

На правах рукописи

МОЛДАВАНОВА АНАСТАСИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА АНТИМИКРОБНОЙ БИОКОМПОЗИЦИИ ДЛЯ
ЗАЩИТЫ ПОВЕРХНОСТИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

Специальность 05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных
продуктов и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискателя ученой степени
кандидата технических наук

Москва 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» (ФГБОУ ВПО МГУПП)

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Ганина Вера Ивановна

Официальные оппоненты: **Шувариков Анатолий Семёнович**,
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор, зав. кафедрой технологии
хранения и переработки продуктов
животноводства Российского
государственного аграрного
университета – МСХА им. К.А. Тимирязева

Кузнецова Людмила Станиславовна,
доктор технических наук,
директор ООО «МИКОБОР»

Ведущая организация: Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт молочной промышленности
(ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии)

Защита состоится «29» октября 2013 г в 13:00 часов
на заседании диссертационного совета ДМ 006.021.01 при
Государственном научном учреждении Всероссийский научно-
исследовательский институт мясной промышленности им. В.М.
Горбатова Российской академии сельскохозяйственных наук по адресу
109316, Москва, ул. Талалихина, д.26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИМП им.
В.М. Горбатова Россельхозакадемии.

Автореферат разослан « » _____ 201_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник

А. Н. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, каждый десятый человек в мире примерно раз в год болеет из-за потребления пищевых продуктов, не отвечающих установленным требованиям по микробиологическим показателям.

Развитие микроорганизмов в пище, в том числе в молоке и молочных продуктах, ограничивают, используя определенные технологические приемы: воздействие на сырьё и продукты высокой и низкой температур; снижение показателя активности воды, активной кислотности и активности оксидоредуктаз; применение химических консервантов; бактофугирование, микрофльтрацию и другие современные методы обработки сырья; применение диоксида углерода, перекиси водорода или смесей газов при фасовании продукции; упаковывание продуктов в различные виды современных упаковочных материалов; применение герметичной упаковки и другие.

Большой вклад в решение проблемы получения молочной продукции с показателями качества и безопасности, которые стабильно сохраняются в течение всего срока годности, внесли отечественные и зарубежные учёные: Гуль В.Е., Зобкова З.С., Кузнецова Л.С., Нагула М.Н., Орлова Е.А., Пешехонова А.Л., Рожкова И.В., Семенихина В.Ф., Снежко А.Г., Федотова А.В., Федотова О.Б., Харитонов В.Д., Massa С.С., Пастер Л. и др.

Используемые приемы не в полной мере позволяют защитить продукцию от возбудителей порчи, которые остаются или попадают в ходе технологического цикла, приводя к ухудшению показателей качества и безопасности, а также уменьшению срока годности молочной продукции. В тоже время к недостаточно изученному вопросу следует отнести возможность направленного применения биопотенциала пробиотических

бактерий, способных ингибировать развитие микроорганизмов – возбудителей порчи, иммобилизованных на полимерные носители в качестве природных биоконсервантов. В этой связи актуальным представляется расширение исследований в области создания барьерных технологий, в частности экологически безопасных биокомпозиций для защиты поверхности молочных продуктов от возбудителей порчи и посторонних микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции.

Цель и задачи исследований

Целью диссертационной работы являлась разработка биокомпозиции на основе изучения консервирующего эффекта пробиотических бактерий и продуктов их метаболизма в сочетании с природными полимерными материалами для защиты молочных продуктов от размножения в них возбудителей порчи и кишечных инфекций.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести скрининг антибактериальной активности пробиотических штаммов по отношению к тестовым культурам, вызывающим порчу молочных продуктов и циркулирующим на молочных предприятиях;
- изучить действие натуральных пленкообразующих веществ на пробиотические бактерии и обосновать их соотношение в антимикробной биокомпозиции;
- провести исследование эффективности применения антимикробной биокомпозиции;
- исследовать влияние антимикробной биокомпозиции на показатели качества и безопасности молочных продуктов в условиях хранения;
- разработать проект технологической документации на получение антимикробной биокомпозиции для защиты молочной продукции от возбудителей порчи.

Научная новизна работы

Теоретически и экспериментально обоснован состав антимикробной биокомпозиции для защиты поверхности молочных продуктов от возбудителей порчи на основе природных полимеров и пробиотических культур.

Выявлены новые штаммы пробиотических бактерий: *Lactobacillus plantarum* LP-885, *Bifidobacterium* GG-71, *Bifidobacterium* GG-72, обладающие выраженным антагонистическим действием по отношению к возбудителям порчи продуктов и кишечных инфекций.

Установлено, что штаммы пробиотических бактерий: *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41 (ВКПМ В – 9644), *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44 (ВКПМ В-9647) и *Lactobacillus acidophilus* АСК-5 (ВКПМ В-9645), *Lactobacillus fermentum* – LFM-2 (ВКПМ В-10368), *Lactobacillus rhamnosus* – LC-52GV (ВКПМ В-9475) оказывают ингибирующее действие на плесневые грибы рода *Penicillium*, которые являются наиболее распространенными возбудителями порчи мягких и полутвёрдых сыров.

Обоснованы рациональные параметры получения биокомпозиции на основе природных полимеров в сочетании с пробиотическими бактериями и продуктами их метаболизма, а также охарактеризованы её показатели качества.

Выявлен характер изменения антимикробной активности биокомпозиции от температуры и времени её хранения.

Установлено, что разработанная антимикробная биокомпозиция позволяет снижать количество возбудителей порчи на поверхности мягких и полутвёрдых сыров.

Практическая значимость работы

Разработаны состав и технология антимикробной биокомпозиции для защиты поверхности мягких и полутвёрдых сыров от возбудителей порчи. На состав антимикробной биокомпозиции подана заявка на изобретение

№2012133748 «Состав для защиты поверхности сыров от микробиологической порчи».

На основании изучения показателей качества сыров, упакованных с применением биокомпозиции, показана возможность сохранения показателей их качества, безопасности и увеличению их срока годности в среднем на 30%.

Проведена проверка эффективности применения антимикробной биокомпозиции при испытаниях на лабораторных обезьянах.

Разработан проект технической документации на антимикробную биокомпозицию.

Проведена опытно-промышленная выработка в производственных условиях ООО «Молоко» в г. Новотроицк, Оренбургской области, показавшая целесообразность использования разработанной антимикробной биокомпозиции при производстве сыра «Адыгейский».

Изученный новый штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* GG-72 был принят на национальное патентное депонирование во Всероссийскую Коллекцию Промышленных Микроорганизмов, ФГУП Гос НИИ генетика с присвоением номера АС-1884.

Результаты исследований внедрены в учебный процесс: подготовлены и изданы методические указания к лабораторным работам «Стартовые культуры в технологии продуктов питания» для направления подготовки магистров 260200.68 – Продукты питания животного происхождения.

Работа выполнялась при поддержке гос. контрактов: №4209: «Коллекция культур бактерий, бактериофагов, дрожжевых и мицелиальных грибов как база для научно-образовательного процесса, сохранения биоразнообразия и развития современной биотехнологии» (2010г.) и №14.740.11.0087 «Разработка ресурсосберегающих биотехнологий многокомпонентных функциональных продуктов на базе инновационных комплексов модифицированных биополимерных носителей с оригинальными

минорными нутриентами, пробиотиками, природными антиоксидантами, создание технологии и аппаратного оформления для их длительного хранения» (2011г.)

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на Международных научных конференциях «Живые системы и биологическая безопасность населения» (М., 2010, 2011, 2012); Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (М., 2010, 2011); Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии и оборудование в молочной промышленности» (Воронеж, 2010); Международном научно-практическом семинаре «Феномен молочной сыворотки: синтез науки, практики и инноваций» (Ставрополь, 2011).

Получены грамоты: за активное участие в работе Центральной выставки V Фестиваля Науки в г. Москве (2010 г.); за участие в IX международной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» в г. Москве (2011 г.); в номинации «Мир науки», за активное участие в научной деятельности МГУПП в г. Москве (2012 г.); за участие в X международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» в г. Москве (2012 г.).

Публикации

По результатам исследований, изложенных в диссертационной работе, опубликовано 12 печатных работ, в т.ч. 3 статьи в журналах, рекомендованных перечнем ВАК, методические указания к лабораторным работам «Стартовые культуры в технологии продуктов питания» для направления подготовки магистров 260200.68 - Продукты питания животного происхождения.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, включающих обзор литературы, методы исследований, экспериментальную часть, выводы, список литературы, содержащий 157 наименований отечественных и 46 зарубежных источников информации, 12 приложений. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, включает 25 таблиц и 23 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение.

Обоснована актуальность проблемы исследований и сформирована общая направленность диссертации.

Глава 1. «Аналитический обзор»

Представлен анализ отечественной и зарубежной научно-технической литературы, в котором показаны роль и перспективы использования в производстве пищевой продукции таких веществ, как природные полимеры и пробиотические бактерии, рассмотрены основные способы обеспечения микробиологической безопасности молочных продуктов, приведены данные о современных способах защиты молочных продуктов от порчи.

На основании проведенного анализа состояния рассматриваемой проблемы обоснована цель и сформулированы задачи её решения.

Глава 2. «Объекты и методы исследований».

Даны краткие характеристики объектов исследований, составлена структурно-логическая схема исследований (рисунок 1) с указанием изучаемых показателей, изложены методы их определения.



Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Объектами исследований являлись:

а) штаммы пробиотических бактерий *Lactobacillus acidophilus* АСТ – 41 (ВКПМ В – 9644), АСТ-44 (ВКПМ В-9647), АСК-5 (ВКПМ В-9645), *Lactobacillus fermentum* – LFM-2 (ВКПМ В-10368), *Lactobacillus rhamnosus* – LC-52GV (ВКПМ В-9475), *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 (ВКПМ Ас-

1742) и новые штаммы *Bifidobacterium* GG-71, *Bifidobacterium* GG-72 и *Lactobacillus plantarum* LP -885 из коллекции кафедры «Технология молока и молочных продуктов» ФГБОУ ВПО МГУПП;

б) композиции из плёнкообразующих природных полимеров и пробиотических культур;

в) созданная антимикробная биокомпозиция;

г) опытные образцы молочных продуктов (сыр «Адыгейский» – ГОСТ Р 53379-2009, сыр «Гауда» – ГОСТ Р 52972-2008, творог – ГОСТ Р 52096-2003) с антимикробной биокомпозицией.

При изучении антагонистической активности использовали штаммы тест-микроорганизмов *Escherichia coli* 0157, *Staphylococcus aureus* 209-P, которые были получены из коллекции ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича» и плесени рода *Penicillium* (*Penicillium roqueforti* ВКМ FW-3071, *Penicillium expansum* ВКМ FW-3075, *Penicillium aurantiogriseum* ВКМ FW-3056, *Penicillium verrucosum* ВКМ FW-3076), полученные из коллекции плесневых грибов, ПНИЛ биозащиты сырья и продуктов питания МГУПБ.

В работе использовали стандартные физико-химические, органолептические и микробиологические методы исследований.

Составление пленкообразующей композиции и определение некоторых её показателей проводили при содействии сотрудников лаборатории ПНИЛПМиПП. Эффективность применения антимикробной биокомпозиции изучали на приматах, в рамках программы «Марс-500» при участии сотрудников на базе ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН.

Математическая обработка проведена с использованием стандартных компьютерных программ. Повторность проведения опытов не менее трех- и пятикратной и достоверность результатов составляет не менее 95%.

Глава 3. «Скрининг штаммов пробиотических бактерий по выявлению их ингибирующего биопотенциала на возбудителей порчи молочных продуктов»

Был проведен контроль микроскопических препаратов восстановленных и новых штаммов пробиотических бактерий, который показал отсутствие в культурах клеток посторонних микроорганизмов и наличие клеток типичной формы. Проверенные штаммы пробиотических бактерий применяли в дальнейшей работе.

Осуществлён скрининг 3 вновь выделенных штаммов: *Lactobacillus plantarum* LP-885; *Bifidobacterium* GG-71, *Bifidobacterium* GG-72 в сравнении с другими коллекционными изучаемыми пробиотическими бактериями по отношению к тест-культурам *E.coli* 0157 и *Staph.aureus* 209-P. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов пробиотических бактерий по отношению к возбудителям кишечных инфекций

Наименование штамма	Ингибирующий потенциал, мм, по отношению к	
	<i>E.coli</i> 0157	<i>Staph.aureus</i> 209-P
<i>Lactobacillus acidophilus</i> АСТ-41	14,0±0,2	12,5±0,1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> АСТ-44	13,0±0,1	12,5±0,1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> АСК-5	12,0±0,2	11,5±0,1
<i>Lactobacillus fermentum</i> LFM- 2	10,3±0,1	8,5±0,2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LC-52GV	10,2±0,3	9,5±0,1
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BGV-11	12,3±0,1	12,5±0,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP-885	10,8±0,2	11,7±0,1

Bifidobacterium GG-71	10,3±0,2	9,9±0,1
Bifidobacterium GG-72	10,9±0,1	9,5±0,2

Выявлено что, новые штаммы пробиотических бактерий по мере снижения ингибирующего эффекта в отношении тест-культур *E.coli* 0157 и *Staph.aureus* 209-P можно расположить в следующем порядке: *Lactobacillus plantarum* LP-885, *Bifidobacterium* GG-72, *Bifidobacterium* GG-71. Показано, что все новые изученные штаммы при использовании диффузионного метода обладали в отношении тест-культур *E.coli* 0157 и *Staph.aureus* 209-P антагонистической активностью, которая была практически на уровне коллекционных штаммов, и это позволило рекомендовать их для применения в дальнейшей работе.

На следующем этапе исследований впервые в отношении плесневых грибов был проведён скрининг функционально и производственно значимых штаммов пробиотических бактерий разных таксонов: *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41; *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44; *Lactobacillus acidophilus* АСК-5; *Lactobacillus fermentum* LFM-2; *Lactobacillus rhamnosus* LC-52GV; *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 и 3 вновь выделенных штаммов: *Lactobacillus plantarum* LP-885; *Bifidobacterium* GG-71, *Bifidobacterium* GG-72. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Полученные данные показали, что пробиотические бактерии рода *Lactobacillus* обладают природным ингибирующим биопотенциалом в отношении плесневых грибов рода *Penicillium*, тогда как изученные штаммы *Bifidobacterium* не проявляли такого действия. Выявлено, что изученные штаммы *Lactobacillus* отличались по ингибирующему биопотенциалу друг от друга.

Таблица 2 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов по отношению к плесневым грибам рода *Penicillium*

Наименование штамма	Зона ингибирования роста, мм.			
	<i>Penicillium roqueforti</i> 3071	<i>Penicillium expansum</i> 3075	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 3056	<i>Penicillium verrucosum</i> 3076
<i>Lactobacillus acidophilus</i> АСТ-41	11,5±0,2	32,0±0,1	26,0±0,3	15,8±0,2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> АСТ-44	13,8±0,1	30,8±0,2	24,0±0,1	14,5±0,1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> АСК-5	12,5±0,2	25,8±0,1	23,3±0,2	15,5±0,3
<i>Lactobacillus fermentum</i> LFM-2	28,5±0,2	24,7±0,1	34,0±0,3	26,8±0,1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LC-52GV	21,0±0,2	14,0±0,2	18,5±0,2	17,5±0,2
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BGV-11	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP-885	13,9±0,3	16,9±0,1	17,3±0,2	14,6±0,2
<i>Bifidobacterium</i> GG-71	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i> GG-72	0	0	0	0

Представленные данные позволяют сделать заключение о том, что разные виды бактерий рода *Lactobacillus* отличались по ингибирующему биопотенциалу в отношении разных видов плесневых грибов. Изученные штаммы *Lactobacillus acidophilus* (АСК-5, АСТ-44, АСТ-41) проявляли

наибольший ингибирующий биопотенциал (25,8; 30,8 и 32,0мм) в отношении *Penicillium expansum*, тогда как штаммы *Lactobacillus plantarum* LP-885, *Lactobacillus rhamnosus* LC-52GV, *Lactobacillus fermentum* LFM-2 – к *Penicillium roqueforti* (13,9; 21,0 и 28,5мм соответственно). В отношении *Penicillium aurantiogriseum* и *Penicillium verrucosum* все штаммы пробиотических бактерий обладали выраженным ингибирующим эффектом.

По результатам проведенного скрининга штаммов пробиотических бактерий из коллекции микроорганизмов МГУПП и вновь выделенных штаммов по выявлению антагонистической активности по отношению к возбудителям порчи продуктов из животного сырья и кишечных инфекций, а также с учётом технологичности получения биомассы пробиотиков, для дальнейшей работы выбраны следующие штаммы: *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41, *Lactobacillus plantarum* LP-885, *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11, *Bifidobacterium* GG-72.

Штамм *Bifidobacterium* GG-72 был принят на национальное патентное депонирование во Всероссийскую Коллекцию Промышленных Микроорганизмов с присвоением номера АС-1884.

Глава 4. «Разработка состава и технологии антимикробной биокомпозиции»

На основании анализа литературы в качестве основного компонента была выбрана метилцеллюлоза, обладающая пленкообразующими свойствами. Приняв во внимание антисептические свойства хитозана, его водорастворимая форма Хитокси-20 была выбрана в качестве второго компонента. В качестве третьего компонента был выбран альгинат натрия, который способен образовывать равномерное по толщине покрытие, улучшать внешний вид продукта, продлевать срок годности, а также используется в качестве влагоудерживающего агента. Все эти компоненты разрешены для применения в пищевой промышленности.

После изучения характеристик монокомпонентов, были приготовлены водные растворы пленок, полученных при различных соотношениях метилцеллюлозы, хитозана, альгината натрия. Пленки получали поливом из раствора на стеклянную подложку.

Показано, что при снижении содержания хитозана в системе набухание пленки увеличивается. Образцы, содержащие в составе альгинат натрия, образуют достаточно устойчивую систему, способную набухать постепенно и не распадаться на фрагменты в течение более длительного периода времени (рисунок 2). Результаты определения основных физико-химических характеристик плёнообразующей композиции представлены в таблице 3. Таким образом, на основании результатов, полученных при рассмотрении различных свойств композиций, сделан вывод, что трехкомпонентный состав, содержащий 1% метилцеллюлозы, 0,6% хитозана и 0,4% альгината натрия, лучше остальных по внешнему виду, эластичности, вкусу и физико-химическим характеристикам удовлетворяет требованиям, предъявляемым к съедобным покрытиям для пищевых продуктов.

Во время исследований отобранные ранее штаммы пробиотических бактерий (*Lactobacillus acidophilus* АСТ-41, *Lactobacillus plantarum* LP-885, *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11, *Bifidobacterium* GG-72) вносили в модельные системы из пленкообразующих композиций (№1-7), которые хранили при температуре $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ и $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ (рисунок 3 а и б).

Анализируя полученные данные, был выбран состав системы №6, в котором выживаемость штаммов *Lactobacillus acidophilus* составляла не менее 10^6 КОЕ в см^3 в течение семи суток хранения при температуре $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ и 10^7 КОЕ в см^3 – при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Было выявлено, что изучаемые штаммы *Bifidobacterium* погибали во всех модельных системах. Известно, что антагонистическая активность бифидобактерий по отношению к возбудителям кишечных инфекций обусловлена главным образом

продуктами метаболизма, поэтому было предложено их вводить вместе с продуктами жизнедеятельности в модельные системы полимерного раствора.

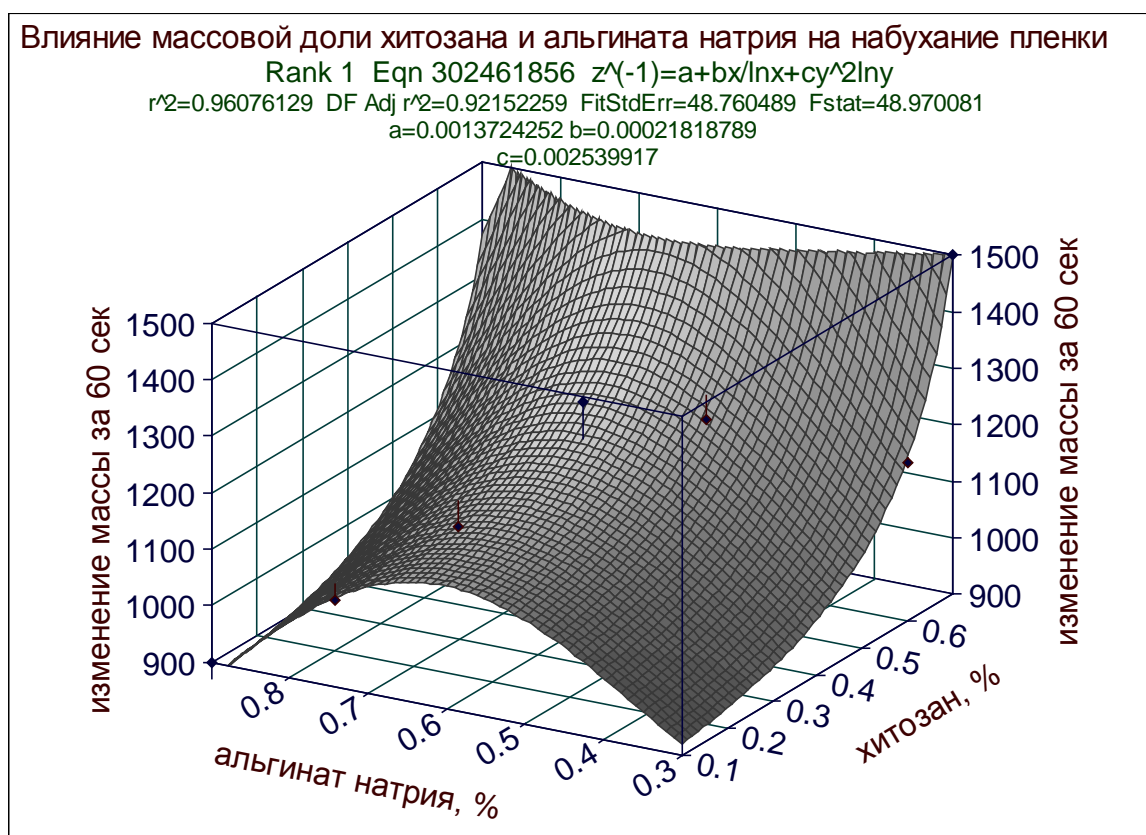
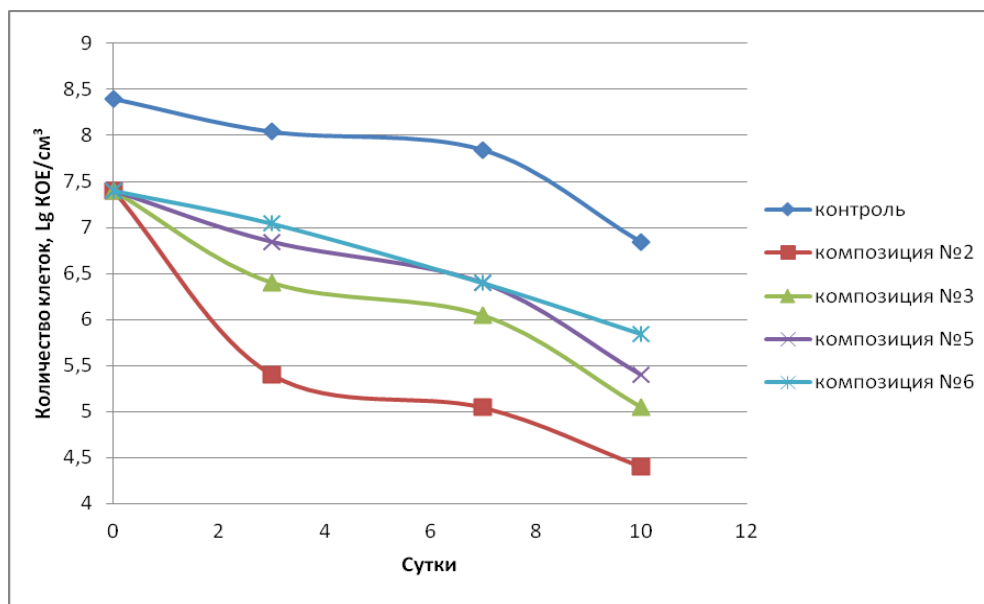


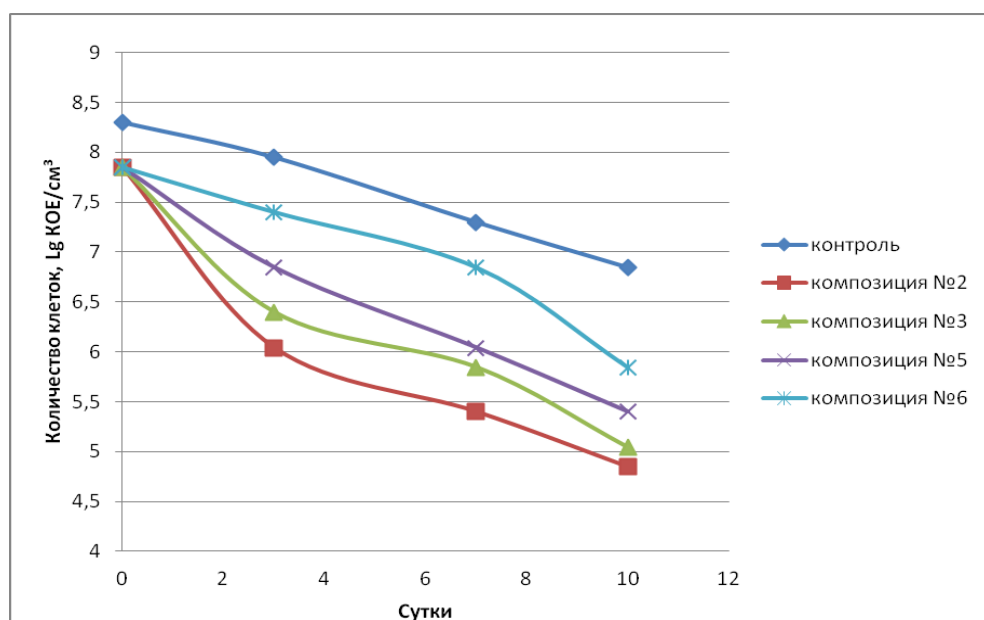
Рисунок 2 – Влияние массовой доли хитозана и альгината натрия на набухание пленки

Таблица 3 – Основные характеристики пленкообразующей композиции

Наименование модельной системы	Плотность, кг/м ³	Условная вязкость, сек	Активная кислотность, ед. рН
разработанная композиция	1,085±0,002	60,0±2	6,00±0,05



а) штамм *Lactobacillus acidophilus* ACT-41



б) *Lactobacillus plantarum* LP-885

Примечание:

Композиция №2 – метилцеллюлоза 1%; хитозан 0,2%; альгинат натрия 0,8%.

Композиция №3 – метилцеллюлоза 1%; хитозан 0,3%; альгинат натрия 0,7%.

Композиция №5 – метилцеллюлоза 1%; хитозан 0,5%; альгинат натрия 0,5%.

Композиция №6 – метилцеллюлоза 1%; хитозан 0,6%; альгинат натрия 0,4%.

Рисунок 3 – Выживаемость лактобактерий в пленкообразующих модельных системах при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$

В дальнейшем определяли рациональное соотношение пробиотических бактерий и количества полимерного раствора. Для этого было составлено 12 композиций, с различным соотношением штаммов культур и модельного раствора. Критерием отбора служили: внешний вид, физические свойства биокомпозиции и антагонистическая активность, проявляемая в отношении возбудителей порчи молочных продуктов.

Для каждого соотношения было приготовлено по четыре композиции, в зависимости от концентрации того или иного штамма. В исследованиях изучали следующие соотношения штаммов *L.acidophilus* ACT-41; *L.plantarum* LP-885; *B.adolescentis* BGV-11 и *B. GG-72* – 2:1:1:1; 1:2:1:1; 1:1:2:1; 1:1:1:2.

Результаты изучения антагонистической активности полученных композиций приведены на рисунке 4.

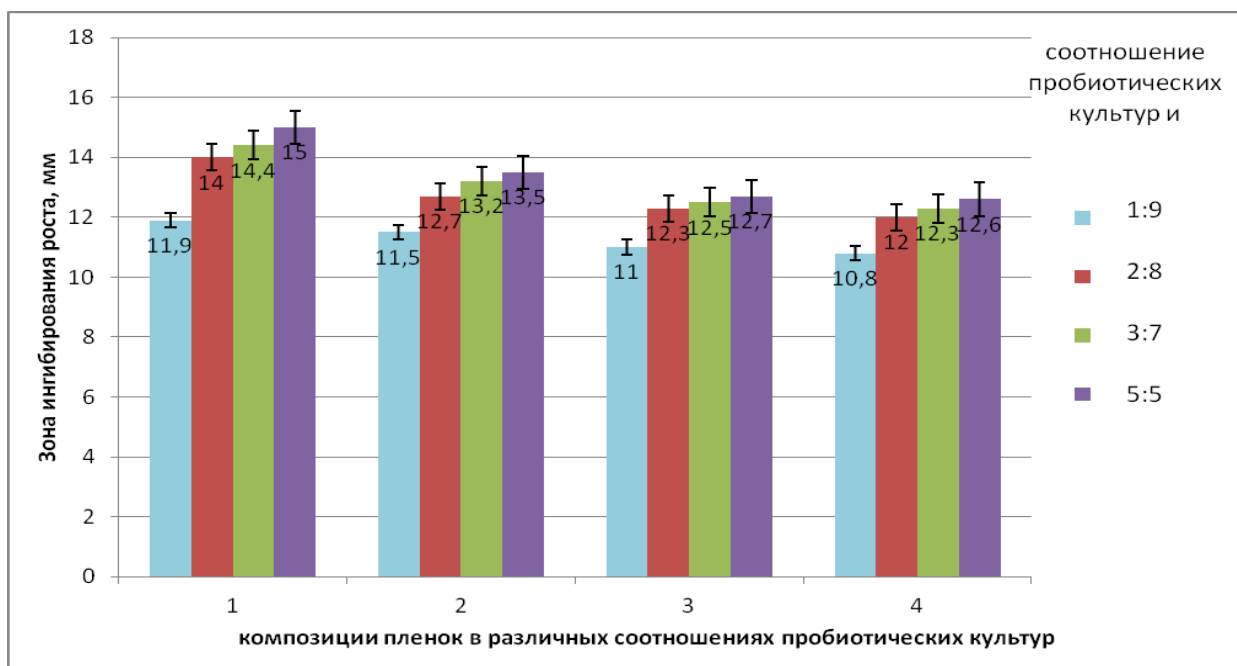


Рисунок 4 – Антагонистическая активность модельных систем биокомпозиции по отношению к *Penicillium roqueforti*

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что созданные модельные системы биокомпозиций способны ингибировать развитие

плесневых грибов. Было установлено, что наиболее выраженной антагонистической активностью по отношению к плесневым грибам *Penicillium* обладали модельные системы № 1, при соотношениях 2:8, 3:7, 5:5. Однако, учитывая физические показатели пленок, наиболее рациональным соотношением является 2:8. В дальнейших исследованиях применяли именно этот состав биокомпозиции.

Представленные результаты убедительно показывают ингибирующее действие созданной биокомпозиции на один из наиболее распространенных на предприятиях видов плесневых грибов. Ингибирующее действие биокомпозиции на другие штаммы плесневых грибов (*Penicillium expansum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium verrucosum*) было аналогично.

В результате комплекса проведенных исследований обоснован состав антимикробной биокомпозиции: метилцеллюлоза, хитозан, альгинат натрия (1%, 0,6%, 0,4%) и *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41, *Lactobacillus plantarum* LP-885, *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 и *Bifidobacterium* GG-72 (при соотношении культур между собой 2:1:1:1). При этом наиболее рациональное соотношение пробиотических культур и пленкообразующей системы является 2:8. На разработанный состав подана заявка на изобретение.

Опытно-расчетным путем определили, что на покрытие поверхности продукта, площадью 100 см², необходимо примерно 2,5 мл биокомпозиции.

Характеристика показателей качества разработанной антимикробной биокомпозиции представлена в таблице 4.

Исходные пленкообразующие компоненты отвечали нормам, указанным в соответствующих ТУ. Водный раствор из пленкообразующих компонентов перемешивали и оставляли для набухания при температуре 22±2°С в течение суток. После чего в него вносили при перемешивании бактериальные концентраты пробиотических культур и продукты жизнедеятельности бифидобактерий. Установлено, что разработанная

антимикробная биокомпозиция сохраняет основные характеристики в течение 7 суток хранения при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Таблица 4 – Характеристика показателей качества антимикробной биокомпозиции

Наименование модельной системы	Цвет	Вкус	Плотность, $\text{кг}/\text{м}^3$	Условная вязкость, сек	Активная кислотность, ед. рН	Количество клеток пробиотических бактерий, КОЕ в см^3
разработанная композиция	прозрачный	нейтральный	$1,083\pm 0,002$	$60,0\pm 2$	$5,80\pm 0,02$	Не менее 10^7

На основании полученных результатов разработали проект технической документации на антимикробную биокомпозицию. Принципиальная схема получения антимикробной биокомпозиции приведена на рисунке 5.



Рисунок 5 – Принципиальная схема получения антимикробной биокомпозиции

Глава 5. «Проверка эффективности действия и показателей качества антимикробной биокомпозиции»

Перед началом проведения исследований у животных не были обнаружены инфекции и гельминты. В эксперименте участвовало 11 обезьян (5 опытных и 6 контрольных). Продукт, приготовленный на основе полученной антимикробной биокомпозиции, скармливали опытной группе из 5 обезьян, по методике, разработанной в ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН. В течение всего эксперимента опытный продукт обезьяны употребляли активно, отказа от продукта не было, аллергических или других негативных проявлений не выявлено. В результате исследований доказано, что созданная антимикробная биокомпозиция безвредна и оказывала благоприятное влияние на полезную микрофлору и работу ЖКТ у животных, а также ингибирующее действие на постороннюю микрофлору кишечника. Результаты проведенных исследований подтверждены актом.

Эффективность действия созданной биокомпозиции проверена в лабораторных условиях на полутвёрдом сыре «Гауда» и мягком сыре «Адыгейский». Для всех видов продуктов были приготовлены контрольные и опытные образцы. Контрольные образцы – продукт без биокомпозиции; опытные образцы – продукт, покрытый антимикробной биокомпозицией.

При нанесении антимикробной биокомпозиции на полутвёрдый сыр «Гауда» её равномерно распыляли по поверхности образцов. Образцы помещали в экстремальные условия для ускорения процесса возможности развития плесневых грибов (температура $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, относительная влажность воздуха 95%). С учетом технологии сыра «Адыгейский» биокомпозицию наносили методом его погружения, после чего на поверхности сыра образовывалась защитная плёнка.

Образцы сыра «Адыгейский» хранили при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. В ходе проведения исследований в образцах определяли: микробиологические

показатели, титруемую кислотность, массовую долю влаги, органолептические показатели.

В процессе хранения контрольные образцы раньше опытных проявляли первые признаки порчи: появлялся кисловатый неприятный запах и привкус, который к окончанию срока хранения резко усиливался. Результаты определения органолептических свойств продуктов коррелировали с физико-химическими и микробиологическими показателями. На поверхности образцов сыра наблюдали более активное развитие плесневых грибов. Таким образом, было показано, что при использовании биокомпозиции происходит ингибирование развития плесневых грибов, а так же дрожжей, что подтверждено микробиологическими исследованиями. Результаты исследований контрольных и опытных образцов, показали, что применение антимикробной биокомпозиции позволяет увеличить срок годности изученных видов сыров в среднем на 30%.

Эффективность действия созданной антимикробной биокомпозиции была также проверена на твороге с различной м.д.ж. Работа в данном направлении требует дальнейших исследований.

Возможность реализации антимикробной биокомпозиции была проверена в промышленных условиях на предприятии ООО «Молоко» в г. Новотроицк, Оренбургской области при выработке сыра «Адыгейский». Результаты апробации показали целесообразность применения разработанной антимикробной биокомпозиции для сохранения показателей качества и безопасности, а также увеличения сроков годности сыра. Результаты проверки подтверждены актом производственной проверки.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что пробиотические бактерии рода *Lactobacillus* подавляют развитие плесневых грибов – основных возбудителей порчи сыров.

2. Выявлено, что новые штаммы пробиотических бактерий: *Lactobacillus plantarum* LP-885, *Bifidobacterium* GG-71 и *Bifidobacterium* GG-72 обладают антагонистической активностью по отношению к возбудителям кишечных инфекций *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, а *Lactobacillus plantarum* LP-885 и к плесневым грибам рода *Penicillium*.

3. Доказано, что биопотенциал пробиотических бактерий может быть использован в качестве природного безопасного консерванта в составе биокомпозиции для защиты сыров от порчи.

4. Обоснованы состав и рациональное соотношение компонентов в антимикробной биокомпозиции: пробиотические бактерии *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41 10%; *Lactobacillus plantarum* LP-885 5%; *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 2,5%; *Bifidobacterium* GG-72 2,5%; 1% водный раствор метилцеллюлозы, 0,6% водный раствор хитозана и 0,4% водный раствор альгината натрия. Соотношение между пробиотическими бактериями и природными пленкообразующими компонентами составляет 2:8.

5. Разработанная антимикробная биокомпозиция сохраняет характеристики в течение 7 суток хранения при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

6. Показано, что нанесение антимикробной биокомпозиции на поверхность сыров приводит к более стабильному и длительному сохранению показателей качества и безопасности продукции и увеличению их срока годности в среднем на 30%.

7. Разработана технология получения и применения антимикробной биокомпозиции, а возможность реализации полученных результатов подтверждена в промышленных условиях на предприятии ООО «Молоко» в г. Новотроицке, Оренбургской области.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Захарченко (Молдаванова), А.В. Инновационное биопокрывание для сыров и молочных продуктов / А.В. Захарченко, В.И. Ганина, А.В. Федотова // Сыроделие и маслоделие. – 2012. – №1. – С. 42-43.

2. Ганина, В.И. Иммобилизация пробиотических микроорганизмов на бионосителях / В.И. Ганина, Н.В. Ананьева, А.В. Захарченко (Молдаванова) // Молочная промышленность. – 2012. – №2. – С. 57-58.

3. Захарченко (Молдаванова), А.В. Биопокрытие для повышения безопасности и качества сыра «Адыгейский» / А.В. Захарченко, В.И. Ганина, А.В. Федотова, Т.Е. Галкина // Сыроделие и маслоделие. – 2012. – №5. – С. 50-51.

4. Ганина, В.И. Иммобилизация пробиотических бактерий – перспективный путь их применения в биотехнологии / В.И. Ганина, Н.В. Ананьева, И.В. Ким, А.В. Захарченко (Молдаванова) // Биотехнология: экология крупных городов: материалы Международной научно-практической конференции в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 15-17 марта, 2010). – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2010. – С. 220.

5. Ким, И.В. Разработка биологически активной добавки для кормов сельскохозяйственных животных / И.В. Ким, В.И. Ганина, Т.Н. Данильчук, А.В. Захарченко (Молдаванова) // Переработка молока. – 2010. – №5. – С.22.

6. Захарченко (Молдаванова), А.В. Перспективы создания биосорбентов для повышения безопасности пищевых продуктов / А.В. Захарченко, В.И. Ганина, А.В. Федотова // Материалы научно-практической конференции «Инновационные технологии и оборудование в молочной промышленности», Воронеж, 2010. – С. 22-23.

7. Ганина, В.И. Биобезопасность молочной продукции / В.И. Ганина, Л.А. Борисова, А.В. Захарченко (Молдаванова) // Переработка молока. – 2010. – №8. – С. 14-16.

8. Захарченко (Молдаванова), А.В. Скрининг штаммов *Lactobacillus acidophilus* по признаку подавления возбудителей порчи молочных продуктов / А.В. Захарченко, Е.П. Гаврюнькина // Живые системы и биологическая

безопасность населения: материалы VIII Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – М.: МГУПБ, 2010. – С. 106-107.

9. Захарченко (Молдаванова), А.В. Изучение возможности применения биопленки для деконтаминации поверхности молочных продуктов / А.В. Захарченко, В.И. Ганина, А.В. Федотова // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VI Московского международного конгресса (Москва, 21-25 марта, 2011). – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2011. – Часть 2. – С. 227-228.

10. Захарченко (Молдаванова), А.В. Изучение возможности применения *Lactobacillus* для защитного покрытия продуктов питания / А.В. Захарченко, В.И. Ганина, А.И. Гриневиц // Материалы международного научно-практического семинара «Феномен молочной сыворотки: синтез науки, практики и инноваций», Ставрополь, 2011. – С. 35-36.

11. Захарченко (Молдаванова), А.В. Применение пробиотических бактерий для формирования безопасности и качества молочных продуктов / А.В. Захарченко // Живые системы и биологическая безопасность населения: материалы IX Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – М.: МГУПП, 2011. – С. 177-178.

12. Молдаванова, А.В. Проверка безопасности антимикробной биопленки / А.В. Молдаванова, Н.А. Усанова // Живые системы и биологическая безопасность населения: материалы X Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – М.: МГУПП, 2012. – С. 55-56.

13. Ганина, В.И., Федотова, А.В., Захарченко (Молдаванова), А.В. Заявка на патент №2012133748 «Состав для защиты поверхности сыров от микробиологической порчи».