Бегунова Анна Васильевна

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С *LACTOBACILLUS REUTERI* LR1

05.18.04 — Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук

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

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор

Семенихина Вера Филатовна

Официальные оппоненты: Антипова Татьяна Алексеевна

доктор биологических наук,

НИИ детского питания (НИИ ДП) –филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», главный научный сотрудник отдела специализированных продуктов детского

питания

Сорокина Нинель Петровна

кандидат технических наук,

врио директора ФГБНУ «Экспериментальная

биофабрика»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный

университет»

Защита состоится «30» ноября 2021 г. в __. часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу: 109316, Москва, Талалихина, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН: www.vniimp.ru

Автореферат разослан «_»_____ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат технических наук, старший научный сотрудник

А.Н. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Разработка и производство продуктов с функциональными свойствами является одним из приоритетных направлений Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года (Распоряжение правительства РФ от 29 июня 2016 года N 1364-р). В соответствии с ним, качество продукции с функциональными свойствами является важной составляющей для укрепления здоровья, увеличения продолжительности и повышения качества жизни населения. Концепция оздоровления человека и предупреждения развития различных заболеваний желудочно-кишечного тракта заключается во введении в рацион питания кисломолочных продуктов, содержащих пробиотические, в том числе молочнокислые микроорганизмы, которые являются представителями нормальной кишечной микробиоты человека. Многочисленные исследования открыли широкие возможности для применения пробиотических микроорганизмов, а также показали их преимущества в профилактике и лечении различных заболеваний.

Производство таких продуктов невозможно без применения высокоэффективных заквасочных культур, способных обеспечить получение продукции, отвечающей требуемым показателям качества и безопасности. В технологии заквасок прямого внесения большое внимание уделяется увеличению количества жизнеспособных клеток, что возможно обеспечить разработкой новых питательных сред и оптимизацией режимов культивирования. Поэтому основные стадии производства заквасок прямого внесения (ЗПВ), связанные с накоплением бактериальной биомассы и сохранением жизнеспособных клеток, являются объектами интенсивных исследований.

Среди пробиотических бактерий большое внимание исследователей уделяется Lactobacillus reuteri (Limosilactobacillus reuteri). Поэтому работа, направленная на разработку технологии пробиотического кисломолочного продукта с использованием закваски прямого внесения Lactobacillus reuteri LR1, является актуальной и перспективной, т.к. позволит увеличить ассортимент кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами.

Разработке кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами и исследованию молочнокислых и пробиотических микроорганизмов, содержащихся в их составе посвящены работы Королевой Н.С., Банниковой Л.А., Семенихиной В.Ф., Свириденко Г.М., Ганиной В.И., Сорокиной Н.П., Поспеловой В.В., Хамагаевой И.С. и др.

Цели и задачи исследования

Целью работы является создание закваски прямого внесения *Lactobacillus reuteri* LR1 (GenBank MN994628) и технологии пробиотического кисломолочного продукта с её использованием.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

- исследовать пробиотические свойства *L.reuteri* LR1 *in vitro*;
- разработать состав питательной среды и исследовать влияние технологических параметров культивирования на накопление клеток L.reuteri LR1, определить состав защитной среды для сохранения L.reuteri LR1 в процессе сушки и хранения закваски прямого внесения;
- разработать технологию закваски прямого внесения пробиотической культуры L.reuteri LR1 и провести опытно-промышленную выработку;
- разработать технологию кисломолочного продукта с использованием закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1;
- исследовать *in vitro* и *in vivo* функциональные свойства разработанного кисломолочного продукта;
- определить рекомендуемые сроки годности, разработать комплект технической документации и провести опытно-промышленную выработку кисломолочного продукта «Релакт» в производственных условиях.

Научная новизна

- Теоретически обоснованы и подтверждены *in vitro* пробиотические свойства штамма *L. reuteri* LR1;
- Выявлены закономерности накопления клеток L. reuteri LR1 на различных питательных средах и зависимость выживаемости этого штамма от состава защитной среды;
- Доказаны *in vitro* и *in vivo* функциональные свойства разработанного кисломолочного продукта

Теоретическая и практическая значимость

Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены пробиотические свойства штамма *L. reuteri* LR1, что явилось предпосылкой к разработке технологии кисломолочного продукта.

Научно обоснованы и практически установлены параметры технологического процесса создания закваски прямого внесения L. reuteri LR1 для кисломолочного продукта с её использованием.

Разработана программа для моделирования и расчета питательной среды для культивирования пробиотического микроорганизма *Lactobacillus reuteri* (Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2015617178, 02.07.2015)

Разработан СТО 00419785-045-2019 «Закваска прямого внесения *Lactobacillus reuteri* LR1». По данной технологии в ООО «Лактосинтез» освоено производство закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1.

Разработана технология кисломолочного продукта «Релакт» СТО 00419785-047-2020 «Продукты кисломолочные «Релакт» и на ООО «МОЛОДЕЛ» осуществлена опытнопромышленная выработка кисломолочного продукта «Релакт».

Методология и методы исследования. При проведении исследований использовали общепринятые физико-химические, микробиологические, математические и др. методы.

Положения, выносимые на защиту.

Наукоёмкая технология закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1.

Научно обоснованная технология кисломолочного продукта с пробиотическими свойствами.

Теоретическое и экспериментальное обоснование *in vitro* и *in vivo* функциональных свойств разработанного кисломолочного продукта.

Степень достоверности и апробация результатов

Обработка полученных экспериментальных данных и достоверность исследований подтверждена с применением регрессионного и дисперсионного анализа с использованием компьютерного пакета «Statistica 10.0».

Исследования проводились на базе Центральной лаборатории микробиологии Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»), часть исследований проводили на базе ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН». Медико-биологическая оценка кисломолочного продукта «Релакт» проводились *in vivo* на крысах линии Wistar в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Апробация работы Основные результаты диссертационной работы были предметом докладов на научных конференциях, форумах, конгрессах: VII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2015), Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова (Москва, 2016), Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова (Москва, 2017), XII Международная научно-практическая конференция под ред. С.А. Богатырева «Безопасность и качество товаров» (Москва, 2018), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018).

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 статья, из них 1 статья в журнале, индексируемом в Web of Science, 2 статьи в журналах, индексируемых в Scopus, 5 статей – в журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ.

Структура и объем работы Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и перечня использованных литературных источников. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 32 рисунка. Список литературы включает 204 источника, из них 51 отечественных и 153 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

<u>Во введении</u> обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи диссертации, изложены научная новизна, практическая значимость, положения, выносимые на защиту.

<u>В первой главе</u> представлен анализ научно-технической литературы. Описано влияние пробиотических микроорганизмов и кисломолочных продуктов с их использованием на организм человека. Представлена характеристика рода *Lactobacillus* и спектр основных пробиотических свойств лактобацилл. Проанализированы аспекты повышения качества заквасок прямого внесения (ЗПВ) в процессе их производства.

На основании литературных данных подтверждена актуальность выбранной темы диссертационной работы и необходимость разработки технологии кисломолочного продукта с пробиотическими свойствами с использованием ЗПВ *L.reuteri* LR1

<u>Во второй главе «Организация работы, объекты и методы исследований»</u> приведена организация работы, описаны объекты и методы исследований, представлена схема проведения исследований (рис. 1).

Объектами исследований служили:

- штамм *L. reuteri* LR1 (GenBank MN994628) из коллекции культур молочнокислых бактерий, пробиотических бактерий и дрожжей Центральной лаборатории микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ»;
 - закваска прямого внесения *L. reuteri* LR1;
 - кисломолочный продукт «Релакт».

При проведении экспериментальной части исследований были использованы общепринятые микробиологические, физико-химические, математические и др. методы. Для определения кислотообразующей активности штамма L.reuteri LR1, а также для периодического культивирования в условиях регулируемых параметров процесса был использован прибор параллельных биореакторов фирмы DASGIP (Германия). Для сублимационного высушивания клеток использовали сушилку FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry Systems (Labconco, США). Антагонистическую активность штамма L.reuteri LR1 определяли in vitro по МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарноэпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов», определение устойчивости штамма L. reuteri LR1 к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом с использованием индикаторных дисков с противомикробными лекарственными средствами по МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным Протеолитическую, препаратам». антиоксидантную ингибирующую активности in vitro в образцах ферментированного L. reuteri LR1 молока определяли спектрофотометрически с использованием микропланшетного фотометрафлуориметра Synergy 2 (BioTek, США).

Протеолитическую активность измеряли при длине волны 340 нм и выражали в L-лейциновых эквивалентах. Антиоксидантную активность (AOA) определяли по отношению к пероксильному радикалу методом ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity – поглощающая способность кислородных радикалов). Для чего регистрировали кинетику убыли интенсивности флуоресценции флуоресценна при температуре $(37\pm1)^{\circ}$ C в течение 50 мин

(длины волн возбуждения и эмиссии 485 и 528 нм соответственно). АОА выражали в мкмоль эквивалентов тролокса на мг белка (мкмоль ТЭ/мг).

При определении АПФ—ингибирующей активности регистрировали кинетику возрастания интенсивности флуоресценции при температуре $(37\pm1)^{\circ}$ С в течение 15 мин (длина волны возбуждения и эмиссии флуоресценции — 320 и 420 нм соответственно). В качестве субстрата с внутренним тушением флуоресценции использовали о-аминобензоилфенилаланил-аргинил-лизил(динитрофенил)-пролин. АПФ-ингибирующую активность определяли, как концентрацию белка способную ингибировать АПФ на 50% (IC50) и выражали в мг белка на мл.

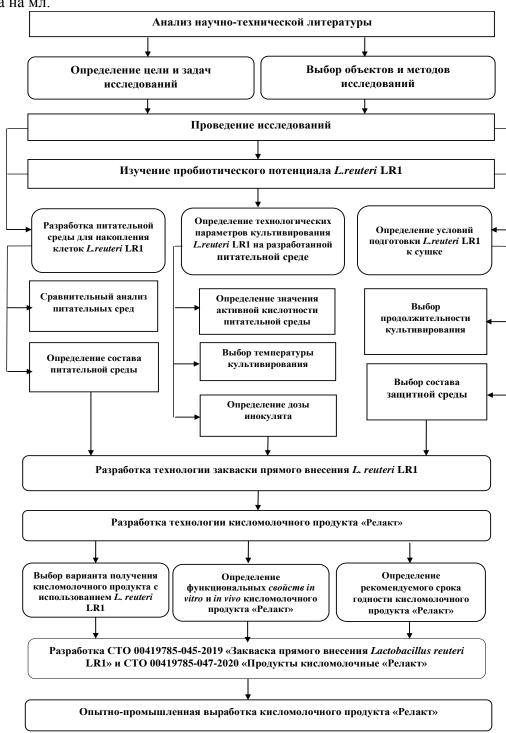


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Пептидный профиль анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией ионно-циклотронного резонанса с использованием

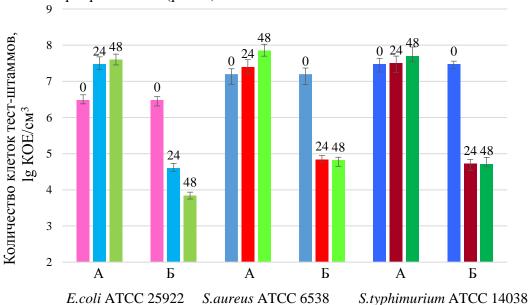
системы, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), колонки Reprosil-Pur Basic C18 и ультра-масс-спектрометра LTQ-FT (Thermo Scientific, Waltham, MA, США). Масс-спектрометрический анализ проводили в диапазоне m/z 300-1600 и разрешением R=50000 для m/z 400. Для автоматического поиска по базам данных пептидов использовали программное обеспечение Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., США, version 8.5). Для графического представления в цветовой гамме полученных данных пептидного профиля были построены тепловые карты (англ. heatmap) для пептидов β -, α s1-, α s2- и к- казеинов коровьего молока с использованием веб-приложения для визуализации пептидомных данных Peptigram.

Рекомендуемые сроки годности определяли по МУК 4.2.1847-04 «Санитарноэпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов».

Обработку результатов, полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью пакета программ «Microsoft Office», «Statistica 10.0», OriginPro 8.0 по результатам 3-5 повторностей.

<u>В третьей главе «Изучение пробиотических свойств штамма Lactobacillus reuteri LR1»</u> приведены результаты исследований пробиотических свойств штамма *L. reuteri* LR1.

Определена *in vitro* антагонистическая активность штамма *L. reuteri* LR1 к условнопатогенным микроорганизмам (рис. 2).



А – монокультура, Б – сокультивирование с *L. reuteri* LR1

Рисунок 2 – Антагонистическая активность L. reuteri LR1

Установлено, что при сокультивировании с *L. reuteri* LR1, содержание тест-штаммов достоверно снижается, и через 24 ч составляет для *E. coli* ATCC 25922 - 4×10^4 KOE/cm³, для *S. aureus* ATCC 6538 - 6.9×10^4 KOE/cm³, а для *S. typhimurium* ATCC 14028 - 5.25×10^4 KOE/cm³. Через 48 ч сокультивирования количество *E. coli* ATCC 25922 снизилось еще на порядок и составило 7×10^3 KOE/cm³, количество клеток *S. aureus* ATCC 6538 и *S. typhimurium* ATCC 14028 практически не изменилось и составило 6.6×10^4 KOE/cm³ и 5.2×10^4 KOE/cm³. Из представленных данных видно, штамм *L. reuteri* LR1 обладает выраженной антагонистической активностью, которая варьируется в зависимости от используемой тест-культуры и продолжительности сокультивирования штаммов. Наибольшую антагонистическую активность штамм *L. reuteri* LR1 проявлял по отношению к *E. coli* ATCC 25922.

Определена чувствительность штамма *L. reuteri* LR1 к антимикробным препаратам (табл. 1).

Таблица 1 –	- Vстойнивость	I routeri	IR1 ĸ	антимикробным препаратам
таолица т –	- У СТОИЧИВОСТЬ	L. remen		антимикрооным препаратам

Антибактериальный препарат	Доза вещества на диске, мкг	Категория чувстви- тельности	Антибактериальный препарат	Доза вещества на диске, мкг	Категория чувстви- тельности
Гентамицин	120	R	Левофлоксацин	5	R
Канамицин	30	R	Пефлоксацин	5	R
Неомицин	30	I	Доксициклин	30	R
Амоксициллин	20	S	Тетрациклин	30	R
Ампициллин	10	I	Азитромицин	15	R
Бензилпенициллин	10	R	Линкомицин	15	S
Оксациллин	1	R	Левомицетин	30	S
Фосфомицин	200	R			

Выявлено, что штамм L. reuteri LR1 чувствителен к линкомицину, амоксициллину и левомицетину, проявляет промежуточную устойчивость к ампициллину и неомицину, и обладает устойчивостью к остальным изучаемым антимикробным препаратам. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм L. reuteri LR1 является антибиотикоустойчивым.

Исследована *in vitro* динамика изменения антиоксидантной, протеолитической, и АПФ - ингибирующей активностей в процессе культивирования *L.reuteri* LR1 на обезжиренном молоке (табл. 2).

Таблица 2 — Динамика изменения протеолитической, антиоксидантной и $A\Pi\Phi$ - ингибирующей активностей в процессе культивирования штамма *L. reuteri* LR1 на обезжиренном молоке

Продолжительность культивирования, ч	Количество клеток <i>L.reuteri</i> LR1, KOE/cм ³	Антиоксидантная активность (ORAC), мкмоль ТЭ/мг	АПФ ингибирующая активность, (IC ₅₀) мг /см ³	Протеолитическая активность, (Эквиваленты L-лейцина), ммоль/дм ³
0	$1,2\times10^7$	216,55±16	$12,68\pm0,39$	3,08±0,37
24	$1,9 \times 10^7$	414,61±26	2,63±0,29	2,86±0,34
48	$4,5 \times 10^8$	420,88±28	$1,45\pm0,18$	5,48±0,46
72	4×10 ⁸	422,72±31	$1,07\pm0,13$	6,35±0,76

Установлено, что в первые 24 часа сквашивания молока штаммом L. reuteri LR1 происходит достоверное повышение антиоксидантной (414,61 \pm 26 мкмоль TЭ) и АПФ-ингибирующей активности (IC_{50} 2,63 \pm 0,29 мг/см³ на фоне снижения количества эквивалентов L-лейцина (2,86 \pm 0,34 ммоль/дм³) по сравнению с исходным молоком. Это обусловлено достаточно низкой протеолитической активностью штамма L. reuteri LR1 в отношении казеиновых белков молока в связи с чем, наблюдается медленный рост клеток L. reuteri LR1. В первые 24 часа культивирования количество клеток L. reuteri LR1 увеличивается с $1,2\times10^7$ КОЕ/см³до $1,9\times10^7$ КОЕ/см³. В последующие 24 часа культивирования рост клеток L. reuteri LR1 достигает наибольшего значения $4,5\times10^8$ КОЕ/см³. При этом через 72 ч наблюдается увеличение АПФ-ингибирующей активности (IC_{50} 1,07 \pm 0,13 мг/см³) на фоне повышения количества эквивалентов L-лейцина ($6,35\pm0,76$ ммоль/дм³), а антиоксидантная активность остается практически неизменной до конца ферментации и через 72 ч составляет 422,72 \pm 31 мкмоль TЭ.

Чтобы получить более глубокое представление о процессе развития антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей был определен профиль пептидов. Для иллюстрации закономерностей протеолиза казеиновых фракций все выделенные пептиды были нанесены на карту аминокислотных последовательностей β -, aS1-, aS2 - и к- казеиновых белков (рис. 3).

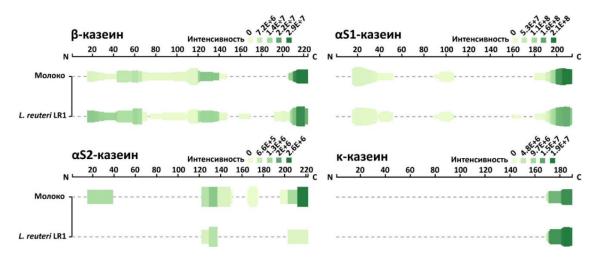


Рисунок 3 — Тепловая карта пептидного профиля молока, сквашенного *L. reuteri* LR1 Интенсивность цвета пропорциональна нормализованной интенсивности ионов белка пептидов, причем темно-зеленый цвет указывает на высокую интенсивность пептидов, а светло-зеленый-на низкую интенсивность пептидов

По сравнению с контрольным образцом исходного молока в сквашенном молоке на фоне увеличения числа пептидов из β-казеина, снижается количество пептидов из αs1-казеина и αs2-казеина. Что обусловлено достаточно низкой протеолитической активностью штамма L. $reuteri\ LR1$ в отношении казеиновых белков молока и, как хорошо видно на тепловой диаграмме, для своего роста и развития клетки L. $reuteri\ LR1$ используют пептиды, исходно присутствующие в молоке.

При сравнении пептидов, идентифицированных только в образцах ферментированного *L. reuteri* LR1 молока, с базой данных Milk Bioactive Peptide Database были обнаружены полные совпадения с биопептидами, функциональные свойства которых ранее были описаны в научной литературе (табл. 3).

Таблица 3 — Некоторые пептиды, обнаруженные в составе белково-пептидной фракции молока, сквашенного L. reuteri LR1, с ранее описанными в литературе биологическими активностями

Пептид	Белок предшественник	Функция пептидов
YQEPVLGPVRGPFPIIV	β-казеин	АПФ-ингибирующая Антимикробная Иммуномодуляторная
VKEAMAPK	β-казеин	Антиоксидантная
KVLPVPQK	β-казеин	Антиоксидантная
VQVTSTAV	к-казеин	Антимикробная
YPFPGPIPN	β-казеин	АПФ-ингибирующая

Таким образом, в результате проведенной детальной характеристики пептидного профиля молока, сквашенного *L. reuteri* LR1, в его составе идентифицированы биопептиды, отвечающие за антиоксидантные, гипотензивные и антимикробные свойства, что подтверждается наличием соответствующих активностей ферментированного молока в тестах *in vitro*. Полученные данные доказывают, что штамм *L. reuteri* LR1 обладает выраженным пробиотическим потенциалом.

<u>В 4 главе «Разработка технологии закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1» приведены результаты исследований по разработке технологии ЗПВ *L. reuteri* LR1.</u>

При определении оптимального количества компонентов питательной среды для накопления клеток L. reuteri LR1 был разработан предварительный 5-факторный малый центральный композиционный план со следующим диапазоном варьирования ингредиентов: гидролизованное молоко (30-100) %, дрожжевой экстракт (0-5) %, сахароза (0-5) %,

инулин (0-1) %, цистеин (0-0.5) % (табл. 4). Температура культивирования $(37\pm1)^{\circ}$ С, доза инокулята 1%, отбор проб проводили через 16-17 часов культивирования.

Таблица 4 – Уровни варьирования независимых факторов

Фактор	Переменная	Уровни варьирования				
		- 1	0	+ 1		
Гидролизованное молоко, %	X_1	30	75	100		
Дрожжевой экстракт, %	X_2	0	2,5	5,0		
Сахароза, %	X ₃	0	2,5	5		
Цистеин, %	X_4	0	0,25	0,5		
Инулин, %	X_5	0	0,5	1,0		

На основании разработанного композиционного плана были проведены исследования по влиянию компонентов питательной среды на накопление L. reuteri LR1. В результате регрессионного анализа получено уравнение регрессии, описывающее зависимость накопления клеток L. reuteri LR1 от исследуемых компонентов, входящих в состав питательной среды:

 $y = 9,002 + 0,87308 \times X_2 - 0,69872 \times X_3 - 3,70255 \times X_4 + 9,95274 \times X_5 + 0,07586 \times X_{1} \times X_4 - 0,08051 \times X_{1} \times X_5 - 1,98279 \times X_{2} \times X_5$

Влияние фактора «Сахароза» (X_3) , на накопление клеток L. $reuteri\ LR1$ в питательной среде в виде поверхностей отклика представлены на рис. 5.

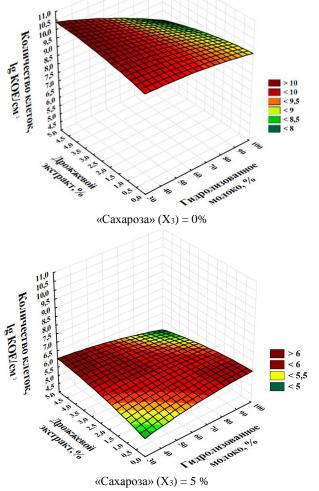
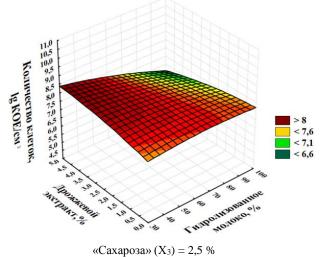


Рисунок 5 — Количество L. reuteri LR1 в зависимости от концентрации компонентов X_1 и X_2 в питательной среде при различном количестве сахарозы



Факторы «Инулин» (X_5) и «Цистеин» (X_4) были установлены на центральных значениях.

Приведенные поверхности отклика зависимости количества клеток концентрации компонентов в питательной среде при содержании сахарозы от 0 до 5% показывают, что наибольшее накопление L. reuteri LR1 было получено на питательной среде без добавления сахарозы. Также, исходя ИЗ обработанных данных, накопление клеток В процессе культивирования влияет взаимодействие факторов «Гидролизованное молоко-Цистеин» «Дрожжевой экстракт-Цистеин».

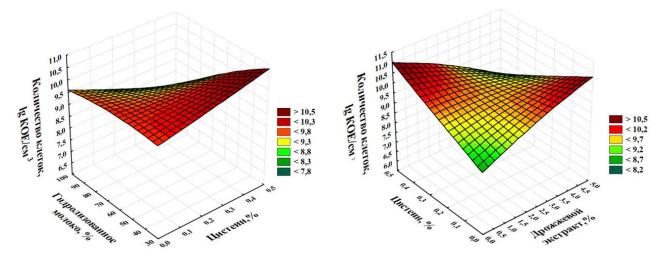


Рисунок 6 — Зависимость количества клеток $L.\ reuteri\ LR1$ от концентрации компонентов «Гидролизованное молоко» (X_1) и «Цистеин» (X_4)

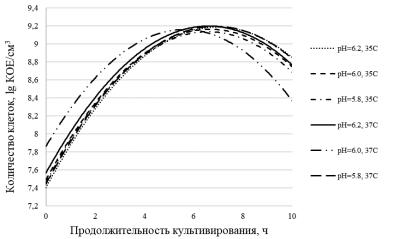
Рисунок 7 — Зависимость количества клеток $L.\ reuteri\ LR1$ от концентрации компонентов «Дрожжевой экстракт» (X_2) и «Цистеин» (X_4)

Определено, что с увеличением содержания цистеина в составе питательной среды, количество клеток *L. reuteri* LR1 повышается (рис. 6). Компоненты дрожжевой экстракт и цистеин могут быть взаимозаменяемы (рис. 7). Таким образом, было установлено, что добавление цистеина и дрожжевого экстракта в гидролизованное молоко стимулирует развитие *L. reuteri* LR1, тогда как сахароза подавляет.

В ходе дальнейших исследований была разработана программа для моделирования и расчета состава питательной среды для культивирования пробиотического микроорганизма L. $reuteri\ LR1$ и с её использованием усовершенствована питательная среда: гидролизованное молоко $-500\ \text{cm}^3/\text{дm}^3$, дрожжевой экстракт $-15\ \text{г/дm}^3$, $CH_3COONa-5\ \text{г/дm}^3$, цистеин $-0.25\ \text{г/дm}^3$, $KH_2PO_4-2\ \text{г/дm}^3$, $MgSO_4-0.2\ \text{г/дm}^3$, $MnSO_4-0.05\ \text{г/дm}^3$, дистиллированная вода до $1000\ \text{cm}^3$, позволяющая получить высокое количество клеток L. $reuteri\ LR1$ в $3\Pi B$.

При проведении исследований по влиянию технологических параметров культивирования на накопление L. reuteri LR1 определили зависимость динамики развития L. reuteri LR1 от активной кислотности питательной среды, температуры культивирования, дозы инокулята и продолжительности культивирования.

Сводные данные по изменению количества клеток *L. reuteri* LR1 в процессе культивирования при температурах 35°C, 37°C и поддержании активной кислотности на уровне 5,8 ед. рH, 6,0 ед. рH, 6,2 ед. рH представлены на рис. 8.



Уравнение регрессии: y=a+bx+cx² Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции:

рH=6.2, 35°C a=7,39; b=0.53; c= -0.04; r=0.984;

pH=6.0, 35°C a=7,49; b=0.50; c= - 0.04; r=0.98;

pH=5.8, 35°C a=7,45; b=0.52; c= - 0.04; r=0.969;

pH=6.2, 37°C a=7,57; b=0.49; c= - 0.04; r=0.955;

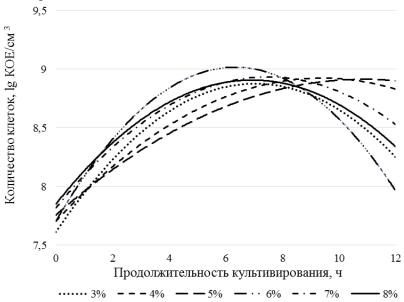
pH=6.0, 37°Ca=7,86; b=0.46; c= - 0.04; r=0.99;

pH=5.8, 37°Ca=7,44; b=0.51; c= -0.04; r=0.996

Рисунок 8 – Динамика изменения содержания клеток *L. reuteri* LR1 при различных температурах и значениях активной кислотности

Установлено, что количество L. reuteri LR1 при культивировании при вышеуказанных режимах отличалось незначительно. Однако, наибольшее содержание клеток L. reuteri LR1 было достигнуто при температуре культивирования $(37\pm1)^{\circ}$ С, активной кислотности питательной среды 6,2 ед. pH и составило $1,75\times10^{9}$ KOE/cm³. Также следует отметить, что наибольшее накопление жизнеспособных клеток L. reuteri LR1 было получено через 8-9 часов культивирования.

Влияние дозы инокулята на накопление *L. reuteri* LR1 при температуре $(37\pm1)^{\circ}$ С и рН = 6.2 представлены на рис. 9.



Уравнение регрессии: $y=a+bx+cx^2$. Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции: 3% a=7.61; b=0.36; c=-0.03; r=0.933; 4% a=7.71; b=0.26; c=-0.01; r=0.995; 5% a=7.76; b=0.21; c=-0.01; r=0.963; 6% a=7.71; b=0.41; c=-0.02; r=0.975; 7% a=7.82; b=0.3; c=-0.02; r=0.968; 8% a=7.85; b=0.31; c=-0.02; r=0.959

Рисунок 9 – Влияние дозы инокулята на накопление клеток *L. reuteri* LR1

При исследовании динамики развития L. reuteri LR1 в зависимости от дозы инокулята выявлено, что наибольшее количество клеток L. reuteri LR1 было получено через 6 - 8 часов культивирования при внесении 6-7% инокулята и составило 2×10^9 KOE/cm³.

Предварительно проведенные исследования различных защитных сред показали, что наибольшая выживаемость L. reuteri LR1 отмечена при использовании защитных сред, содержащих в своем составе обезжиренное молоко, сахарозу и уксуснокислый натрий. Для уточнения количества компонентов в составе защитной среды был составлен 3-факторный план эксперимента для смеси с ограничениями, со следующим диапазоном варьирования компонентов: молоко коровье обезжиренное -0%-90%, 10%-й раствор сахарозы -0%-90%, 35%-й раствор уксуснокислого натрия -0%-20% (табл. 5).

Ta	олица :	5 — У	ровни	варьи	рования	компонентов	защитной	среды
----	---------	-------	-------	-------	---------	-------------	----------	-------

№	Варьируемые компоненты							
защитной	Обезжиренное коровье	Сахароза, %	Уксуснокислый натрий, %					
среды	молоко, %	0	20					
1	80	U	20					
2	100	0	0					
3	0	90	10					
4	38	52	10					
5	10	90	0					
6	0	80	20					

Биомассу L. reuteri LR1 смешивали с в соотношении 1:1 с защитными средами, полученную суспензию разливали в стерильные флаконы по 2 см³ и замораживали, высушивали и закладывали на хранение в морозильную камеру при температуре минус $(18\pm2)^{\circ}$ C.

Математически обработанные результаты исследований по определению влияния концентрации компонентов защитной среды на выживаемость L. reuteri LR1 представлены на рис. 10.



K=9,34X+10,64Y+10,24Z; r=0.918 Рисунок 10- Карта линий уровня влияния компонентов защитной среды на выживаемость L. reuteri LR1

На основании проведенных исследований определен состав защитной среды, обеспечивающий наибольшую выживаемость клеток L.reuteri LR1 в процессе сублимационного высушивания: обезжиренное молоко – 17,7%, сахароза – 72,8%, уксуснокислый натрий – 9,5%.

В результате дальнейших исследований были получены данные по выживаемости клеток L. reuteri LR1 в процессе хранения 3ПВ L. reuteri LR1 при температуре минус (18 \pm 2)°C (рис. 11).

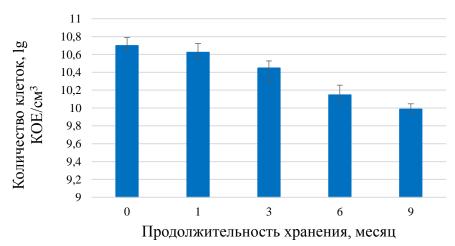


Рисунок 11 – Выживаемость L. reuteri LR1 в процессе хранения ЗПВ

Установлено, что количество *L. reuteri* LR1 в процессе хранения снижается и через 6 месяцев, составляет $1,4\times10^{10}$ KOE/cm³, а через 9 месяцев хранения количество *L. reuteri* LR1 составило $9,7\times10^9$ KOE/cm³. Таким образом, проведенные исследования позволили определить состав защитной среды и установить рекомендуемый срок годности 3ПВ *L. reuteri* LR1.

Согласно нормативной документации количество клеток в 3ПВ молочнокислых бактерий должно быть не менее 1×10^{10} КОЕ/г. Таким образом, проведенные исследования показали, что рекомендуемый срок годности закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1 при температуре минус $(18\pm2)^{\circ}$ С составляет 6 месяцев.

На основании проведенных исследований разработан СТО 00419785-045-2019 «Закваска прямого внесения *L. reuteri* LR1».

В главе 5 «Разработка кисломолочного продукта с использованием закваски прямого внесения L. reuteri LR1» приведены результаты исследований по разработке кисломолочного продукта с использованием закваски прямого внесения L. reuteri LR1. Полученная $3\Pi B$ L. reuteri LR1 была использована при разработке кисломолочного продукта «Релакт». Исследовано влияние факторов роста на развитие клеток L. reuteri LR1 в пастеризованном молоке. В качестве факторов роста были выбраны: дрожжевой экстракт -2 $r/дм^3$ и сухая питательная среда $\Gamma MK-3-2$ $r/дм^3$ (рис. 12).

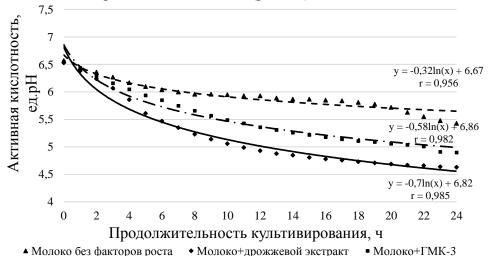


Рисунок 12 — Влияние различных факторов роста на изменение активной кислотности при сквашивании молока *L. reuteri* LR1

Отмечено, что использование дрожжевого экстракта и ГМК -3 положительно влияет на развитие клеток L. reuteri LR1 в молоке. Так, при его культивировании на пастеризованном молоке без факторов роста в течение 24 ч снижение значения активной кислотности составляет 1,14 ед. pH, тогда как при добавлении к молоку ГМК-3-1,65 ед. pH, а при добавлении дрожжевого экстракта -1,9 ед. pH. Характер кривой указывает на стимулирующее воздействие ингредиентов на рост L. reuteri LR1.

Полученные результаты показали, что для стимулирования роста *L. reuteri* LR1 в молоке могут использоваться исследуемые факторы роста, но наибольшая активность кислотообразования, наилучшее развитие клеток и сокращение лаг-фазы было отмечено при использовании дрожжевого экстракта. Представленные результаты показывают целесообразность использования дрожжевого экстракта, в качестве добавки в молоко, для приготовления КП с использованием чистой культуры *L. reuteri* LR1.

При разработке технологии вариантов пробиотического КП, обеспечивающей высокое содержание клеток L. reuteri LR1, были выбраны два варианта заквасок: монокультура L. reuteri LR1, и закваска, состоящая из консорциума молочнокислых бактерий XTC (L. helveticus NK1 и S. thermophilus 159) и L. reuteri LR1. Выбранные культуры не обладают антагонизмом при совместном культивировании. $3\Pi B$ L. reuteri LR1 может вноситься в молоко, подготовленное для заквашивания одновременно с закваской XTC, или заквашивание осуществляют с использованием закваски XTC и добавляют $3\Pi B$ L. reuteri LR1 в сгусток после сквашивания. При использовании монокультуры L. reuteri LR1 $3\Pi B$ добавляется в подготовленное для сквашивания молоко с дрожжевым экстрактом (табл. 6). В молоко, подготовленное для сквашивания вносили $3\Pi B$ L. reuteri LR1 в количестве 5×10^6 KOE/cм 3 .

Таблица 6 – Варианты кисломолочного продукта

II	0-5							
Номер образца	Особенности технологии							
1	ЗПВ L. reuteri LR1 вносится в нормализованное молоко с							
	дрожжевым экстрактом, подготовленное для сквашивания							
2	ЗПВ L. reuteri LR1 вносится в нормализованное молоко,							
	подготовленное для сквашивания, одновременно с							
	производственной закваской XTC							
3	Сквашивание проводят с использованием производственной							
	закваски ХТС, а ЗПВ L. reuteri LR1 вносят в полученный сгусток							

Сквашивание проводили при температуре $(37\pm2)^{\circ}$ С. Продолжительность сквашивания для образца № 1 составила 10 ч, для образца № 2 – 6 ч, для образца № 3 – 6,5 ч.

Для каждого образца КП проводили исследование физико-химических, органолептических и микробиологических характеристик. Результаты исследований содержания клеток молочнокислых и пробиотических культур в образцах КП представлены на рис. 13.

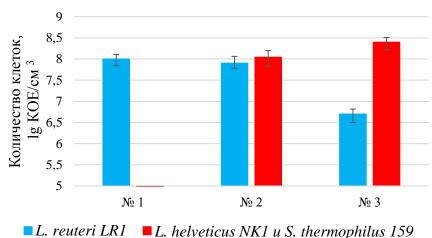


Рисунок 13 — Содержание *L. reuteri* LR1 и *L. helveticus* NK1 + *S. thermophilus* 159 в образцах КП

Установлено, что после сквашивания в образцах КП количество клеток *L. reuteri* LR1 составило для образца № $1-1\times10^8$ КОЕ/см³, для образца № $2-8\times10^7$ КОЕ/см³, для образца № $3-5\times10^6$ КОЕ/см³. Наибольшее содержание клеток ХТС (*L. helveticus* NK1 и *S. thermophilus* 159) отмечено в образце № 3 и составляет 2.5×10^8 КОЕ/см³. В образце № 2 количество клеток ХТС (*L. helveticus* NK1 и *S. thermophilus* 159) составило 1.1×10^8 КОЕ/см³.

Органолептические показатели образцов кисломолочных продуктов представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Органолептические показатели образцов КП

No	Наименование показателя							
образца	Внешний вид и консистенция	Вкус и запах	Цвет					
1	Однородная с нарушенным сгустком, газообразование в виде отдельных глазков, вызванных развитием <i>L.reuteri</i>	Чистый, кисломолочный	Молочно-белый, равномерный по всей массе					
2	Однородная с нарушенным сгустком, газообразование в виде отдельных глазков, вызванных развитием <i>L.reuteri</i>	Чистый, кисломолочный	Молочно-белый, равномерный по всей массе					
3	Однородная с нарушенным сгустком	Чистый, кисломолочный	Молочно-белый, равномерный по всей массе					

При определении показателей безопасности образцов КП установлено, что все исследуемые образцы по микробиологическим показателям соответствуют требованиям ТР ТС 033/2013 «Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции».

Принципиальная схема технологического процесса производства кисломолочного продукта с пробиотическими свойствами приведена на рисунке 14.

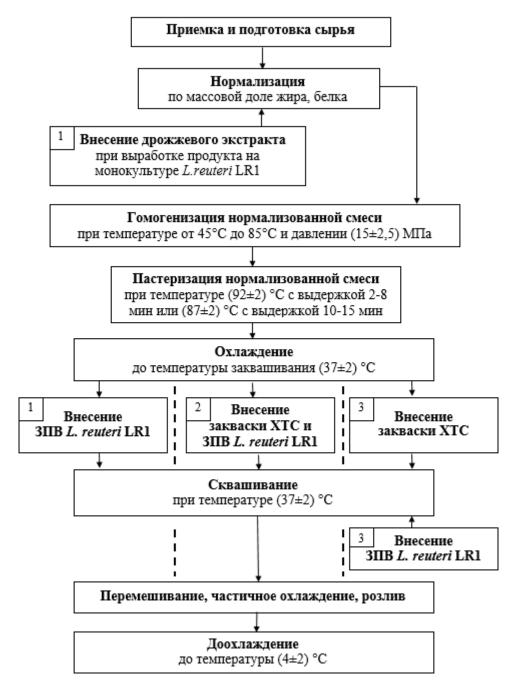


Рисунок 14 — Принципиальная схема технологического процесса производства кисломолочного продукта с пробиотическими свойствами

При определении рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта были выработаны по три партии образцов продукта и заложены на хранение при температуре (4±2)°C на 20 суток (предполагаемый срок годности – 15 суток).

В полученном кисломолочном продукте в процессе хранения определяли количество клеток L. reuteri LR1 (рис. 15) и XTC (L. helveticus NK1 + S. thermophilus 159) (рис. 16).

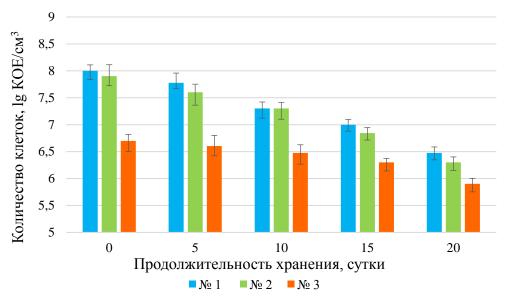


Рисунок 15 – Динамика изменения количества *L. reuteri* LR1 в процессе хранения образцов кисломолочных продуктов

Установлено, что в образце №1 в процессе хранения количество клеток L. reuteri LR1 уменьшилось с 1×10^8 KOE/cм³ до 3×10^6 KOE/cм³, в образце № 2-c 8×10^7 KOE/cм³ до 2×10^6 KOE/cм³. В образце №3 количество клеток L. reuteri LR1 за 20 суток хранения снизилось с 5×10^6 KOE/cм³ до 8×10^5 KOE/cм³.

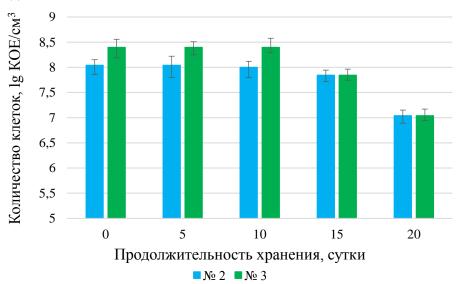


Рисунок 16 — Динамика изменения количества XTC (*L. helveticus* NK1 + *S. thermophilus* 159) процессе хранения образцов кисломолочных продуктов

Количество клеток *L. helveticus* NK1 + *S. thermophilus* 159 в образце №2 сразу после сквашивания данного продукта составляло $1,1\times10^8$ KOE/cм³ и за 20 суток хранения снизилось до 6×10^7 KOE/cм³ (рис. 16), а в образце № 3 количество клеток *L. helveticus* NK1 + *S. thermophilus* 159 за период хранения снизилось с $2,5\times10^8$ KOE/cм³ до $1,1\times10^7$ KOE/cм³.

Остальные микробиологические показатели готового продукта соответствовали нормам, изложенным в ТР ТС 033/2013 на протяжении всего срока хранения. На основании проведенных исследований определены рекомендуемые сроки годности КП. Рекомендуемый срок годности образцов №1 и №2 составляет 15 суток, образца № 3 – 10 суток.

По совокупности полученных данных для исследования функциональных свойств был выбран образец КП №2. Разработанный КП обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам (рис.17).

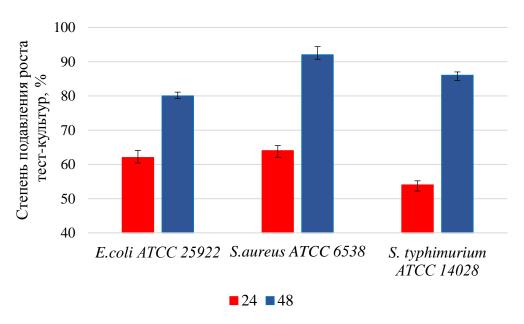


Рисунок 17 — Антагонистическая активность разработанного кисломолочного продукта

Степень подавления тест-штаммов варьируется в зависимости от вида тест-штамма и составляет через 24 ч от 54 до 64 %, а через 48 ч от 80 до 92%.

Медико-биологическая оценка разработанного КП, проведенная в условиях однофакторного эксперимента на белых крысах линии Wistar (с исходной массой тела 160±10 г, n=10 в каждой группе), показала его эффективность в плане нормализации состава микробиоты и ряда показателей липидного обмена. Отмечено, что исследуемый КП при введении в рацион (5 мл/сут рег оѕ) в течение 30 суток не вызывает отклонений в состоянии здоровья и поведении лабораторных животных spf-категории. У животных всех групп (интакт, контроль и опыт) содержание лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов и их распределение по популяциям находились в пределах физиологической нормы. При введении в рацион экспериментальных животных разработанного КП в составе микробиома кишечника крыс увеличилось содержание бифидо- и лактобактерий, а также энтеробактерий, типичных для нормобиоты крыс (табл. 8).

Таблица 8 - Состав микробиома кишечника крыс после включения в их рацион КП

(содержание микроорганизмов, lg КОЕ/г сырой массы фецес)

Группа животных	Анаэробы	Аэробы	Энтеробактерии	Enterococcus faecalis	Enterococcus faecium	S. aureus	Лактобациллы	Бифидобактерии	Дрожжи	Плесневые грибы
Интактная	8,4±0,3	8,4±0,3	5,0±0,2	7,7±0,2	6,8±0,3	2,3±0,1	8,3±0,2	8,3±0,2	2,3±0,3	4,5±0,4
Контрольная	8,7±0,4	8,4±0,3	5,2±0,3	7,4±0,4	6,6±0,2	2,3±0,4	8,6±0,1	8,6±0,2	2,3±0,4	3,9±0,3
Опытная	9,0±0,2	8,6±0,2	5,9±0,5	6,6±0,4	4,9±0,4	Не обнаруж	9,5±0,4	9,0±0,3	Не обнаруж	3,6±0,2

Проведенный комплекс исследований по изучению функциональных свойств разработанного КП свидетельствует о наличии у него нормализующего эффекта на микробиоту и ряд показателей липидного обмена. При введении в рацион экспериментальных животных разработанного КП в составе микробиоты кишечника крыс увеличилось

содержание бифидо- и лактобактерий, а также энтеробактерий, типичных для нормобиоты крыс, в сыворотке крови снижалась концентрация холестерина и триглицеридов.

На основании проведенных исследований разработан СТО 00419785-047-2020 «Продукты кисломолочные «Релакт».

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

- 1. Комплекс проведенных исследований позволил разработать технологию кисломолочного продукта «Релакт» с пробиотическими свойствами с использованием закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1
- 2. Исследованы *in vitro* пробиотические свойства *L.reuteri* LR1. Установлено, штамм *L.reuteri* LR1 обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам, которая варьируется в зависимости от используемой тест-культуры и продолжительности сокультивирования штаммов. Штамм *L. reuteri* LR1 чувствителен к линкомицину, амоксициллину и левомицетину, проявляет промежуточную устойчивость к ампициллину и неомицину, и обладает устойчивостью к остальным изучаемым антимикробным препаратам. Определена динамика изменения протеолитической, антиоксидантной и АПФ ингибирующей активностей в процессе культивирования штамма *L.reuteri* LR1 на обезжиренном молоке. Охарактеризован пептидный профиль белково-пептидной фракции обезжиренного молока, сквашенного *L. reuteri* LR1 и идентифицированы пептиды, отвечающие за антиоксидантные, гипотензивные и антимикробные свойства;
- 3. Разработан состав питательной среды для накопления *L.reuteri* LR1: гидролизованное молоко $-500 \text{ см}^3/\text{дм}^3$, дрожжевой экстракт -15 г/дм^3 , CH₃COONa -5 г/ дм^3 , цистеин -0.25 г/дм^3 , KH₂PO₄ -2 г/дм^3 , MgSO₄ -0.2 г/ дм^3 , MnSO₄ -0.05 г/ дм^3 , дистиллированная вода до 1000 мл. Определен состав защитной среды, обеспечивающий наибольшую выживаемость клеток *L.reuteri* LR1 в процессе сублимационного высушивания: обезжиренное молоко -17.7%, сахароза -72.8%, уксуснокислый натрий -9.5%;
- 4. Разработана технология ЗПВ *L.reuteri* LR1. Установлены технологические параметры культивирования *L.reuteri* LR1: активная кислотность питательной среды $-(6,2\pm0,1)$ ед. рH, количество инокулята $-(6,0\pm0,5)\%$; температура культивирования $-(37\pm1)^{\circ}$ С; продолжительность культивирования $(7,0\pm0,5)$ ч.;
- 5. Разработана технология кисломолочного продукта «Релакт» с пробиотическими свойствами с использованием закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1 и исследованы *in vitro* и *in vivo* функциональные свойства разработанного КП;
- 6. Определены рекомендуемые сроки годности, разработан комплект технической документации СТО 00419785-045-2019 «Закваска прямого внесения *L.reuteri* LR1» и СТО 00419785-047-2020 «Продукты кисломолочные «Релакт». Проведена опытно-промышленная выработка закваски прямого внесения *L.reuteri* LR1 и кисломолочного продукта «Релакт» с её использованием.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:

Статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus

- 1. **Begunova, A.V**. Development of Antioxidant and Antihypertensive Properties during Growth of Lactobacillus helveticus, Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus reuteri on Cow's Milk: Fermentation and Peptidomics Study / A.V.Begunova [et al.] // Foods. 2021. V. 10(1). P.17. DOI:10.3390/foods10010017 (**Web of Science**)
- 2. **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. Фёдорова // Прикладная биохимия и микробиология. − 2020. − Т. 56. − № 5. − С. 472 − 482. DOI: 10.31857/S0555109920050049 (**Scopus**)
- 3. Семенихина, В.Ф. Разработка биотехнологии кисломолочного продукта с *Lactobacillus* reuteri LR1 и исследование его функциональных свойств в эксперименте in vitro иin vivo / В.Ф.

Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова**, Т.В. Федорова, Т.И. Ширшова // Вопросы питания. -2018. - T. 87. - № 5. - C. 52-62. DOI: 10.24411/0042-8833-2018-10053 (**Scopus**)

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

- 4. **Бегунова, А.В.** Влияние технологических факторов на хранимоспособность кисломолочного продукта с *Lactobacillus reuteri* LR1 / **А.В. Бегунова**, И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная, Т.И. Ширшова // Молочная промышленность. − 2018. − № 3. − С. 54 − 55. DOI: 10.31515/1019-8946-2018-3-54-55
- 5. Семенихина, В.Ф. Ассоциация пробиотических культур *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus helveticus* для разработки бактериального концентрата / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова**, Т.А. Раскошная, Т.И. Ширшова // Молочная промышленность. − 2017. − № 10. − С. 60 61.
- 6. Раскошная, Т.А. Разработка питательной среды и режимов культивирования *Lactobacillus reuteri* для получения бактериального концентрата / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова** // Техника и технология пищевых производств. − 2016. − № 3 (42). − С. 56 62.
- 7. Рожкова, И.В. Новый пробиотический штамм *Lactobacillus reuteri* / И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная, С.Г. Ботина, **А.В. Бегунова** // Молочная промышленность. -2015. -№ 12. C. 38 39.
- 8. Раскошная, Т.А Культивирование пробиотического микроорганизма *Lactobacillus reuteri*: конструирование питательной среды / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова** // Молочная промышленность. $-2015. N \cdot 24. C. 26 27.$

Материалы конференций и другие публикации

- 9. Рожкова, И.В. Разработка кисломолочного продукта с пробиотиком *Lactobacillus reuteri* LR1 / И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная, **А.В. Бегунова**, Т.И. Ширшова // Переработка молока. -2018. -№ 7. C. 44 47.
- 10. Семенихина, В.Ф. О динамике культивирования нового пробиотического штамма / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова**, Т.И. Ширшова //Переработка молока. -2016. -№ 11 (205). С. 39-41.
- 11. Семенихина, В.Ф. Разработка технологического процесса получения бактериального концентрата *Lactobacillus reuteri* / В.Ф. Семенихина, Т.А. Раскошная, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова**, Т.И. Ширшова // Вестник Орловского государственного аграрного университета. − 2016. № 5 (62). C. 86 93.
- 12. Раскошная, Т.А. Исследование динамики развития *Lactobacillus reuteri* в зависимости от отдельных технологических параметров культивирования / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова** // В сборнике: Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности. Сборник научных трудов. Учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (ФГБНУ «ВНИМИ»). 2015. С. 204 207
- 13. Раскошная, Т.А. Разработка питательной среды для накопления клеток *Lactobacillus reuteri* / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова** // В сборнике: Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности. Сборник научных трудов. Учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (ФГБНУ «ВНИМИ»). 2015. С. 207 211.
- 14. Раскошная, Т.А. Антагонистическая активность штамма Lactobacillus reuteri как показатель его пробиотических свойств / Т.А. Раскошная, И.В. Рожкова, В.Ф. Семенихина, А.В. Бегунова // В сборнике: Научное обеспечение Ширшова. промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности. Сборник научных трудов. Учреждение Всероссийский исследовательский институт молочной промышленности (ФГБНУ «ВНИМИ»). – 2015. – С. 211 - 214.

- 15. Рожкова, И.В. Исследование динамики развития *Lactobacillus reuteri* в зависимости от температуры культивирования / И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, **А.В. Бегунова** // В сборнике: Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности. Сборник научных трудов. Учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (ФГБНУ «ВНИМИ»). 2015. С. 219 223.
- 16. **Бегунова**, **А.В.** Исследование динамики размножения *Lactobacillus reuteri* в ферментере при различных дозах инокулята и продолжительности культивирования / **А.В. Бегунова**, Т.А. Раскошная, И.В. Рожкова, Т.И. Ширшова // В сборнике: Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности. Сборник научных трудов. Учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (ФГБНУ «ВНИМИ»). 2015. С. 24 26.
- 17. Раскошная, Т.А. Исследование пробиотических и технологических свойств штамма *Lactobacillus reuteri* LR1 / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, **А.В. Бегунова,** Т.И. Ширшова // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. − 2017. − № 1. − С. 291 − 295.
- 18. Семенихина, В.Ф. Антагонистическая активность пробиотических культур к госпитальной флоре / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная, **А.В. Бегунова**, Н.И. Романова, Н.И. Габриэлян / Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. 2015. С. 307 308.
- 19. Леонова, В.А. Влияние состава защитных сред на выживаемость пробиотических культур / В.А. Леонова, **А.В. Бегунова**, И.В. Рожкова, Ю.И. Крысанова // В сборнике: Безопасность и качество товаров. Материалы XII Международной научно-практической конференции. Под ред. С.А. Богатырева. 2018. С. 192 200.
- 20. Раскошная, Т.А. Медико-биологическая оценка разработанного кисломолочного продукта с пробиотическим микроорганизмом *L. reuteri* LR1 / Т.А. Раскошная, **А.В. Бегунова** // В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы международного форума. 2018. С. 631 633.
- 21. Семенихина, В.Ф. Исследование динамики размножения *Lactobacillus reuteri* при культивировании в ферментере при различных рН и температурах / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная, **А.В. Бегунова** // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. 2016. № 1. С. 270 271.

Перечень сокращений и условных обозначений:

ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) – поглощающая способность кислородных радикалов;

АОА – антиоксидантная активность;

АПФ – ангиотензин превращающий фермент;

 $\Lambda\Pi\Phi$ -ингибирующая активность (IC_{50}) – концентрация белка, способная ингибировать $\Lambda\Pi\Phi$ на 50%;

АТСС – американская коллекция типовых культур;

ЗПВ – закваска прямого внесения;

КОЕ – колониеобразующая единица;

КП – кисломолочный продукт;

СТО – стандарт организации.