов, синтезирующих ЭПС, на среде с рутением красным имеют белую окраску, поскольку краситель не проникает в клеточную стенку бактерий через экзополисахаридную капсулу. При отсутствии синтеза ЭПС колонии приобретают красную или розовую окраску [134, 135].

*Антимикробную активность L. helveticus* исследовали методом развивающихся смешанных популяций согласно МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов». Антимикробную активность определяли по отношению к тест-культурам *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, полученным из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН ГНЦ ПМБ (Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск). Тест-культуры хранили при температуре на полужидком питательном агаре при



температуре  $(4\pm 2)$  °С. Перед проведением исследований тест-культуры пересеивали на скошенный агар (среда СПА (ООО НПЦ Биокомпас-С, Россия)) и культивировали при температуре  $(37\pm 1)$  °С в течение 24 ч. Из полученных на скошенном агаре культур готовили суспензии клеток с мутностью, эквивалентной 5 ед. по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича.

Для исследования антимикробной активности в 20 см<sup>3</sup> питательной среды MRS-бульон (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия) вносили 1 см<sup>3</sup> суспензии тест-штамма и 1 см<sup>3</sup> инокулята *L. helveticus*. В контрольные пробирки вносили только 1 см<sup>3</sup> суспензии тест-штамма. Все образцы инкубировали при температуре  $(37\pm 1)$  °С. Через 12 ч, 24 ч, 36 ч и 48 ч инкубации из пробирок проводили посев на селективно-диагностические среды для определения количества клеток тест-штамма. Для определения количества *E. coli* ATCC 25922 использовали агар Эндо (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия), для *Staph. aureus* ATCC – агар Байрд-Паркера (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия) 6538, для *S. typhimurium* ATCC 14028 – ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия).

Для накопления метаболитных комплексов инокуляты *L. helveticus* в количестве 3%, 5% и 7% вносили в питательные среды MRS-бульон (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия) и стерильное обезжиренное молоко «Стандарт» (Комплимилк, Слуцкий сыродельный комбинат, г. Слуцк, Беларусь). Инокулированные среды инкубировали при температуре  $(37\pm 1)$  °С. Количество клеток *L. helveticus* определяли по ГОСТ 33951-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов» на питательной среде MRS-агар (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия).

Для получения бесклеточных метаболитных комплексов на разных этапах культивирования накопленную биомассу клеток отделяли центрифугированием при температуре 4°С в течение 15 мин при (2000–8000) об/мин на центрифуге (Rotanta 46, Германия). Полученные супернатанты,

содержащие метаболитные комплексы, стерилизовали фильтрацией через фильтр 0,2 мкм (Sartorius, Германия).

*Антимикробную активность МК* определяли методом луночной диффузии в агар [136, 137]. Тест-культуры *E. coli* ATCC 25922, *Staph. aureus* ATCC 6538, *S. typhimurium* ATCC 14028 культивировали на скошенном питательном агаре при температуре  $(37\pm1)$  °С в течение 24 ч. Из агаровых культур готовили суспензии в 0,9% растворе натрия хлористого мутностью 0,5 ед. по МакФарланду, что соответствует  $1,0\times10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Полученные суспензии вносили в регенерированную и охлажденную до  $(45\pm2)$  °С питательную среду Питательный агар (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия) и тщательно перемешивали. Инокулированные питательные среды разливали в стерильные чашки Петри слоем толщиной 5 мм. Чашки оставляли для застывания агара, затем стерильной стеклянной трубочкой делали лунки диаметром 8 мм. Исследуемые МК вносили в лунки в количестве 50 мкл. После чего чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч, затем помещали в термостат для инкубации при температуре  $(37\pm1)$  °С. Через 24 ч инкубации проводили измерение диаметра зон ингибирования роста исследуемых тест-культур.

*Бифидогенную активность* определяли *in vitro* по способности исследуемых образцов стимулировать рост бифидобактерий при добавлении в питательную среду ГМК-2 [138]. Метаболитные комплексы вносили в количестве 0,5 см<sup>3</sup> в пробирки с питательной средой ГМК-2, содержащей *B. adolescentis (longum)* МС-42. В контрольные пробирки МК не вносили. Инкубацию посевов проводили при температуре  $(37\pm1)$  °С в течение 24 ч.

По окончании инкубирования для подсчета накопленных клеток *B. adolescentis (longum)* МС-42 из инкубированных пробирок со средой ГМК-2 (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия) проводили посев в пробирки с питательной средой ГМК-1 (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия). Пробирки со средой ГМК-1 инкубировали при  $(37\pm1)$  °С в течение 72 ч. После инкубации

производили подсчет колоний *B. adolescentis (longum)* МС-42, выросших на среде ГМК-1.

*Содержание органических кислот* в МК определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель 205», оборудованном спектрофотометрическим детектором и кварцевым капилляром с внутренним диаметром 75 мкм и общей длиной 60 см. Образцы предварительно разбавляли дистиллированной водой. Буферный электролит был приготовлен на основе бензойной кислоты, диэтаноламина, цетилтриметиламмония бромиды и трилона Б. Разделение проводили при напряжении -20кВ и ультрафиолетовом детектировании при 254 нм. Электрофорограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения Эльфоран.

*Содержание аминокислот* в МК определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель 205», оборудованном спектрофотометрическим детектором и кварцевым капилляром с внутренним диаметром 50 мкм и общей длиной 75 см. При анализе аминокислотного состава образцы предварительно подвергали кислотному и щелочному (для триптофана) гидролизу с целью перевода связанных аминокислот из в свободные формы. Для всех аминокислот, кроме триптофана, получали фенилизотиокарбамильные производные, которые разделяли и количественно определяли методом капиллярного электрофореза. Для триптофана было применено прямое определение без получения ТФК-производного. При определении триптофана использовали боратный буферный раствор, напряжение +25 кВ, ультрафиолетовое детектирование при 219 нм. Глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и цистин определяли в фосфатном буферном растворе с добавкой  $\beta$ -циклодекстрина, при напряжении +25 кВ, давлении 50 мбар и ультрафиолетовом детектировании при 254 нм. Для определения остальных аминокислот (аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лейцин+изолейцин, метионин, валин, гидроксипролин, пролин, треонин, серин, аланин, глицин) использовали метод, аналогичных предыдущему, но без приложения давления.

Электроферограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения Эльфоран.

*Содержание витаминов группы В* оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС) с использованием хроматографической системы Agilent 1260 (Сингапур), оснащённой детектором triple quad Agilent 6465. Для хроматографического разделения применяли колонку Agilent InfinityLab 120 Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 3.0×100 mm, 2.7 µm.

Пробоподготовку образцов проводили следующим образом: 1 г образца смешивали с 4 см<sup>3</sup> деионизированной воды, перемешивали на вортексе, затем добавляли 5 см<sup>3</sup> ацетонитрила и 0,1 г аскорбиновой кислоты, перемешивали на вортексе, затем обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин, после чего центрифугировали при 3500 об/мин 10 мин и фильтровали через фильтр 0,22 мкм.

Определение витамина В<sub>12</sub> (цианокобаламина) проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в соответствии с ГОСТ ISO 20634-2018 «Смеси адаптированные для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смеси для энтерального питания взрослых. Определение витамина В<sub>12</sub> методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии». Содержание витамина В<sub>12</sub> определяли по совокупности содержания цианокобаламина и других кобальтсодержащих корриноидов с биологической активностью, включая аквокобаламин, гидроксокобаламин, метилкобаламин и аденозилкобаламин, в пересчете на цианокобаламин. Определение витамина В<sub>6</sub> (включая гликозилированные формы) проводили методом ВЭЖХ в соответствии с ГОСТ EN 14663-2014 «Продукция пищевая. Определение витамина В<sub>6</sub> (включая гликозилированные формы) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

*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.

Катион-радикал АБТС получали по методу, описанному в работе [139]. Раствор, содержащий 7 мМ АБТС (Sigma-Aldrich, США) и 2,5 мМ пероксодисульфата (Sigma-Aldrich, США) выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 28-18 ч, затем полученный раствор АБТС катион-радикала разводили фосфатно-солевым буфером (50 мМ, рН 7,40 ед. рН) до достижения оптической плотности ( $0,70 \pm 0,02$ ) при длине волны 734 нм, что соответствует концентрации катион-радикала АБТС 47 мкмоль/дм<sup>3</sup>. Приготовленный раствор имеет зелено-голубой цвет, а внесение в тестируемую пробу антиоксидантов снижает интенсивность окраски раствора пропорционально их содержанию в исследуемом образце.

При определении АОА в лунки микропланшетов вносили по 20 мкл исследуемого образца и 180 мкл раствора катион-радикала АБТС. В качестве контроля использовали смесь 20 мкл фосфатно-солевого буфера и 180 мкл раствора катион-радикала АБТС. Реакцию регистрировали по убыли оптической плотности 40,5 мин с интервалом измерений каждые 60 с при температуре 25 °С при длине волны 734 нм.

В качестве калибровочной кривой (рисунок 2.2) использовался график зависимости убыли оптической плотности от концентрации тролокса в растворе. При построении калибровочной кривой использовали стандартные растворы с концентрацией тролокса (10–100) мкмоль/дм<sup>3</sup>.

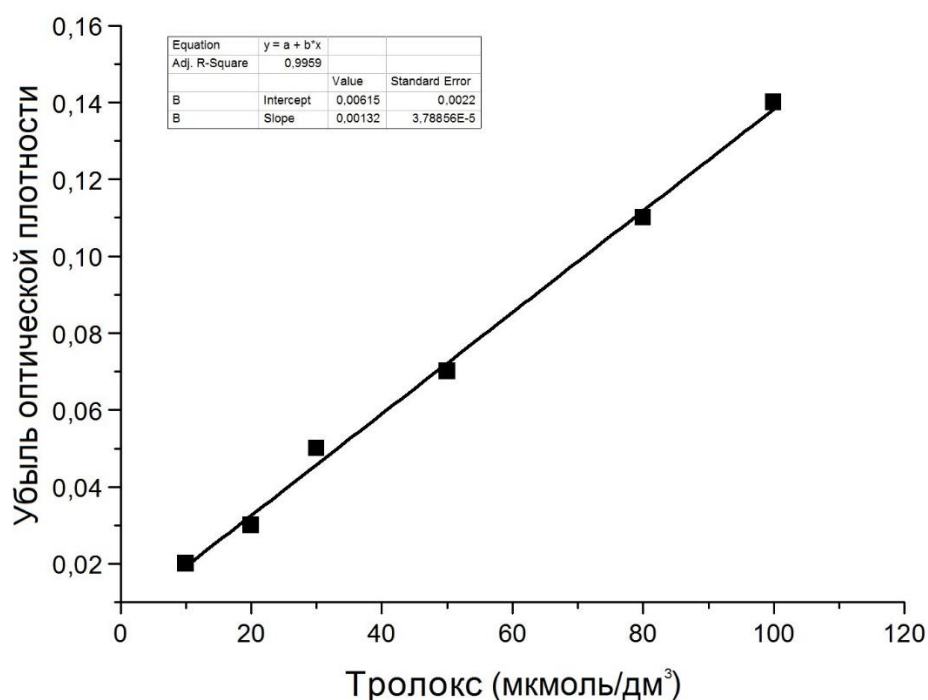


Рисунок 2.2 – Калибровочная кривая убыли оптической плотности растворов АБТС катион-радикала от концентрации тролокса

Полученные данные обрабатывали в программе OriginPro 8.0 путем расчета площади под кривой убыли оптической плотности. Антиоксидантную активность исследуемых образцов выражали в молярном эквиваленте тролокса мкМ (ТЕ) на массу образца. При этом АОА тролокса условно принималась за единицу.

Сухие МК получали методами сублимационной и распылительной сушки. Для проведения *сублимационной сушки* МК замораживали при температуре минус  $(35 \pm 5)^\circ \text{C}$  в течение 5 часов. Замороженные МК высушивали на лиофильной сушилке FreeZone 4.5 L (Labconco, США) (Рисунок 2.3) при следующих режимах:

- температура коллектора минус  $(55 \pm 5)^\circ \text{C}$ ;
- температура полки в начале процесса минус  $(25 \pm 5)^\circ \text{C}$ ;
- температура полки в конце процесса плюс  $(30 \pm 5)^\circ \text{C}$ ;
- остаточное давление  $(0,3\text{--}1,3)$  Па;
- продолжительность процесса – 48 ч.



Рисунок 2.3 – Внешний вид лиофильной сушилки

*Распылительную сушку* МК проводили на распылительной сушилке BXT-2000MLH (Shanghai Yuhua Instrument Equipment Co. Ltd, Китай) с диаметром форсунки – 1 мм. Температура воздуха на входе составляла  $(180 \pm 5)$  °C, а на выходе  $(60 \pm 5)$  °C, что обеспечивалось за счет разделения потоков горячего воздуха (Рисунок 2.4) и предотвращало перегрев и налипание продукта.



Рисунок 2.4 – Внешний вид распылительной сушилки

*Массовую долю влаги* в МК определяли по ГОСТ 30305.1 «Консервы молочные сгущенные. Методики выполнения измерений массовой доли влаги».

В кисломолочном продукте определяли *микробиологические показатели безопасности* в соответствии с ТР ТС 033/2013: БГКП по ГОСТ 32901 «Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа», дрожжи и плесневые грибы по ГОСТ 33566 «Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов», патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы по ГОСТ 31659, *Staph. aureus* по ГОСТ 30347. Рекомендуемые сроки годности определяли в соответствии с МУК 4.2.1847–04 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов. Титруемую кислотность продукта определяли по ГОСТ 3624-92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности».

*Массовую долю белка* в кисломолочном продукте определяли по ГОСТ 34454-2018 «Продукция молочная. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля», *массовую долю жира* – по ГОСТ 5867-2023 «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира».

*Органолептическую оценку* проводили описательным методом согласно ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011 «Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки». Дегустационная комиссия для органолептической оценки включала в себя 9 человек – сотрудников лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов и сотрудников лаборатории теххимического контроля ФГАНУ «ВНИМИ».

*Сухой обезжиренный молочный остаток* определяли по ГОСТ Р 54761-2011 «Молоко и молочная продукция. Методы определения массовой доли сухого обезжиренного молочного остатка».

*Определение рекомендуемого срока годности* проводили в соответствии с МУК 4.2.1847-04. 4.2. «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов. Методические указания».



При оценке рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта проводили оценку *физико-химических показателей безопасности*.

Содержание токсичных элементов определяли:

- ртути – по ГОСТ 26927, МУ 5178;
- мышьяка – по ГОСТ 26930, ГОСТ Р 51766, ГОСТ 30538, ГОСТ 31628;
- свинца – по ГОСТ 26932, ГОСТ 30178, ГОСТ 30538;
- кадмия – по ГОСТ 26933, ГОСТ 30178, ГОСТ 30538;
- пестицидов – по ГОСТ 23452 и по МУ 2142.

Определение содержания радионуклидов проводили по ГОСТ 32161 «продукты пищевые. Метод определения содержания цезия Cs-137», ГОСТ 32163 «продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90». Определение содержания микотоксинов (афлатоксина М<sub>1</sub>) – по ГОСТ 30711, меламина – по МУК 4.1.2420 и диоксида, в порядке государственного надзора. Определение содержания антибиотиков определяли – по ГОСТ 31502, ГОСТ 32219 и ГОСТ 33526.

Все исследования были проведены в 3-5 повторностях, анализ данных и построение графиков проводили с использованием пакета Ms. Office Excel. Экспериментальные данные были проанализированы при помощи процедуры парного сравнения (критерий Тьюки) при уровне статистической значимости  $p = 0,05$ .

## ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 3.1 Выбор пробиотического штамма

На данном этапе работы исследовались штаммы *Lactobacillus helveticus* из коллекции молочнокислых и пробиотических бактерий ФГАНУ «ВНИМИ»: *L. helveticus* Н9, *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* 20Т.

#### 3.1.1 Исследование биохимического профиля

Биохимические профили метаболизма углеводов штаммами *L. helveticus* 20Т, *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* Н-9 представлен в таблице 1.

Таблица 3.1 – Биохимические профили штаммов *L. helveticus*

Соединение	Биохимическая реакция			Соединение	Биохимическая реакция		
	1	2	3		1	2	3
Глицерин	-	-	-	Саллицин	-	-	-
Эритрол	-	-	-	D-целлобиоза	-	-	-
D-арабиноза	-	-	-	D-мальтоза	-	-	-
L-арабиноза	-	-	-	D-лактоза	+	+	+
D-рибоза	-	-	-	D-меллибиоза	-	-	-
D-ксилоза	-	-	-	D-сахароза	-	-	-
L-ксилоза	-	-	-	D-трегалоза	+	-	+
D-адонитол	-	-	-	Инулин	-	-	-
Метил-βD-ксилапиранозид	-	-	-	D-мелецитоза	-	-	-
D-галактоза	+	+	+	D-раффиноза	-	-	-
D-глюкоза	+	+	+	Амидон	-	-	-
D-фруктоза	+	-	-	Гликоген	-	-	-
D-манноза	-	+	-	Ксилит	-	-	-
L-сорбоза	-	-	-	Гентобиоза	-	-	-
L-рамноза	-	-	-	D-тураноза	-	-	-
Дульцитол	-	-	-	D-ликсоза	-	-	-
Инозит	-	-	-	D-тагатоза	-	-	-
D-маннит	-	-	-	D-фукоза	-	-	-
D-сорбит	-	-	-	L-фукоза	-	-	-
Метил-α-D-маннопиранозид	-	-	-	D-арабит	-	-	-
Метил-α-D-глюкопиранозид	-	-	-	L-арабит	-	-	-
N-ацетиглюкозамин	+	+	-	Калия глюконат	-	-	-

Соединение	Биохимическая реакция			Соединение	Биохимическая реакция		
	1	2	3		1	2	3
Амигдалин	-	-	-	Калия -2-кетоглюконат	-	-	-
Арбутин	-	-	-	Калия-5-кетоглюконат	-	-	-
Эскулин Железа цитрат	-	-	-				

**Примечание:** 1 – *L. helveticus* АВ, 2 – *L. helveticus* 20Т, 3 – *L. helveticus* Н-9

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

### 3.1.2 Определение ферментативных профилей

При исследовании производственных штаммов МКБ важной задачей является изучение их ферментативной активности, в частности активности гидролаз. Ферментативный профиль имеет большое значение для прогнозирования физиологической активности штаммов МКБ [140, 141].

Ферментативные профили исследуемых штаммов представлены в таблице.

Таблица 3.2 – Профили ферментативной активности штаммов *L. helveticus*

Фермент	Активность, у.е.			Фермент	Активность, у.е.		
	Н9	20Т	АВ		Н9	20Т	АВ
Щелочная фосфатаза	0	0	0	Нафтол-AS-BI-фосфогидролаза	4,0	4,0	3,0
Эстераза (С4)	0	0	0	$\alpha$ -галактозидаза	0	0	0
Эстераза-липаза (С8)	0	0	0	$\beta$ -галактозидаза	4,0	4,0	4,0
Липаза	0	0	0	$\beta$ -глюкоронидаза	0	0	0
Лейцин ариламидаза	4,0	3,5	5,0	$\alpha$ -глюкозидаза	0	0	0

Фермент	Активность, у.е.			Фермент	Активность, у.е.		
	H9	20T	AB		H9	20T	AB
Валин ариламидаза	0	0	4,0	$\beta$ -глюкозидаза	0	0	0
Цистин ариламидаза	3,0	0	4,0	N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидаза	0	0	0
Трипсин	0	0	0	$\alpha$ -маннозидаза	0	0	0
$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	$\alpha$ -фруктозидаза	0	0	0
Кислая фосфатаза	1,5	0	1,0				

У исследуемых штаммов *L. helveticus* выявлена высокая активность  $\beta$ -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.

Кислая фосфатаза и нафтол-AS-BI-гидролаза являются важными ферментами желудочно-кишечного тракта человека, поскольку участвуют в реакциях освобождения и присоединения фосфорильных групп от других молекул в процессе пищеварения. Фермент  $\beta$ -галактозидаза представляет биотехнологический интерес, так как облегчает симптомы непереносимости лактозы [142]. У исследуемых штаммов не выявлено  $\beta$ -глюкоронидазной активности, что важно с точки зрения оценки их безопасности, поскольку  $\beta$ -глюкоронидаза связана с индукцией канцерогенеза в кишечнике [143].

### 3.1.3 Исследование устойчивости к антибактериальным препаратам

При оценке безопасности производственных штаммов молочнокислых бактерий необходимо проводить оценку их устойчивости к антибактериальным препаратам (АБП). Механизмы устойчивости бактерий к АБП условно делятся на две группы: природные и приобретенные. Приобретенная устойчивость возникает в результате хромосомных мутаций или при передаче мобильных генетических элементов (плазмид) от

антибиотикорезистентных микроорганизмов микроорганизмам других видов. Молочнокислые бактерии способны приобретать гены устойчивости к антибиотикам и передавать их другим видам микроорганизмов [144, 145, 146]. Некоторые штаммы МКБ, традиционно используемые при производстве кисломолочных продуктов, могут являться носителями генов антибиотикорезистентности, которые могут передаваться патогенным микроорганизмам, что приводит к распространению антибиотикорезистентности [140]. Результаты исследования устойчивости штаммов *L. helveticus* к АБП различных групп представлены в таблице.

Таблица 3.3 – Устойчивость штаммов *L. helveticus* к антибактериальным препаратам

№ п/п	Антибактериальный препарат	Количество вещества на диске, мкг	Класс чувствительности		
			<i>L. helveticus</i> 20 Т	<i>L. helveticus</i> Н-9	<i>L. helveticus</i> АВ
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, штаммы *L. helveticus* 20 Т, *L. helveticus* Н-9 и *L. helveticus* АВ чувствительны антибиотикам различных групп: к гентамицину, ампициллину, тетрациклину, азитромицину, линкомицину и левомецетину. Отсутствие у исследуемых штаммов устойчивости к АБП позволяет сделать вывод о безопасности использования данных штаммов с точки зрения распространения антибиотикорезистентности.

### 3.1.4 Определение способности синтезировать экзополисахариды

В ходе исследования была проведена качественная оценка способности штаммов *L. helveticus* 20Т, *L. helveticus* АВ и *L. helveticus* Н-9 из синтезировать

ЭПС. Колонии исследуемых штаммов на агаре с рутением красным представлены на рисунке 3.1.



*L. helveticus* 20T

*L. helveticus* H-9

*L. helveticus* AB

Рисунок 3.1 – Рост штаммов *L. helveticus* на среде с рутением красным

Синтез ЭПС молочнокислыми бактериями зависит от условий культивирования: активной кислотности среды, температуры, исходного инокулята [147, 148]. Согласно полученным данным, исследуемые штаммы имеют способность синтезировать ЭПС. При культивировании на среде с рутениевым красным колонии исследуемых штаммов *L. helveticus* белую окраску.

#### 3.1.4 Определение антимикробной активности

При оценке пробиотического потенциала культур важным параметром является антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Результаты по исследованию антагонистической активности исследуемых культур представлены на рисунках 3.2 – 3.4.

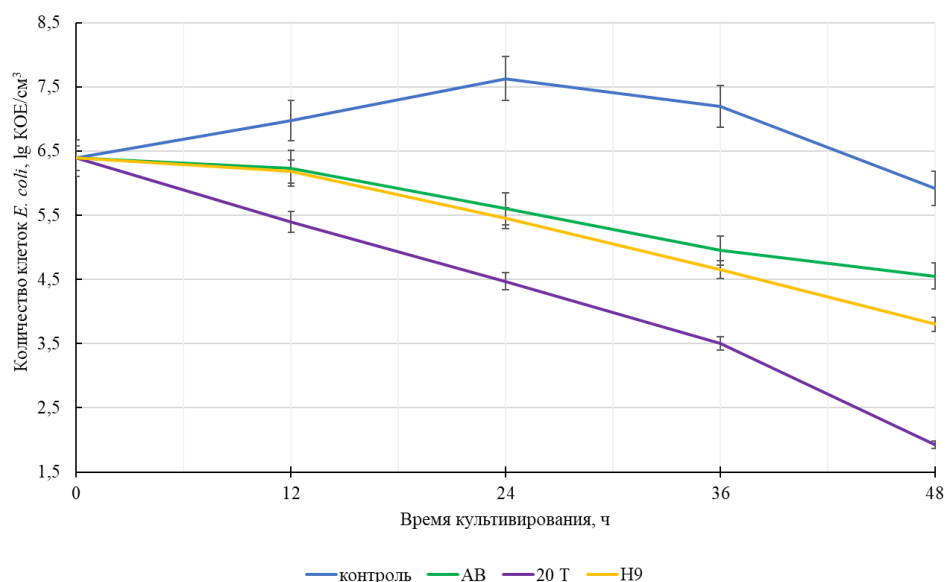


Рисунок 3.2 – Антимикробная активность штаммов *L. helveticus* по отношению к *E. coli* ATCC 25922

Установлено, что исследуемые штаммы *L. helveticus* подавляют рост *E. coli* ATCC 25922 при совместном культивировании. В контрольном образце количество клеток *E. coli* через 24 ч культивирования составляло  $4,3 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 48 ч -  $8,5 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

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

При совместном культивировании *E. coli* ATCC 25922 и штамма *L. helveticus* Н9 клеток *E. coli* через 24 ч сокультивирования составило  $2,8 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 48 ч культивирования количество клеток патогена снизилось до  $6,5 \times 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Наибольшее антимикробное действие на *E. coli* ATCC 25922 оказывал штамм *L. helveticus* 20Т. Через 24 ч количество клеток *E. coli* составило  $3,0 \times 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 48 ч -  $8,5 \times 10^1$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

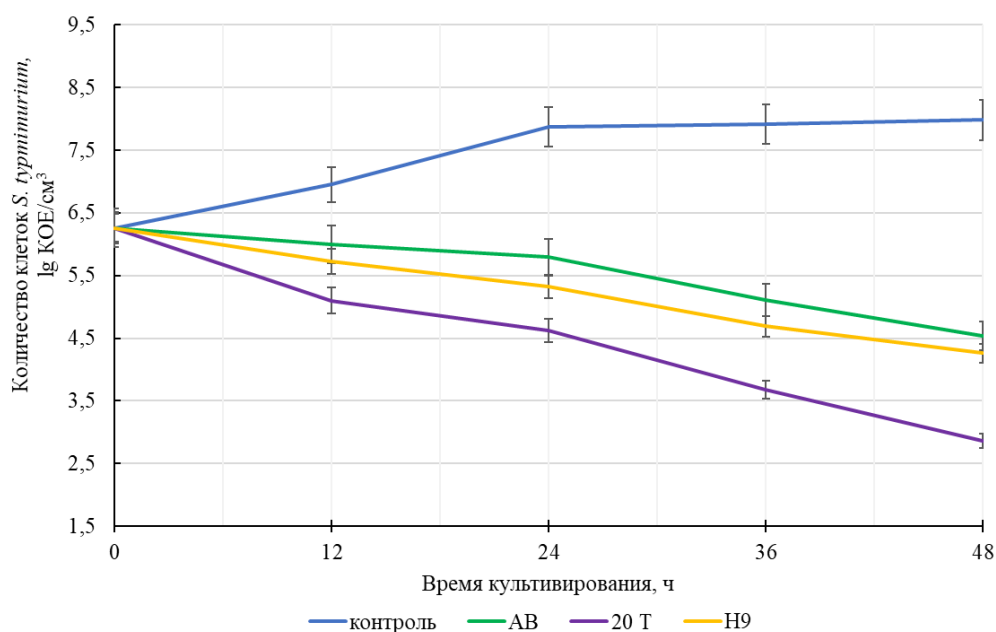


Рисунок 3.3 – Антимикробная активность штаммов *L. helveticus* по отношению к *S. typhimurium* ATCC 14028

Исследуемые штаммы *L. helveticus* также проявляли выраженную антимикробную активность по отношению к *S. typhimurium* ATCC 14028. В контрольном образце количество клеток *S. typhimurium* через 24 ч культивирования составляло  $7,5 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 48 ч –  $9,6 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Штаммы *L. helveticus* AB и *L. helveticus* Н9 проявляли схожее антимикробное действие на тест-культуру *S. typhimurium* ATCC 14028. При сокультивировании количество клеток *S. typhimurium* через 24 ч составляло  $(2,1-6,2) \times 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Через 48 ч сокультивирования количество клеток *S. typhimurium* снижалось до  $3,5 \times 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> и  $1,8 \times 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> для штаммов *L. helveticus* AB и *L. helveticus* Н9 соответственно.

При сокультивировании *S. typhimurium* ATCC 14028 со штаммом *L. helveticus* 20Т через 24 ч количество клеток *S. typhimurium* составило  $4,2 \times 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 48 ч количество клеток *S. typhimurium* снизилось до  $7,0 \times 10^2$  КОЕ/см<sup>3</sup>.



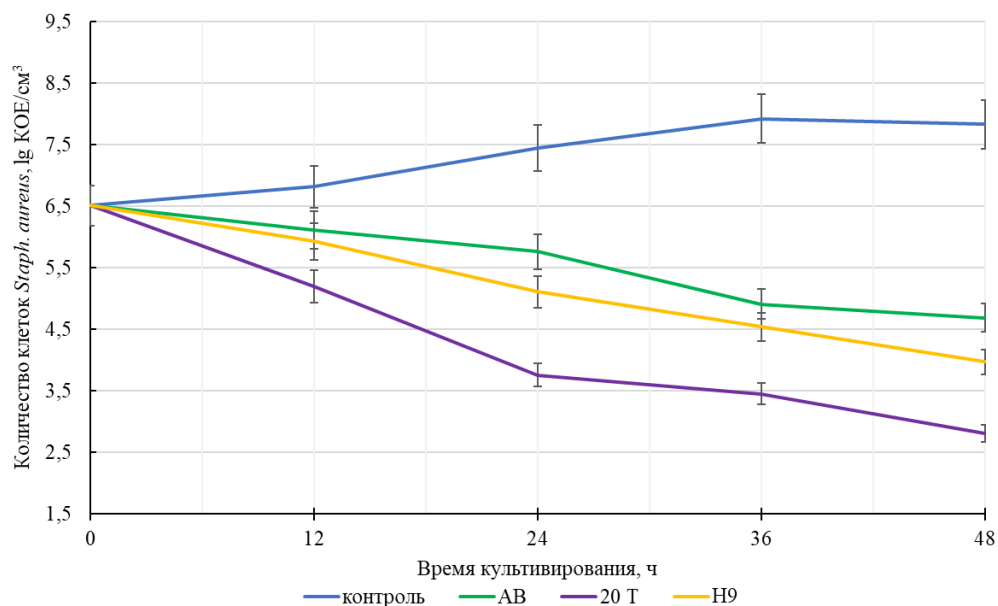


Рисунок 3.4 – Антимикробная активность штаммов *L. helveticus* по отношению к *Staph. aureus* ATCC 6538

Все исследуемые штаммы *L. helveticus* оказывали антимикробное действие на *Staph. aureus* ATCC 6538. В контрольном образце количество клеток *Staph. aureus* через 24 ч культивирования составило  $2,8 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 48 ч культивирования количество клеток *Staph. aureus* в контрольном образце возросло до  $6,8 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

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/см<sup>3</sup>, через 48 ч сокультивирования количество клеток *Staph. aureus* снизилось до  $5,0 \times 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>. При совместном культивировании *S. aureus* ATCC 6538 и *L. helveticus* Н9 количество клеток *Staph. aureus* составило  $1,3 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup> и  $9,5 \times 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup> через 24 ч и 48 ч культивирования соответственно.

При совместном культивировании *Staph. aureus* ATCC 6538 и *L. helveticus* 20Т количество клеток *Staph. aureus* через 24 ч составило  $5,8 \times 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 48 ч сокультивирования количество клеток *S. aureus* снизилось до  $6,5 \times 10^2$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

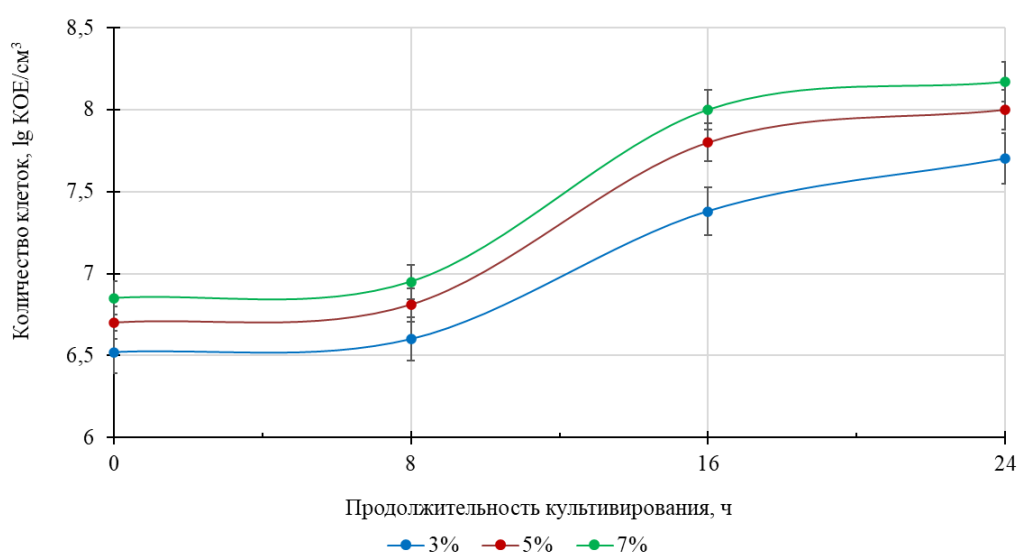
По результатам исследований, исследуемые штаммы *L. helveticus* Н9, *L. helveticus* АВ и *L. helveticus* 20Т проявляли схожую биохимическую и

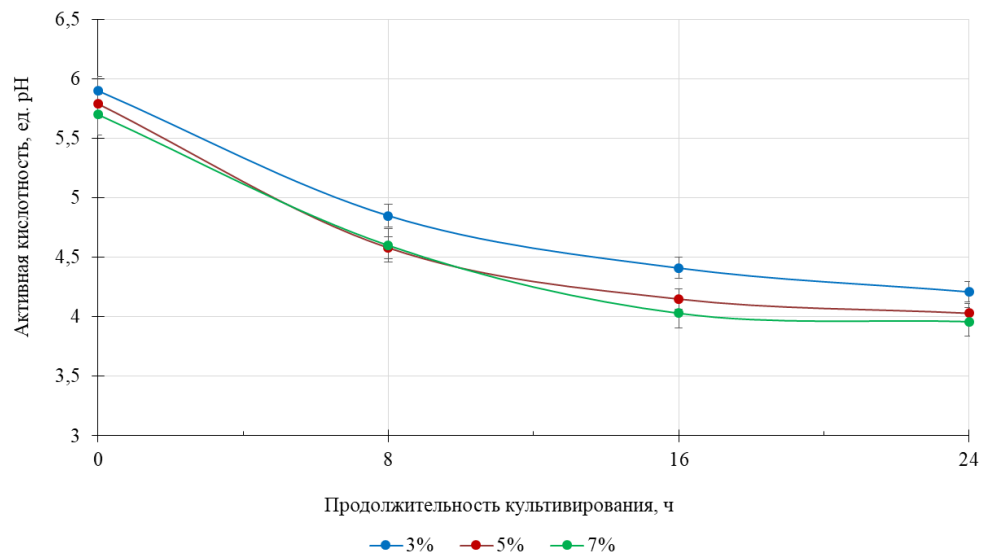
ферментативную активность, а также способность к синтезу экзополисахаридов. Однако по антимикробной активности, являющейся одним из важнейших пробиотических свойств, наблюдались существенные различия. Наибольшую антимикробную активность по отношению к патогенным тест-культурам проявлял штамм *L. helveticus* 20T. Исходя из данных результатов, для дальнейшей работы был выбран штамм *L. helveticus* 20T.

### 3.2 Подбор питательной среды и условий культивирования выбранного штамма

Основными параметрами, определяющими синтез различных метаболитов микроорганизмами, являются используемая питательная среда, вносимая доза инокулята и продолжительность культивирования.

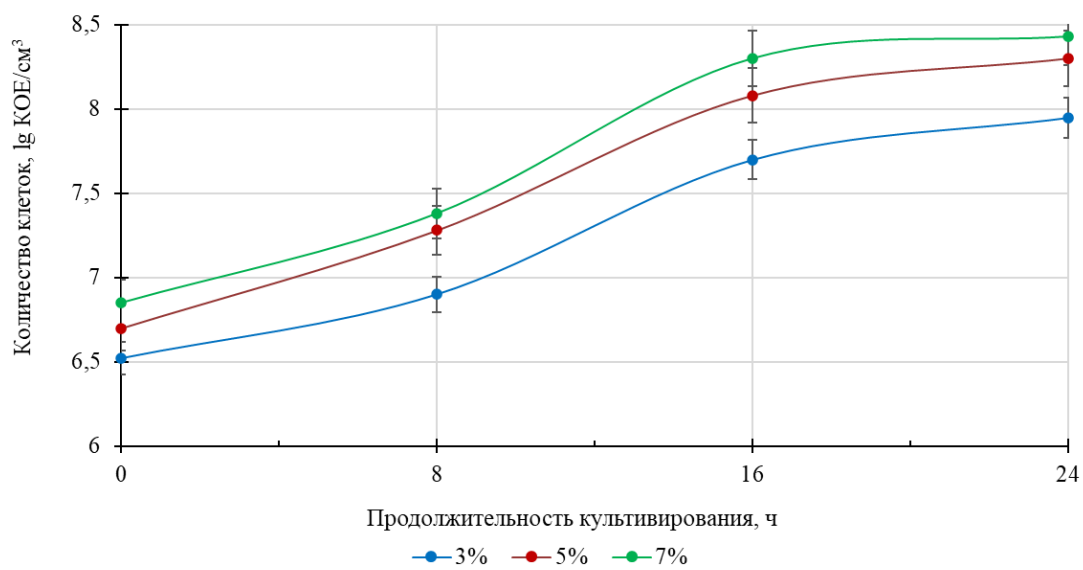
При исследовании влияния параметров культивирования на накопление метаболитных комплексов инокуляты *L. helveticus* 20T в количестве 3%, 5% и 7% вносили в питательные среды MRS-бульон и обезжиренное молоко инкубировали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Результаты представлены на рисунках 3.5 и 3.6.



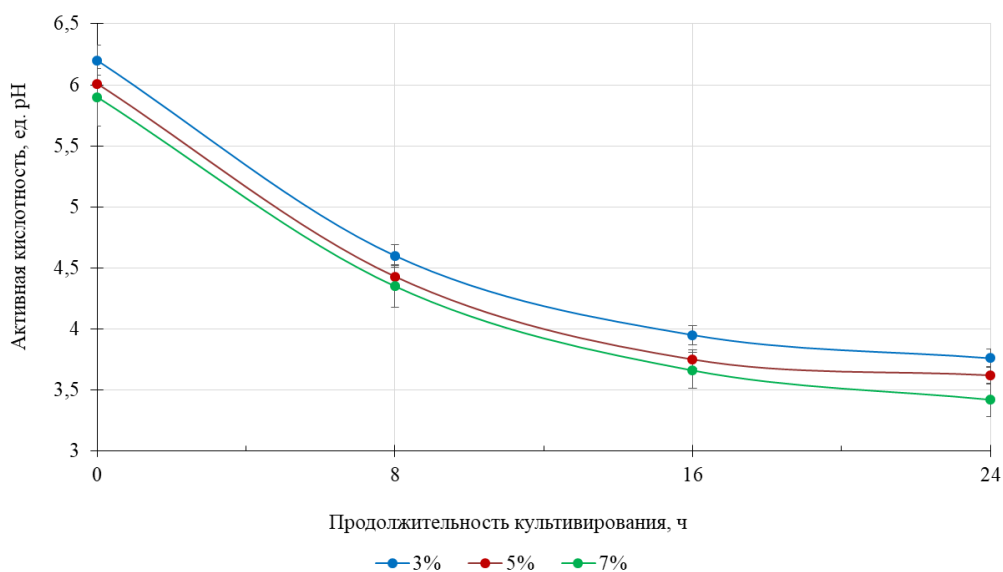


б

Рисунок 3.5 – Изменение количества клеток *L. helveticus* 20Т (а) и активной кислотности среды (б) при культивировании на среде MRS-бульон



а



б

Рисунок 3.6 – 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.

Количество клеток *L. helveticus* 20Т при культивировании на обезжиренном молоке с использованием 5% через 8 культивирования составило  $1,9 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 16 часов –  $1,2 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 24 ч –  $2,0 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. При культивировании *L. helveticus* 20Т на среде MRS-бульон при использовании 5% инокулята количество клеток через 8 ч культивирования составило  $2,4 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 16 часов –  $2,0 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 24 ч –  $2,7 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Активная кислотность среды при культивировании *L. helveticus* 20Т на стерильном обезжиренном молоке при использовании 5% инокулята

составила 4,43 ед. рН через 8 ч, 3,75 ед. рН, – через 16 ч и 3,62 ед.рН через 24 ч. При использовании 7% инокулята активная кислотность среды через 8 ч составила 4,35 ед. рН, 3,66 ед. рН – через 16 ч и 3,42 ед.рН через 24 ч.

При культивировании на среде MRS-бульон активная кислотность среды при использовании 5% составила 4,58 ед. рН через 8 ч, 4,15 ед. рН, – через 16 ч и 4,03 ед.рН через 24 ч. При использовании 7% инокулята активная кислотность среды составила 4,60 ед. рН через 8 ч, 4,03 ед. рН, – через 16 ч и 3,96 ед.рН через 24 ч.

Для подбора оптимальных параметров культивирования проведены дополнительные исследования по оценке влияния продолжительности культивирования и дозы инокулята на антимикробную активность получаемой КЖ *L. helveticus* 20Т. Антимикробную активность КЖ исследовали методом луночной диффузии в агар. Результаты представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – 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.</i> <i>typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staph.</i> <i>aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staph.</i> <i>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

По результатам исследований, при увеличении продолжительности культивирования наблюдалось усиление антимикробной активности КЖ. Также 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  $(37\pm 2)$  °С: доза инокулята 5%, продолжительность 24ч.

### 3.2.1 Параметры отделения клеток продуцента для получения метаболитных комплексов

В технологии получения биологически активных метаболитов МКБ необходимо обеспечить наиболее полное отделение клеток от культуральной жидкости. Для отделения бактериальных клеток от культуральной жидкости применяется центрифугирование, при этом на качество отделения бактериальной массы от культуральной жидкости влияет скорость центрифугирования. Данные по влиянию скорости центрифугирования на остаточное количество клеток *L. helveticus* в супернатанте культуральной жидкости представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Влияние скорости центрифугирования на количество клеток *L. helveticus* 20Т в супернатанте культуральной жидкости

№ п/п	Скорость вращения центрифуги, об/мин	Центробежное ускорение центрифуги, g	Остаточное количество клеток КОЕ/см <sup>3</sup>	
			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 уменьшалось остаточное количество клеток продуцента в полученных

супернатантах. При дальнейшем увеличении частоты вращения остаточное количество клеток в супернатантах менялось незначительно.

Поскольку в полученных нативных метаболитных комплексах содержалось остаточное количество клеток *L. helveticus* 20 Т, потребовалось введение дополнительной стадии стерилизующей фильтрации через фильтр 0,2 мкм (Sartorius, Германия).

### 3.2.2 Зависимость состава метаболитных комплексов от используемой питательной среды

На данном этапе исследований проводилась оценка состава МК *L. helveticus* 20Т, полученных при культивировании данного штамма на разных питательных средах. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение 24 ч, доза инокулята составила 5%. Контрольные образцы перед проведением исследований подвергались центрифугированию со скоростью 8000 об/мин в течение 15 мин. Данные по содержанию органических кислот в МК *L. helveticus* 20Т представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Содержание органических кислот в МК *L. helveticus* 20Т

№ п/п	Название	Концентрация, мг/100 см <sup>3</sup>			
		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. Также выявлено содержание уксусной кислоты. В МК, полученном при культивировании на MRS-бульоне, содержание уксусной и лимонной кислот сопоставимо с контролем.

### 3.2.3 Зависимость биологической активности метаболитных комплексов от среды культивирования

Результаты оценки антимикробной активности МК (24 ч культивирования, доза инокулята 5%) в зависимости от используемой питательной среды представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Антимикробная активность МК в зависимости от используемой питательной среды

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

Антимикробная активность МК, полученных при культивировании на разных питательных средах, отличалась. МК, полученные при культивировании на обезжиренном молоке, проявляли большую антимикробную активность по отношению к исследуемым тест-культурам. Это коррелирует с данными по содержанию молочной кислоты в МК.

Результаты исследования бифидогенной активности МК представлены на рисунке 3.7.



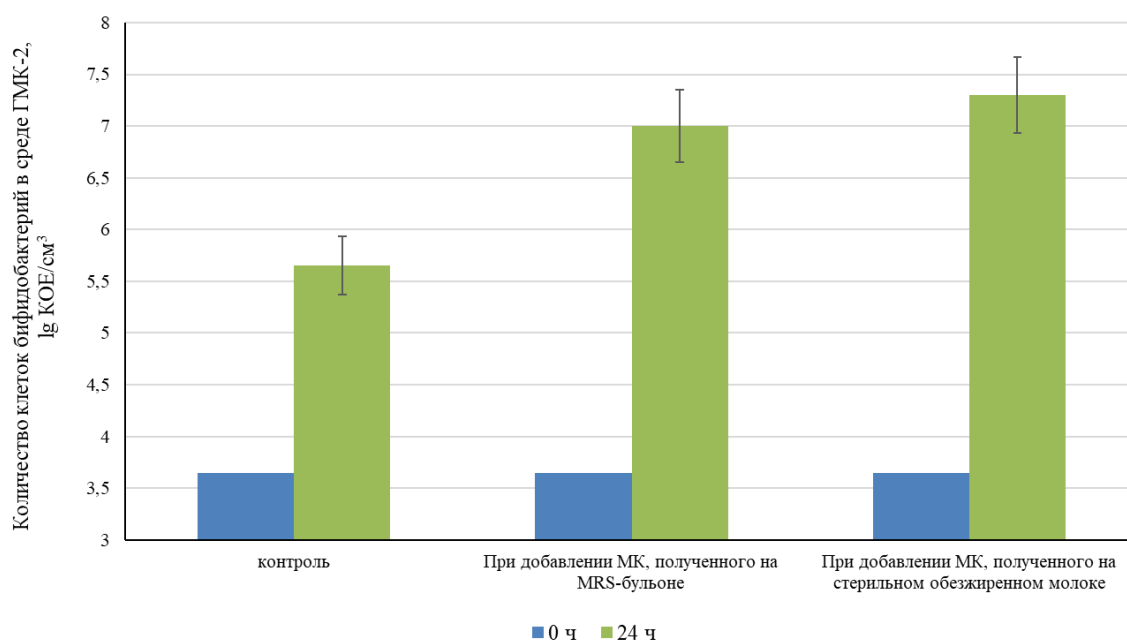


Рисунок 3.7 – Бифидогенная активность МК *L. helveticus* 20T

Согласно полученным результатам МК *L. helveticus* 20T проявляли выраженное бифидогенное действие *in vitro*. В контрольном образце начальное содержание *B. adolescentis* MC-42 составило  $4,5 \times 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>, через 24 ч культивирования количество бифидобактерий в контроле увеличилось на два порядка до  $4,5 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>. При добавлении МК, полученного на среде накопления MRS-бульон, количество клеток *B. adolescentis* MC-42 через 24 ч культивирования составило  $1,0 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>. При добавлении МК, полученного на стерильном обезжиренном молоке, количество бифидобактерий через 24 ч культивирования составило  $2,0 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

МК, полученные при культивировании на стерильном обезжиренном молоке, характеризуются более высокой антимикробной активностью и более высоким содержанием органических кислот, чем МК, полученные на MRS-бульоне. При этом бифидогенная активность МК была сопоставима.

Исходя из этого, для дальнейшей работы выбраны следующие параметры накопления МК:

- среда культивирования – стерильное обезжиренное молоко;
- доза инокулята 5%;
- продолжительность культивирования 24 ч.

### 3.3.2 Выбор способа и параметров сушки

В процессе исследований проводилась сублимационная и распылительная сушка полученных МК *L. helveticus* 20 Т.

Перед сублимационной сушкой МК замораживали при температуре минус  $(35 \pm 5)$  °С в течение 5 часов. Замороженные метаболитные комплексы высушивали на при следующем режиме:

- температура коллектора минус  $(55 \pm 5)$  °С;
- остаточное давление (0,3–1,3) Па.

Стоит отметить, что продолжительность сублимационной сушки МК составила 48 ч, так же потребовалось предварительное замораживание МК перед сушкой, что невыгодно с экономической точки зрения.

При распылительной сушке применялись различные температурные параметры:

1. температура на входе  $(185 \pm 5)$  °С, на выходе –  $(70 \pm 5)$  °С;
2. температура на входе  $(175 \pm 5)$  °С, на выходе –  $(70 \pm 5)$  °С;
3. температура на входе  $(175 \pm 5)$  °С, на выходе –  $(60 \pm 5)$  °С;
4. температура на входе  $(175 \pm 5)$  °С, на выходе –  $(25 \pm 5)$  °С;
5. температура на входе  $(175 \pm 5)$  °С, на выходе –  $(40 \pm 5)$  °С.

В процессе распылительной сушки при температурных режимах №1 - №3 наблюдалось образование горелых частиц и налипание МК на стенки оборудования (рисунок 3.8), что вероятно связано с высоким содержанием органических кислот в МК.



Рисунок 3.8 – Налипание МК на стенки оборудования в процессе распылительного высушивания

При использовании температурных режимов №4 и №5 не удавалось достигнуть необходимой влажности продукта, что связано с недостаточно высокой температурой воздуха на выходе.

Чтобы обеспечить высушивание МК и предотвратить перегрев продукта использовалось разделение потоков горячего воздуха, при этом температура воздуха на входе составила  $(180 \pm 5)^\circ\text{C}$ , а на выходе  $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ . Внешний вид полученного распылительно высушенного порошка МК представлен на рисунке 3.9.

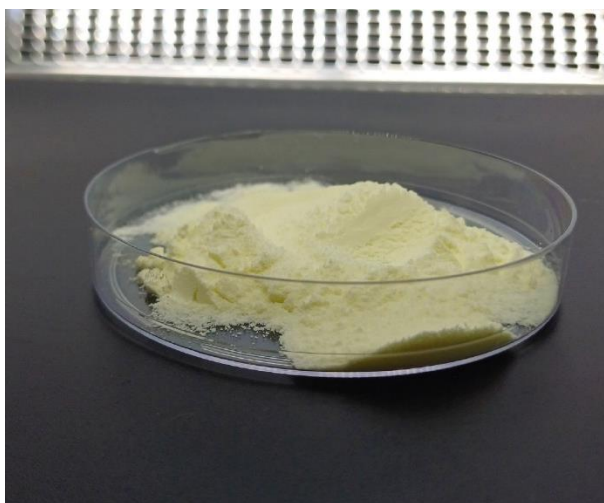


Рисунок 3.9 – Распылительно высушенный МК *L. helveticus* 20 Т

### 3.3.2.1 Влияние способа сушки на состав и свойства МК

Для выбора способа сушки необходима оценка влияния способа сушки на состав полученных сухих МК. На следующем этапе исследований проводилось сравнение состава полученных сухих МК *L. helveticus* 20 Т, высушенных разными способами. Результаты исследования количества органических кислот в сухих метаболитных комплексах представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Содержание органических кислот в сухих метаболитных комплексах *L. helveticus* 20Т

Образец	Содержание органических кислот, мг/100г		
	Молочная	Уксусная	Лимонная
Сублимационно высушенный МК	26901,3±125	231,2±11	1041,2±35
Распылительно высушенный МК	26572,0±114	192,8±15	956,0±42

Согласно результатам исследований, содержание органических кислот в распылительно высушенном МК *L. helveticus* 20Т было сопоставимо с содержанием органических кислот в сублимационно высушенном МК. Это обеспечивалось снижением температуры на выходе из сушки до  $(60\pm 5)^\circ\text{C}$ , что согласуется с литературными данными. Результаты исследования аминокислотного состава сухих метаболитных комплексов *L. helveticus* представлены на рисунке 3.10.

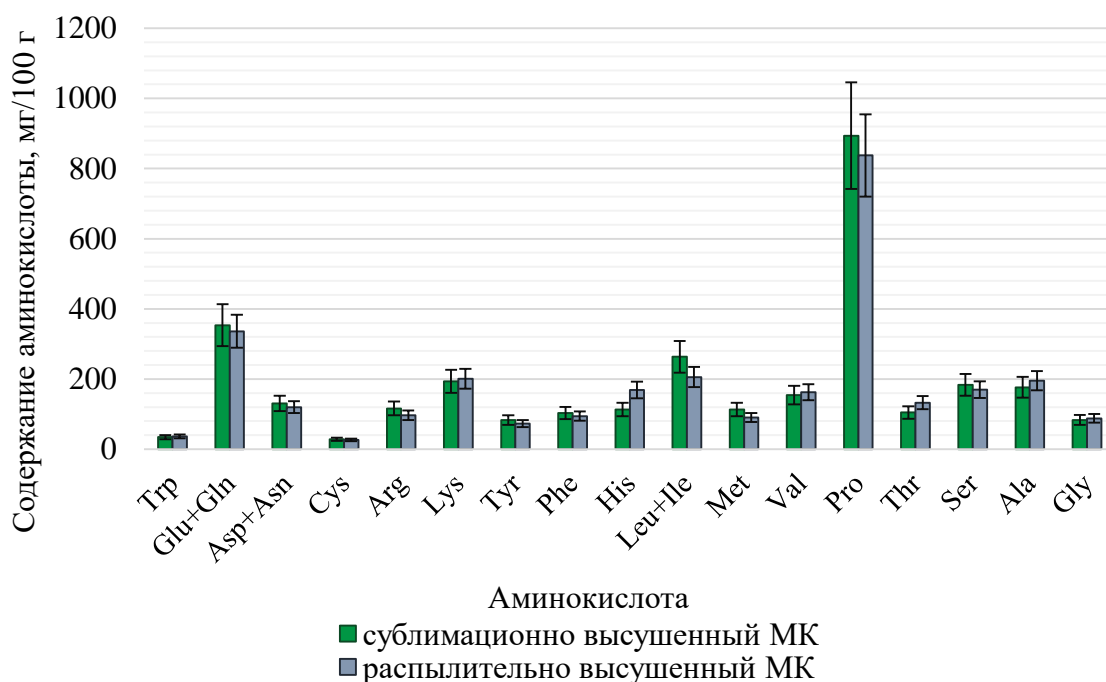


Рисунок 3.10 – Содержание аминокислот в сухих метаболитных комплексах *L. helveticus* 20T

По результатам исследований, аминокислотный состав полученных МК, высушенных разными способами, 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.

В сухих МК также определяли содержание витаминов группы В. Результаты представлены на рисунке 3.11.

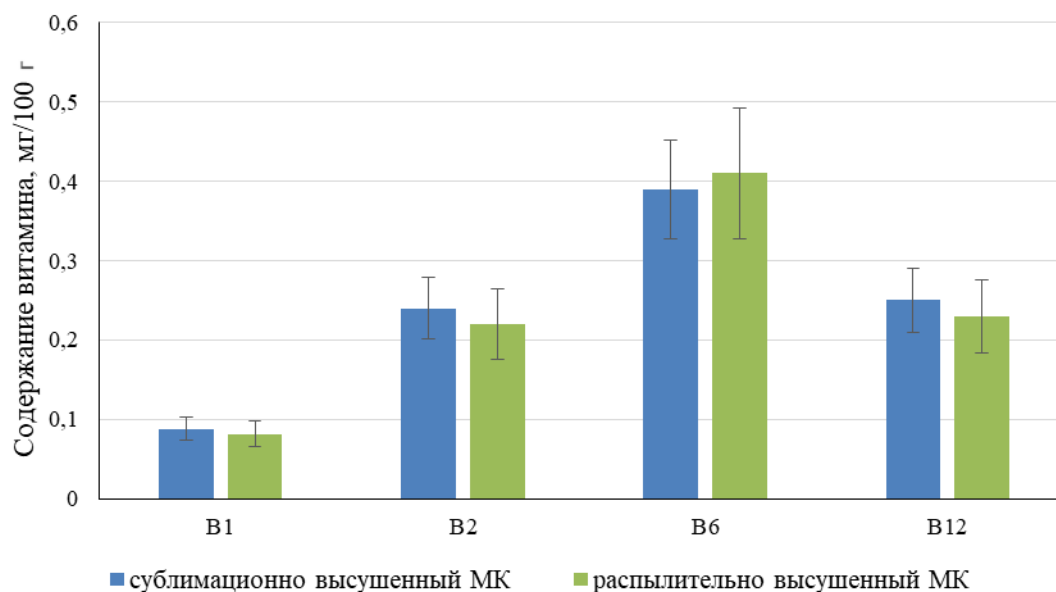


Рисунок 3.11 – Содержание витаминов группы В в сухих МК

Согласно полученным результатам, содержание витаминов группы В в МК, высушенных разными способами, было сопоставимо. Так, содержание витамина В<sub>6</sub> в сублимационно высушенном МК составило 0,39 мг/100 г, в распылительно высушенном – 0,41 мг/100 г, содержание витамина В<sub>2</sub> сублимационно высушенном МК составило 0,24 мг/100 г, в распылительно высушенном 0,22 мг/100 г. Исходя из этого, можно сделать вывод, что предложенный способ распылительной сушки не влияет на содержание витаминов в готовом препарате.

В сухих МК исследована антимикробная активность. Для проведения исследования 0,1 г навески МК растворяли в 100 мкл стерильной дистиллированной воды. Результаты исследования представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – 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

Продолжение таблицы 3.9

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.

По показателям качества и безопасности полученный МК соответствовал требованиям ТР ТС 029 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств».

### **3.5 Разработка технической документации и опытно-промышленная апробация метаболитного комплекса *L. helveticus***

На основе результатов экспериментальных исследований разработана технология получения метаболитного комплекса *L. helveticus* 20Т, утверждена и техническая документация СТО 00419785-081/1-2024 «Метаболитный комплекс *L. helveticus*».

Принципиальная технологическая схема получения метаболитного комплекса представлена на рисунке 3.11.



Рисунок 3.11 – Принципиальная технологическая схема получения метаболитного комплекса *L. helveticus*

МК предназначен для использования в составе пищевых продуктов, в том числе, специализированной продукции. По физико-химическим, органолептическим и микробиологическим показателям метаболитный комплекс должен соответствовать требованиям, представленным в таблицах 3.10-3.12.

Таблица 3.10 – Органолептические показатели МК

Наименование показателя	Характеристика
Внешний вид, консистенция	Однородный сухой порошок
Вкус и запах	Чистые, кисломолочные, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Белый или с кремовым оттенком, равномерный по всей массе

Таблица 3.11 – Физико-химические показатели МК

Наименование показателя	Значение для добавки
Массовая доля влаги, %, не более	4,7
Молочная кислота, не менее, г/100 г	15
Витамин В <sub>6</sub> , не менее, мкг/100г	350



Таблица 3.12 – Микробиологические показатели МК

Наименование показателя	Значение показателя
Количество дрожжей и плесневых грибов, КОЕ/г, не более	10
Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, КОЕ/г, не более	$1 \times 10^3$
Количество <i>L. helveticus</i> , КОЕ/г	не допускается в 1,0 г
Бактерии группы кишечных палочек (БГКП) (колиформы)	не допускается в 2,0 г
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы	не допускается в 10,0 г
<i>Staph. aureus</i>	не допускается в 2,0 г

Рекомендуемый срок годности метаболитного комплекса составляет 6 месяцев при температуре  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ . МК соответствовал требованиям разработанного СТО на протяжении 7 месяцев хранения (коэффициент резерва 1,15). Содержание витамина В<sub>6</sub> к концу срока хранения снизилось на 5%.

Опытно-промышленная апробация МК *L. helveticus* проводилась на базе экспериментального цеха ФГАНУ «ВНИМИ». Выработанные образцы соответствовали требованиям СТО 00419785-081/1-2024 «Метаболитный комплекс *L. helveticus*», что подтверждено актом внедрения (Приложение Б).

### 3.5 Экономический расчет себестоимости производства МК *L. helveticus*

Экономическая эффективность производства МК связана с использованием ранее не перерабатываемых отходов. Поскольку производство МК предполагает переработку КЖ, образующейся при производстве бактериальных препаратов, при определении себестоимости учитываются только затраты, связанные с технологическим циклом, и не учитываются затраты на сырье. Результаты калькуляции себестоимости метаболитного комплекса представлены в таблице 3.13.

Таблица 3.13 – Калькуляция себестоимости МК *L. helveticus*

Статьи калькуляции	Затраты на производство 1 т
Расходы на энергию, руб	18304,64
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования, руб	86400,0

Продолжение таблицы 3.13

Расходы на заработную плату, руб	108000,0
Себестоимость, руб	195604,64
Расходы на продажу продукции, руб	3912,1
Полная себестоимость 1 т продукции, руб	412220,64

Стоимость энергоресурсов заложена в соответствии со среднестатистическими ценами: электроэнергия – 5,7 руб. за кВт\*ч, водоснабжение – 50 руб. за м<sup>3</sup>, пар – 370 руб. за т. Расход энергоносителей на 1 т МК: пар – 0,3 т, электроэнергия – 65,2 кВт / ч, вода – 14,62 м<sup>3</sup>. Расходы на оплату труда рассчитаны с учетом укрупненных норм времени и расценок на производство 1т продукции. Расходы по содержанию и эксплуатации оборудования принимаем в размере 80 % от заработной платы основных рабочих. Затраты на продажу продукции принимаем в размере 2% от производственной себестоимости продукции.

Исходя из расчетов примерная себестоимость 1 кг продукции составляет ориентировочно 412,22 руб.

### 3.6 Разработка технологии кисломолочного продукта, содержащего МК *L. helveticus*

Для получения кисломолочного продукта использовали закваску ProdLine®St1/Lb3 (ФГАНУ «ВНИМИ», Россия), содержащую культуры *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, вносимую в пастеризованное молоко жирностью 3,2% в количестве 3%. МК вносили в количестве 1% одновременно с закваской. Перед внесением в молочную основу 10 г сухой навески МК растворяли в 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и пастеризовали при температуре (87±2) °С 15 мин. Сбраживание осуществляли при температуре (42±2) °С до образования сгустка.

Полученные образцы кисломолочного продукта исследовали по физико-химическим, микробиологическим и органолептическим характеристикам. В качестве контроля использовался кисломолочный продукт, полученный при тех же технологических режимах, но без внесения МК. Результаты представлены в таблице 3.14.

Таблица 3.14 – 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 <sup>3</sup>	1,2×10 <sup>9</sup>	1,4×10 <sup>9</sup>
Витамин В <sub>6</sub> 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
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. По показателям безопасности кисломолочный продукт соответствовал требованиям, представленным в ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» (Приложения 4, 8).

### 3.7 Исследование функциональных свойств кисломолочного продукта

На следующем этапе исследования проводилась оценка биологической активности полученного кисломолочного продукта. При этом исследовались антимикробные, бифидогенные и антиоксидантные свойства кисломолочного продукта. 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 кисломолочного продукта по отношению к тест-штаммам патогенных микроорганизмов представлена в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Антимикробная активность исследуемых образцов кисломолочного 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

Согласно полученным данным, при внесении МК в молочную основу антимикробная активность готового кисломолочного продукта по отношению к исследуемым тест-штаммам увеличивалась в сравнении с контролем. При этом антимикробная активность контрольного образца была одинакова для всех тест-штаммов.

Зона подавления роста *E. coli* ATCC 25922 составляла 11,5 мм для опытного образца и 10,0 мм для контроля. Зона подавления роста *S.*

*typhimurium* ATCC 14028 составляла 12,5 мм для опытного образца и 10,0 мм для контроля. Наибольшая антимикробная активность кисломолочного продукта с добавлением МК наблюдалась по отношению к *Staph. aureus* ATCC 6538. Зона подавления роста *Staph. aureus* ATCC 6538 составляла 14,0 мм для опытного образца и 10,0 мм для контроля.

По результатам исследований, добавление МК *L. helveticus* 20T в молочную основу при получении кисломолочного продукта усиливает антимикробную активность микроорганизмов закваски, что может позволить снизить риск контаминации продукта в процессе его производства. Результаты исследования бифидогенной активности кисломолочного продукта представлены в таблице 3.16.

Таблица 3.16 – Бифидогенная активность кисломолочного продукта

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

Согласно результатам исследований, кисломолочный продукт обладает способностью стимулировать рост бифидобактерий. Начальное содержание клеток *B. adolescentis* MC-42 в опытном и контрольном образцах составило  $1,7 \times 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>. При сокультивировании с разработанным кисломолочным продуктом количество клеток *B. adolescentis* MC-42 через 24 ч было выше и составило  $3,8 \times 10^8$ .

Результаты исследования антиоксидантной активности кисломолочного продукта представлены в таблице 3.17.

Таблица 3.17 – Антиоксидантная активность кисломолочного продукта

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

Согласно результатам исследований, внесение МК способствовало значительному увеличению антиоксидантной активности кисломолочного напитка: АОА в опытном образце была в 4,5 раза выше, чем в контроле.

### 3.8 Определение рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта

Для определения рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта 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%. На 0, 8, 15, 20 и 26 сутки хранения проводили исследования по определению количества МКБ, титруемой кислотности, органолептических характеристик и показателей безопасности продукта.

Графики изменения титруемой кислотности и количества МКБ в процессе хранения кисломолочного продукта представлены на рисунках 3.12 и 3.13

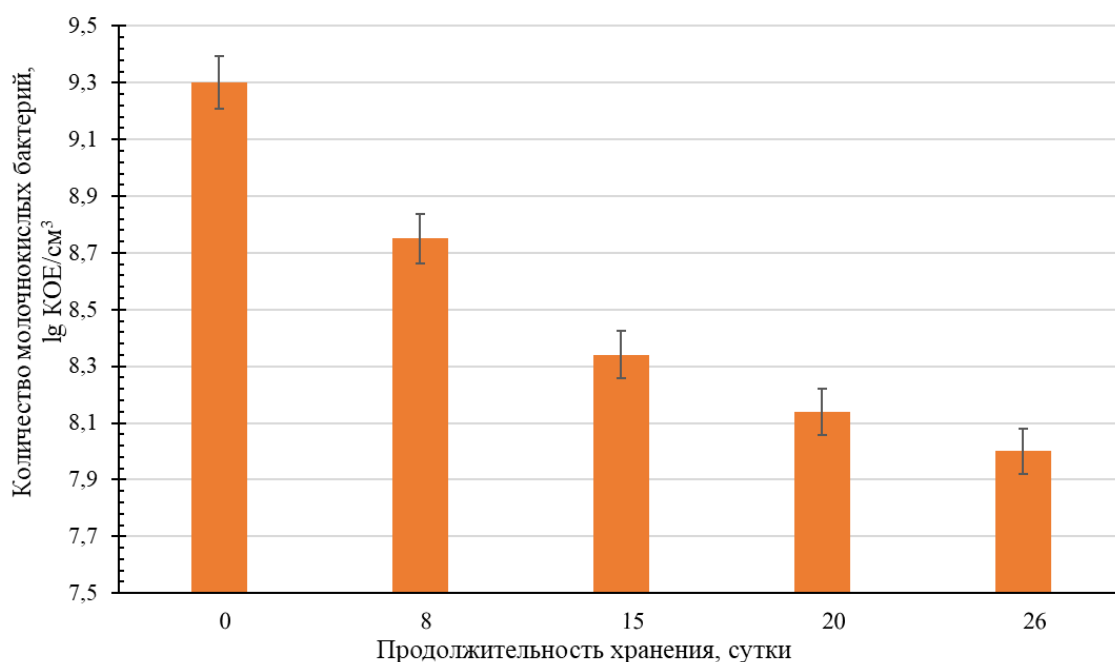


Рисунок 3.12 – Динамика изменения количества МКБ в процессе хранения кисломолочного продукта

Согласно полученным данным, количество молочнокислых на всего периода хранения соответствовало нормам, представленным в ТР ТС 033/2013. На 26 сутки количество МКБ составило  $1,0 \times 10^8$ .

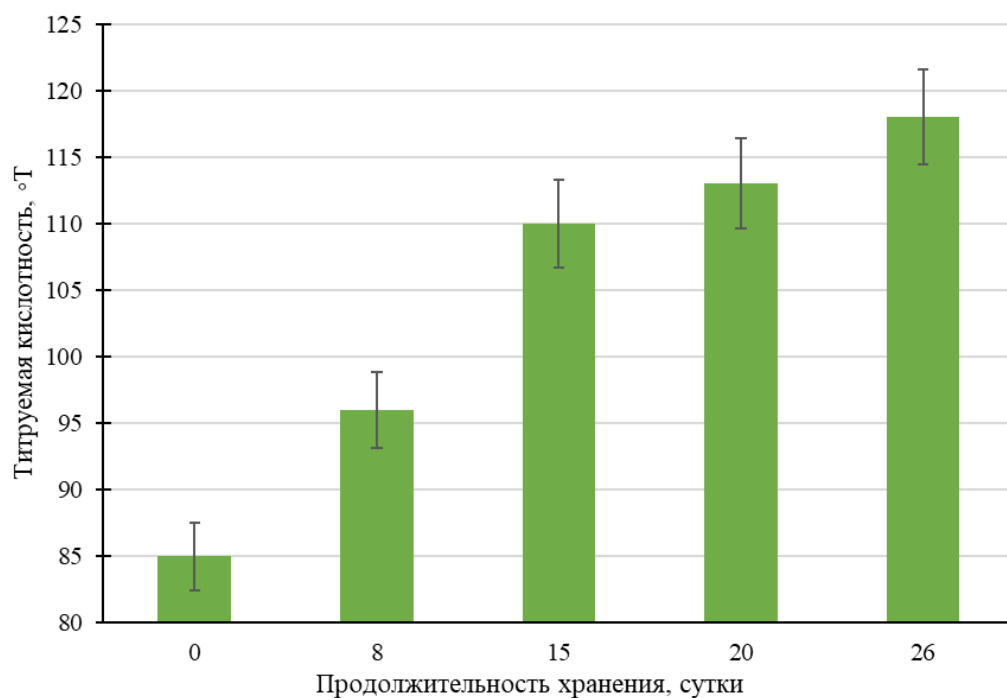


Рисунок 3.13 – Изменение титруемой кислотности в процессе хранения продукта

Согласно полученным результатам, на протяжении всего срока хранения наблюдалось возрастание титруемой кислотности. На 26 сутки хранения титруемая кислотность продукта составила 118°Т. Результаты исследования органолептических характеристик кисломолочного продукта в процессе хранения представлены в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Органолептические характеристики продукта в процессе хранения

Продолжительность хранения, сутки	Показатель		
	Вкус и запах	Цвет	Внешний вид и консистенция
0	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Молочно-белый, равномерный по всей массе	Однородная с нарушенным сгустком
8	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Молочно-белый, равномерный по всей массе	Однородная с нарушенным сгустком
15	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Молочно-белый, равномерный по всей массе	Однородная с нарушенным сгустком

Продолжение таблицы 3.18

20	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Молочно-белый, равномерный по всей массе	Однородная с нарушенным сгустком, наблюдалось незначительное отделение сыворотки
26	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Молочно-белый, равномерный по всей массе	Однородная с нарушенным сгустком, наблюдалось незначительное отделение сыворотки

Результаты исследования микробиологических показателей безопасности кисломолочного продукта на протяжении хранения представлены в таблице 3.19.

Содержание массовой доли белка, массовой доли жира, СОМО не менялись в процессе хранения продукта. Содержание витамина В<sub>6</sub> на 26 сутки хранения снизилось незначительно и составило 5,26 мкг/100г.

Таблица 3.19 – Результаты исследования микробиологических показателей безопасности кисломолочного продукта в процессе хранения

Наименование показателя					
	БГКП	<i>Staph. aureus</i>	Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы	Дрожжи и плесневые грибы	
	в 1 см <sup>3</sup> продукта	в 1 см <sup>3</sup> продукта	в 25 г продукта	КОЕ/г	
Нормируемое значение	Не допускаются	Не допускаются	Не допускаются	Не более 50	
Период хранения, сутки	0	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Менее 10
	8	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Менее 10
	15	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Менее 10
	20	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Менее 10
	26	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Менее 10

Исследования физико-химических показателей безопасности (антибиотики, микотоксины, радионуклиды, токсичные элементы)



биотехнологической системы на протяжении всего исследуемого срока хранения соответствовали требованиям ТР ТС 033/2013.

### 3.8 Разработка технической документации и опытно-промышленная апробация продукта кисломолочного с метаболитным комплексом

По результатам исследований разработана и внедрена на производство техническая документация СТО 00419785-081/1.1-2024 «Продукт кисломолочный с метаболитным комплексом». Продукт вырабатывается путем сквашивания нормализованного молока с добавлением метаболитного комплекса *L. helveticus* закваской, содержащей культуры термофильного молочнокислого стрептококка и болгарской палочки, с последующим фасованием и охлаждением полученного сгустка. Принципиальная технологическая схема представлена на рисунке 3.20.



Рисунок 3.20 – Принципиальная технологическая схема получения продукта кисломолочного с метаболитным комплексом

По физико-химическим показателям разработанный кисломолочный продукт должен соответствовать требованиям, представленным в таблице 3.20.

Таблица 3.20 – Физико-химические показатели продукта

Наименование показателя	Значение показателя	
Массовая доля жира, %, не менее	2,5	3,2
Массовая доля белка, %, не менее	2,8	
Кислотность, °Т	от 80 до 130 включительно	
Температура при выпуске с предприятия, не более, °С	4 ± 2	
Витамин В <sub>6</sub> мкг/100г не менее	3,0	

Микробиологические показатели качества и безопасности продукта не должны превышать допустимые уровни, установленные ТР ТС 033/2013 и приведены в таблице 3.21.

Таблица 3.21 – Микробиологические показатели качества и безопасности продукта

Наименование показателя		Значение показателя
Количество молочнокислых микроорганизмов на конец срока годности, КОЕ/см <sup>3</sup> не менее		1×10 <sup>7</sup>
Дрожжи, КОЕ/см <sup>3</sup> , не более		50
Плесневые грибы, КОЕ/см <sup>3</sup> , не более		50
Масса продукта (см <sup>3</sup> ), в которой не допускаются	БГКП (колиформы)	0,01
	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы	25
	<i>S. aureus</i>	1,0

Содержание потенциально опасных веществ в продукте не должно превышать допустимые уровни, приведенные в таблице 3.22.

Таблица 3.22 – Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ в продукте

Наименование показателя	Допустимые уровни, мг/кг (л), не более
<b>Антибиотики:</b>	
Левомецетин (хлорамфеникол)	не допускается (менее 0,0003)
Тетрациклиновая группа	не допускается (менее 0,01)
Стрептомицин	не допускается (менее 0,2)
Пенициллин	не допускается (менее 0,004)
<b>Микотоксин:</b> афлатоксин М <sub>1</sub>	не более 0,00002
<b>Радионуклиды:</b>	
цезий-137	40 Бк/л
стронций-90	25 Бк/л
<b>Токсичные элементы:</b>	
свинец	0,02
мышьяк	0,05
кадмий	0,02

Наименование показателя	Допустимые уровни, мг/кг (л), не более
ртуть	0,005
<b>Пестициды:</b>	
гексахлорциклогексан ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ - изомеры)	0,02
ДДТ и его метаболиты	0,01

Опытно-промышленная выработка продукта проводилась на предприятиях ООО «Итальянские традиции» и ООО «НОВАЯ ИЗИДА». Выработанные партии продукта соответствовали требованиям СТО 00419785-081/1.1-2024 «Продукт кисломолочный с метаболитным комплексом», что подтверждается актами (Приложение Б).

## 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  $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ : 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  $(175 \pm 5)^\circ\text{C}$ , на выходе –  $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$  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 В<sub>6</sub> в продукте составило 5,32 мкг/100 г. Рекомендуемый срок годности кисломолочного продукта составляет 26 суток. Содержание витамина В<sub>6</sub> 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 ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Просеков, А. Ю. Инновационный менеджмент биотехнологий заквасочных культур / А. Ю. Просеков, Л. А. Остроумов // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – № 4(43). – С. 64-69.
2. Бурков, И. А. Перспективы развития рынка молочных заквасок в России / И. А. Бурков, А. Е. Рябова // Переработка молока. – 2024. – № 1(291). – С. 36-38. – DOI 10.33465/2222-5455-2024-1-36-38.
3. Сорокина Н.П., Кураева Е.В. Закваски вчера, сегодня, завтра... // Молочная промышленность. 2023. 5. С. 50-52.
4. Ганина, В. И. Производство заквасок в России / В. И. Ганина, С. А. Фильчакова // Переработка молока. – 2018. – № 3(221). – С. 38-41.
5. Ганина, В. И. Рынок заквасок в России / В. И. Ганина // Молочная промышленность. – 2018. – № 12. – С. 29-30.
6. Danilova T. A. et al. Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2019. – Т. 167. – С. 751-754
7. Salminen S. et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics //Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2021. – Т. 18. – №. 9. – С. 649-667.radi
8. Рябцева С.А. Постбиотики: новый термин и направление в получении функциональных продуктов из молочного сырья/ С.А. Рябцева, М.А. Шпак//Актуальные направления научных исследований: технологии, качество, безопасность. – 2020. – С. 39–40.
9. Cuevas-González P. F., Liceaga A. M., Aguilar-Toalá J. E. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications //Food research international. – 2020. – Т. 136. – С. 109502.

10. Peluzio M. C. G., Martinez J. A., Milagro F. I. Postbiotics: Metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions //Trends in Food Science & Technology. – 2021. – Т. 108. – С. 11-26.
11. Полянская, И. С. Исследование антимикробной активности постбиотиков при производстве ферментированных молочных продуктов / И. С. Полянская, М. В. Корюкина, О. Б. Бадеева // Актуальная биотехнология. – 2023. – № 4. – С. 29. – DOI 10.20914/2304-4691-2023-4-29.
12. Полянская, И. С. Метабиотики в составе обогащенного йогурта / Е. С. Шигина, И. С. Полянская, В. Ф. Семенихина, Л. Г. Стоянова // Молочная промышленность. – 2022. – № 3. – С. 19-21. – DOI 10.31515/1019-8946-2022-03-19-21.
13. Шендеров Б. А. Метабиотики-новая технология профилактики заболеваний, связанных с микрoэкологическим дисбалансом человека /Б. А. Шендеров//Вестник восстановительной медицины. – 2017. – № 4(80). – С. 40–49.
14. Вахитов, Т. Я. Концепция пробиотического препарата, содержащего оригинальные микробные метаболиты / Т. Я. Вахитов, Л. Н. Петров, В. М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 5. – С. 108-114.
15. Комарова О. Н., Данилова А. И. Ферментация молочной основы с естественным образованием олигосахаридов грудного молока - новые возможности в адаптации детских смесей // Лечащий Врач. – 2023. – №. 9. – С. 50-56.
16. Сазанова, С. Н. Получение мороженого с постбиотиками / С. Н. Сазанова, С. А. Рябцева // Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство: Материалы IX Международной научно-технической конференции, Воронеж, 08 декабря 2023 года. – Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2024. – С. 136-140.

17. Сазанова, С. Н. Получение мороженого с пробиотиками и постбиотиками *Saccharomyces boulardii* / С. Н. Сазанова, С. А. Рябцева, С. С. Аванесян // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2024. – № 2-3(396). – С. 48-54. – DOI 10.26297/0579-3009.2024.2-3
18. Zeng J. et al. Heat-killed yogurt-containing lactic acid bacteria prevent cytokine-induced barrier disruption in human intestinal Caco-2 cells // *Annals of microbiology*. – 2016. – Т. 66. – С. 171-178.
19. Sawada D. et al. Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function // *Food Research International*. – 2016. – Т. 79. – С. 33-39.
20. Sadighbathi S. et al. Development and properties of functional yoghurt enriched with postbiotic produced by yoghurt cultures using cheese whey and skim milk // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Т. 14. – С. 1276268.
21. Moradi M. et al. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. – 2020. – Т. 19. – №. 6. – С. 3390-3415.
22. Sharafi H., Moradi M., Amiri S. Application of cheese whey containing postbiotics of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* BB12 as a preserving liquid in high-moisture mozzarella // *Foods*. – 2022. – Т. 11. – №. 21. – С. 3387.
23. Thorakkattu P. et al. Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry // *Foods*. – 2022. – Т. 11. – №. 19. – С. 3094.
24. Nataraj, B. H. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods / B.H. Nataraj, S. A. Ali, P. V. Behare, H. Yadav // *Microbial cell factories*. – 2020. – Т. 19. – №. 1. – С. 1-22.
25. Тихомирова, Н. А. Специализированная пищевая продукция: качество и безопасность / Н. А. Тихомирова // *Молочная промышленность*. – 2017. – № 6. – С. 38-42.
26. Granato, D. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety / D. Granato, F. J. Barba, D. Bursac Kovacevic, J. M.



- Lorenzo, A. G. Cruz, P. Putnik // *Annual review of food science and technology*. – 2020. – Т. 11. – С.93-118.
27. Юрова, Е. А. Молоко как основа для производства специализированных продуктов питания с улучшенными нутритивными свойствами / Е. А. Юрова, С. А. Фильчакова, Н. В. Ананьева // *Вестник КрасГАУ*. – 2022. – № 5(182). – С. 206-215.
28. Полянская, И. С. Классификация функциональных пищевых продуктов на молочной основе / И. С. Полянская, В. Ф. Семенихина // *Молочная промышленность*. – 2017. – № 2. – С. 56-58.
29. Донская, Г. А. Молочные продукты массового потребления с натуральными пищевыми ингредиентами профилактической направленности / Г. А. Донская // *Инновационные технологии обогащения молочной продукции (теория и практика)*. – 2016. – С. 62-87.
30. Рожкова, И. В. Разработка кисломолочных продуктов с использованием пробиотиков / И. В. Рожкова, А. В. Бегунова, Ю. И. Крысанова // *Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством*. – 2020. – Т. 1. – № 1(1). – С. 457-461.
31. Ruiz, L. Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes / L. Ruiz, A. Hevia, D. Bernardo, A. Margolles, B. Sánchez // *FEMS microbiology letters*. – 2014. – Т. 359. – №. 1. – С. 1-11.
32. Бегунова, А. В. Оценка пробиотического потенциала и функциональных свойств *Lactobacillus reuteri* LR1 in vitro / А. В. Бегунова, О. С. Савинова, И. В. Рожкова, Ю. И. Крысанова, Т. В. Федорова // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2020. – Т. 56. – № 5. – С. 472-482.
33. Kok, C. R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria / C. R. Kok, R. Hutkins R. // *Nutrition reviews*. – 2018. – Т. 76. – №. 1. – С.4-15.
34. Sharifi-Rad J. et al. Probiotics: versatile bioactive components in promoting human health // *Medicina*. – 2020. – Т. 56. – №. 9. – С. 433.

35. Popovic, N. Yogurt produced by novel natural starter cultures improves gut epithelial barrier in vitro / N. Popovic, E. Brdaric, J. Dokic, M. Dinic, K. Veljovic, N. Golic, A. Terzic-Vidojevic // *Microorganisms*. – 2020. – Т. 8. – №. 10. – С. 1586.
36. Chelladurai K. et al. *Lactobacillus helveticus*: Health effects, current applications, and future trends in dairy fermentation // *Trends in Food Science & Technology*. – 2023. – Т. 136. – С. 159–168.
37. Griffiths M. W., Tellez A. M. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – Т. 4. – С. 30.
38. Федорова, Т.В. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий *Lactobacillus* spp. В отношении клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* / Т. В. Федорова, Д. В. Васина, А. В. Бегунова [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2018. – Т. 54, № 3. – С. 264-276. – DOI 10.7868/S0555109918030054
39. Семенихина, В.Ф. Ассоциация пробиотических культур *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus helveticus* для разработки бактериального концентрата / В. Ф. Семенихина, И. В. Рожкова, А. В. Бегунова [и др.] // *Молочная промышленность*. – 2017. – № 10. – С. 60-61.
40. Бегунова, А.В. Антимикробные свойства *Lactobacillus* в кисломолочных продуктах / А. В. Бегунова, И. В. Рожкова, Т. И. Ширшова, Ю. И. Крысанова // *Молочная промышленность*. – 2020. – № 6. – С. 22-23. – DOI 10.31515/1019-8946-2020-06-22-23.
41. Глазунова, О.А. Функциональные свойства и особенности генома заквасочных пробиотических культур лактобактерий / О. А. Глазунова, К. В. Моисеенко, А. В. Бегунова [и др.] // *Актуальная биотехнология*. – 2022. – № 1. – С. 73-77. – EDN SLTOBG
42. Ji J. et al. Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease // *MedComm*. – 2023. – Т. 4. – №. 6. – С. e420.
43. Yadav M. K. et al. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2022. – Т. 106. – №. 2. – С. 505-521.

44. Liu J. et al. Screening and Evaluation of Prebiotic Exopolysaccharide of *Lactobacillus plantarum* on treating IBD in mice //Food Bioscience. – 2024. – С. 104098.
45. Tarique M. et al. Investigating the biological activities and prebiotic potential of exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactocaseibacillus rhamnosus*: Implications for gut microbiota modulation and rheological properties in fermented milk //Food Hydrocolloids for Health. – 2023. – Т. 4. – С. 100162.
46. Das D., Baruah R., Goyal A. A food additive with prebiotic properties of an  $\alpha$ -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5 //International journal of biological macromolecules. – 2014. – Т. 69. – С. 20-26.
47. Wang X. et al. Structural and prebiotic activity analysis of the polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* SNA12 //Carbohydrate Polymers. – 2022. – Т. 296. – С. 119971.
48. Mohanty D. et al. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition //Food bioscience. – 2018. – Т. 26. – С.152-160.
49. Swanson K. S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics //Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2020. – Т. 17. – №. 11. – С. 687-701.
50. Хавкин, А. И. Кисломолочные пробиотические продукты - пища или лекарство? / А. И. Хавкин, Т. А. Ковтун, Д. В. Макаркин, О. Б. Федотова // Вопросы детской диетологии. – 2021. – Т. 19, № 3. – С. 58-69.
51. Ismail S. A. et al. The production of stirred yogurt fortified with prebiotic xylooligosaccharide, probiotic and synbiotic microcapsules //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2023. – Т. 50. – С. 102729.
52. Бегунова, А. В. Биологически активные метаболиты молочнокислых бактерий / А. В. Бегунова // Пищевая промышленность. – 2022. – № 6. – С. 21-25.

53. Aggarwal, S. Postbiotics: From emerging concept to application / S. Aggarwal, V. Sabharwal, P. Kaushik, A. Joshi, A. Aayushi, M. Suri // *Front. Sustain. Food Syst.* – 2022. – Т. 6. – С. 887642.
54. Conlon, M. A. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health / M. A. Conlon, A. R. Bird // *Nutrients.* – 2014. – Т. 7. – №. 1. – С. 17-44.
55. Singh, R. P. Biotechnological applications of probiotics: a multifarious weapon to disease and metabolic abnormality / R. P. Singh, A. Shadan, Y. Ma // *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* – 2022. – Т. 14. – №. 6. – С. 1184-1210.
56. Стоянова, Л. Г. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) / Л. Г. Стоянова, Е. А. Устюгова, А. И. Нетрусов // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2012. – Т. 48. – № 3. – С. 259-274.
57. Abiola, R. R. Lactic Acid Bacteria and the Food Industry - A Comprehensive Review / R. R. Abiola, E. K. Okoro, O. Sokunbi // *International Journal of Health Sciences and Research.* – 2022. – Т. 12. – С. 129-142.
58. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics // *AIMS microbiology.* – 2018. – Т. 4. – №. 4. – С. 665.
59. Wang Y. et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry // *Frontiers in bioengineering and biotechnology.* – 2021. – Т. 9. – С. 612285.
60. Ojo A. O., de Smidt O. Lactic acid: a comprehensive review of production to purification // *Processes.* – 2023. – Т. 11. – №. 3. – С. 688.
61. Torino M. I., Taranto M. P., Font de Valdez G. Citrate catabolism and production of acetate and succinate by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2005. – Т. 69. – С. 79-85.
62. Fidan H. et al. Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps // *Food bioscience.* – 2022. – Т. 47. – С. 101741

63. Sorathiya K. B. et al. Organic acids in food preservation: exploring synergies, molecular insights, and sustainable applications // *Sustainability*. – 2025. – Т. 17. – №. 8. – С. 3434.
64. Федорова, Т. В. Технологические аспекты разработки поликомпонентного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий: дис. канд.фарм. наук: 14.04.01/ Т.В. Федорова. – Пермь., 2016. – 127 с.
65. Глушанова Н. А. Биологические свойства лактобацилл // *Бюллетень сибирской медицины*. 2003. Т. 2, № 4. С. 50–57.
66. Belenguer A. et al. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut // *Applied and environmental microbiology*. – 2006. – Т. 72. – №. 5. – С. 3593-3599.
67. Mokoena, M. P. Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens / M. P. Mokoena, C. A. Omatola, A. O. Olaniran // *Molecules*. – 2021. – Т. 26. – №. 22. – С. 7055.
68. Kumariya R. et al. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria // *Microbial pathogenesis*. – 2019. – Т. 128. – С. 171-177.
69. Daba, G. M. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects / G. M. Daba, W. A. Elkhateeb // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – Т. 28. – С. 101750.
70. Perez, R. H. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications / R. H. Perez, T. Zendo, K. Sonomoto // *Microbial cell factories*. – 2014. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-13.
71. Fernandes, J. Bacteriocins from lactic acid bacteria: a natural strategy for inhibiting unwanted bacteria / J. Fernandes R. Kumbhar, R. Kulkarni // *Resonance*. – 2021. – Т. 26. – С.387-398.
72. Levit, R. Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation / R. Levit,

- G. Savoy de Giori, A. de Moreno de LeBlanc, J.G. LeBlanc // *Journal of applied microbiology*. – 2021. – T. 130. – №. 5. – C. 1412-1424.
73. Florou-Paneri, P. Lactic acid bacteria as source of functional ingredients / P. Florou-Paneri, E. Christaki, E. Bonos // *Lactic acid bacteria-R&D for food, health and livestock purposes*. – IntechOpen, 2013.
74. Levit, R. et al. Folate-producing lactic acid bacteria reduce inflammation in mice with induced intestinal mucositis // *Journal of applied microbiology*. – 2018. – T. 125. – №. 5. – C. 1494-1501.
75. Angelin, J. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential/ J. Angelin, M. Kavitha // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – T. 162. – C. 853-865.
76. Caggianiello, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms / G. Caggianiello, M. Kleerebezem, G. Spano // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2016. – T. 100. – C. 3877-3886.
77. Chugh, B. Bioactive compounds produced by probiotics in food products / B. Chugh, A. Kamal-Eldin // *Current Opinion in Food Science*. – 2020. – T. 32. – C. 76-82.
78. Prete R. Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods / R. Prete, M. K. Alam, G. Perpetuini, C. Perla, P. Pittia, A. Corsetti // *Foods*. – 2021. – T. 10. – №. 7. – C. 1653.
79. Zolkiewicz J. Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics / J. Zolkiewicz, A. Marzec, M. Ruszczynski, W. Feleszko // *Nutrients*. – 2020. – T. 12. – №. 8. – C. 2189.
80. Pessione, E. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines / E. Pessione, S. Cirrincione // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – T. 7. – C. 876.
81. Toe, C.J. Extracellular Proteolytic Activity and Amino Acid Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Foods / C.J. Toe, H. L. Foo, T.C. Loh,

- R. Mohamad, R. Abdul Rahim, Z. Idrus // Int J Mol Sci. – 2019. – № 20(7). – C. 1777.
82. World Health Organization United Nations University. Protein and amino acid requirements in human nutrition. – World Health Organization, 2007. – T. 935.
83. Maske B. L. et al. A review on enzyme-producing lactobacilli associated with the human digestive process: From metabolism to application //Enzyme and Microbial Technology. – 2021. – T. 149. – C. 109836.
84. Broadbent J. R. et al. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains //Journal of dairy science. – 2011. – T. 94. – №. 9. – C. 4313-4328.
85. Kieliszek M. et al. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria //Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 7. – C. 1858.
86. Guo Q., Chen P., Chen X. Bioactive peptides derived from fermented foods: Preparation and biological activities //Journal of functional foods. – 2023. – T. 101. – C. 105422.
87. Moradi, M. A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria / M. Moradi, R. Molaei, J. T. Guimaraes // Enzyme and Microbial Technology. – 2021. – T. 143. – C. 109722.
88. Burns P. et al. Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli //International Journal of Dairy Technology. – 2008. – T. 61. – №. 2. – C. 156-164.
89. Бегунова, А.В. Биосинтез антимикробных бактериоциноподобных соединений штаммом *Lactobacillus reuteri* LR1: оптимизация условий культивирования / А. В. Бегунова, И. В. Рожкова, Т. И. Ширшова, О. А. Глазунова, Т. В. Федорова // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – № 5. – С. 58-69.
90. Schaefer L. et al. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups //Microbiology. – 2010. – T. 156. – №. 6. – C. 1589-1599.

91. Calvillo, A. Bioprocess Strategies for vitamin B12 production by microbial fermentation and its market applications // A. Calvillo, T. Pellicer, M. Carnicer, A. Planas // Bioengineering (Basel). – 2022. – T. 9. – №. 8. – C. 365.
92. Torres, A. C. Novel pathway for corrinoid compounds production in *Lactobacillus* / A.C. Torres, V. Vannini, G. Font, L. Saavedra, M. P. Taranto // Frontiers in Microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 2256.
93. Diez-Gutierrez, L. Characterisation of the probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* K16 and its ability to produce the postbiotic metabolite  $\gamma$ -aminobutyric acid / L. Diez-Gutierrez, L. San Vicente, J. Jessica Saenz, L. J. R. Barron, M. Chavarria // Journal of Functional Foods. – 2022. – T. 97. – C. 105230.
94. Widdel F. Theory and measurement of bacterial growth // Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie. – 2007. – T. 4. – №. 11. – C. 1-11.
95. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture // Brazilian Journal of Microbiology. – 2017. – T. 48. – №. 2. – C. 251-258.
96. Pujato S. A. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: strategies for the bioprotection of dairy foods // Frontiers in Food Science and Technology. – 2024. – T. 4. – C. 1439891.
97. Vereecken, K. M. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria / K. M. Vereecken, J. F. Van Impe // International Journal of Food Microbiology. – 2002. – T. 73. – №. 2-3. – C. 239-250.
98. Kruchinin, A. G. Baromembrane technologies as a prospective alternative to vacuum evaporation in the dry milk production / A. G. Kruchinin, E. E. Illarionova, A. V. Bigaeva, S. N. Turovskaya // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия химии и технологии. – 2021. – No. 1. – P. 133-138.



99. Castro-Munoz R. et al. Membrane technologies assisting plant-based and agro-food by-products processing: a comprehensive review //Trends in Food Science & Technology. – 2020. – T. 95. – C. 219-232.
100. Charcosset C. Classical and recent applications of membrane processes in the food industry //Food Engineering Reviews. – 2021. – T. 13. – №. 2. – C. 322-343.
101. Alfano A. et al. Lactobacillus brevis CD2: fermentation strategies and extracellular metabolites characterization //Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2020. – T. 12. – C. 1542-1554.
102. Qadi W. S. M. et al. Biological Characterization and Metabolic Variations among Cell-Free Supernatants Produced by Selected Plant-Based Lactic Acid Bacteria //Metabolites. – 2023. – T. 13. – №. 7. – C. 849.
103. Scillato M. et al. Antimicrobial properties of Lactobacillus cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens //Microbiologyopen. – 2021. – T. 10. – №. 2. – C. e1173.
104. Rad, A. H. Potential pharmaceutical and food applications of postbiotics: A review / A.H. Rad, A. Abbasi, H. S. Kafil, K. Ganbarov // Current pharmaceutical biotechnology. – 2020. – T. 21. – №. 15. – C. 1576-1587.
105. Teame, T. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic Lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: A review / T. Teame, A. Wang, M. Xie, Z. Zhang, Y. Yang, Q. Ding, Z. Zhou // Frontiers in nutrition. – 2020. – T. 7. – C. 570344.
106. Muzaffar K., Nayik G. A., Kumar P. Stickiness problem associated with spray drying of sugar and acid rich foods: a mini review //Journal of Nutrition & Food Sciences. – 2015. – №. S12. – C.1.
107. Murugesan R., Orsat V. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients—a review //Food and Bioprocess Technology. – 2012. – T. 5. – C. 3-14.
108. Coskun N. et al. The impact of freeze drying on bioactivity and physical properties of food products //Applied Sciences. – 2024. – T. 14. – №. 20. – C. 9183.

109. Oddone I., Barresi A. A., Pisano R. Influence of controlled ice nucleation on the freeze-drying of pharmaceutical products: the secondary drying step //International journal of pharmaceutics. – 2017. – T. 524. – №. 1-2. – C. 134-140
110. Nowak D., Jakubczyk E. The freeze-drying of foods—The characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials //Foods. – 2020. – T. 9. – №. 10. – C. 1488.
111. Chhabra N. et al. Spray freeze-drying-A synergistic drying technology and its applications in the food industry to preserve bioactive compounds //Food Control. – 2023. – C. 110099.
112. Samborska K. et al. Innovations in spray drying process for food and pharma industries //Journal of Food Engineering. – 2022. – T. 321. – C. 110960
113. Nik Abd Rahman N. F. N. et al. Revolutionizing Spray Drying: An In-Depth Analysis of Surface Stickiness Trends and the Role of Physicochemical Innovations in Boosting Productivity //Journal of Food Quality. – 2024. – T. 2024. – №. 1. – C. 8929464.
114. Meena K. K. et al. Application of spray-drying and freeze-drying for microencapsulation of lactic acid bacteria: A review //Annals of Phytomedicine. – 2023. – T. 12. – №. 1. – C. 706-716.
115. Burns P. et al. Suitability of buttermilk for fermentation with *Lactobacillus helveticus* and production of a functional peptide-enriched powder by spray-drying //Journal of applied microbiology. – 2010. – T. 109. – №. 4. – C. 1370-1378.
116. Goula A. M., Adamopoulos K. G. A new technique for spray drying orange juice concentrate //Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2010. – T. 11. – №. 2. – C. 342-351.
117. de la Paz N. et al. Spray drying of chitosan acid salts: Process development, scaling up and physicochemical material characterization //Marine Drugs. – 2021. – T. 19. – №. 6. – C. 329.
118. Gaspar, P. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria / P. Gaspar, A. L. Carvalho, S.

Vinga, H. Santos, A. R. Neves //Biotechnology advances. – 2013. – Т. 31. – №. 6. – С. 764-788.

119. Rodriguez-Herrera A. et al. Early-life fecal microbiome and metabolome dynamics in response to an intervention with infant formula containing specific prebiotics and postbiotics //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2022. – Т. 322. – №. 6. – С. G571-G582.

120. Mishra B. et al. Postbiotics: the new horizons of microbial functional bioactive compounds in food preservation and security //Food Production, Processing and Nutrition. – 2024. – Т. 6. – №. 1. – С. 28.

121. Волкова, Г. С. Использование комплекса метаболитов пропионовокислых и молочнокислых бактерий с высоким антимикробным действием для защиты пищевых продуктов / Г. С. Волкова, Е. В. Куксова // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. – 2013. – № 1. – С. 25-28.

122. O'Reilly, C. Impact of nisin on Clostridioides difficile and microbiota composition in a faecal fermentation model of the human colon / C. O'Reilly, P. M. O'Connor, O. O'Sullivan, M. C. Rea, C. Hill, R. P. Ross // Journal of Applied Microbiology. – 2022. – Т. 132. – №. 2. – С. 1397-1408.

123. Волкова, Г. С. Выделение и характеристика антимикробных метаболитов консорциума молочнокислых и пропионовокислых бактерий и их фунгицидная активность / Г. С. Волкова, Е. В. Дуксова // Успехи медицинской микологии. – 2021. – Т. 22. – С. 162-168.

124. Волкова, Г. С. изучение фунгицидных свойств метаболитов молочнокислых бактерий / Г. С. Волкова, Е. В. Куксова // Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т. 20. – С. 470-475.

125. Shi C., Maktabdar M. Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products—A review //Frontiers in microbiology. – 2022. – Т. 12. – С. 819684.

126. Garnier L. et al. Development of antifungal ingredients for dairy products: From in vitro screening to pilot scale application //Food microbiology. – 2019. – Т. 81. – С. 97-107.
127. Moradi M., Mardani K., Tajik H. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models //Lwt. – 2019. – Т. 111. – С. 457-464.
128. Babu A. S. et al. A Critical Analysis of Postbiotics: Exploring their Potential Impact on the Health and Food Industries //Journal of Pure and Applied Microbiology. – 2023. – Т. 17. – №. 4. – С. 2041-2060.
129. Beristain-Bauza S. C. et al. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* //Food Control. – 2016. – Т. 62. – С. 44-51.
130. Lim, Y. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements / Y. Lim, H. L. Foo, R. Mohammad, N. Abdullah // Journal of Animal Science and Biotechnology. – 2019. – Т. 10. – С. 1-13.
131. Elyass M. E. et al. Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity of Bacteriocins from *Lactobacillus curvatus* and *Pediococcus pentosaceus* //J Infect Non Infect Dis. – 2015. – Т. 1. – №. 001.
132. de Toledo Guimarães J. et al. Postbiotics preparation for use in food and beverages //Probiotic foods and beverages: Technologies and protocols. – New York, NY: Springer US, 2023. – С. 223-242.
133. Zhong Y. et al. Recent advances and potentiality of postbiotics in the food industry: Composition, inactivation methods, current applications in metabolic syndrome, and future trends //Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2022. – С. 1-25.
134. Ботина, С. Г. Технологические свойства штаммов *Streptococcus thermophilus*, выделенных из кисломолочных продуктов / С.Г. Ботина, М.А. Корниенко, Ю.Д. Цыганков, В.В. Суходолец // Биотехнология. – 2007. – №. 2. – С. 21-27.

135. Leeuwendaal N. et al. The potential of non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese to colonise the gut // *Journal of Functional Foods*. – 2021. – Т. 83. – С. 104425.
136. Amarantini C. et al. Screening of antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from traditional fish fermentation against pathogenic bacteria // *Journal of Physics: Conference Series*. – IOP Publishing, 2019. – Т. 1397. – №. 1. – С. 012045.
137. De Giani A. et al. Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells // *AMB Express*. – 2019. – Т. 9. – С. 1-11.
138. Рожкова, И. В. Бифидогенные и антиоксидантные свойства постбиотиков пробиотических культур / И. В. Рожкова, А. В. Бегунова, В. А. Леонова // *Молочная промышленность*. – 2022. – № 12. – С. 20-21. – DOI 10.31515/1019-8946-2022-12-20-21.
139. Re, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26. – P. 1231-1237.
140. Abarquero D. et al. Technological and safety assessment of selected lactic acid bacteria for cheese starter cultures design: Enzymatic and antimicrobial activity, antibiotic resistance and biogenic amine production // *LWT*. – 2023. – Т. 180. – С. 114709.
141. Georgieva R. et al. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains // *International Dairy Journal*. – 2009. – Т. 19. – №. 11. – С. 696-702.
142. Luz C. et al. Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product // *Journal of Functional Foods*. – 2021. – Т. 84. – С. 104599.
143. Ling W. H. et al. Enzyme profile of *Lactobacillus* strain GG by a rapid API ZYM system: a comparison of intestinal bacterial strains // *Microbial ecology in health and disease*. – 1994. – Т. 7. – №. 2. – С. 99-104.

144. Nunziata L. et al. Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria strains of dairy origin: An update // Food Microbiology. – 2022. – C. 103999.
145. Zarzecka U., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. Microorganisms from starter and protective cultures-Occurrence of antibiotic resistance and conjugal transfer of tet genes in vitro and during food fermentation // LWT. – 2022. – T. 153. – C. 112490.
146. Wang K. et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China // Journal of Agriculture and Food Research. – 2019. – T. 1. – C. 100006.
147. Yadav M. K. et al. Methods for Detection, Extraction, Purification, and Characterization of Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria—A Systematic Review // Foods. – 2024. – T. 13. – №. 22. – C. 3687.
148. Laws A., Gu Y., Marshall V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria // Biotechnology advances. – 2001. – T. 19. – №. 8. – C. 597-625.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

## Приложение А Титульные листы документов по стандартизации

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

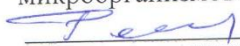
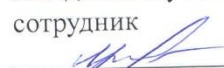
---

СТАНДАРТ	СТО
ОРГАНИЗАЦИИ	00419785-081/1.1-2024

---

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФГАНУ «ВНИМИ»  
  
Галстян А.Г.  
«25» января 2024 г.

ПРОДУКТ КИСЛОМОЛОЧНЫЙ С МЕТАБОЛИТНЫМ  
КОМПЛЕКСОМ

РАЗРАБОТАНО:  
ФГАНУ «ВНИМИ»  
Зам. зав. лаборатории прикладной  
микробиологии и геномики  
микроорганизмов  
 И.В. Рожкова  
подпись  
Младший научный  
сотрудник  
 В.А. Леонова  
подпись

Москва  
2024



---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ»  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

---

СТАНДАРТ  
ОРГАНИЗАЦИИ

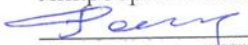
СТО  
00419785-081/1-2024

---

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФГАНУ «ВНИМИ»  
  
Галстян А.Г.  
«19» декабря 2024 г.

МЕТАБОЛИТНЫЙ КОМПЛЕКС *L. HELVETICUS*

РАЗРАБОТАНО:  
ФГАНУ «ВНИМИ»  
Зам. заведующего лаборатории прикладной  
микробиологии и геномики  
микроорганизмов

  
И.В. Рожкова  
подпись

Младший научный  
сотрудник  
  
В.А. Леонова  
подпись

Москва  
2024

## Приложение Б Акты внедрения



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)



ОГРН 1037739374672 | ОКПО 00419785 | ИНН 7705009252 | КПП 770501001  
Лясиневская ул., д. 35, к. 7, Москва, 115093, www.vnimi.org, info@vnimi.org, (499) 236-31-64

Утверждаю

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»

А.Г.Галстян

«13» января 2025 г.

### АКТ

#### Опытно-промышленной выработки метаболитного комплекса *L. helveticus*

Мы, нижеподписавшиеся: зам. зав. лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Рожкова И.В., младший научный сотрудник Леонова В.А., инженер Бавин И.В., разнорабочий Атанесян Х.А., составили настоящий акт о том, что на базе экспериментального цеха ФГАНУ «ВНИМИ» с «04» по «05» апреля 2024 г. проведена опытно-промышленная выработка сухого метаболитного комплекса *L. helveticus* (далее – добавка) в количестве 10 кг. Опытно-промышленная выработка добавки проводилась в соответствии с технической документацией СТО 00419785-081/1-2024, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ».

Для выработки добавки использовали молоко сухое обезжиренное по ГОСТ Р 52791 и штамм *L. helveticus* 20Т из коллекции молочнокислых и пробиотических микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ».

Технологический процесс производства добавки состоит из следующих операций:

- приемка и подготовка сырья, восстановление сухого обезжиренного молока;
- стерилизация обезжиренного молока и охлаждение;
- получение инокулята *L. helveticus* 20Т;
- внесение инокулята *L. helveticus* 20Т в стерильное обезжиренное молоко;
- культивирование *L. helveticus* 20Т;
- центрифугирование полученной культуральной жидкости;
- микрофилтрация супернатанта;
- распылительная сушка бесклеточного супернатанта;
- фасование и маркировка добавки.

## Продолжение приложения Б

Выработанная партия добавки резервировалась для определения рекомендуемых сроков годности. По результатам исследований, рекомендуемый срок годности добавки при хранении при температуре  $(4\pm 2)$  °С составляет 6 месяцев. По физико-химическим, органолептическим и микробиологическим показателям выработанная добавка соответствовала требованиям СТО 00419785-081/1-2024 на протяжении всего срока хранения с учетом коэффициента резерва.

 И.В. Рожкова В.А. Леонова И.В. Бавин Х.А. Атанесян



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)



ОГРН 1037739374672 | ОКПО 00419785 | ИНН 7705009252 | КПП 770501001  
Люсиновская ул., д. 35, к. 7, Москва, 115093, www.vnimi.org, info@vnimi.org, (499) 236-31-64

Утверждаю

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»

А.Г. Галстян

«15» января 2025 г.

АКТ

#### Опытно-промышленной выработки метаболитного комплекса *L. helveticus*

Мы, нижеподписавшиеся: зам. зав. лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Рожкова И.В., младший научный сотрудник Леонова В.А., инженер Бавин И.В., разнорабочий Атанесян Х.А., составили настоящий акт о том, что на базе экспериментального цеха ФГАНУ «ВНИМИ» с «14» по «15» января 2025 г. проведена опытно-промышленная выработка сухого метаболитного комплекса *L. helveticus* (далее – добавка) в количестве 20 кг. Опытно-промышленная выработка добавки проводилась в соответствии с технической документацией СТО 00419785-081/1-2024, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ».




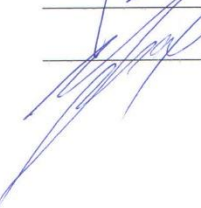
Для выработки добавки использовали молоко сухое обезжиренное по ГОСТ Р 52791 и штамм *L. helveticus* 20Т из коллекции молочнокислых и пробиотических микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ».

Технологический процесс производства добавки состоит из следующих операций:

- приемка и подготовка сырья, восстановление сухого обезжиренного молока;
- стерилизация обезжиренного молока и охлаждение;
- получение инокулята *L. helveticus* 20Т;
- внесение инокулята *L. helveticus* 20Т в стерильное обезжиренное молоко;
- культивирование *L. helveticus* 20Т;
- центрифугирование полученной культуральной жидкости;
- микрофльтрация супернатанта;
- распылительная сушка бесклеточного супернатанта;
- фасование и маркировка добавки.

## Продолжение приложения Б

По физико-химическим, органолептическим и микробиологическим показателям выработанная добавка соответствовала требованиям СТО 00419785-081/1-2024.

 И.В. Рожкова  
 В.А. Леонова  
 И.В. Бавин  
 Х.А. Атанесян





ИТАЛЬЯНСКИЕ  
ТРАДИЦИИ

**Общество с ограниченной ответственностью  
«Итальянские традиции»**

Россия, 115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7А, 2 эт., ком. 20  
ИНН 7729660696, КПП 770501001, ОГРН 1107746588113



Утверждаю  
Генеральный директор  
ООО «Итальянские традиции»

А. Демченко

3 марта 2025 г.

**Акт проведения опытной выработки**

Мы, нижеподписавшиеся: директор по производству ООО «Итальянские традиции» И. Новелли, технолог ООО «Итальянские традиции» С. Бухарова, младший научный сотрудник ФГАНУ «ВНИМИ» В. Леонова, младший научный сотрудник ФГАНУ «ВНИМИ» М. Алкадур настоящим актом подтверждаем, что ООО «Итальянские традиции» 20 января 2025 г. выработали продукт кисломолочный с метаболитным комплексом по СТО 00419785-081/1.1-2024, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ». Объем выработанной партии кисломолочного продукта составил 150 кг. В состав рецептуры входил метаболитный комплекс *L. helveticus*, выработанный ФГАНУ «ВНИМИ» 15 января 2025 г.

Образцы продукта были заложены на хранение в ФГАНУ «ВНИМИ» при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$  в течение 26 суток. В результате исследований установлено, что по физико-химическим, микробиологическим и органолептическим характеристикам выработанный продукт соответствовал требованиям СТО 00419785-081/1.1-2024 на протяжении всего срока хранения. Фактический срок годности продукта – 20 суток при температуре хранения  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ .

И. Новелли

С. Бухарова

В. Леонова

М. Алкадур

## Продолжение приложения Б

Утверждаю

Генеральный директор  
ООО «НОВАЯ ИЗИДА»

Мазуров А.В.

«21» марта 2025 г.

## АКТ

опытно-промышленной выработки

Мы, нижеподписавшиеся, И.А. Чичиров – бригадир производственного участка, М.С. Казакова – технолог производства, В.А. Леонова – младший научный сотрудник ФГАНУ «ВНИМИ», М. Алкадур – младший научный сотрудник ФГАНУ «ВНИМИ» составили настоящий акт о том, что в промышленных условиях ООО «НОВАЯ ИЗИДА» был запущен выпуск продукции: «Продукт кисломолочный с метаболитным комплексом» по СТО 00419785-081/1.1-2024.

В качестве заквасочной культуры применяли *L. Bulgaricus* и *S. Tervophilus* из коллекции ФГАНУ «ВНИМИ» с маркировкой *ProdLine St1/Lb3*.

В соответствии с технологией в состав рецептуры входил сухой метаболитный комплекс *L. helveticus*, выпущенный ФГАНУ «ВНИМИ» по СТО 00419785-081/1-2024.

Объем продукции, произведенной с «05» по «06» марта 2025 г. составил 500 кг. Срок годности 20 суток. Цвет - белый равномерный по всей массе; вкус – кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов; консистенция – сгусток плотный, без отстоя сыворотки.

Проведенные фокус-группы и опрос торговых сетей, проводивших реализацию продукции, не выявил нареканий от потребителей. Принято решение о внедрении технологии в производство. Ориентировочный объем – 1 тонна в сутки.

И.А.Чичиров

М.С.Казакова

В.А. Леонова

М. Алкадур

**ООО «ЮЖСКИЙ МОЛОЧНЫЙ ЗАВОД»**

Россия, 155630 Ивановская область, г. Южа, ул. Заводская, д. 5  
ИНН 3706020685. Р/с 40702810617000003515 в отделении №8639 ОАО «Сбербанк России» г. Иваново  
Тел./факс +7(49347) 2-22-34. E-mail: molzavodumz@mail.ru

Утверждаю:

Директор

ООО «Южский молочный завод»

С.А. Закочурин

8 апреля 2025 г.

**Акт проведения опытной выработки**

Мы, нижеподписавшиеся, настоящим актом подтверждаем, что на ООО «Южский молочный завод» 10 марта 2025 г. произведена выработка продукта кисломолочного с метаболитным комплексом в количестве 500 кг по СТО 00419785-081/1.1-2024, разработанным ФГАНУ «ВНИМИ». В состав рецептуры входил метаболитный комплекс *L. Helveticus* в количестве 1,0 %, выработанный на базе ФГАНУ «ВНИМИ» 15 января 2025 г. по СТО 00419785-081/1-2024.

Технологический процесс производства продукта состоял из следующих операций:

- приемка и подготовка сырья, нормализация и очистка нормализованной смеси;
- гомогенизация, пастеризация и охлаждение смеси;
- приготовление закваски;
- восстановление и пастеризация метаболитного комплекса;
- заквашивание, внесение метаболитного комплекса;
- сквашивание смеси;
- охлаждение, перемешивание
- розлив, упаковывание, маркирование и доохлаждение готового продукта до температуры  $(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ .

По физико-химическим, органолептическим и микробиологическим показателям выработанный кисломолочный продукт соответствовал требованиям СТО 00419785-081/1.1-2024.

Главный технолог \_\_\_\_\_ Белов Ю.А.

Технолог \_\_\_\_\_ Белова О.Ю.



## Приложение В Дипломы

**РОСБИОТЕХ**РОССИЙСКИЙ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ**СЕРТИФИКАТ**

подтверждает участие

**Леоновой  
Виктории Александровны**

в работе СЕКЦИИ «НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ И  
БИОТЕХНОЛОГИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ  
АСПИРАНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ В РЕАЛИЗАЦИИ  
НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ», прошедшей в рамках I  
I ВСЕРОССИЙСКОГО НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОГО  
КОНГРЕССА С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ  
«БИОТЕХНОЛОГИЯ И УСТОЙЧИВОЕ РАЗВИТИЕ»

**Н.В. Жукова**

И.о. ректора  
ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет  
(РОСБИОТЕХ)»  
20-21.11.2024  
г. Москва

### Список используемых сокращений

АБП – антибактериальные препараты;

АОА – антиоксидантная активность;

АТСС – американская коллекция типовых культур;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

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);

GRAS – gerenerally recognized as safe.