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

На правах рукописи

БЕГУНОВА АННА ВАСИЛЬЕВНА

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С *LACTOBACILLUS REUTERI* LR1

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель –
доктор технических наук, профессор

В.Ф. Семенихина

Москва 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Список используемых сокращений 4
ВВЕДЕНИЕ 5
Глава 1 Состояние вопроса 9
1.1 Пробиотические микроорганизмы: потенциал и влияние на человека 9
1.2 Характеристика *Lactobacillus reuteri* 15
1.3 Технологические аспекты производства заквасок прямого внесения 21
Заключение к литературному обзору 26
Глава 2 Организация работы, объекты и методы исследований 27
2.1 Организация работы 27
2.2 Объекты и методы исследований 29
2.2.1 Объекты исследований 29
2.2.2 Методы исследований 29
Глава 3 Исследование пробиотических свойств штамма *Lactobacillus reuteri* LR1 42
3.1 Исследование *in vitro* антагонистической активности *L. reuteri* LR1 42
3.2 Определение устойчивости *L. reuteri* LR1 к антимикробным препаратам 43
3.3 Определение *in vitro* протеолитической, антиоксидантной, АПФ-ингибирующей активности штамма *L. reuteri* LR1 45
3.4 Определение пептидного профиля в образцах молока, ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 46
Глава 4 Разработка технологии закваски прямого внесения 51
Lactobacillus reuteri LR1 51
4.1 Разработка состава питательной среды для накопления клеток *L. reuteri* LR1 51
4.2 Исследование влияния технологических параметров культивирования на накопление *L. reuteri* LR1 58
Исследование динамики развития *L.reuteri* LR1 в биореакторе при различных значениях активной кислотности питательной среды 59
Исследование динамики развития *L.reuteri* LR1 в биореакторе при различных температурах. 60
Исследование динамики размножения *L. reuteri* LR1 в биореакторе при различных дозах инокулята и продолжительности культивирования 64

4.3 Исследование влияния компонентов защитной среды на выживаемость *L. reuteri* LR1 при сублимационной сушке 65

4.4 Исследование влияния продолжительности культивирования *L. reuteri* LR1 до отделения биомассы на выживаемость клеток при сублимационной сушке. 68

4.5 Технология ЗПВ *L. reuteri* LR1 70

4.6 Опытно-промышленная выработка ЗПВ *L. reuteri* LR1 74

ГЛАВА 5 Разработка кисломолочного продукта «Релакт» с использованием ЗПВ *L. reuteri* LR1 76

5.1 Влияние факторов роста на развитие клеток *L. reuteri* LR1 в пастеризованном молоке 76

5.2 Выбор варианта получения кисломолочного продукта с использованием ЗПВ *L. reuteri* LR1 78

5.3 Определение рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта 84

5.4 Исследоваие функциональных свойств разработанного кисломолочного продукта 87

Исследование антагонистической активности разработанного кисломолочного продукта 87

Медико-биологическая оценка разработанного кисломолочного продукта 88

5.5 Опытно-промышленная выработка кисломолочного продукта «Релакт» 94

Выводы 97

Библиографичекий список 99

Приложение 1 123

Приложение 2 127

Приложение 3 134

Приложение 4 143

Приложение 5 147

Приложение 6 147

Приложение 7 150

Приложение 8 151

Список используемых сокращений

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

АОА – антиоксидантная активность;

АПФ – ангиотензин превращающий фермент;

АПФ-ингибирующая активность (IC_{50}) – концентрация белка, способная ингибировать АПФ на 50%;

АТСС – американская коллекция типовых культур;

АФК – активные формы кислорода;

БГКП – бактерии группы кишечных палочек;

ЗПВ – закваска прямого внесения;

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов;

КОЕ – колониеобразующая единица;

КП – кисломолочный продукт;

СТО – стандарт организации.

ВВЕДЕНИЕ

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. В последние годы 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 [131, 138, 142, 191].

Всё большее внимание уделяется исследованиям пробиотических продуктов, способных оказывать определенное действие на организм и ведутся интенсивные исследования по разработке кисломолочных продуктов с пробиотическими бактериями, которые способны корректировать кишечную микробиоту человека. Многочисленные исследования открыли широкие возможности для применения пробиотических микроорганизмов, а также показали их преимущества в профилактике и лечении различных заболеваний. [95, 117, 174, 192, 204]. В последние годы на различных дискуссионных площадках активно обсуждается перспектива конкуренции продуктов питания, содержащих пробиотические микроорганизмы с лекарственными препаратами [38, 48].

Производство таких продуктов невозможно без применения высокоэффективных заквасочных культур, способных обеспечить получение продукции, отвечающей требуемым показателям качества и безопасности. При производстве заквасок прямого внесения высокое количество жизнеспособных

микроорганизмов возможно обеспечить разработывая новые питательные среды, обеспечивающие потребности определенных видов микроорганизмов, а также оптимизацией режимов культивирования. Поэтому основные стадии производства заквасок прямого внесения, связанные с накоплением бактериальной биомассы и сохранением жизнеспособных кулеток, являются объектами интенсивных исследований.

В настоящее время среди пробиотических бактерий большое внимание исследователей уделяется *Lactobacillus reuteri* [110, 187, 197, 198]. 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. [2, 5], Семенихиной В.Ф. [27, 34, 35, 37, 39], Свириденко Г.М. [32, 33], Ганиной В.И. [12, 13, 14, 15], Сорокиной Н.П. [40, 42], Поспеловой В.В. [26, 30], Хамагаевой [48] и др.

Цель и задачи исследований

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 и 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 кисломолочного продукта, разработать комплект технической документации и и провести опытно-промышленную выработку кисломолочного продукта «Релакт» в производственных условиях.

Научная новизна работы

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

Практическая значимость работы

Теоретически обоснован 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 опытно-промышленная выработка кисломолочного продукта «Релакт».

Глава 1 Состояние вопроса

1.1 Пробиотические микроорганизмы: потенциал и влияние на человека

Интерес к продуктам питания с пробиотическими свойствами постоянно усиливается. Это связано с тем, что такие продукты питания обладают дополнительными преимуществами для поддержания физического и умственного здоровья человека. Увеличение потребности в пробиотических продуктах связаны с глобальным повышением цен на медицинские услуги, постепенно растущей продолжительностью жизни. Среди продуктов с пробиотическими свойствами кисломолочные продукты занимают лидирующую позицию. Это связано с тем, что кисломолочные продукты хорошо усваиваются и содержат необходимые для организма питательные вещества. Состав используемого при производстве кисломолочных продуктов сырья и состав применяемых заквасок определяют биологичесую ценность пробиотических кисломолочных продуктов. Особое место занимают пробиотические продукты, которые в своем составе содержат живые микроорганизмы и продукты их метаболизма, проявляющие свои положительные действия на организм человека путем регуляции микробиоты желудочно-кишечного тракта [9, 46, 77]. Именно от конкретных штаммов микроорганизмов применяемых в качестве заквасочных культур зависят пробиотические свойства продуктов [10, 11, 36].

Употребление кисломолочных продуктов помогает усилить устойчивость организма человека к инфекциям и образованию опухолей, положительно влияет на нервную систему, обмен веществ, защищает от преждевременного старения. [44].

В ГОСТ Р 52349 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением N 1)» прописано, что «пробиотик – это физиологически функциональный пищевой ингредиент в виде полезных для человека (непатогенных и нетоксигенных) живых микроорганизмов, обеспечивающий при систематическом употреблении человеком в пищу в виде препаратов или в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате нормализации состава и (или) повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника» [17].

К пробиотическим микроорганизмам относят представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также отдельные штаммы некоторых видов *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Bacillus* и *Saccharomyces* [55, 118]. Многочисленными исследованиями подтверждены положительные эффекты, оказываемые пробиотическими культурами и продуктами на их основе при профилактике и лечении различных заболеваний желудочно-кишечного тракта [6, 55, 57, 61].

Исследования последних лет взаимоотношений макроорганизма и его нормальной кишечной микробиоты убедительно показали, что в формировании и функционировании различных органов и систем за счет продукции метаболитов, ферментов, витаминов, биологически активных веществ исключительно важную роль играют микроорганизмы желудочно-кишечного тракта. Накоплены многочисленные данные о том, что назначение кисломолочных продуктов, приготовленных с использованием различных пробиотических культур, значительно улучшает самочувствие больных, страдающих непереносимостью лактозы.

Микроорганизмы в желудочо-кишечном тракте формируют колонизационную резистентность по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам за счет образования таких метаболитов как короткоцепочечные жирные кислоты, пероксид водорода, гистамин и др., снижении бактериальных токсинов [114, 186]. Пробиотические микроорганизмы способны ингибировать рост условно-патогенных и патогенных микроорганизмов

за счет синтеза широкого спектра антимикробных веществ. [19]. Расщепление желчных кислот микроорганизмами определяет гипохолестеринемический эффект микробиоты [202]. Активные гнилостные процессы в толстой кишке и дефицит молочнокислых и бифидобактерий способствуют накоплению холестерина в организме человека. Ферменты, которые выделяют молочнокислые и бифидобактерии в толстой кишке, переводят соли желчных кислот в труднорастворимые формы, акцептирующие холестерин для выведения его из организма. При дефиците молочнокислых и бифидобактерий холестерин в толстом кишечнике всасывается в кровь, вследствие чего начинается выделение желчи и накопление жира в печени [202]. Кроме того, естественная микробиота кишечника, снижает риск пищевой аллергии у детей [8]. Также микробиота активно синтезирует неспецифические факторы защиты организма (клеточные и гуморальные), что определяет иммуномодулирующиесвойство микроорганизмов [91].

Пробиотические, в том числе молочнокислые бактерии реализуют своё положительное влияние с помощью различных механизмов, которые уникальны для каждого из них [161]. К основным пробиотическим свойствам относятся антимикробная, антиоксидантная, гипотензивная и гипохолестеринемическая активность и антибиотикоустойчивость. Исследования, проводимые в последнее время выявляют штаммовую специфичность пробиотических эффектов микроорганизмов.

Антимикробный эффект молочнокислых бактерий человечество использовало в той или иной форме в течение столетий для продления срока годности пищевых продуктов за счет образования молочной кислоты с сопутствующим снижением pH, а также биологически активных веществ, обладающих бактерицидным действием на микроорганизмы, включая и патогенные формы. Ведущее место в объяснении явления антагонизма молочнокислых бактерий отводится бактериоцинам.

В настоящее время роль активных форм кислорода (АФК) в ряде патологических процессов вызывает интерес исследователей. При повышенном

накоплении АФК, пероксидов и их вторичных продуктов возникает нарушение структуры и функций клеточных мембран, изменением белков, ДНК и липидов, этот процесс называют окислительным стрессом. Этот процесс влияет на проявление различных хронических заболеваний, таких как диабет, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания [62]. В последнее время при исследовании антиоксидантного действия молочнокислых бактерий появляется все больше данных, доказывающих ингибирующую активность в отношении перекисного окисления различных молочнокислых микроорганизмов, в частности, рода *Lactobacillus* [113, 144]. Антиоксидантная активность молочнокислых микроорганизмов *in vitro* была показана исследованиями ряда авторов [122, 125, 166, 183].

Долгое время считалось, что устойчивость к антибиотикам пробиотических штаммов бактерий, является полезным свойством, которое обеспечивает эффективность пробиотических продуктов и препаратов с их использованием при совместном прием пробиотиков и антибиотиков [22, 150]. Однако, в последние годы в связи с распространением среди микроорганизмов антибиотикорезистентности, ситуация изменилась. Европейское ведомство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) ограничило возможность применения в составе пробиотиков и продуктов питания штаммов, устойчивость которых к ряду клинически важных антибиотиков превышает рекомендуемые значения [58, 102]. Для представителей рода *Lactobacillus* характерна природная устойчивость к ряду антибиотических препаратов. Штаммы, у которых выявлена природная устойчивость к антибиотикам, считаются пригодными (*acceptable*) для использования в составе пробиотических продуктов и препаратов [58]. Штаммы пробиотических, в том числе молочнокислых бактерий, устойчивость которых к антибиотикам обусловлена мутацией хромосомных генов, являются «в целом пригодными» (*generally acceptable*) для использования в биотехнологии. Штаммы, обладающие способностью к передаче генов антибиотикорезистентности, не могут применяться (*not acceptable*) в составе пробиотических продуктов и препаратов [58].

За последнее десятилетие возрос интерес к кисломолочным продуктам, которые укрепляют здоровье и могут предотвращать такие заболевания, как гипертония - хроническое дегенеративное заболевание, характеризующееся значениями артериального давления, превышающими нормальный диапазон [78], она затрагивает более 1 миллиарда человек во всем мире [200]. Кроме того, это важный фактор риска для развития других сердечно-сосудистых заболеваний, инсультов, почечной недостаточности и многих других осложнений [67]. Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) играет фундаментальную роль в кровяном давлении. Ингибирование АПФ будет вызывать сосудорасширяющую реакцию, которая снижает артериальное давление. Изучение АПФ-ингибирующих веществ, таких как пептиды, в пищевых продуктах позволит использовать их для профилактики и лечения гипертонии [196]. Биологически активные пептиды могут высвобождаться во время сквашивания молока различными молочнокислыми бактериями или во время пищеварения. Наиболее изученные биоактивные пептиды, полученные из белков молока, являются антигипертензивными пептидами [63, 107, 115, 164]. Пептиды, ингибирующие АПФ, обычно представляют собой пептиды с короткой цепью, часто содержащие полярные аминокислотные остатки, такие как пролин [99]. Значение IC_{50} (концентрация белка, приводящая к 50% ингибированию) используется для оценки эффективности различных ингибирующих АПФ пептидов.

Поиск ингибиторов АПФ с помощью исследований *in vitro* является наиболее распространенной стратегией отбора кисломолочных продуктов с антигипертензивным потенциалом. Хотя было проведено большое количество исследований, связанных с антигипертензивными пептидами [86, 90, 119, 160], существует необходимость найти и оценить новые штаммы молочнокислых бактерий, которые обладают способностью генерировать эту биологическую активность, а также обладают хорошими технологическими свойствами для производства кисломолочных продуктов.

В 1963 году появились исследования, подтверждающие, что сквашенное молочнокислыми бактериями молоко проявляет гипохолестеринемические

эффекты [182, 141], т.е. молочнокислые бактерии обладают способностью к удалению холестерина [135]. В исследованиях K.W. Lee и др. показано, что штаммы пробиотических микроорганизмов должны выживать при прохождении через желудочно-кишечный тракт, быть толерантными к желчным солям и адгезироваться на эпителиальной ткани кишечника [130, 199]. Это позволит штаммам с пробиотическими свойствами достигать достаточного количества в кишечнике и обеспечивать снижение содержания дезоксихолевой кислоты, что в свою очередь позволит снизить уровень холестерина в сыворотке и сократить риск возникновения сердечно - сосудистых заболеваний [104]. В работе Hori G и др. показаны гипохолестеринемические эффекты для пептидов, полученных из казеина и сыворотки [109]. Одним из функциональных свойств, используемых для характеристики пробиотиков, является устойчивость к желудочной кислотности, к желчным солям и дегидратация холестерина [159, 201]. Несколько пробиотических бактерий были найдены для производства гидролазы желчных солей, которая помогает снизить сывороточный холестерин [142] и, следовательно, активность гидролазы желчных солей также рассматривается в качестве дополнительного критерия для выбора пробиотиков. Механизм этих эффектов еще предстоит выяснить.

Пробиотические, в том числе молочнокислые бактерии оказывают положительноме влияние на формирование защитного барьера кишечника, включающего конкуренцию с другими микроорганизмами за эпителиальные рецепторы и пищевые вещества, синтез антимикробных компонентов, стимуляцию выработки муцина и восстановление эпителия [106]. В процессе формирования и функционирования иммунной системы человека молочнокислые бактерии играют ключевую роль [108].

Полезные для здоровья человека свойства молочнокислых бактерий интенсивно изучаются. В настоящее время проводятся исследования и накапливаются данные о более широком спектре пробиотический активности микроорганизмов, которые способны нормализовать функции микробиоты желудочно-кишечного тракта, усиливать иммунитет, снижать аллергию на

пищевые продкты, облегчать симптомы лактазной недостаточности, оказывать гипохолестеринемическое, антиканцерогенное и антимутагенное действие [96, 128]. Накоплены многочисленные данные различных ранжированных исследований, которые подтверждают, что продукты, произведеные с использованием пробиотических, в том числе молочнокислых бактерий при содержании в 1 мл не менее 1×10^7 жизнеспособных клеток. могут оказывать терапевтический эффект. Употребление пробиотических продуктов должно быть регулярным [29, 47, 49, 50]. Применение пробиотических, в том числе молочнокислых микроорганизмов при производстве кисломолочных продуктов позволит добавить продукту ряд функциональных свойств [152, 188].

1.2 Характеристика *Lactobacillus reuteri*

Молочнокислые бактерии широко распространены в окружающей среде, в том числе в качестве важной составляющей здоровой кишечной микробиоты людей и животных [70, 163, 167]. Представители рода *Lactobacillus* являются наиболее широко встречаемыми пробиотическими микроорганизмами в группе молочнокислых бактерий. Они обладают высокой биологической и функциональной активностью, что определяет их практическое использование в качестве пробиотиков и в производстве пищевых продуктов. Одним из наиболее известных биологических свойств лактобацилл является антагонистическая активность в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий [16], что объясняется продуцированием ряда противомикробных метаболитов, включая перекись водорода, органические кислоты, антибиотики, бактериоцины и другие [85]. Более того эффект, оказываемый здоровой кишечной микрофлорой, на общее физиологической состояние людей и животных бесспорно высок [126].

Номенклатура и таксономия бактерий рода *Lactobacillus* в настоящее время подвержена пересмотру. По состоянию на март 2020 г. род *Lactobacillus* включал более 260 видов, которые являлись очень гетерогенной микробной группой. Ранняя

таксономия лактобацилл была основана на фенотипических признаках, включая оптимальную температуру роста, использование сахара и спектр продуцируемых метаболитов [155]. С 1983 года сходство генов 16S рРНК используется в бактериальной систематике для обеспечения филогенетических схем в качестве основы для классификации и номенклатуры [178]. В течение последних 15 лет секвенирование полных бактериальных геномов стало широко доступным, и средние значения нуклеотидной идентичности (ANI) генов, общих для двух бактериальных геномов, были введены в качестве золотого стандарта для определения новых видов бактерий [79, 123]. Определена более простая дифференциация гомоферментативных и гетерофермкентативных молочнокислых бактерий по пути метаболизирования гексоз:

- гомоферментативные молочнокислые бактерии метаболизируют гексозы через путь Эмбдена-Мейерхоффа, образуя пируват в качестве ключевого промежуточного продукта метаболизма;

- гетероферментативные молочнокислые бактерии, метаболизируют гексозы через фосфокетолазный путь до пирувата и ацетилфосфата в качестве ключевых промежуточных продуктов [100, 203].

На основе филогенетических исследований основного генома с учетом физиологических и экологических критериев род *Lactobacillus* был реклассифицирован [41]. Лактобациллы, которые используются в составе заквасок для изготовления молочной продукции, в соответствии с новой таксономией относятся к пяти разным родам: 10 видов включены в род *Lactobacillus*, остальные отнесены к новым родам *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lentilactobacillus*, *Limosilactobacillus*.

В основе способности молочнокислых бактерий к сохранению продуктов питания, лежит производство ими молочной кислоты во время развития, что способствует ингибированию роста посторонних микроорганизмов [177]. В процессе образования молочной кислоты, активная кислотность (pH) в среде культивирования снижается, вследствие чего различные короткоцепочечные

жирные кислоты переходят в свою недиссоциированную форму, что является основой антимикробной активности молочнокислых бактерий [170].

Большинство представителей рода *Lactobacillus* имеют форму прямых палочек с закругленными концами, которые располагаются одиночно, парами или цепочками различной длины. Среди лактобацилл встречаются короткие кокковидные и извитые формы, а также длинные, нитевидные палочки длиной от 0.7 – 1.1 до 3.0 – 8.0 мкм. Длина клеток зависит от возраста культуры, условий ее культивирования, особенно от состава питательной среды, температуры и содержания кислорода.

Одним из уникальных представителей семейства *Lactobacillaceae* является *Lactobacillus reuteri*, которая впервые была выделена немецким микробиологом Gerhard Reuter из грудного молока в 1965 г. [169] и была отнесена к молочнокислым бактериям, в частности, к *Lactobacillus fermentum* биотип II. В 1980 г. Kandler et. al [116] установили существенное различием между *Lactobacillus fermentum* биотип II и другими биотипами *Lactobacillus fermentum*, поэтому было предложено определить *Lactobacillus fermentum* биотип II в новый вид *Lactobacillus reuteri*. В соответствии с новой таксономией теперь *Lactobacillus reuteri* - *Limosilactobacillus reuteri*.

Морфологически это неправильной формы с закругленными концами грамположительные палочки, которые располагаются и по отдельности, и парами, и небольшими кластерами. *L. reuteri* облигатная гетероферментативная молочнокислая палочка, микроаэрофил, неподвижны, спор не образует, продуцирует большое количество глюканов и фруктанов экзополисахаридов, которые рассматриваются как пребиотики [76, 121]. Конечные продукты метаболизма - молочная и уксусная кислоты.

L. reuteri заселяет желудочно-кишечный тракт человека и животных и считается одним из немногих истинно аутохтомных видов *Lactobacillus*, присущих человеку [153]. В проведенных исследованиях зарубежных ученых была продемонстрирована высокая способность *L.reuteri* к адгезии на стенках желудочно-кишечного тракта. Этот организм чаще всего встречается в

проксимальном отделе пищеварительного тракта хозяина [97]. При этом согласно экспериментальным данным, *L. reuteri* имеет высокую выживаемость в присутствии соляной кислоты желудка, желчи и ферментов пищеварительной системы [7, 59].

Благодаря выработке антимикробных компонентов *L. reuteri* способна уменьшать адгезию *Helycobacter pylori* к эпителию желудка и подавлять ее рост, что способствует снижению воспаления слизистой желудка [189]. В исследованиях, проводимых на лабораторных животных, отмечалось что *L. reuteri* стимулирует в кишечнике синтез масляной кислоты. Некоторое время назад было сообщено о производстве *L. reuteri* низкомолекулярного антибиотика широкого спектра действия, который получил название реутерициклин. Было показано, что антимикробная активность реутерициклина распространяется на многие грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus, Listeria innocua, Enterococcus faecium*), в то время, как против грамотрицательных бактерий он не эффективен [139].

Еще один бактериоцин, продуцируемый *L. reuteri*, был идентифицирован и обозначался как реутерицин 6. Реутерицин 6 был активен против некоторых родственных *Lactobacillus* spp., но не против *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* [195]. *L. reuteri* продуцируют антимикробный компонент широкого спектра действия – реутерин. Способность продуцировать реутерин *in vivo* определяет экологическую значимость *L. reuteri*, которая играет модулирующую роль в росте всей кишечной микрофлоры [59, 80, 190]. *L. reuteri,* способны продуцировать витамин B_{12}, и в работах Santose F. и других, показано, что его количество зависит от состава питательной среды, на которой он культивируется [176]. В нескольких исследованиях оценивалась безопасность этого организма у взрослых, детей, младенцев и даже среди ВИЧ-инфицированных [111]. Результаты показали, что доза, равная $2{,}9\times10^9$ КОЕ/сутки хорошо переносится, безопасна и эффективна для людей. Получены данные показывающие штаммовую специфичность пробиотических свойств *L.reuteri* [89]. Прказано, что штаммы *L.reuteri* ATCC 55730 и *L.reuteri* L22 обладают различной антимикробной

активностью против патогенных бактерий, различаются по способности превращать глицерин в реутерин, а также различной выживаемостью в кишечном тракте [89]. Штамм *L. reuteri* BM36301, показал предварительные доказательства противовоспалительной активности как *in vitro*, так и *in vivo*. Также этот штамм помогал самцам мышей в процессе естественного старения поддерживать массу тела и высокий уровень тестостерона в сыворотке крови. У самок мышей, потреблявших этот штамм, наблюдалась более здоровая кожа [129]. Штамм *L. reuteri* ATCC PTA 6475 обладает эффективными пробиотическими свойствами в отношении колита, ожирения, старения и здоровья кожи [36, 136, 167, 169]. Кроме того, исследования Poutahidis T и др. [165] показали, что одной только пероральной терапии *L. reuteri* было достаточно, чтобы изменить профиль провоспалительных иммунных клеток и предотвратить патологию абдоминального жира и связанное с возрастом увеличение веса у мышей независимо от их базовой диеты. Эксперименты на мышах подтвердили, что внутрижелудочное введение штамма *L. reuteri* FLRE5K1, стимулируя выработку цитокинов в организме, может уменьшить возникновение меланомы и и улучшить выживаемость мышей, несущих опухоль [137]. Таким образом, преимущества *L. reuteri* заключаются в укреплении здоровья, снижении инфекций, улучшении толерантности к пище, усилении усвоения питательных веществ, минералов и витаминов, модуляции иммунных ответов хозяина, укреплении целостности слизистой оболочки кишечника и уменьшении бактериальной транслокации [110].

В связи с повышением интереса потребителей к пробиотическим продуктам увеличивается объем промышленного производства кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами и возрастает спрос на заквасочные культуры. Наибольшим спросом у производителей кисломолочных продуктов пользуются закваски прямого внесения (бактериальные концентраты), которые улучшают качество продукта, повышают экономическую эффективность производства и позволяют оптимизировать технологический процесс. В закваскаx прямого внесения количестве жизнеспособных клеток бактерий должно быть не менее 1×10^{10} КОЕ/см^3(г), а в традиционных бактериальных закваскаx нормируется не

менее 10^9 КОЕ/см^3(г), в этом и состоит отличительная особенность традиционных заквасок от заквасок прямого внесения. Использование ЗПВ в производстве кисломолочных продуктов позволяет ислючить стадию лабораторной и производственной закваски, что позволяет интенсифицировать процесс сквашивания, получить необходимые органолептические свойства готового продукта за счёт улучшения микробиологических показателей.

В промышленности *L. reuteri* была впервые использована в 1991 году в Швеции для обогащения кисломолочного продукта, содержащего *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium infantis*. Данный продукт был коммерчески реализован под названием «BRA-milk». В 1995 году в Швеции был разработан кисломолочный продукт «SymBalance», который имеет в своем составе 4 пробиотических штамма, включая *L. reuteri* [21]. Однако, несмотря на присутствие в молоке большого количества факторов роста, *L. reuteri*, в отличие от других молочнокислых бактерий, развивается в нем достаточно медленно.

1.3 Технологические аспекты производства заквасок прямого внесения

Технологические операции в процессе производства заквасок прямого внесения (ЗПВ) оказывают непосредственное влияние на качество получаемой закваски.

Первым этапом является культивирование выбранного штамма или штаммов (при производстве многоштаммовой ЗПВ) на питательной среде при оптимальных технологических параметрах (температуре, активной кислотности среды, продолжительности культивирования и др.) для наибольшего накопления клеток [15, 31, 43, 45]. После чего проводят отделение биомассы клеток от культуральной среды и дальнейшее консервирование: замораживание и/или высушивание.

Бактерии рода *Lactobacillus* относятся к микроорганизмам, имеющим сложные питательные потребности. Для их активного развития требуется наличие веществ, необходимых для роста и построения бактериальной клетки, включая аминокислоты, витамины, пурины и пиримидины и др. [20, 18, 31, 51, 52, 87, 92, 172]. Лактобациллы лучше развиваются в питательных средах, которые содержат аминокислоты, связанные с пептидом, а не свободную форму [64].

Наиболее важным источником энергии для молочнокислых бактерий являются моно - и дисахариды. Имеются данные о том, что в отсутствие сбраживаемых углеродосодержащих субстратов молочнокислые бактерии могут использовать аминокислоты (глутаминовую кислоту, аргинин, тирозин) в качестве источника энергии; при этом происходит их декарбоксилирование с выделением углекислого газа. Более доступным и часто используемым в составе питательных сред углеводом является глюкоза, хотя есть виды молочнокислых бактерий, предпочитающие другие сахара - лактозу, галактозу. По мнению ряда авторов, фосфорилитическое расщепление дисахаридов имеет энергетическое преимущество по сравнению с гидролизом моносахаридов [4, 28, 184]. В качестве источника азота большинство молочнокислых микроорганизмов используют его органические формы. При недостатке органического азота лактобактерии для

синтеза ряда органических соединений могут использовать минеральные соединения азота. Рост некоторых молочнокислых бактерий в сложных по составу питательных средах стимулируют аммонийные соли.

Также молочнокислые палочки нуждаются в дополнительных веществах, называемых факторами роста, которые не способны сами синтезировать. Такие факторы роста относятся к трем группам соединений - к аминокислотам, пуринам и пиримидинам, а также к витаминам. Аминокислоты, пурины и пиримидины - составные части белков и нуклеиновых кислот, поэтому клетка нуждается в достаточных количествах этих соединений. Многим видам лактобацилл для развития необходимы витамины. Этим объясняется значительное влияние на их рост добавок к питательной среде различных экстрактов (например, дрожжевого, кукурузного), а также других соединений. Например, для роста болгарской палочки требуется никотиновая кислота (B_5), пантотенат (B_3) и рибофлавин (B_2) [1]. Витамины же входят в коферменты или простетические группы и, таким образом, участвуют в каталитических функциях; поэтому они необходимы только в очень малых количествах. Большинство видов молочнокислых палочек остро нуждается для своего развития в витаминах, чем и объясняется в значительной мере влияния на их рост добавок к средам.

Различными исследованиями выявлено, что такие добавки как марганец, ацетат, жирные кислоты (например, олеиновая кислота), томатный сок [60], казеиновый порошок [145], сывороточный протеин [143] или простые сбраживаемые сахара (например, сахароза, фруктоза) [168] способствуют усилению роста лактобацилл.

Для обеспечения роста и развития молочнокислые бактерии нуждаются в ряде неорганических соединений - меди, железе, натрии, калии, фосфоре, йоде, сере, магнии и особенно марганце. Наличие солей железа в питательной среде оказывает благоприятное действие на рост культур болгарской палочки, причем установлено, что они практически не растут в отсутствии марганца и/или железа [20].

Таким образом, питательная среда, применяемая при культивировании лактобацилл для получения заквасок прямого внесения должна удовлетворять потребности микроорганизмов в источниках энергии, содержать компоненты, необходимые для конструктивного метаболизма, обеспечивающего высокую скорость развития бактерий для получения высокой концентрации жизнеспособных микроорганизмов. Сырье для приготовления таких сред должно быть доступным, технологически целесообразным и недорогим. В качестве основы питательных сред для культивирования молочнокислых бактерий обычно используют обезжиренное молоко, гидролизованное молоко, сыворотку и др. Дополнительно вносят пептоны мясного и растительного происхождения, кислотный и панкреатический гидролизат казеина, дрожжевые экстракты и автолизаты, кукурузные экстракты, твин 80, растворы минеральных солей и другие компоненты в качестве факторов роста [66, 181]

Вместе с тем следует отметить, что условия культивирования такие как температура, активная кислотность, вид нейтрализатора и окислительно-восстановительный потенциал среды влияют на интенсивность роста и накопления лактобацилл [31, 72, 73]. Следующим этапом является концентрирование накопленных клеток микроорганизмов. Чаще всего концентрирование осуществляется посредством центрифуг периодического и непрерывного действия, сепараторов и бактофуги. Параметры концентрирования различны.

После концентрирования клеточной биомассы при производстве заквасок прямого внесения проводят консервирование микроорганизмов с целью сохранения технологических и пробиотических свойств культур, уменьшения трудозатрат на поддержание жидких культур, увеличения срока хранения и облегчения транспортирования культур без заметного снижения их активности. Консервирование микроорганизмов осуществляют замораживанием и/или высушиванием. Анализ литературных данных показывает, что как слишком раннее, так и слишком позднее отделение клеток отрицательно сказывается жизнеспособности микроорганизмов, а также на активности заквасок прямого внесения. Большинство исследователей рекомендуют отделять клетки

молочнокислых бактерий в конце логарифмической фазы или перед началом стационарной фазы.

Для высушивания бактериальных концентратов используют следующие методы: распылительный, вакуумный, сублимационный, распыление в частичном вакууме и контактно-сорбционное высушивание. [101, 127, 148]

Сублимационный метод высушивания являетсяодним из самых широко используемым видов сушки при производстве сухих заквасок [65]. Сублимационная сушка обычно дает более высокие показатели выживаемости молочнокислых, в том числе пробиотических микроорганизмов по сравнению с распылительной сушкой [175]. Как правило, сушка продолжается до тех пор, пока содержание влаги не упадет ниже 4%, что способствует долгосрочному хранению и предотвращению порчи [94]. Сублимационная сушка (лиофилизация) имеет определенные нежелательные эффекты, такие как денатурация чувствительных белков и снижение жизнеспособности клеток [132]. Эти эффекты вызваны низкой температурой, замораживанием, осмотическим и иссушающим стрессом, которому бактерии подвергаются в процессе сублимационной сушки. Повреждения клетки в результате сублимационной сушки включают в себя многие аспекты, такие как целостность и текучесть клеточных мембран [179], денатурация белка и повреждение ДНК [134, 193]

Выживаемость клеток при замораживании и сушке, а также хранимоспособность заквасок прямого внесения (бактериальных концентратов) зависит от состава питательной среды культивирования, режимов культивирования, способа концентрирования, продолжительности культивирования до отделения биомассы клеток, состава защитной среды, режимов замораживания и сушки, температуры хранения [31, 69, 71, 74, 83, 84, 133, 148, 180]. Отмечено, что 60 – 70% клеток, переживших этап первоначального замораживания, переживут этап обезвоживания [194].

Для предотвращения или уменьшения гибели клеток во время сублимационной сушки и последующего хранения используют криопротекторы. В качестве криопротектора в производстве заквасок широко используется

обезжиренное молоко. Обезжиренное молоко, используемое в качестве защитной среды, предотвращает повреждение клеток путем стабилизации компонентов клеточной мембраны [75, 181]. Добавление в обезжиренное молоко защитных веществ может усилить его внутренний защитный эффект при хранении, в разной степени в зависимости от добавляемого соединения. До сих пор было доказано, что за защитный эффект, оказываемый обезжиренным молоком на выживание микроорганизмов во время сублимационной сушки, отвечают несколько механизмов. King показал, что молочные белки могут образовывать защитное покрытие на белках клеточной стенки, а кальций в молоке повышает выживаемость после замораживания или сублимационной сушки [120].

Кроме того, было исследовано влияние глюкозы, сахарозы, мальтозы, лактозы, трегалозы, а также как отдельно, так и в дополнение к обезжиренному молоку. Отмечено, что добавление сахоров повышает жизнеспособность молочнокислых бактерий при замораживании и сублимационной сушке [105, 154]. В исследованиях [179] показано, что сахароза, фруктоолигосахариды и обезжиренное молоко значительно повышали выживаемость клеток *L. reuteri* при сублимационной сушке, если биомассу отделяли в экспоненциальной фазе роста клеток. А защитные эффекты сахарозы, фруктоолигосахаридов и инулина были аналогичны или лучше, чем эффекты обезжиренного молока [179]. Благотворное влияние сахарозы и трегалозы при сушке объясняется их способностью снижать температуру фазового перехода жидкость-кристалл/гель [154]. Сравнивая защитное действие глюкозы и сахарозы, Scott установил, что из-за наличия карбонильных групп глюкоза иногда оказывает токсическое действие на микроорганизмы и снижает выживаемость, в то время как сахароза, не имеющая карбонильных групп, повышает выживаемость микроорганизмов при высушивании. В связи с этим при составлении защитных сред предпочтение отдают сахарозе [180]. Показано, что что наиболее эффективны смесь белков и сахаров [53].

Для повышения выживаемости клеток молочнокислых бактерий Л.А. Банниковой и другими было рекомендовано в защитную среду добавлять буферные

соли [3, 5]. При создании защитных сред для производства ЗПВ, используемых в пищевой промышленности, в качестве криопротекторов должны использоваться вещества, имеющие статус пищевых.

Согласно исследованиям [88, 98] содержание влаги в ЗПВ не должно превышать 5%. По данным многих исследователей, чем выше температура хранения, тем больше гибнет клеток в сухих заквасках. Наиболее благоприятной температурой хранения является минус (20 ± 2) °С [88].

Заключение к литературному обзору

Из обзора литературных данных следует, что запросы функционального питания предопределили необходимость создания кисломолочных продуктов, содержащих пробиотические, в том числе молочнокислые микроорганизмы, которые являются представителями нормальной кишечной микробиоты человека. Введение в рацион питания таких кисломолочных продуктов, способствуют оздоровлению человека и предупреждению развития различных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Производство кисломолочных 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*. Создание ЗПВ пробиотических микроорганизмов для технологии кисломолочных продуктов позволит расширить ассортимент кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами.

Глава 2 Организация работы, объекты и методы исследований

2.1 Организация работы

Экспериментальная часть работы проведена 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» ФИЦ Биотехнологии РАН. Опытную проверку разработанной технологии закваски прямого внесения *L.reuteri* LR1 осуществляли на производстве ООО «Лактосинтез», которая подтверждена «Актом промышленной выработки закваски прямого внесения *L.reuteri* LR1».

Опытную проверку разработанной технологии кисломолочного продукта «Релакт» осуществляли на производстве ООО «МОЛОДЕЛ», которая подтвержлена «Актом опытно-промышленной выработки». Медико-биологическая оценка кисломолочного продукта «Релакт», выработанного с использованием созданной закваски прямого внесения *L.reuteri* LR1, проводились *in vivo* на крысах линии Wistar в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Работа выполнялась в рамках темы 0587-2014-0008 «Провести селекцию и идентификацию пробиотических штаммов *Lactobacillus reuteri* с использованием современных микробиологических и молекулярно-генетических методов» (с 2014 по 2019)

Исследования проводились в соответствии со схемой, представленной на Рисунке 1.

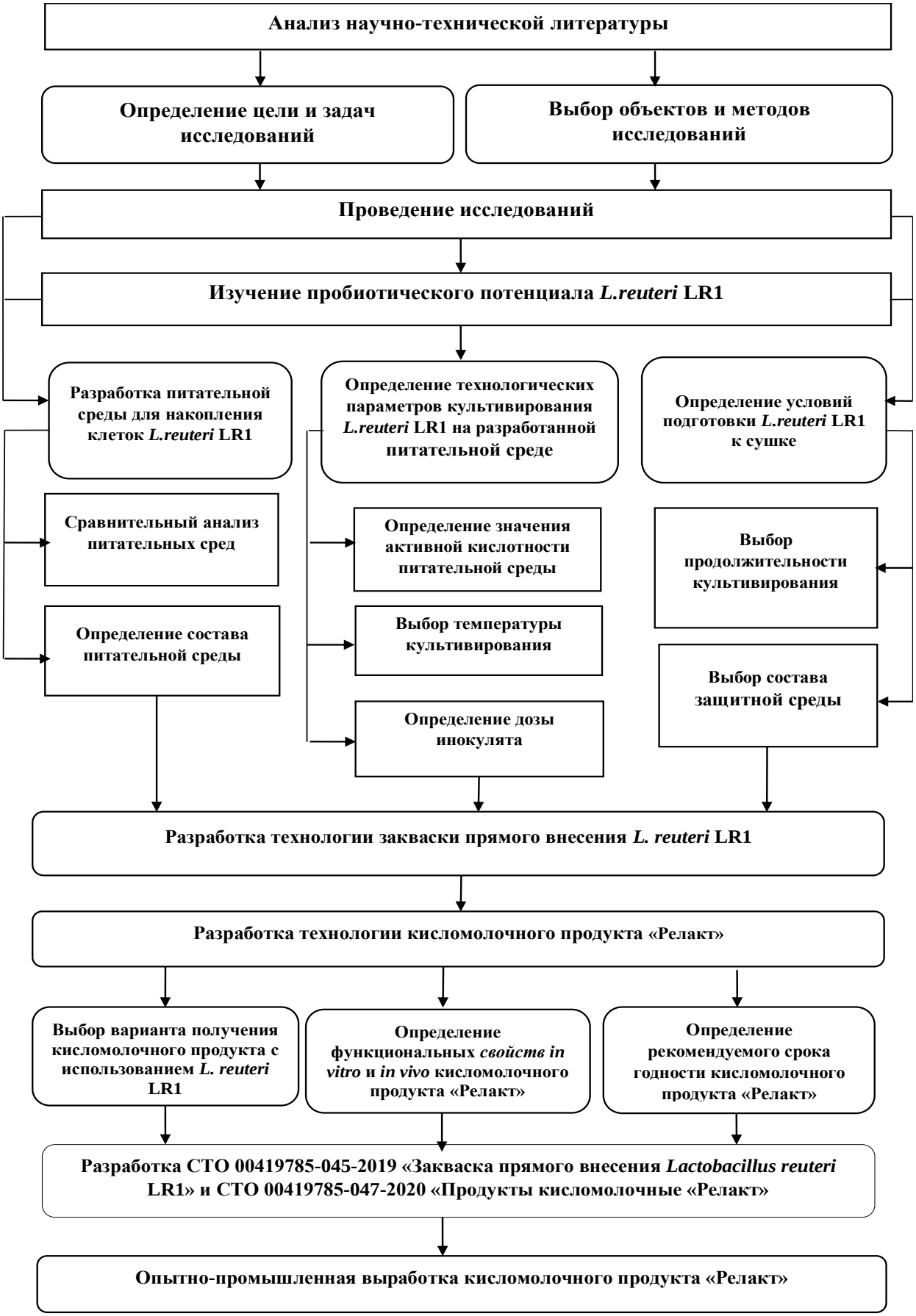


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

2.2 Объекты и методы исследований

2.2.1 Объекты исследований

Объектами исследований являются:

- штамм *L. reuteri* LR1 (GenBank MN994628) из коллекции культур молочнокислых бактерий, пробиотических бактерий Центральной лаборатории микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ»;

- закваска прямого внесения *L. reuteri* LR1;

- кисломолочный продукт «Релакт».

2.2.2 Методы исследований

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

Кислотообразующую активность штамма *L. reuteri* LR1 определяли на приборе параллельных биореакторов DASGIP (Германия) при внесении 1% инокулята, приготовленного на питательной среде MRS-бульон (ООО «НПЦ «Биокомпас-С», Россия) в обезжиренное молоко (с ростовыми факторами и без) и культивированием в течение 24 часов при температуре (37 ± 1) °С с автоматическим измерением активной кислотности. В качестве ростовых факторов использовали дрожжевой экстракт, ГМК–2 и ГМК–3 (ООО «НПЦ «Биокомпас-С», Россия).

Антагонистическую активность штамма *L. reuteri* LR1 определяли методом развивающихся смешанных популяций в сравнении с ростом тест - штаммов в монокультурах по МУ 2.3.2.2789-10 [23]. Тест-штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 были

получены из ФБУН ГНЦ ПМБ (Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск). Тест-культуры *S. aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028 выращивали на скошенном питательном агаре при температуре (37 ± 1) °С в течение 18 ч. Для совместного культивирования в 20 $см^3$ питательной среды MRS-бульон вносили по 1 $см^3$ инокулята *L. reuteri* LR1 и по 1 $см^3$ суспензии тест-штамма. В качестве контроля - пробирки с монокультурами тест-штаммов. Сокультивирование проводили при температуре (37 ± 1) °С. Через 24 ч и 48 ч из опытных и контрольных пробирок готовили ряд последовательных десятикратных разведений в физиологическом растворе. Из разведений делали посевы на селективные среды, термостатировали 72 ч при температуре (37 ± 1) °С, после чего подсчитывали количество клеток тест-штаммов.

Кратность угнетения роста тест-штаммов культурой *L. reuteri* LR1 рассчитывали по формуле:

$$К=N_k/N_o, \qquad (1)$$

где К – кратность угнетения роста тест-штамма;

N_K – число колоний тест-штамма, выросших в контрольной пробе;

N_o – число колоний тест-штамма, выросших в опытных пробах.

Показатель К рассчитывали через 24 ч роста тест-штаммов в контрольных (монокультура) и опытных (сокультивирование) пробах.

Определение устойчивости штамма *L. reuteri* LR1 к антибиотикам проводили по МУК 4.2.1890-04 [25] диско-диффузионным методом, который основан на способности антимикробных препаратов диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара с использованием индикаторных дисков с противомикробными лекарственными средствами ДИ-ПЛС-50-01 по ТУ 9398-001-39484474-2000 (ООО «научно-исследовательский центр «Фармакотерапии», Россия). Критерии интерпретации результатов для оценки чувствительности *L.*

reuteri LR1 проводили по МУ 2.3.2.2789-10 [23]. Исследования были проведены с целью уточнения показателей в паспорте на штамм (Приложение 1).

Пробоподготовку образцов ферментированного *L. reuteri* LR1 молока для определения протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей, проводили следующим образом: для получения белково-пептидных фракций образцов ферментированного молока аликвоту (15 мл) каждого образца центрифугировали в течение 30 мин при температуре (4 ± 1) °С и угловой скорости 4400 об./мин на центрифуге 5702R (Eppendorf, Германия) с последующей фильтрацией надосадочной жидкости вместе с жировым слоем через складчатый бумажный фильтр (MN 640W, Macherey-Nagel, Германия). Активную кислотность фильтрата доводили до значения 4,60 ед.pH добавлением 0,1М раствора гидроксида натрия с последующим центрифугированием полученной смеси при (4 ± 1) °С в течение 30 мин при угловой скорости 4400 об./мин и фильтрацией надосадочной жидкости через шприцевые фильтры с гидрофильной мембраной с диаметром пор 0,20 мкм (Sartorius, Германия). Полученные белково-пептидные фракции замораживали и хранили при температуре минус (73 ± 1) °С до проведения анализа. Перед проведением анализа, образцы белково-пептидных фракций ферментированного молока размораживали и дополнительно фильтровали с помощью шприцевых фильтров с гидрофильной PVDF-мембраной с диаметром пор 0,45 мкм (Carl Roth, Германия).

В полученных таким образом образцах белково-пептидных фракций ферментированного *L. reuteri* LR1 обезжиренного молока определяли протеолитическую, антиоксидантную и АПФ-ингибирующую активности.

Протеолитическую активность *L. reuteri* LR1 определяли путем измерения количества высвобождаемых аминогрупп в супернатантах с использованием метода TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота).

Реакцию взаимодействия аминогрупп с TNBS проводили в пластиковых фальконах объемом 15 мл с винтовой пробкой. В фалькон последовательно вносили по 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, (pH = 8,20), 200 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия, 50 мкл приготовленной как описано выше

пробы белково-пептидной фракции ферментированного молока и 2 мл свежеприготовленного 0,1% водного раствора TNBS.

В фалькон с холостой пробой вносили 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, (pH = 8,20), 250 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия, и 2 мл свежеприготовленного 0,1% раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты.

В фальконы с различными концентрациями стандарта вносили 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера (pH = 8,20), 250 мкл раствора стандарта, и 2 мл свежеприготовленного 0,1% раствора TNBS.

В качестве стандарта для определения протеолитической активности использовали L-лейцин. Из базового раствора лейцина с концентрацией 3,0 ммоль/дм^3 в 1% растворе додецилсульфата натрия приготавливали серию разведений в 1% водном растворе додецилсульфата натрия с концентрациями L-лейцина в диапазоне значений 0,15 – 3,0 ммоль/дм^3.

Фальконы с опытными, холостой и стандартными пробами плотно закрывали винтовыми пробками и встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 10 с, затем инкубировали на водяной бане GFL (Германия) с непрозрачной крышкой при температуре (50 ± 1) °С в течение 1 ч. По завершении инкубации для остановки реакции в каждый фалькон вносили по 4,0 мл 0,1 М раствора соляной кислоты. Фальконы плотно закрывали винтовыми пробками, встряхивали на вортексе PV1 в течение 10 с, и выдерживали 30 мин при комнатной температуре для охлаждения.

Для определения оптической плотности по 200 мкл раствора из каждого фалькона (в 3-х повторностях) переносили в лунки 96-луночных несорбирующих УФ-прозрачных планшетов с плоским профилем дна UV-Star (Greiner BioOne, Германия). Оптическую плотность растворов при длине волны 340 нм определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 (Bio Tek, США).

Калибровочная кривая представлена на рисунке 2. Результаты измерений выражали в ммоль/дм^3 эквивалентов L-лейцина.

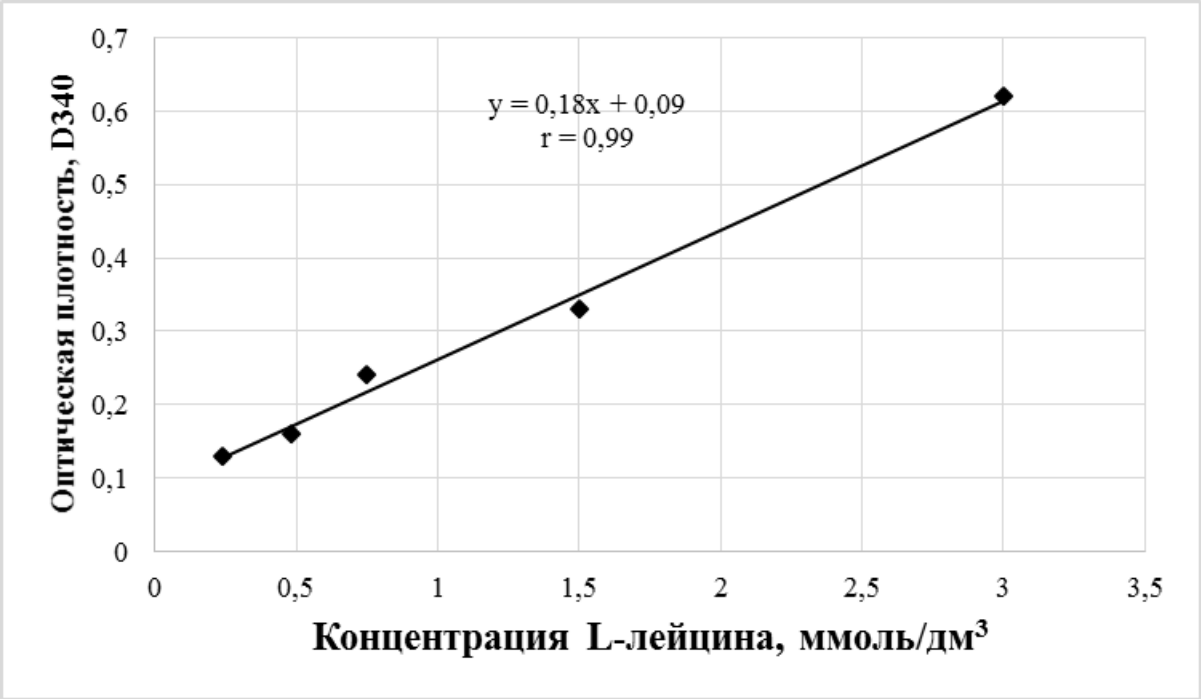


Рисунок 2 – Калибровочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации L-лейцина в реакционной смеси

Определение антиоксидантной активности в образцах ферментированного *L. reuteri* LR1 молока проводили по методу ORAC (oxygen radical absorbance capacity – поглощающая способность кислородных радикалов) [149, 158]. Данный метод основан на способности антиоксидантов перехватывать пероксильные радикалы, образующиеся при термическом разложении органических азосоединений, и измерении уменьшения (гашения) флуоресценции (свечения) флуоресцеина, т.к. антиоксиданты нейтрализуют воздействие свободных радикалов на флуоресцеин.

Пероксильный радикал генерировался непосредственно в реакционной среде при термическом распаде азосоединения 2,2’-азобис (2-этилпропионамидина) дигидрохлорида (AAPH), инициируемом путем инкубации при температуре (37 ± 1) °С в течение 10 мин.

Реакционная смесь содержала 15 мкл раствора исследуемого образца или стандарта и 115 мкл $8{,}16\times10^{-8}$ М свежеприготовленного раствора флуоресцеината натрия в 75 мМ Na-фосфатном буфере (pH = 7,40).

В качестве стандарта для оценки антиоксидантной активности использовали тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) – водорастворимый аналог токоферола (витамин Е). Активность тролокса условно принимается за единицу, а антиоксидантная активность исследуемого вещества (образца) выражается в эквивалентных молях тролокса на массу образца (мкмоль/мг).

Реакцию инициировали добавлением 15 мкл свежеприготовленного 0,6 М раствора ААРН (Sigma, США) в 75 мМ Na-фосфатном буфере во всех вариантах, кроме контроля 3. В реакционную смесь контроля 3 вносили 15 мкл 75 мМ Na-фосфатного буфера (pH = 7,4) вместо 15 мкл свежеприготовленного 0,6 М раствора ААРН в 75 мМ Na-фосфатном буфере (pH = 7,4). Реакционную смесь инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 30 с при интенсивном перемешивании (скорость вращения 1200 об/мин) на микропланшетном термошейкере-инкубаторе PHMP Grant Bio (Великобритания).

При определении антиоксидантной активности были использованы 3 варианта контролей (таблица 1).

Таблица 1 – Состав реакционных смесей, вносимых в контроли $К_1$ – $К_3$.

Вариант контроля	Состав реакционной смеси
$К_1$	15 мкл Na-фосфатного буфера и 115 мкл $8{,}16\times10^{-8}$ М раствора флуоресцеината натрия в 75 мМ Na-фосфатном буфере, pH = 7,40
$К_2$ (для 0% интенсивности флуоресценции)	130 мкл 75 мМ Na-фосфатного буфера, pH = 7,40
$К_3$ (для 100% интенсивности флуоресценции)	15 мкл Na-фосфатного буфера и 115 мкл $8{,}16\times10^{-8}$ М раствора флуоресцеината натрия в 75 мМ Na-фосфатном буфере, pH = 7,40

Кинетику убыли интенсивности флуоресценции регистрировали в течение 50 мин с при температуре (37 ± 1) ºС на фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США) (длина волны возбуждения – 485 нм, длина волны испускания – 528 нм).

Относительную интенсивность флуоресценции ($I_{отн}$) исследуемых образцов рассчитывали по уравнению:

$$I_{отн}=(I - I_{0\%}) / (I_{100\%} - I_{0\%}), \qquad (2)$$

где: $I_{0\%}$ – интенсивность флуоресценции в $К_2$;

$I_{100\%}$ – интенсивность флуоресценции в $К_3$.

Полученные значения использовали для построения кинетических кривых убыли $I_{отн}$. Интегрируя в программе OriginPro 8.0, рассчитывали величину площади под кривой убыли интенсивности флуоресценции (AUC), что соответствует светосумме флуоресценции флуоресцеина. Приведенную площадь под кривой (net AUC) рассчитывали, как разность площадей под кинетическими кривыми в присутствии антиоксидантов (стандарт или образец) и их отсутствии ($К_1$). Калибровочная кривая зависимости приведенной площади (net AUC) для тролокса от его концентрации в пробе (С, мкмоль) (рисунок 3) характеризуется высокой достоверностью линейной аппроксимации (r = 0,99) и позволяет рассчитывать величину антиоксидантной активности образцов ферментированного молока по отношению к пероксильному радикалу в ммоль эквивалентов тролокса (ТЭ) согласно уравнению:

$$AOA= ((net\ AUC - B) \times R)/F\times 1000, \qquad (3)$$

где: В – свободный член уравнения, описывающего калибровочный график;

F – тангенс угла наклона калибровочной зависимости (рисунок 3);

R – фактор разбавления;

1000 – коэффициент пересчета с мкмоль на ммоль.

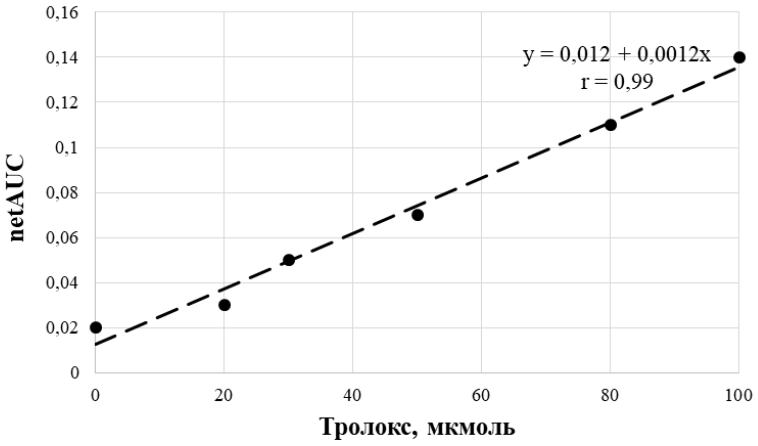


Рисунок 3 – Калибровочная кривая зависимости приведенной площади под кинетической кривой (net AUC) от концентрации стандартного антиоксиданта (тролокса) в пробе

АПФ-ингибирующую (гипотензивную) активность *in vitro* в образцах ферментированного *L. reuteri* LR1 обезжиренного молока определяли по их способности ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент (АПФ) – ключевое звено ренин-ангиотензиновой системы, регулирующей кровеносное давление у человека. Наиболее чувствительным методом определения АПФ-ингибирующей активности вещества является метод с использованием АПФ-субстратов с внутренним тушением флуоресценции.

Для анализа готовили серию разведений образцов в дистиллированной воде с фактором разбавления 2-32 раза. Лиофилизированный препарат ангиотензин-1-превращающего фермента (АПФ) из легкого кролика, содержащий 0,1 ед. фермента, растворяли в 1 см^3 0,1 М трис-HCl буфера, содержащего 50 ммоль хлорида натрия и 10 мкмоль хлорида цинка. Контроль активной кислотности буферного раствора проводили с помощью pH-метра Seven easy (Mettler Toledo, Германия), снабженного комбинированным стеклянным электродом с точностью определения pH 0,02 ед.

В качестве субстрата с внутренним тушением флуоресценции использовали

трифторацетат о-аминобензоил-фенилаланил-аргинил-лизил (динитрофенил)-пролина (Sigma, США). Для приготовления базового раствора 1 мг субстрата растворяли в 5 $см^3$ диметилсульфоксида (DMSO). Концентрацию субстрата в полученном растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 365 нм. Контроль оптической плотности раствора субстрата проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США) с пределом измерений в диапазоне значений оптической плотности от 0,001 до 3,500. Непосредственно перед анализом базовый раствор субстрата разводили 0,1 М трис-HCl буфером (pH = 7,50), содержащим 50 ммоль хлорида натрия и 10 мкмоль хлорида цинка, до концентрации 10 мкмоль.

Анализ АПФ-ингибирующей активности проводили в 96-луночных полипропиленовых черных несорбирующих микропланшетах (Greiner Bio One, Германия). В лунки микропланшета вносили по 20 мкл раствора ангиотензин превращающего фермента (АПФ). Затем в контрольные лунки вносили 20 мкл деионизированной воды, в лунки с образцами – по 20 мкл растворов исследуемых образцов. Планшеты закрывали покровной пленкой и инкубировали в микропланшетном шейкере-инкубаторе PHMP (Grant Bio, Великобритания) при температуре (37 ± 1) °С и скорости перемешивания 600 об./мин в течение 30 мин. Затем в каждую лунку вносили по 160 мкл раствора субстрата. Кинетику возрастания интенсивности флуоресценции исследовали в течение 15 мин с интервалом в 20 с на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США) при температуре (37 ± 1) °С, длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции – 320 и 420 нм соответственно.

Строили зависимость процента ингибирования АПФ от десятичного логарифма фактора разбавления исходного образца ферментированного молока и методом линейной интерполяции определяли фактор разбавления образца, при котором наблюдается 50% ингибирование активности АПФ (IC_{50}). Величину IC_{50} для образцов ферментированного молока, выраженную в мг белка/$см^3$, рассчитывали путем деления концентрации белка в образце (в мг/$см^3$) на величину фактора разбавления, при котором наблюдается 50% ингибирование активности

АПФ. Концентрацию белка в препаратах определяли с использованием коммерческого набора BCA assay kit (ThermoFisher, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение пептидного профиля в образцах обезжиренного молока, ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1, проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС). Для ВЭЖХ-МС анализа использовали систему, состоящую из хроматографа Agilent 1100 («Agilent Technologies», США) и масс-спектрометра LTQ-FT Ultra («Thermo», Германия). Для разделения пептидов использовали обращенно-фазовую градиентную хроматографию (колонка Reprosil-Pur Basic C18, 75 мкм×12 см, 3 мкм; Dr.Maisch HPLC GmbH, Аммербух-Энтринген, Германия).

Для анализа полученные белково-пептидные фракции ферментированного обезжиренного молока разводили деионизованной водой до концентрации 0,3 мг/см^3 и вносили в хроматографические виалы по 20 мкл образца. Проводили 3 закола каждого образца по 1 мкл. Между двумя образцами проводился 1 закол 4 мкл 50% ацетонитрила для предотвращения переноса и контаминации образцов. Описание хроматографического метода приведено в таблице 2.

Таблица 2 – Градиентная программа Элюент А – 0,1% муравьиной кислоты в хроматографически чистой воде. Элюент В – 0,1% муравьиной кислоты в хроматографически чистом ацетонитриле.

Интервал, мин	Скорость потока, мл/мин	Элюент А, % об	Элюент В, % об
0 – 15	0,3	97	3
15 – 45	0,3	97 → 50	3 → 50
45 –50	0,3	50 → 10	50 → 90
50 – 60	0,3	10	90
60 – 65	0,3	10 → 3	90 → 3

65 – 75	0,3	97	3

Масс-спектрометрический анализ проводился на тандемном масс-спектрометре LTQ FT Ultra в 2-х стадийном режиме автоматического измерения спектров. На первой стадии в ИЦР ячейке масс-спектрометра измерялись точные массы пептидов в диапазоне m/z 300 – 1600 и разрешением R = 50000 для m/z 400. На второй стадии в линейной ионной ловушке детектировали ионы-фрагментов, образующихся при столкновительно-индуцированной фрагментации (CID) пяти пиков с максимальной интенсивностью. Молекулярные ионы, для которых фрагментация уже была проведена, динамически исключались из рассмотрения на 30 секунд.

Контроль результатов ВЭЖХ-МС проводили с помощью программы QualBrowser. С помощью программы Raw2msm из масс-хроматограмм были получены списки точных масс пептидов и масс их фрагментов и использованы для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., США, version 8.5). Для идентификации пептидов использовалась аминокислотная последовательность белка согласно базе данных UniprotKB. Для идентификации использовались следующие параметры поиска: фермент –None (нативные пептиды); точность масс для родительского иона – 15 ppm; точность масс для MS/MS фрагментов – 0,50 Да; возможные модификации – окисление метионина, гистидина, триптофана (Oxidation (HW): 15,99 Oxidation (M): 15,99), деамидирование остатков глутамина и аспарагина (Deamidation (NQ): 0,98), а также карбамидометилирование цистеинов (Carbamidomethylation: 57,02). Также проводился анализ с использованием режима поиска с допустимым отклонением.

Для графического представления в цветовой гамме полученных данных были построены тепловые карты (англ. heatmap) для пептидов β-, α_{S1}-, κ- и α_{S2}-казеинов коровьего молока с использованием веб-приложения для визуализации пептидомных данных Peptigram [140] Интенсивность окраски пропорциональна суммарной интенсивности ионов пептидов, при этом тёмно-зелёный цвет

указывает на высокую интенсивность сигнала пептида, а светло-зелёный указывает соответственно на низкую интенсивность.

Все питательные среды, используемые в данной работе, готовили в соответствии с методическими указаниями и инструкциями производителей по их приготовлению. Разработанную питательную среду готовили на дистиллированной воде и стерилизовали при при температуре (118 ± 2) °С с выдержкой (60 ± 5) мин. Перед стерилизацией устанавливали активную кислотность с помощью молочной кислоты или 20% - ного раствора NaOH.

Все работы, связанные с приготовлением инокулята, проводили с соблюдением асептических условий: в микробиологическом боксе и соблюдением правил работы с микроорганизмами. Инокулят готовили на питательных средах путем добавления 0,1% культуры и термостатировании при температуре (37 ± 1) °С в течение 16 часов.

Биомассу смешивали с приготовленными заранее защитными средами в соотношении 1:1, разливали по 2 $см^3$ в стерильные стеклянные флаконы, замораживали в морозильной камере при температуре минус (18 ± 2) °С в течение 16 часов и сушили в течение 18 – 20 часов. Сублимационное высушивание клеток микроорганизмов проводили с использованием сушилки FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry Systems (Labconco, США).

Для расчета процента выживаемости клеток микроорганизмов при высушивании, была использована формула:

$$В = (К_{после} / К_{до}) \times 100, \qquad (4)$$

где $К_{до}$ – концентрация жизнеспособных клеток микроорганизмов в фиксированном объеме перед высушиванием во флаконе, КОЕ;

$К_{после}$ – концентрация жизнеспособных клеток микроорганизмов в фиксированном объеме после сушки (или хранения), КОЕ.

В питательных средах и защитных средах определяли КМАФАнМ по ГОСТ 32901 и споры мезофильных аэробных и термофильных микроорганизмов в соответствии с Методическими рекомендациями по организации

производственного микробиологического контроля на предприятиях цельномолочной и молочно-консервной промышленности, в закваске прямого внесения *L.reuteri* LR1 и кисломолочном продукте «Релакт» определяли бактерии группы кишечных палочек по ГОСТ 32901, дрожжи и плесневые грибы по ГОСТ 33566, патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы по ГОСТ 31659, *S. aureus* по ГОСТ 30347. Рекомендуемые сроки годности определяли по МУК 4.2.1847–04 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов» [24].

При проведении исследований температуру питательных сред, закваски прямого внесения *L.reuteri* LR1 и кисломолочного продукта «Релакт» контролировали по ГОСТ 26754, активную кислотность определяли в питательных средах, защитных средах и культуральной среде с *L.reuteri* LR1 по ГОСТ 32892, в кисломолочном продукте «Релакт» определяли титруемую кислотность по ГОСТ 3624, массовую долю жира кислотный методом по ГОСТ 5867, массовую долю белка определяли методом Къельдаля по ГОСТ 23327, массовую долю влаги и сухого вещества в закваске прямого внесения *L.reuteri* LR1 определяли по ГОСТ 30305.1, в кисломолочном продукте «Релакт» по ГОСТ 3626.

Для эффективной постановки опытов и выбора рациональных параметров использовали метод математического планирования эксперимента. Обработку результатов, полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью пакета программ «Microsoft Office», «Statistica 10.0», OriginPro 8.0 по результатам 3 – 5 повторностей.

Глава 3 Исследование пробиотических свойств штамма *Lactobacillus reuteri* LR1

3.1 Исследование *in vitro* антагонистической активности *L. reuteri* LR1

При подборе заквасочных культур для производства кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами, одним из важных критериев является антагонистическая активность штамма к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам.

Результаты исследований по определению антагонистической активности штамма *L. reuteri* LR1 к условно-патогенным микроорганизмам представлены на рисунке 4.

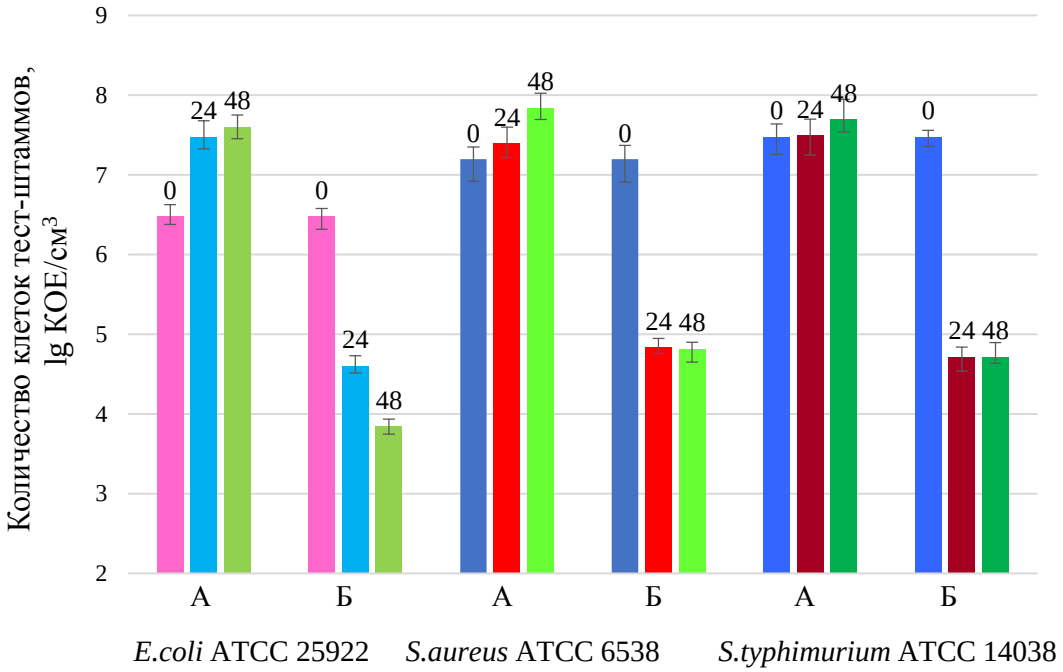


Рисунок 4 – Антагонистическая активность *L. reuteri* LR1 *in vitro*

Установлено, что при сокультивировании с *L. reuteri* LR1 содерание тест-штаммов достоверно снижается, и через 24 ч составляет для *E. coli* АТСС 25922 – 4×10^4 КОЕ/см^3, для *S. aureus* АТСС 6538 – $6{,}9\times10^4$ КОЕ/см^3, а для *S. typhimurium* АТСС 14028 – $5{,}25\times10^4$ КОЕ/см^3 соответственно. Через 48 ч количество *E. coli* АТСС 25922 снизилось еще на порядок и составило 7×10^3 КОЕ/см^3, количество клеток *S. aureus* АТСС 6538 и *S. typhimurium* АТСС 14028 практически не изменилось и составило $6{,}6\times10^4$ КОЕ/см^3 и $5{,}2\times10^4$ КОЕ/см^3 соответственно. Данные по кратности угнетения роста тест-штаммов культурой *L. reuteri* LR1 представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Кратность угнетения роста тест-штаммов культурой *L. reuteri* LR1

№ п/п	Продолжительность сокультивирования, ч	Тест-штамм	Кратность угнетения роста
1	24	*E. coli* АТСС 25922	779,22 ± 37
2	24	*S. aureus* АТСС 6538	362,32 ± 14
3	24	*S. typhimurium* АТСС 14028	605,77 ± 23

Из представленных данных видно, штамм *L. reuteri* LR1 обладает выраженной антимикробной активностью, которая варьируется в зависимости от используемой тест-культуры и продолжительности сокультивирования штаммов. Так, наибольшую антагонистическую активность штамм *L. reuteri* LR1 проявлял по отношению к *E. coli* АТСС 25922, кратность угнетения роста этого штамма при сокультивировании составила 779,22 ± 37. Кратность угнетения роста *S. typhimurium* АТСС 14028 составила 605,77 ± 23, а *S. aureus* АТСС 6538 – 362,32 ± 14.

3.2 Определение устойчивости *L. reuteri* LR1 к антимикробным препаратам

Важное значение при подборе культур микроорганизмов для пробиотических кисломолочных продуктов и препаратов придается такому свойству как устойчивость к антимикробным препаратам.

Чувствительность штамма *L. reuteri* LR1 к различным антимикробным препаратам является важным показателем его пробиотического потенциала. Данные проведенных исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Устойчивость *L. reuteri* LR1 к антимикробным препаратам

№ п/п	Антибактериальный препарат	Доза вещества на диске, мкг	Диаметр зоны задержки роста, мм	Категория чувствительности лактобактерий [25]
Аминогликозиды				
1	Гентамицин	120	12 ± 0,5	R
	Канамицин	30	9 ± 1	R
2	Неомицин	30	13 ± 0,5	I
Пенициллины				
3	Амоксициллин	20	25 ± 1	S
4	Ампициллин	10	15 ± 0,5	I
5	Бензилпенициллин	10	10 ± 1	R
6	Оксациллин	1	10 ± 1	R
Фторхинолоны				
8	Левофлоксацин	5	9 ± 1	R
9	Пефлоксацин	5	–	R
Тетрациклины				
10	Доксициклин	30	8 ± 1	R
11	Тетрациклин	30	–	R
Макролиды-азалиды				
12	Азитромицин	15	9 ± 1	R
Другие				
13	Линкомицин	15	27 ± 1	S
14	Левомицетин	30	31 ± 1	S
15	Фосфомицин	200	10 ± 0,5	R

В результате проведенных исследований установлено, что штамм *L. reuteri* LR1 был чувствителен к линкомицину, амоксициллину и левомицетину, проявлял промежуточную устойчивость к ампициллину и неомицину, и обладал устойчивостью к остальным изучаемым антимикробным препаратам. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм *L. reuteri* LR1 является антибиотикоустойчивым и может быть рекомендован для применения в виде бактериального препарата или в составе кисломолочного продукта совместно с определенными антибиотиками для более эффективной нормализации микробиоты ЖКТ.

3.3 Определение *in vitro* протеолитической, антиоксидантной, АПФ-ингибирующей активности штамма *L. reuteri* LR1

Данные по изменению протеолитической, антиоксидантной и АПФ ингибирующей активностей в процессе культивирования *L. reuteri* LR1 на обезжиренном молоке представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Динамика изменения протеолитической, антиоксидантной и АПФ–ингибирующей активностей в процессе культивирования штамма *L. reuteri* LR1 на обезжиренном молоке

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

В процессе сквашивания обезжиренного молока штаммом *L.reuteri* LR1 происходит снижение активной кислотности (pH) в результате сбраживания углеводов молока с образованием органических кислот, а также ферментативный гидролиз белков молока (протеолиз), преимущественно различных фракций казеина, синтезируемыми *L.reuteri* LR1 протеазами и/или пептидазами с образованием пептидов.

В результате проведенных исследований установлено, что в первые 24 часа сквашивания молока штаммом *L. reuteri* LR1 происходит достоверное повышение антиоксидантной (414,61 ± 26) мкмоль ТЭ и АПФ-ингибирующей активности (2,63 ± 0,29) (IC_{50}) мг/см^3 на фоне снижения количества эквивалентов L-лейцина (2,86 ± 0,34) 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/см^3 до $1{,}9\times10^7$ КОЕ/см^3. В последующие 24 часа культивирования рост клеток *L. reuteri* LR1 достигает наибольшего значения $4{,}5\times10^8$ КОЕ/см^3. При этом через 72 ч наблюдается увеличение АПФ-ингибирующей активности (IC_{50} 1,07 ± 0,13 мг/см^3) на фоне повышения количества эквивалентов L-лейцина (6,35 ± 0,76), а антиоксидантная активность остается практически неизменной до конца культивирования и через 72 ч составляет (422,72 ± 31) мкмоль ТЭ.

Полученные для штамма *L. reuteri* LR1 значения протеолитической и антиоксидантной активности сквашенного обезжиренного молока соответствуют имеющимся в литературе данным для других пробиотических штаммов *Lactobacillus* [54, 185]. По величине АПФ-ингибирующей активности, сквашенное штаммом *L. reuteri* LR1 молоко соответствуют диапазону величин IC_{50}, описанных в литературе для кисломолочных продуктов [149].

3.4 Определение пептидного профиля в образцах молока, ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1

Чтобы получить более глубокое представление о процессе развития антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активности был определен профиль пептидов. Данные по определению пептидного профиля исходного обезжиренного молока и обезжиренного молока, ферментированного *L.reuteri* LR1 представлены на рисунке 5. Для иллюстрации закономерностей протеолиза казеиновых фракций коровьего обезжиренного молока все выделенные пептиды были нанесены на карту аминокислотных последовательностей β-, α_{S1}-, α_{S2} - и к-казеинов (рисунок 5).

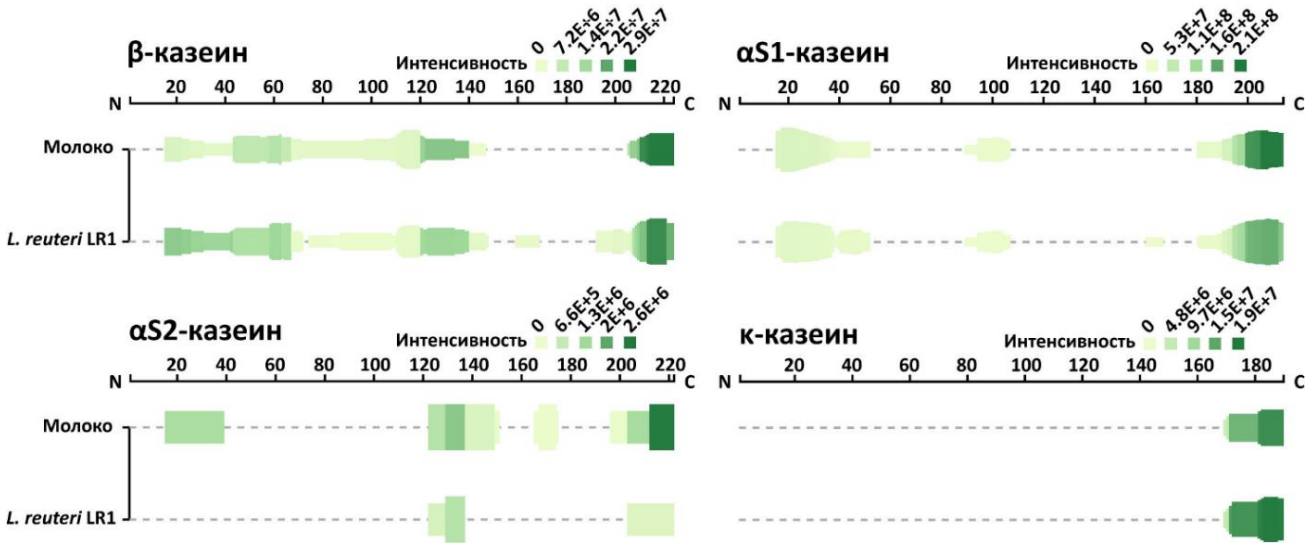


Рисунок 5 – Пептидный профиль (Тепловая карта данных пептидомики) Интенсивность цвета пропорциональна нормализованной интенсивности ионов пептидов, причем тёмно-зеленый цвет указывает на высокую интенсивность, а светло-зеленый соответственно на низкую интенсивность

Как видно из результатов, представленных на рисунке 5, пептидный профиль обезжиренного молока, ферментированного *L.reuteri* LR1 заметно отличается от пептидного профиля исходного молока. В результате анализа пептидных фракций образцов было идентифицировано 277 пептидов, которые образовались в результате протеолиза различных белков (таблица 6). Перечень пептидов, идентифицированных в составе белково-пептидных фракций образцов исходного

и ферментированного *L. reuteri* LR1 обезжиренного молока, представлен в Приложении 2 и Приложении 3.

Таблица 6 – Количество идентифицированных пептидов казеиновых и неказеиновых белков в образцах исходного и ферментированного *L. reuteri* LR1 обезжиренного молока

Образцы	Всего пептидов	β казеин	α_{s1} казеин	α_{s2} казеин	κ казеин	Неказеиновые белки
Молоко, ферментированное *L.reuteri* LR1	151	54	75	10	3	9
Контроль (исходное молоко)	126	39	61	6	12	8

По сравнению с контрольным образцом исходного молока в ферментированном молоке на фоне увеличения числа пептидов из β-казеина, αs1-казеина и αs2-казеина снижается количество пептидов из κ-казеина. Установлено, что *L. reuteri* LR1 способна расщеплять β-казеин почти по всей длине его последовательности; aS1-казеин был преимущественно расщеплен на его N– и C–концах, а κ-казеин на его C–конце. В случае aS2-казеина *L. reuteri* LR1 выполнял расщепление только на C–конце.

При сравнении обнаруженных пептидов с базой данных Milk Bioactive Peptide Database было обнаружено 5 полных совпадений с пептидами, функциональные свойства которых ранее были описаны в научной литературе (таблица 7).

Таблица 7 – Некоторые пептиды, обнаруженные в составе белково-пептидной фракции обезжиренного молока, ферментированного *L. reuteri* LR1, с ранее описанными биологическими активностями

Пептид	Белок предшественник	Функция пептидов	Ссылка
YQEPVLGPVRGPFPIIV	β-казеин	АПФ-ингибирующая Антимикробная Иммуномодуляторная	[56] [162]
VKEAMAPK	β-казеин	Антиоксидантная	[124]
KVLPVPQK	β-казеин	Антиоксидантная	[171]
VQVTSTAV	κ-казеин	Антимикробная	[82]
YPFPGPIPN	β-казеин	АПФ-ингибирующая	[173]

Среди идентифицированных в составе образцов пептидов около половины содержат остатки редокс-активных аминокислот (тирозина, триптофана, метионина, цистеина и гистидина), определяющих наличие у данных пептидов антиоксидантных свойств [151]. Так, пептид VKEAMAPK, обладает антиоксидантной активностью в системе с липоксигеназным окислением линоленовой кислоты [124]. Кроме того, в составе образца ферментированного молока идентифицирован октапептид KVLPVPQK, для которого ранее также было показано наличие антиоксидантной активности в системе с липоксигеназным окислением линоленовой кислоты [171].

Анализ полученных пептидов показал, что в состав белково-пептидных фракций сквашенного обезжиренного молока входят также пептиды, содержащие в своем составе фрагменты, для которых по литературным данным показано наличие гипотензивных свойств, обусловленных их АПФ-ингибирующим действием.

Таким образом, в результате проведенной детальной характеристики пептидного профиля белково-пептидной фракции обезжиренного молока,

сквашенного *L. reuteri* LR1 в его составе идентифицированы пептиды, отвечающие за антиоксидантные, гипотензивные и антимикробные свойства, что подтверждается наличием соответствующих активностей ферментированного обезжиренного молока в тестах *in vitro*.

Результаты проведенных исследований доказывают наличие у штамма *L. reuteri* LR1 выраженного пробиотического потенциала и свидетельствуют о возможности использования штамма *L. reuteri* LR1 при производстве заквасок прямого внесения, используемых при производстве кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами. Штамм *L. reuteri* LR1 может быть использован для дальнейших исследований по разработке технологии закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1 и кисломолочного продукта на его основе.

Глава 4 Разработка технологии закваски прямого внесения *Lactobacillus reuteri* LR1

4.1 Разработка состава питательной среды для накопления клеток *L. reuteri* LR1

Основной задачей при производстве заквасок прямого внесения является накопление жизнеспособных клеток и получение их биомассы. Технология заквасок прямого внесения включает в себя культивирование микроорганизмов в питательной среде при отпимальных технологических параметрах и отделение накопленных клеток для получения бактериальной биомассы.

Для культивирования были выбраны наиболее часто используемые питательные среды, такие как гидролизованное молоко, MRS-бульон, ГМК-2, сыворотка молочная. Динамика изменения активной кислотности при культивировании *L. reuteri* LR1 на различных средах в течение 24 часов при температуре (37 ± 1) °С показана на рисунке 6.

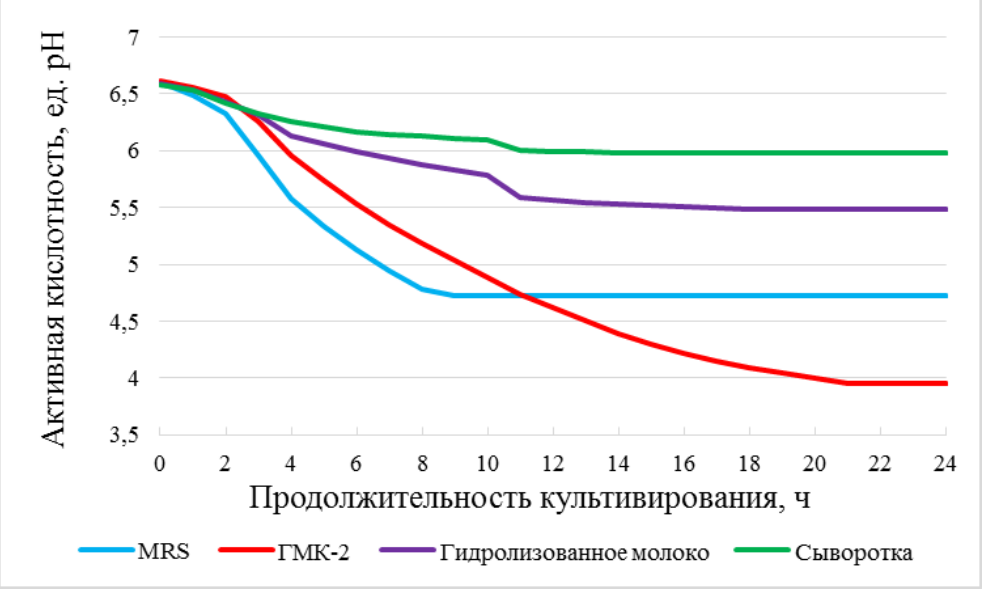


Рисунок 6 – Изменение активной кислотности в процессе культивирования *L. reuteri* LR1 на различных питательных средах

Наибольшая скорость изменения активной кислотности, а значит, и наибольшая скорость роста *L. reuteri* LR1 отмечалась на питательных средах ГМК-2 и MRS-бульон. Через 12 ч культивирования активная кислотность снизилась на (1,99 ± 0,12) ед. pH при использовании питательной среды ГМК-2, на (1,88 ± 0,1) ед. pH при использовании питательной среды MRS-бульон, на (1,03 ± 0,07) ед. pH при использовании гидролизованного молока и на (0,59±0,04) ед. pH при использовании в качестве питательной среды молочной сыворотки.

В качестве азотистой основы для питательных сред широко используются гидролизаты белков молока. Анализ литературных данных поаазал, что для стимулирования развития и накопления клеток *L. reuteri* следует использовать дрожжевой экстракт, инулин, сахарозу, фруктозу, глицерол, цистеин, сернокислые соли марганца и магния, аминокислоты серин и изолейцин, соевой пептон, триптон, Tween-80 [160, 178].

В этой связи, с целью обогащения гидролизованного молока ростовыми веществами, 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) %. Диапазон варьирования факторов представлен в таблице 8. Температура культивирования (37 ±1) °С, доза инокулята 1%, отбор проб проводили через 16 – 17 часов культивирования.

Таблица 8 - Уровни варьирования 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

В соответствии с композиционным планом было проведено 25 опытов с различным варьированием компонентов. С использованием программы «Statistica 10.0» проведен регрессионный анализ (таблица 9) и получено уравнение регресии, описывающее зависимость накопления клеток *L. reuteri* LR1 от исследуемых компонентов (факторов), входящих в состав питательной среды (члены, входящие в уравнение, имеют статистически значимые эффекты – уровень $p<0,05$):

$$y = 9,002 + 0,87308X_2 - 0,69872X_3 - 3,70255X_4 + 9,95274X_5 + 0,07586X_1X_4 - 0,08051X_1X_5 - 1,98279X_2X_5$$

Таблица 9 – Результаты регрессионного анализа (R^2=0.9941)

Члены уравнения	Регресиоонные коэффициенты	Стандартная ошибка	t	p
Свободный член регрессии	9,002	0,686134	13,12013	0,000195
X_1	-0,00770	0,025185	-0,30575	0,775048
X_1^2	-0,00013	0,000157	-0,81777	0,459402
X_2	0,87308	0,183451	4,75918	0,008911
X_2^2	-0,02680	0,022923	-1,16912	0,307271
X_3	-0,69872	0,193811	-3,60517	0,022654
X_3^2	-0,02728	0,022923	-1,19006	0,299825
X_4	-3,70255	0,798672	-4,63588	0,009764
X_4^2	0,78997	0,606218	1,30312	0,262484
X_5	9,95274	2,341843	4,24996	0,013158
X_5^2	0,47278	2,438003	0,19392	0,855687
X_1X_2	-0,00548	0,002173	-2,52371	0,065099
X_1X_3	0,00395	0,002467	1,60066	0,184706
X_1X_4	0,07586	0,013215	5,74039	0,004563
X_1X_5	-0,08051	0,026725	-3,01269	0,039446
X_2X_3	0,01167	0,038811	0,30067	0,778646
X_2X_4	0,02153	0,132407	0,16261	0,878713
X_2X_5	-1,98279	0,359864	-5,50983	0,005294
X_3X_4	-0,34191	0,150639	-2,26973	0,085753
X_3X_5	-0,26927	0,258924	-1,03998	0,357079
X_4X_5	-1,62633	1,763286	-0,92233	0,408555

Из представленных данных видно, что фактор «Дрожжевой экстракт» (X_2) оказывает положительный эффект, «Сахароза» (X_3) оказывает отрицательный эффект, взаимодействие факторов «Гидролизованное молоко» и «Цистеин» (X_1X_4) оказывает положительный эффект.

Для определения влияния факторов «Гидролизованное молоко», «Дрожжевой экстракт» (X_2) и «Сахароза» (X_3) на накопление клеток *L. reuteri* LR1 в питательной среде использовали подогнанные поверхности отклика на 3–уровнях значения фактора «Сахароза» (X_3) (нижнего, центрального и верхнего). Остальные факторы «Цистеин» (X_4) и «Инулин» (X_5) были установлены на центральных значениях (рисунки 7 – 9)

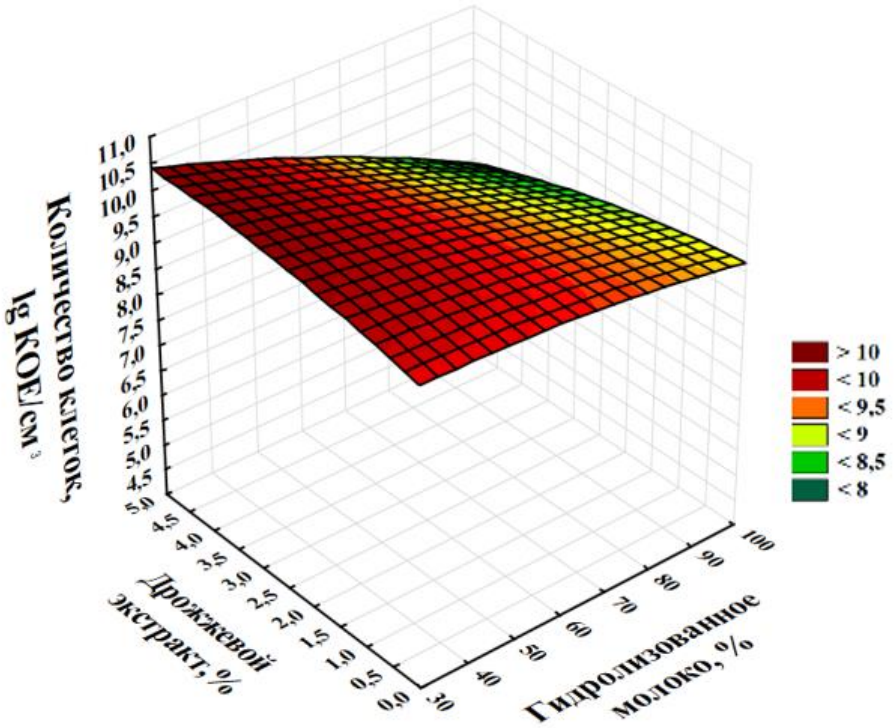


Рисунок 7 – Зависимость количества клеток *L. reuteri* LR1 от концентрации компонентов в питательной среде при «Сахароза» (X_3) = 0%

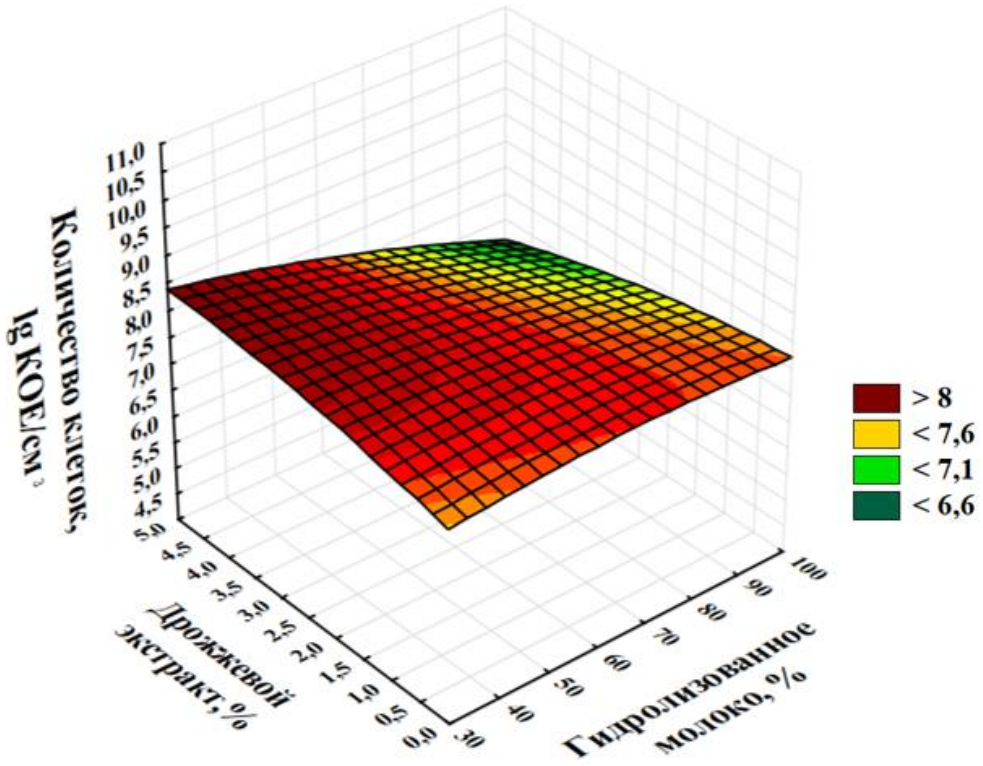


Рисунок 8 – Зависимость количества клеток *L. reuteri* LR1 от концентрации компонентов в питательной среде при «Сахароза» (X_3) = 2,5 %

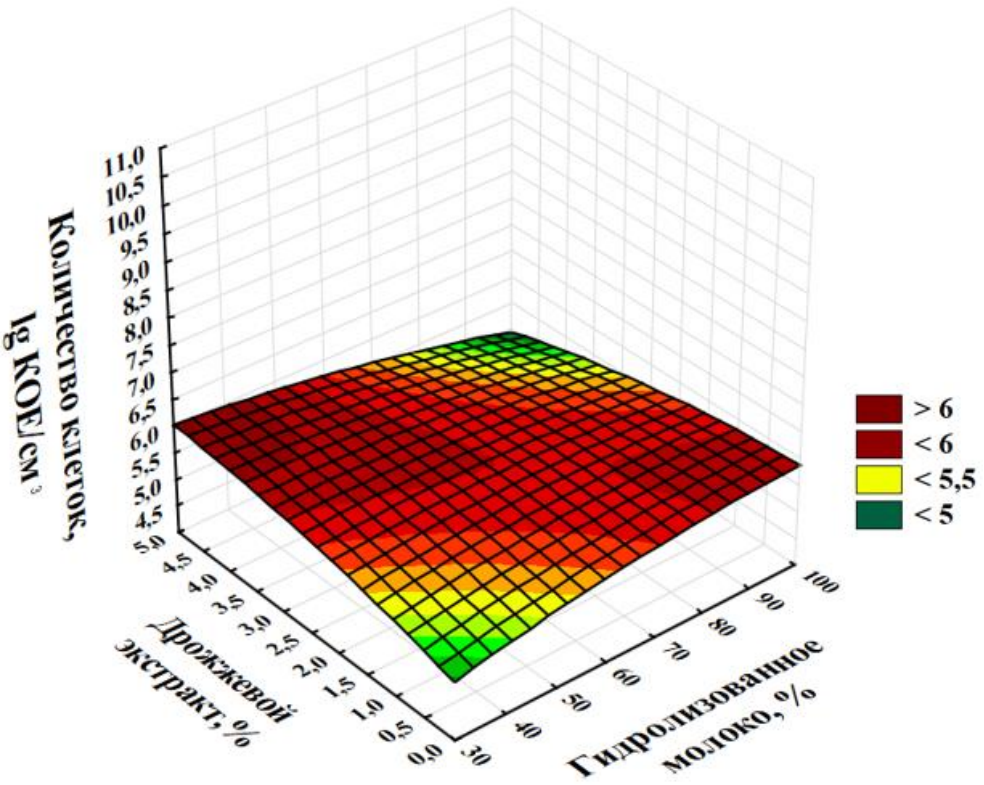


Рисунок 9 – Зависимость количества клеток *L. reuteri* LR1 от концентрации компонентов в питательной среде при «Сахароза» (X_3) = 5 %

Приведенные поверхности отклика зависимости количества клеток от концентрации компонентов в питательной среде при различном содержании сахарозы от 0 до 5% показывают, что наибольшее накопление *L. reuteri* LR1 было получено на питательной среде без добавления сахарозы.

На рисунках 10 – 11 показаны их поверхности отклика влияния факторов «Гидролизованное молоко-Цистеин» (X_1X_4) и «Дрожжевой экстракт-Цистеин» (X_2X_4).

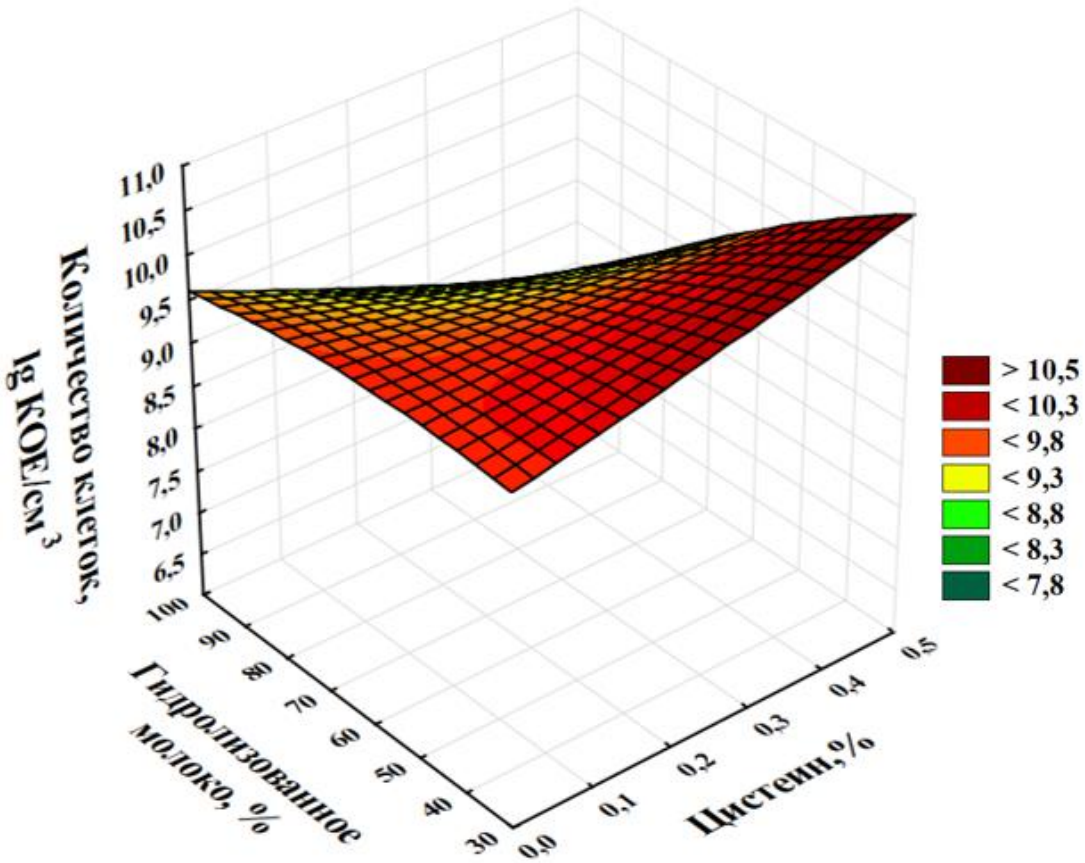


Рисунок 10 – Зависимость количества клеток *L. reuteri* LR1 от концентрации компонентов «Цистеин» (X_4) и «Гидролизованное молоко» (X_1) в питательной среде

Анализ данных, представленных на рисунке 11, показывает, что с увеличением содержания цистеина в составе питательной среде, количество клеток *L. reuteri* LR1 возрастает.

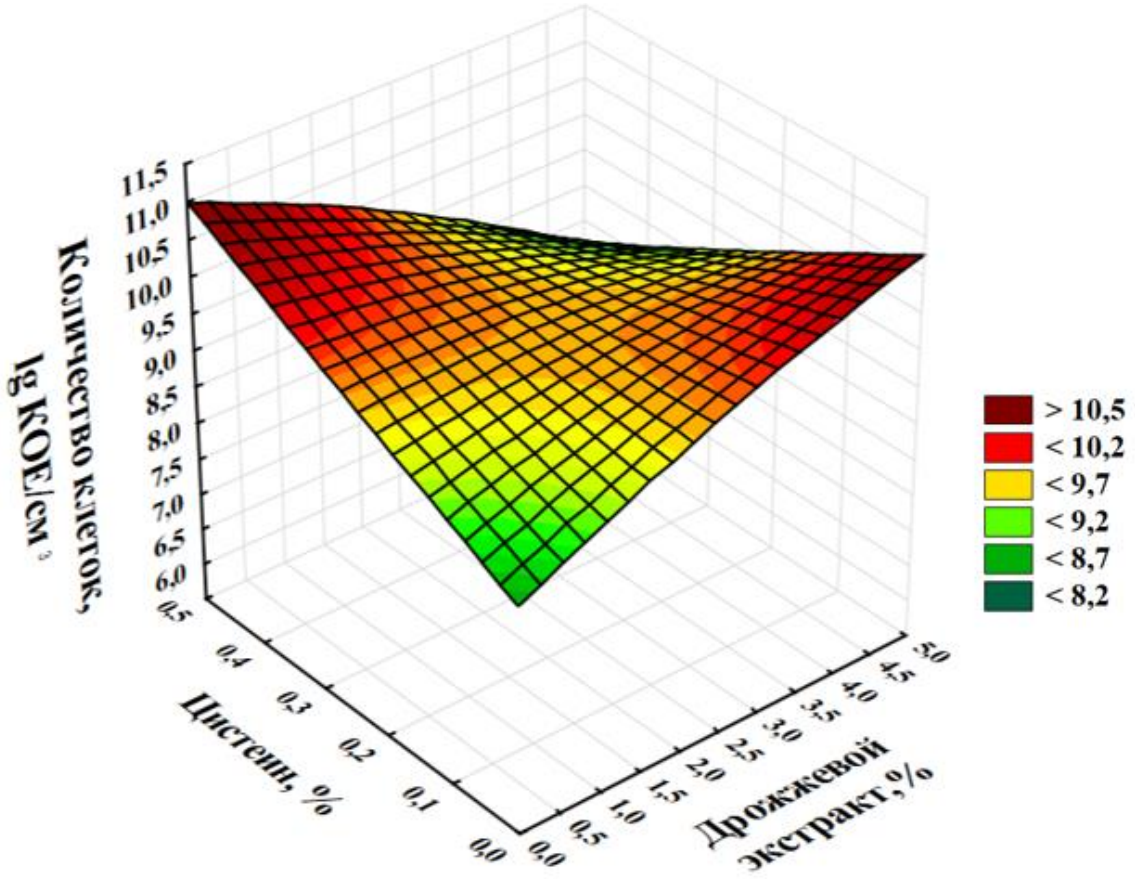


Рисунок 11 – Зависимость количества клеток *L. reuteri* LR1 от концентрации компонентов «Дрожжевой экстракт» (X_2) и «Цистеин» (X_4) в питательной среде

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что компоненты дрожжевой экстракт и цистеин могут быть взаимозаменяемы в составе питательной среды для культивирования *L. reuteri* LR1.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что добавление дрожжевого экстракта и цистеина в гидролизованное молоко стимулирует развитие *L. reuteri* LR1, тогда как сахароза подавляет.

В ходе дальнейших исследований была усовершенствована питательная среда и разработана программа для моделирования и расчета состава питательной среды для культивирования пробиотического микроорганизма *L. reuteri* LR1. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2015617178 ПРОГРАММА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И РАСЧЕТА СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО МИКРООРГАНИЗМА LACTOBACILLUS REUTERI (Приложение 4)

Применение данной программы позволяет осуществить оптимизацию питательной среды для культивирования пробиотического микроорганизма *L. reuteri* LR1, обеспечивающей максимальный выход биомассы и количества клеток, тем самым улучшая эффективность и рентабельность производства закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1. Также программа позволяет расширение базы данных компонентов среды, с возможностью их замены, включая импортозамещение компонентов, с поддержанием на заданном уровне соотношение питательных веществ. Программа создана для предприятий и специализированных цехов, производящих закваски и бактериальные концентраты.

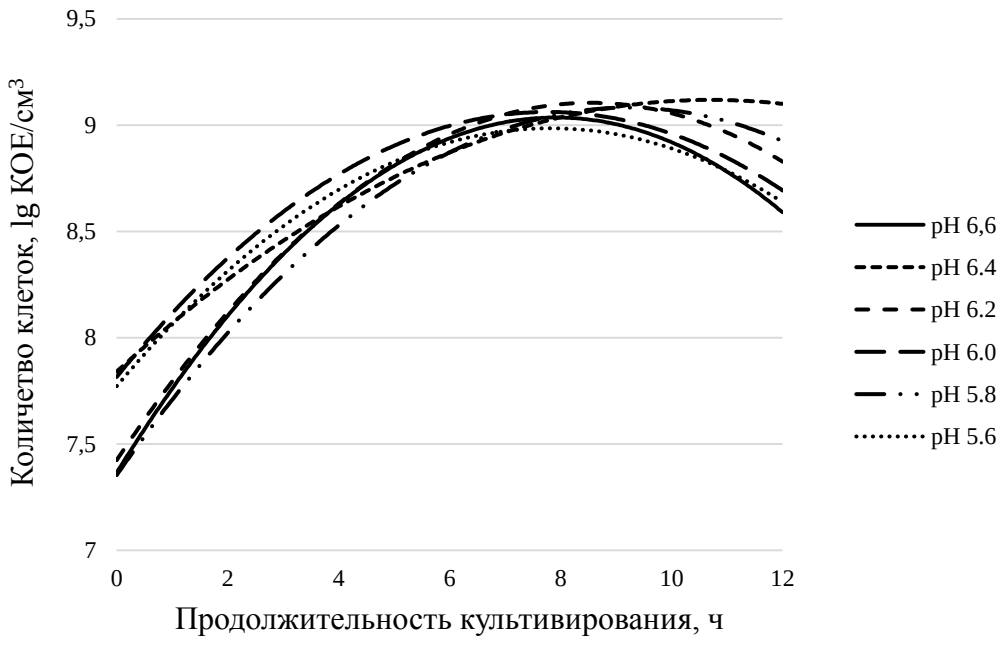
На основании проведенных исследований и с использованием программы усовершенствована питательная среда для культивирования *L. reuteri* LR1: гидролизованное молоко – 500 см^3/дм^3, дрожжевой экстракт – 15 г/дм^3, CH_3COONa - 5 г/дм^3, цистеин – 0,25 г/дм^3, KH_2PO_4 – 2 г/дм^3, $MgSO_4$ – 0,2 г/дм^3, $MnSO_4$ – 0,05 г/дм^3, дистилированная вода до 1000 см^3, позволяющая получить высокое количество клеток в закваске прямого внесения.

4.2 Исследование влияния технологических параметров культивирования на накопление *L. reuteri* LR1

Исследование динамики развития *L.reuteri* LR1 в биореакторе при различных значениях активной кислотности питательной среды

При культивировании микроорганизмов в биореакторах с целью накопления наибольшего количества биомассы жизнеспособных клеток определяющими факторами кроме состава питательной среды являются температура культивирования и поддержание значений активной кислотности питательной среды на определенном уровне.

При исследовании динамики изменения количества клеток *L.reuteri* LR1 в процессе культивирования в питательной среде с различными значениями активной кислотности, значение активной кислотности варьировали от 5,6 ед. pH до 6,6 ед. pH с шагом 0.2, температура культивирования составляла (37 ± 1) °C. Данные представлены на рисунке 12.



Уравнение регрессии: $y=a+bx+cx^2$

Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции:

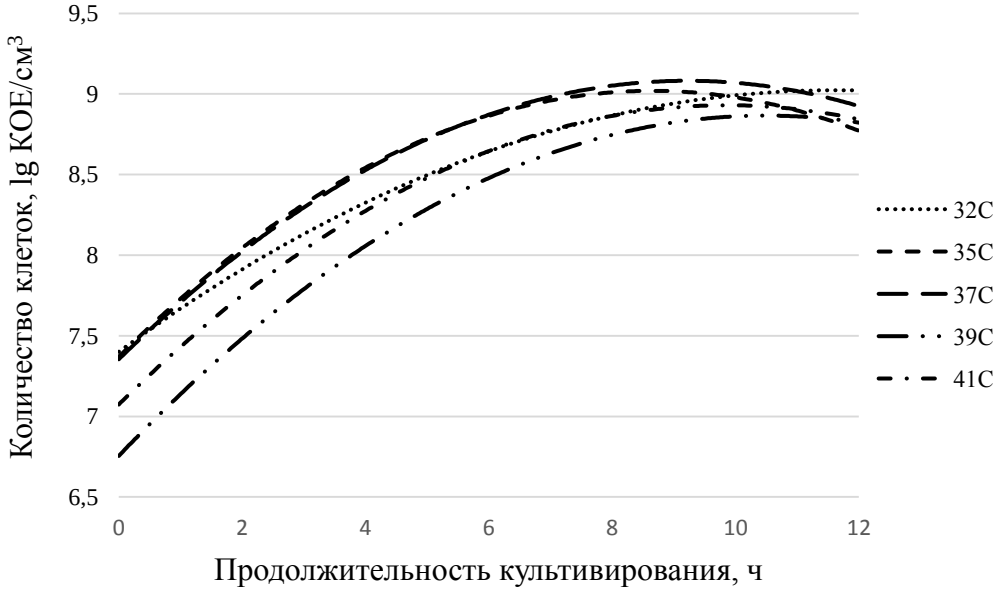
pH 6.6 a=7.36; b=0.43; c=0.03; r=0.994; pH 6.4 a=7.42; b=0.35; c=0.02; r=0.991
pH 6.2 a=7.42; b=0.4; c=0.02; r=0.998; pH 6.0 a=7.42; b=0.4; c=0.03; r=0.997
pH 5.8 a=7.35; b=0.37; c=0.02; r=0.991; pH 5.6 a=7.39; b=0.45; c=0.03; r=0.99

Рисунок 12 – Влияние значений активной кислотности питательной среды на накопление клеток *L.reuteri* LR1 в процессе культивирования

Отмечено, что наибольшее количество клеток было накоплено при культивировании в диапазоне значений активной кислотности от 5,8 до 6,2 ед. pH и составило $2{,}4\times10^9$ КОЕ/см^3. Поэтому в дальнейших исследованиях по изучению влияния температуры на накопление клеток были использованы значения активной кислотности 5,8 ед. pH, 6,0 ед. pH и 6,2 ед. pH.

Исследование динамики развития *L.reuteri* LR1 в биореакторе при различных температурах.

На рисунке 13 представлены данные по изменению роста *L. reuteri* LR1 при поддержании значения активной кислотности питательной среды на уровне 5,8 ед. pH при различных температурах культивирования (32 ± 1) °C, (35 ± 1) °C, (37 ± 1) °C, (39 ± 1) °C и (41 ± 1) °C.



Уравнение регрессии: $y=a+bx+cx^2$

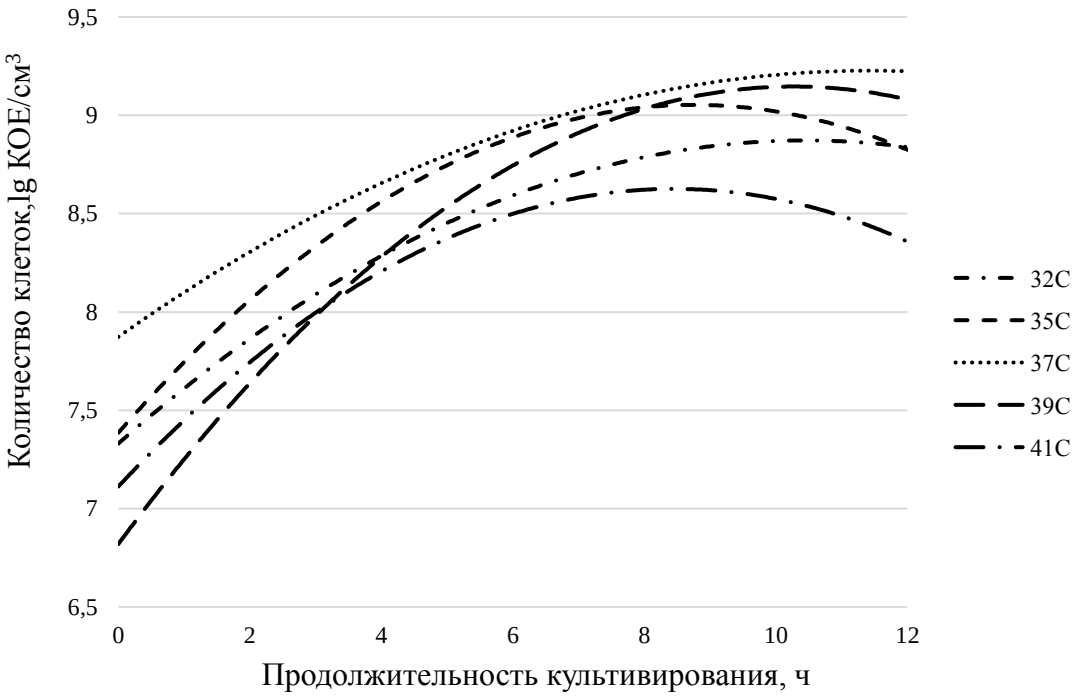
Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции:

32°C a=6.76; b=0.40; c= - 0.02; r=0.954;
35°C a=7.40; b=0.28; c= - 0.01; r=0.99;
37°C a=7.07; b=0.38; c= - 0.02; r=0.995;
39°C a=7.37; b=0.38; c= - 0.02; r=0.954;
41°C a=7.35; b=0.38; c= - 0.02; r=0.99

Рисунок 13 – Динамика изменения количества клеток *L. reuteri* LR1 в процессе культивирования при различных температурах и активной кислотности питательной среды 5,8 ед. pH.

Анализ представленных данных показывает, при поддержании активной кислотности питательной среды на уровне 5,8 ед. pH, наибольшее содержание клеток *L. reuteri* LR1 было получено при температурах культивирования (35 ± 1) °С и (37 ± 1) °С и составляло $1,4\times10^9$ КОЕ/см^3 и $1,5\times10^9$ КОЕ/см^3 соответственно.

На рисунке 14 представлены данные по динамике роста *L. reuteri* LR1 при поддержании активной кислотности питательной среды на уровне 6,0 ед. pH при различных температурах культивирования (32 ± 1) °С, (35 ± 1) °С, (37 ± 1) °С, (39 ± 1) °С и (41 ± 1) °С.



Уравнение регрессии: $y=a+bx+cx^2$

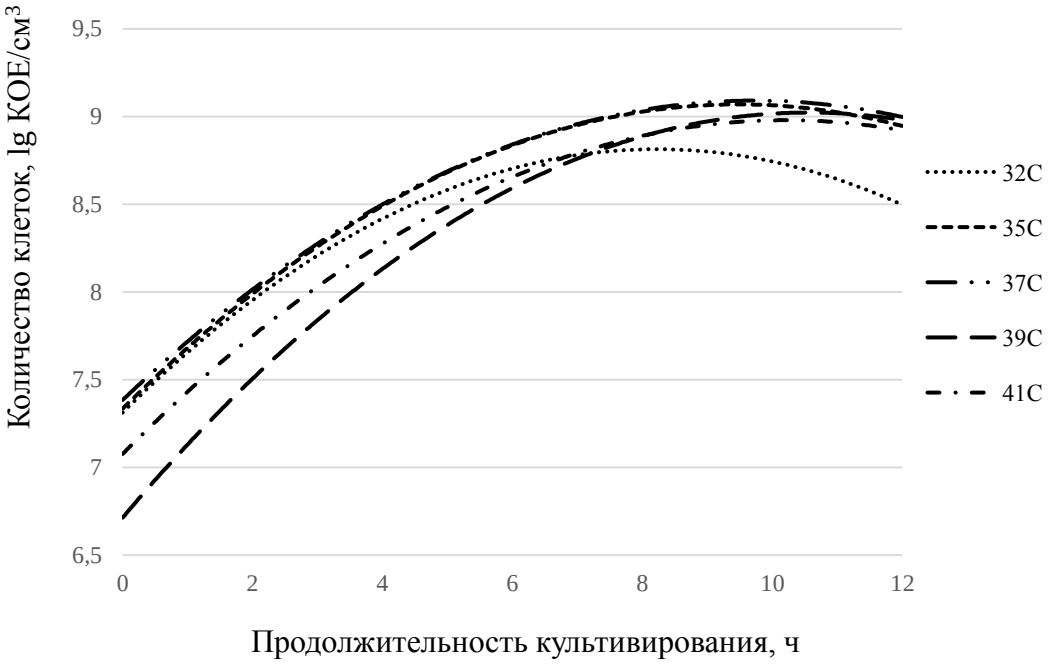
Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции:

32°С a=7,11; b=0.36; c= - 0.02; r=0.97;
35°С a=6,,82; b=0.45; c= - 0.02; r=0.964;
37°С a=7.07; b=0.38; c= - 0.02; r=0.995;
39°С a=7.37; b=0.38; c= - 0.02; r=0.954;
41°С a=7.35; b=0.38; c= - 0.02; r=0.99

Рисунок 14 – Изменение содержания клеток *L. reuteri* LR1 в процессе культивирования при различных температурах и активной кислотности питательной среды 6,0 ед. pH.

Отмечено, что при поддержании активной кислотности на уровне 6,0 ед. pH, наибольшее количество клеток *L. reuteri* LR1 ($1,6\times10^9$ КОЕ/см^3 и $2,4\times10^9$ КОЕ/см^3) было получено при температурах культивировании (35 ± 1) °С и (37 ± 1) °С.

На рисунке 15 представлены данные по изменению количества клеток *L. reuteri* LR1 при различных температурах культивирования (32 ± 1) °С, (35 ± 1) °С, (37 ± 1) °С, (39 ± 1) °С и (41 ± 1) °С и поддержании активной кислотности питательной среды на уровне 6,2 ед. pH.



Уравнение регрессии: $y=a+bx+cx^2$

Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции:

32°C a=7.31; b=0,37; c= -0,02; r = 0,949

35°C a=7,33; b=0,37; c= -0,02; r = 0,958

37°C a= 7,38; b=0,35; c=-0,02; r = 0,99

39°C a=6,71; b=0,44; c= -0,02; r = 0,982

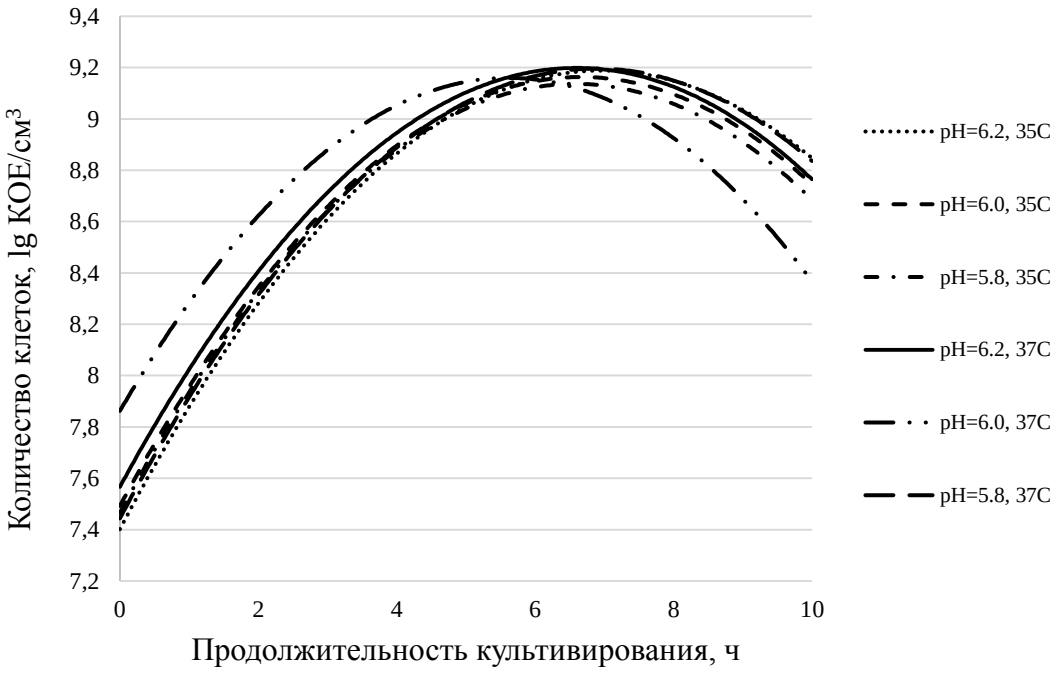
41°C a=7,07; b=0,37; c= -0,02; r = 0,978

Рисунок 15 – Изменение содержания клеток *L. reuteri* LR1 в процессе культивирования при различных температурах и активной кислотности питательной среды 6,2 ед. pH

Исходя из данных, представленных на рисунке 15, можно сделать вывод, что при температурах (35 ± 1) °С и (37 ± 1) °С и активной кислотности питательной

среды 6,2 ед. pH также отмечалось наибольшее количество клеток *L. reuteri* LR1 в культуральной среде.

На рисунке 16 представлены сводные данные по изменению количества клеток *Lactobacillus reuteri* LR1 в процессе культивирования при температурах (35 ± 1) °C, (37 ± 1) °C и поддержании активной кислотности на уровне 5,8 ед. pH, 6,0 ед. pH, 6,2 ед. pH.



Уравнение регрессии: $y=a+bx+cx^2$

Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции:

pH=6.2, 35°C	pH=6.2, 37°C
a=7,39; b=0.53; c= -0.04; r=0.984	a=7,57; b=0.49; c= -0.04; r=0.955
pH=6.0, 35°C	pH=6.0, 37°C
a=7,49; b=0.50; c= -0.04; r=0.98	a=7,86; b=0.46; c= -0.04; r=0.99
pH=5.8, 35°C	pH=5.8, 37°C
a=7,45; b=0.52; c= -0.04; r=0.969	a=7,44; b=0.51; c= -0.04; r=0.996

Рисунок 16 – Изменение содержания клеток *L. reuteri* в процессе культивирования при различных температурах и pH.

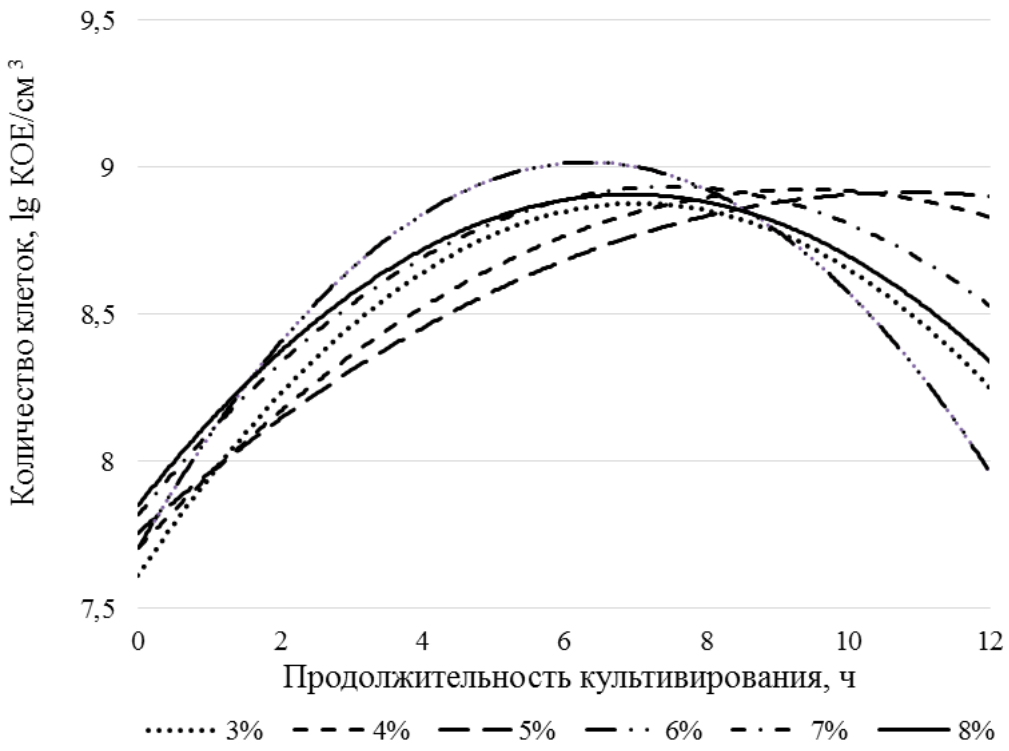
Анализ полученных данных показывает, что количество клеток при культивировании при вышеуказанных режимах отличалось незначительно. Однако, наибольшее содержание клеток *L. reuteri* LR1 было достигнуто при температуре культивирования (37 ± 1) °C и активной кислотности питательной

среды 6,2 ед. pH и составило ($1,75\times10^9$ КОЕ/см^3). Также следует отметить, что наибольшее накопление жизнеспособных клеток *L. reuteri* LR1 было получено через 8 – 9 часов культивирования.

Исследование динамики размножения *L. reuteri* LR1 в биореакторе при различных дозах инокулята и продолжительности культивирования

При культивировании микроорганизмов количество вносимого инокулята обычно находится в диапазоне от 0,5 до 10% от объема питательной среды культивирования.

При исследовании динамики развития *L. reuteri* LR1 в зависимости от дозы инокулята, культивирование проводили при температуре (37 ± 1) °С и активной кислотности питательной среды 6,2 ед. pH. В ходе исследований доза инокулята составляла 3%, 4%, 5%, 6%, 7% и 8%. Данные представлены на рисунке 17.



Уравнение регрессии: $y=a+bx+cx^2$

Коэффициенты уравнения, коэффициенты корреляции:

3% a = 7.67; b=0.19; c= - 0.01; r = 0.978; **4%** a = 7.79; b=0.18; c= - 0.01; r=0.979;

5% a = 7.71; b=0.26; c= - 0.01; r = 0.995; **6%** a = 7.71; b=0.33; c= - 0.02; r=0.952;
7% a = 7.82; b=0.30; c= - 0.02; r = 0.968; **8%** a = 7.82; b=0.33; c= - 0.02; r=0.974

Рисунок 17 – Влияние дозы инокулята на накопление клеток *L. reuteri* LR1

Установлено. что интенсивность накопления клеток *L. reuteri* LR1 зависит от количества внесенного инокулята. Наибольшее количество клеток *L. reuteri* LR1 было получено через 6 – 8 часов культивирования при внесении 6 – 7% инокулята и составило 2×10^9 КОЕ/см^3.

4.3 Исследование влияния компонентов защитной среды на выживаемость *L. reuteri* LR1 при сублимационной сушке

Технология получения лиофилизировванных заквасок прямого внесения состоит из двух этапов – замораживания суспензии клеток в защитной среде и последующего их высушивания в вакууме, что позволяет получить высокое содержание жизнеспособных клеток и их выживаемостиь в процессе хранения. Выживаемость микроорганизмов в процессе высушивания и последующем хранении зависит от таких факторов, как: возраст популяции клеток, состав используемой защитной среды, режим замораживания и высушивания и др.

Анализ литературных данных позволил выбрать в качестве компонентов защитной среды обезжиренное молоко, сахарозу и натрий уксуснокислый. Для уточнения количества этих 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%, раствор сахарозы – 0%–90%, раствор уксуснокислого натрия – 0%–20% (таблица 10).

Таблица 10 – 3-факторный план для смесей с ограничениями

№ защитной среды	Варьируемые компоненты		
	Обезжиренное коровье молоко, % (X)	Сахароза, % (Y)	Уксуснокислый натрий, % (Z)

1	80	0	20
2	100	0	0
3	0	90	10
4	38	52	10
5	10	90	0
6	0	80	20

Приготовленные согласно плану (таблица 11) защитные среды смешивали с биомассой *L. reuteri* LR1 в соотношении 1:1, полученную суспензию разливали в стерильные флаконы по 2 см^3 и замораживали при температуре минус (18±2)°С, сублимационно высушивали и закладывали на хранение в бытовую морозильную камеру при температуре минус (18±2)°С.

Математически обработанные результаты исследований по определению влияния концентрации компонентов защитной среды на выживаемость *L. reuteri* LR1 представлены на рисунках 18, 19, 20.

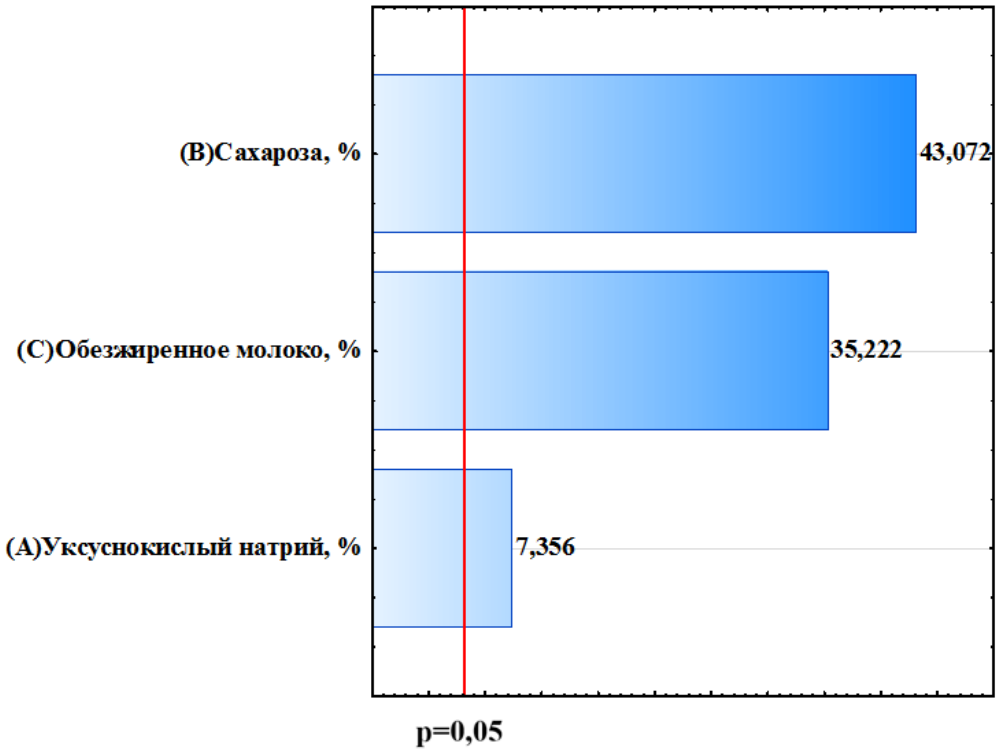
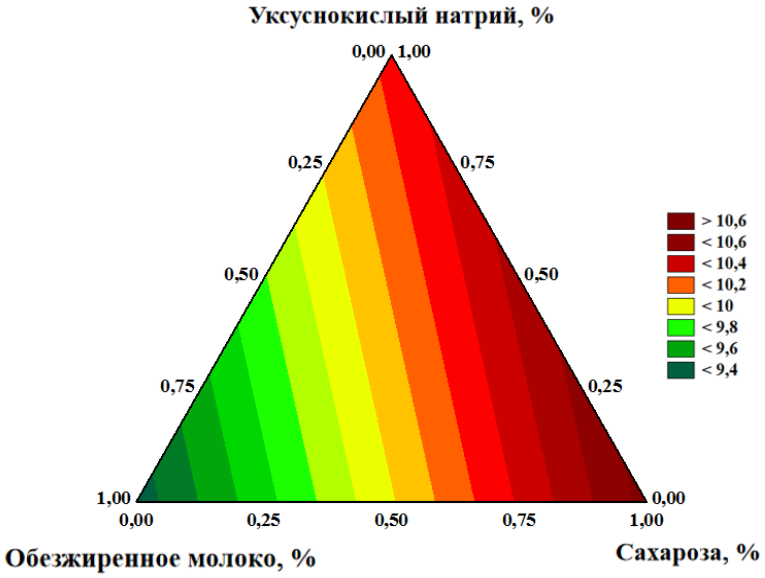


Рисунок 18 – Карта Парето влияния компонентов защитной среды на выживаемость клеток *L. reuteri* LR1 при сублимационном высушивании



$$K = 9{,}34 \times X + 10{,}64 \times Y + 10{,}24 \times Z;$$
$$r = 0.918$$

Рисунок 19 – Влияние компонентов защитной среды на выживаемость клеток *L. reuteri* LR1 при сублимационном высушивании

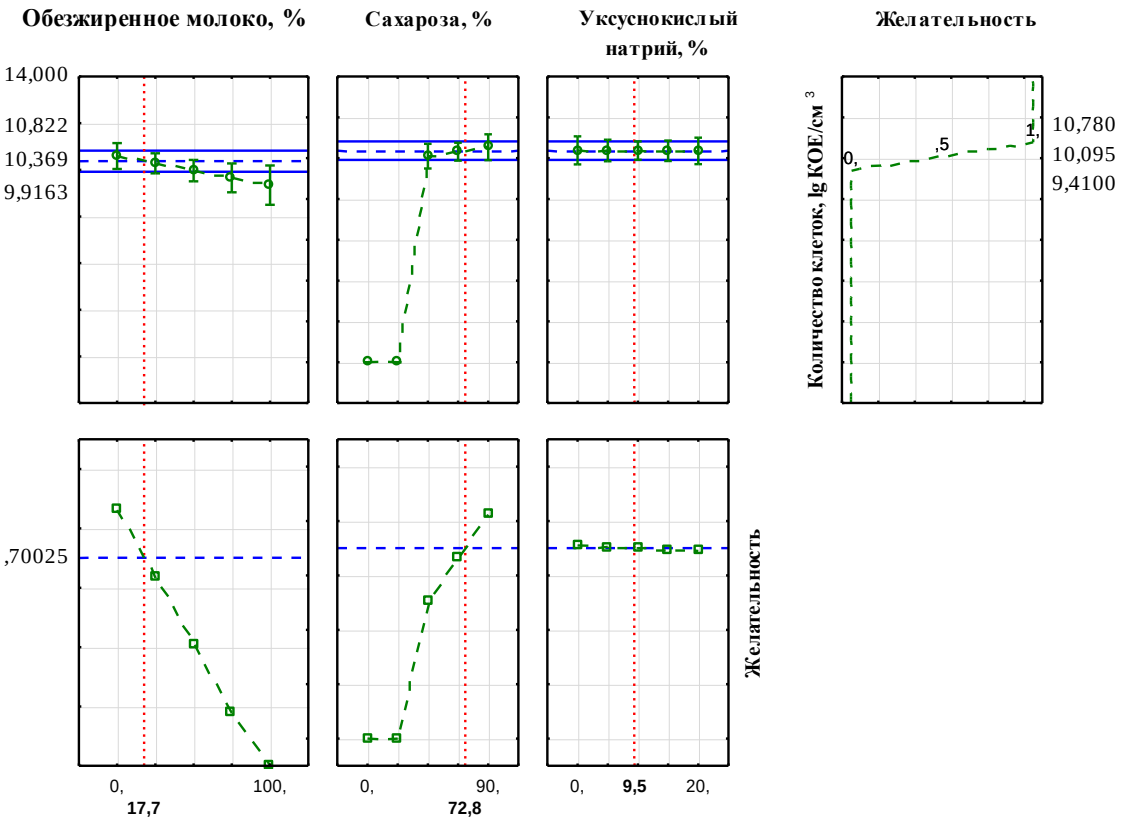


Рисунок 20 – Профили предсказанных значений и функции желательности

На основании проведенных исследований и определен состав защитной среды, обеспечивающий наибольшую выживаемость клеток *L.reuteri* LR1 в процессе сублимационного высушивания: обезжиренное молоко – 17,7%, раствор сахарозы – 72,8 %, расттвор уксуснокислого натрия – 9,5 %.

4.4 Исследование влияния продолжительности культивирования *L. reuteri* LR1 до отделения биомассы на выживаемость клеток при сублимационной сушке.

В процессе культивирования клетки *L. reuteri* LR1 отделяли через различные промежутки времени, смешивали с защитной средой в соотношении 1:1, полученную суспензию клеток разливали в стерильные флаконы, замораживали и высушивали. В высушенной закваске прямого внесения определяли количество жизнеспособных клеток *L. reuteri* LR1. Результаты представлены в таблтце 11.

Таблица 11 – Влияние продолжительности культивирования *L. reuteri* LR1 на выживаемость клеток в процессе сублимационной сушки

№ п/п	Продолжительность культивирования, ч	Количество клеток после сублимационной сушки, lg КОЕ/г
1	5	8,903±0,3
2	6	9,96±0,7
3	7	10,42±0,6
4	8	10,602±0,4
5	9	10,10±0,8
6	10	9,22±0,8

Установлено, что наибольшее количество клеток в закваске прямого внесения получено через 8 ч культивирования *L. reuteri* LR1 до отделения клеток от культуральной среды. Количество клеток после высушивания составило 4×10^{10} КОЕ/см^3.

Таким образом, наибольшая выживаемость клеток *L. reuteri* LR1 при замораживании и высушивании была при отделении клеток от культуральной среды через 8 ч культивирования.

4.5 Определение рекомендуемого срока годности

Для определения рекомендуемого срока годости ЗПВ закладывали на хранение при температуре минус (18 ± 2) °С на 9 месяцев. Данные по выживаемости клеток *L. reuteri* LR1 в процессе хранения ЗПВ *L. reuteri* LR1 представлены на рисунке 21.

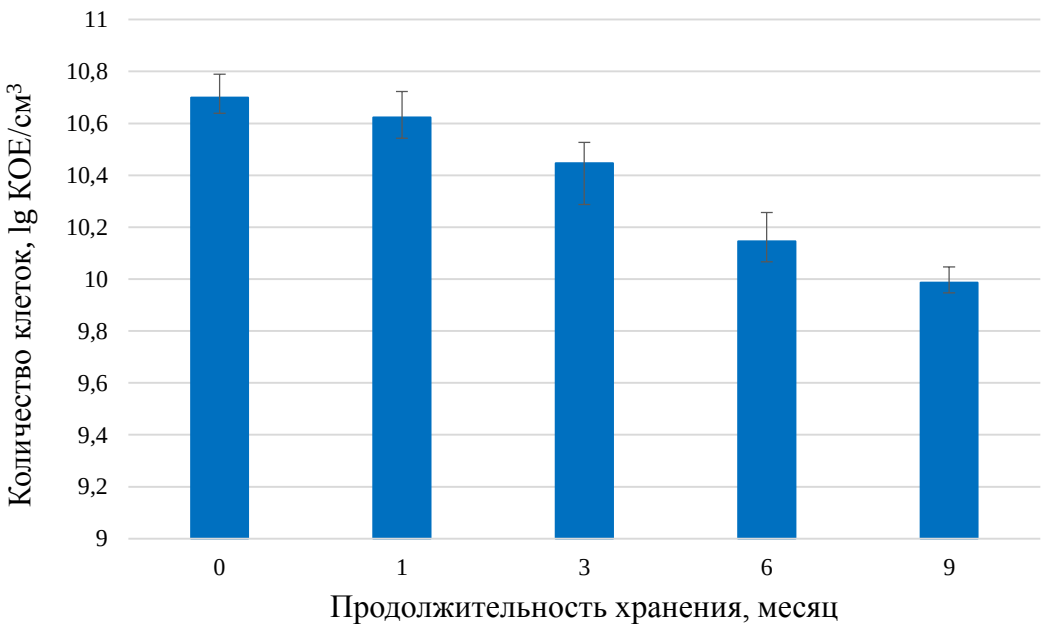


Рисунок 21 – Влияние защитной среды на выживаемость клеток *L. reuteri* LR1 в процессе хранения сухой закваски прямого внесения

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

Согласно нормативной документации количество клеток в ЗПВ молочнокислых бактерий должно быть не менее 1×10^{10} КОЕ/г. Таким образом, проведенные исследования позволили выбрать продолжительность культивирования до отделения биомассы *L. reuteri* LR1 – 8 часов и уточнить состав защитной среды, обеспечивающей наибольшую выживаемость клеток при сублимационной сушке: обезжиренное молоко – 17,7%, сахароза – 72,8%, уксуснокислый натрий – 9,5% и установить рекомендуемые сроки годности ЗПВ *L. reuteri* LR1 – 6 месяцев при температуре хранения минус (18 ± 2) °С.

4.5 Технология ЗПВ *L. reuteri* LR1

На основании проведенных исследований была разработана технология закваски прямого несения *L. reuteri* LR1.

Технология ЗПВ *L. reuteri* LR1 включает следующие этапы:

- подготовка питательной среды для культивирования;
- приготовление инокулята;
- инокулирование среды и накопление клеток;
- приготовление защитной среды;
- получение бактериальной массы и приготовление суспензии клеток;
- высушивание суспензии клеток и получение закваски прямого внесения;
- расфасовка сухой закваски прямого внесения, высушенной на лотках;
- упаковка, маркировка.

Подробнее остановимся на каждом этапе:

1. Подготовка питательной среды для инокуляции.

Гидролизованное молоко готовят с использованием фермента Alcalasa FG и стерилизуют, обеспечивая уничтожение споровых микроорганизмов. Для приготовления 1 дм^3 разработанной питательной среды используют следующие компоненты: гидролизованное молоко – 500 см^3, дрожжевой экстракт – 15 г, натрий

уксуснокислый – 5 г, цистеин – 0,25 г, калий фосфорнокислый – 2 г , магний сернокислый – 2 г, марганец сернокислый – 0,05 г, дистиллированная вода – 475,7 $см^3$. В дистиллированной воде растворяют сухие компоненты при температуре (45 ± 2)°С и добавляют 500 $см^3$ гидролизованного молока. Смесь перемешивают и устанавливают активную кислотность (6,2 ± 0,1) ед. pH. Стерилизацию питательной среды проводят при давлении 0,08 МПа, что соответствует температуре (118 ± 2) °С, с выдержкой 60 мин. или при температуре (135 ± 2) °С с выдержкой 4 с. Питательную среду охлаждают до температуры (37 ± 2) °С.

2. Приготовление инокулята

Культивирование штамма *L.reuteri* LR1 проводят при внесении 0,1 $см^3$ культуры в 10 $см^3$ стерильной питательной среды MRS-бульон. Пробирку с инокулятом *L.reuteri* LR1 термостатируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 16 – 18 ч. Допускается термостатирование до 48ч.

Получение первичной культуры *L.reuteri* LR1 проводят при засеве инокулята в количестве 3% на среду MRS-бульон. Термостатирование проводят при температуре (37 ± 2) °С в течение (16 ± 2) ч. Полученную первичную культуру используют для получения вторичной культуры. Для этого вносят 3% первичной культуры *L.reuteri* LR1 в стерильную среду MRS-бульон и термостатируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 16 – 24 ч. Развитие *L.reuteri* LR1 контролируют по микроскопическому препарату.

3. Инокулирование среды и накопление клеток *L.reuteri* LR1.

Инокулирование питательной среды проводят при строгом соблюдении правил асептики. В стерильную и охлажденную до температуры культивирования питательную среду вносят 6 % инокулята *L.reuteri* LR1. Среду с инокулятом тщательно перемешивают. Наращивание культуры *L.reuteri* LR1 проводят в течение 8 ч при постоянной нейтрализации среды 20%-ным водным раствором NaOH, поддерживая активную кислотность среды на уровне (6,2 ± 0,1) ед. pH. Допускается проведение нейтрализации культуральной среды через каждые (3 ± 0,5) ч культивирования. Развитие культуры оценивают по расходу нейтрализатора

и по микроскопическому препарату в процессе культивирования. По окончании процесса культуральную среду с накопленными клетками *L.reuteri* LR1 охлаждают до температуры (4 ± 2) °С и направляют на центрифугирование.

4. Получение биомассы клеток.

Отделение накопленных клеток от культуральной среды проводят на бактофуге, которую предварительно дезинфицируют. Продолжительность бактофугирования не более чем (3 ± 0,5) ч.

Степень отделения клеток от среды контролируют по прозрачности жидкости, отходящей от бактофуги и по микроскопическому препарату. Наиболее точные данные о степени разделения получаются только при посеве полученной биомассы и фугата на питательные среды. В процессе отделения клеток от культуральной среды бактофугу постоянно охлаждают холодной водой с температурой (4 ± 2) °С. Полученную биомассу извлекают в продезинфицированную емкость для приготовления суспензии клеток (смешивания с защитной средой).

5. Приготовление суспензии клеток (смешивание биомассы с защитной средой).

Полученную биомассу *L.reuteri* LR1 смешивают в предварительно продезинфицированном смесителе с защитной средой в соотношении 1:1 в асептических условиях.

В защитную среду входят следующие компоненты: стерильное обезжиренное молоко с содержанием сухих веществ 13%, которое стерилизуют при 0,1 МПа, что соответствует температуре (121 ± 2) °С в течение (20 ± 5) мин; водный раствор сахарозы с массовой долей 10%, предварительно стерилизованной при 0,05 МПа, что соответствует температуре (118 ± 2) °С в течение (30 ± 5) мин, водный раствор уксуснонокислого натрия с массовой долей 35%, стерилизованный при 0,1 МПа, что соответствует температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 5) мин.

6. Высушивание суспензии клеток и получение сухой закваски прямого внесения *L.reuteri* LR1.

Суспензию клеток в асептических условиях разливают слоем, толщиной (5 ± 2) мм на стерильные лотки. Лотки закрывают стерильными марлевыми салфетками и обхватывают стерильными резиновыми зажимами. Замораживание суспензии в лотках проводят при температуре минус (25 ± 5)°С в течение 24 ч. Режимы работы сублимационной установки при высушивании суспензии клеток в лотках:

- температура в начале процесса – минус (18 ± 2)°С
- температура в конце процесса – плюс (35 ± 5)°С;
- температура конденсатора – минус (55 ± 5) °С
- остаточное давление от 13 до 19 Па;
- продолжительность процесса сушки на лотках 16 – 20 ч.

7. Расфасовка сухой закваски прямого внесения.

Высушенную закваску прямого внесения *L.reuteri* LR1 измельчают в мельнице или на размельчителе, которые предварительно дезинфицируют. Измельченную ЗПВ *L.reuteri* LR1 расфасовывают в условиях максимально приближенных к асептическим в пакеты из комбинированного влагонепроницаемого материала.

8. Маркировка

На каждую упаковочную единицу наносят маркировку при помощи штемпеля, трафарета или наклеивают этикетку с указанием: наименование предприятия-изготовителя, наименование ЗПВ (бактериального концентрата), дату выработки и конечного срока реализации, условий хранения и др.

Маркировка заквасок прямого внесения осуществляется в соответствии с ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки».

9. Транспортирование и хранение.

Транспортирование и хранение закваски прямого внесения проводится в соответствии с действующим СТО на данный вид продукта, а именно, ЗПВ *L. reuteri* LR1 должна храниться при температуре минус (18 ± 2) °С не более 6 месяцев со дня выработки, в том числе на предприятии изготовителе не более одного месяца.

На основании проведенных исследований разработан СТО 00419785-045-2019 «Закваска прямого внсения *L. reuteri* LR1» (Приложение 5).

4.6 Опытно-промышленная выработка ЗПВ *L. reuteri* LR1

На производстве ООО «Лактосинтез» были проведены экспериментальные выработки закваски прямого внесения пробиотической культуры *L. reuteri* LR1. Для изготовления закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1, культивирование проводили в ферментере фирмы Electrolux (Швеция) емкостью одна тонна. Режимы культивирования были установлены в соответствии с разработанной технологией.

Отделение клеток от культуральной среды *L. reuteri* LR1 проводили с помощью бактофуги «Vestfalia» (Германия).

Результаты опытно-промышленной выработки представлены в акте опытно-промышленной выработки (Приложение 6).

Основные показатели полученной закваски прямого внесения представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика выработанной закваски прямого внесения

Наименование показателя	Выработанная ЗПВ *L.reuteri* LR1	Норма для ЗПВ *L.reuteri* (СТО - 00419785-045-2019)
Внешний вид и консистенция	Однородный сухой порошок	Однородный сухой порошок
Цвет	От кремоватого до светло-коричневого по всей массе порошка	От кремоватого до светло-коричневого по всей массе порошка

Микроскопический препарат		Палочки тонкие короткие и средней длины, одиночные и в коротких цепочках	Палочки тонкие короткие и средней длины, одиночные и в коротких цепочках
Наименование показателя		Выработанная ЗПВ *L.reuteri* LR1	Норма для ЗПВ *L.reuteri* (СТО - 00419785-045-2019)
Количество *L. reuteri*, КОЕ/г, не менее		3×10^{10}	10^{10}
Количество дрожжей и плесневых грибов, КОЕ/г, не более		Не обнаружены	5,0
Масса закваски прямого внесения в г, в которой не допускаются	БГКП (колиформы)	Отсутствуют в 1,0 г	1,0
	S.aureus	Отсутствуют в 1,0 г	1,0
	Патогенные, в том числе сальмонеллы	Отсутствуют в 10,0 г	10,0

Таким образом, полученная ЗПВ *L.reuteri* LR1 отвечала требованиям нормативной документации.

ГЛАВА 5 Разработка кисломолочного продукта «Релакт» с использованием ЗПВ *L. reuteri* LR1

5.1 Влияние факторов роста на развитие клеток *L. reuteri* LR1 в пастеризованном молоке

Результаты предварительных опытов по исследованию кислотообразующей активности *L. reuteri* LR1 на молоке показали, что данный штамм обладает низкой кислотообразующей и протеолитической активностью. В связи с этим, с целью интенсификации роста исследуемого штамма были поставлены опыты по изучению влияния факторов роста на развитие клеток *L. reuteri* LR1 в пастеризованном молоке. Культивирование проводили при внесении 1% закваски и температуре (37 ± 2) °С. В качестве факторов роста были выбраны: дрожжевой экстракт – 2 г/дм^3 и сухая питательная среда ГМК–3 – 2 г/дм^3. Такая доза стимулирующих ингредиентов была выбрана, исходя из инструкции по применению сухой питательной среды ГМК–3, которая используется как добавка в молоко, стимулирующая рост микроорганизмов при приготовлении производственной закваски и для производства кисломолочных продуктов. На рисунке 22, представлены данные изменения активной кислотности *L. reuteri* LR1 при сквашивании пастеризованного молока и с пастеризованного молока с различными факторами роста.

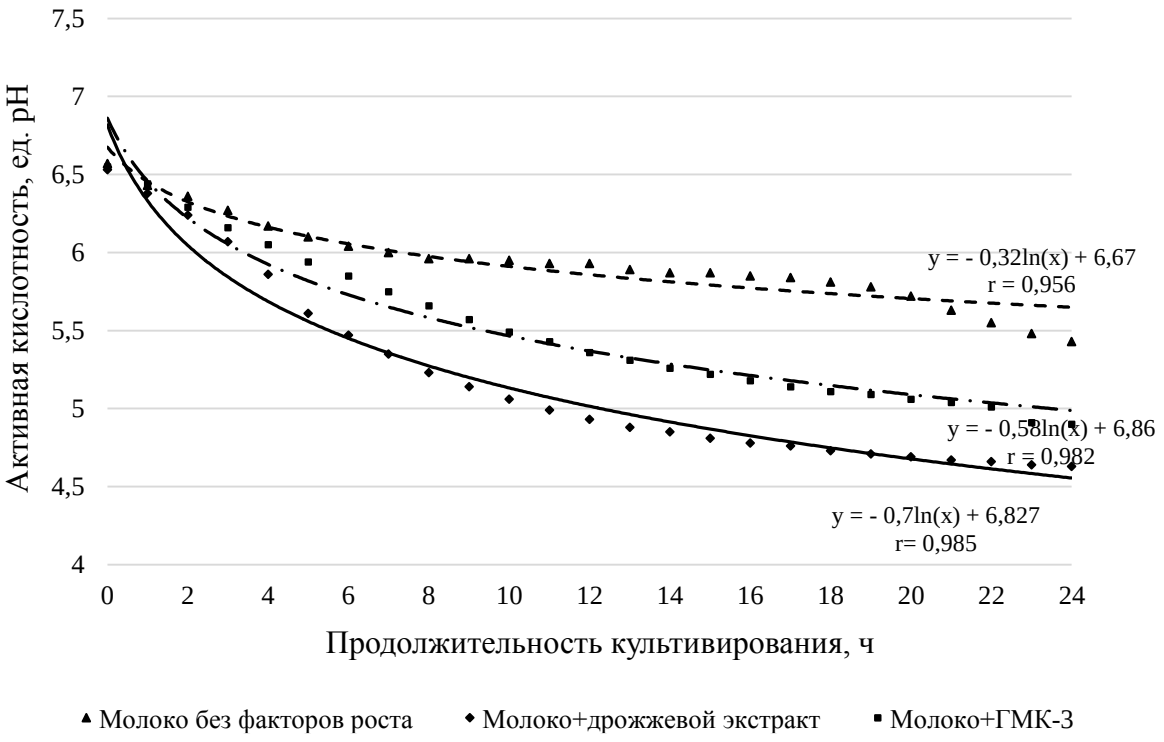


Рисунок 22 – Влияние различных факторов роста на изменение активной кислотности *L. reuteri* LR1

Полученные результаты показали, что использование дрожжевого экстракта и ГМК–3 положительно влияет на развитие клеток *L. reuteri* LR1 в молоке. Так, при культивировании микроорганизма на пастеризованном молоке без факторов роста в течение 24 ч снижение значения активной кислотности составляет (1,14 ± 0,08) ед. pH, тогда как при добавлении к молоку ГМК–3 – (1,65 ± 0,11) ед. pH, а при добавлении дрожжевого экстракта – (1,9 ± 1,13) ед. pH. Следует также отметить, что характер кривой указывает на стимулирующее воздействие ингредиентов на рост *L. reuteri* LR1. Кривая «Молоко без факторов роста» имеет продолжительную лаг – фазу, которая длится практически сутки. Использование «ГМК–3» сокращает лаг – фазу до 7 – 9 часов. Добавление дрожжевого экстракта стимулирует развитие *L. reuteri* LR1 больше, чем ГМК–3, и лаг–фаза составляет всего лишь 4 – 6 ч. Это можно объяснить тем, что сухая питательная среда ГМК–3 сложносоставная, в её составе имеется дрожжевой экстракт, но в меньшем количестве. 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 адаптационного периода (сокращении периода лаг–фазы) было отмечено при использовании дрожжевого экстракта. Представленные результаты показывают возможность и целесообразность использования дрожжевого экстракта, как добавку в молоко, для приготовления кисломолочного продукта с использованием закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1.

5.2 Выбор варианта получения кисломолочного продукта с использованием ЗПВ *L. reuteri* LR1

Так как пробиотические культуры, в основном используются в производстве функциональных продуктов, как обогащающая добавка к продукту, сквашенному другими заквасочными культурами, при разработке технологии кисломолочного продукта с использованием ЗПВ *L. reuteri* LR1 были выбраны «сокультуры» *L. helveticus* NK1 и *S. thermophilus* 159 (ХТС), которые обладают более сильными протеолитическими системами, тем самым ускоряя процесс сквашивания молока и улучшая органолептические показатели продукта.

Для того чтобы выбрать оптимальное технологическое решение производства кисломолочного продукта, обеспечивающего высокое содержание клеток *L. reuteri* LR1 были выбраны два варианта заквасок: монокультура *L. reuteri* LR1, и закваска, состоящая из консорциума молочнокислых бактерий ХТС (*L. helveticus* NK1 и *S. thermophilus* 159) и *L. reuteri* LR1. ЗПВ *L. reuteri* LR1 может вноситься в молоко, подготовленное для сквашивания одновременно с закваской ХТС, или сквашивание осуществляют с использованием закваски ХТС и добавляют ЗПВ *L. reuteri* LR1 в сгусток после сквашивания. При использовании монокультуры *L. reuteri* LR1 ЗПВ добавляется в подготовленное для сквашивания молоко с дрожжевым экстрактом (таблица 13). При выработке образцов КП количество

вносимой ЗПВ составляло 5×10^6 КОЕ/см^3. Сквашивание проводили при температуре (37 ± 2) °С.

Таблица 13 – Варианты кисломолочного продукта

Номер образца	Особенности технологии
№ 1	ЗПВ *L. reuteri* LR1 вносится в молоко с дрожжевым экстрактом, подготовленное для сквашивания
№ 2	ЗПВ *L. reuteri* LR1 вносится в молоко, подготовленное для сквашивания, одновременно с производственной закваской ХТС
№ 3	Сквашивание проводят с использованием производственной закваски ХТС, а ЗПВ *L. reuteri* LR1 вносят в полученный сгусток

Для каждого образца продукта проводили исследование физико-химических, органолептических и микробиологических характеристик.

Результаты исследований содержания клеток молочнокислых и пробиотических культур в образцах кисломолочных продуктов представлены на рисунке 23.

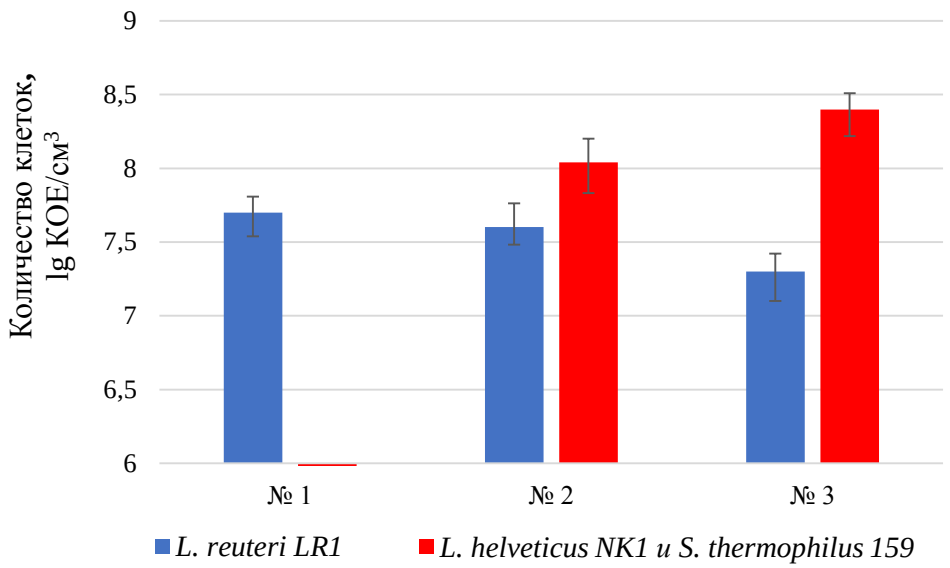


Рисунок 23 – Содержание клеток молочнокислых и пробиотических микроорганизмов в образцах кисломолочных продуктов

Анализ полученных даных показывает, что наибольшее количество пробиотической культуры *L. reuteri* LR1 накапливается при получении кисломолочного продукта путем одновременного внесения в молоко закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1 и 5% закваски ХТС (*L. helveticus* NK1 +*S. thermophilus* 159) с последующим сквашиванием до образования сгустка и составляет 4×10^7 КОЕ/см^3. В кисломолочных продуктах, полученных другими способами количество клеток *L. reuteri* LR1 варьировалось незначительно от 2×10^7 КОЕ/см^3 и 5×10^7 КОЕ/см^3.

Наибольшее накопление клеток ХТС (*L. helveticus* NK1 +*S. thermophilus* 159) также получено при изготовлении кисломолочного продукта путем одновременного внесения в молоко закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1 и 5% закваски ХТС (*L. helveticus* NK1 +*S. thermophilus* 159) с последующим сквашиванием до образования сгустка (Вариант № 2), также путем сквашивания молока 5% закваски ХТС (*L. helveticus* NK1 +*S. thermophilus* 159) до образования сгустка, с последующим внесением в сгусток закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1 для обогащения (Вариант № 3). Количество клеток закваски ХТС (*L. helveticus* NK1 + *S. thermophilus* 159) в кисломолочных продуктах составило 7×10^8 КОЕ/см^3 и 6×10^8 КОЕ/см^3 соответственно.

Данные по кислотности продуктов, полученных разными способами представлены на рисунке 24.

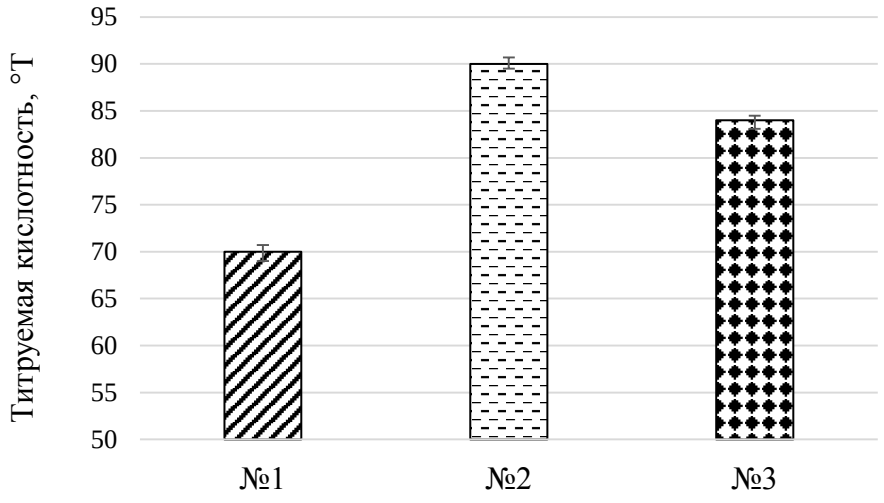


Рисунок 24 – Титруемая кислотность образцов кисломолочных продуктов

В результате проведенных исследований установлено, что титруемая кислотность в кисломолочных продуктах варьировалась от 68°Т до 90°Т, при этом активная составляла 4,64 – 4,8 ед. pH.

Органолептические показатели вариантов кисломолочного продукта представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Органолептические показатели вариантов кисломолочного продукта

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

Результаты проведенных микробиологических исследований образцов продуктов представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты микробиологических испытаний образцов кисломолочных продуктов

Наименование показателя	Нормируемое значение	Номер образца		
		1	2	3
		Значение показателя по результатам исследований		
Количество молочнокислых бактерий КОЕ/см^3	Не менее 1×10^7	-	$1{,}1\times10^8$	$2{,}5\times10^8$
Количество *L.reuteri* LR1, КОЕ/см^3	Не менее 1×10^6	1×10^8	8×10^7	5×10^6
БГКП (коли-формы)	Не допускаются в 0,1 г продукта	Не обнаружены	Не обнаружены	Не обнаружены
S. aureus	Не допускаются в 1 см^3 продукта	Не обнаружены	Не обнаружены	Не обнаружены
Патогенные, в т.ч. сальмонеллы	Не допускаются в 25 г продукта	Не обнаружены	Не обнаружены	Не обнаружены
Количество дрожжей, КОЕ/см^3, не более	Не более 50	Не обнаружены	Не обнаружены	Не обнаружены
Количество плесневых грибов, КОЕ/см^3, не более	Не более 50	Не обнаружены	Не обнаружены	Не обнаружены

Как видно из представленных данных, 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 25.

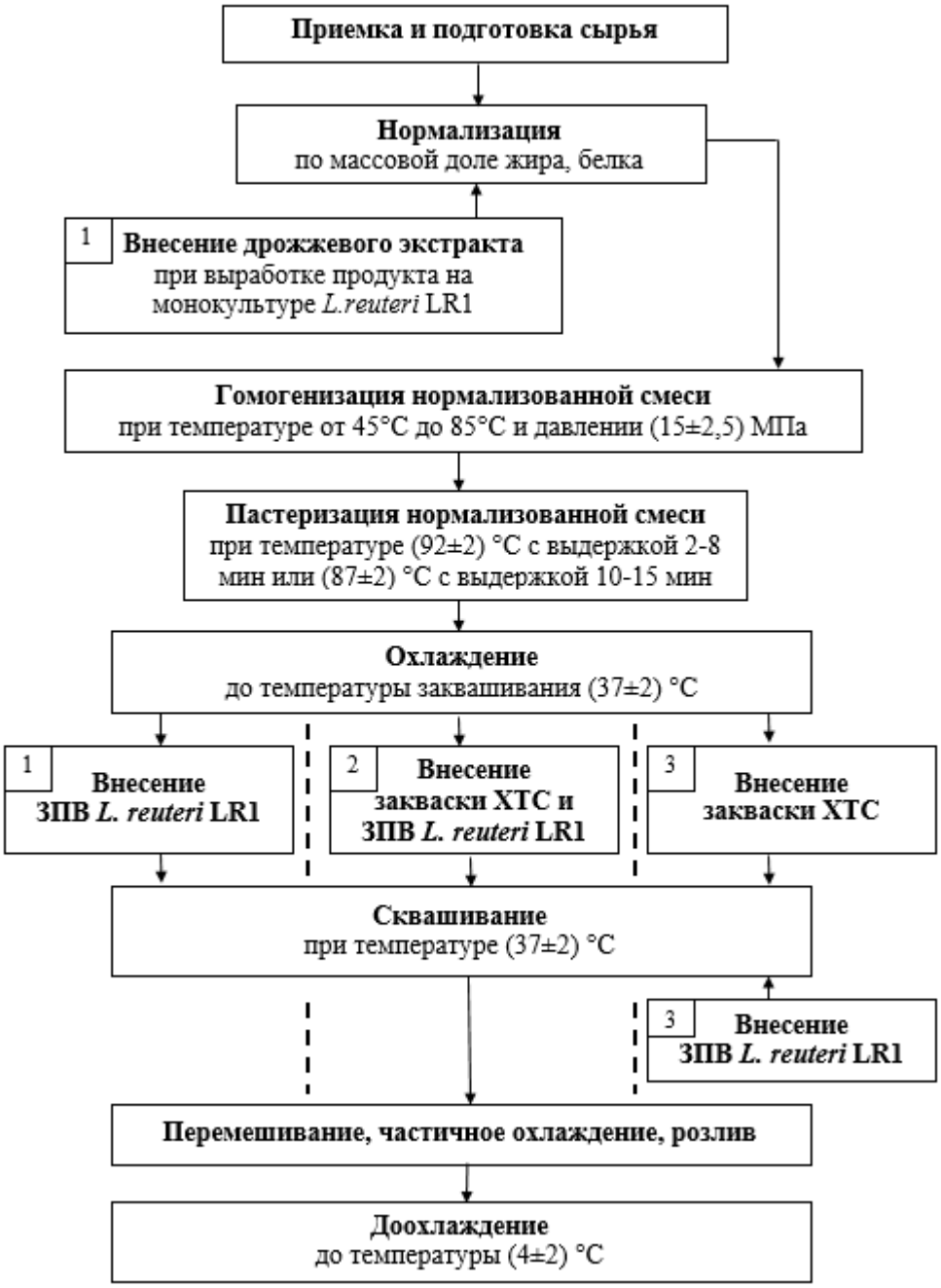


Рисунок 25 – Принципиальная схема технологического процесса производства кисломолочного продукта «Релакт» с пробиотическими свойствами

5.3 Определение рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта

Для определения рекомендуемого срока годности кисломолочного продукта были выработаны по три партии продукта и заложены на хранение при температуре (4 ± 2) °С на 20 суток (предполагаемый срок годности – 15 суток). Молоко, используемое для выработки образцов продуктов жирностью 3,2%, пастеризовали при температуре (87 ± 2) °С с выдержкой 10 минут, охлаждали до температуры заквашивания и заквашивали (одновременно вносили в молоко закваску прямого внесения *L. reuteri* LR1 и 5% закваски ХТС). Сквашивание проводили при температуре (37 ± 2) °С.

Динамика изменения количества клеток *L. reuteri* LR1 в процессе хранения образцов продуктов представлена на рисунке 26.

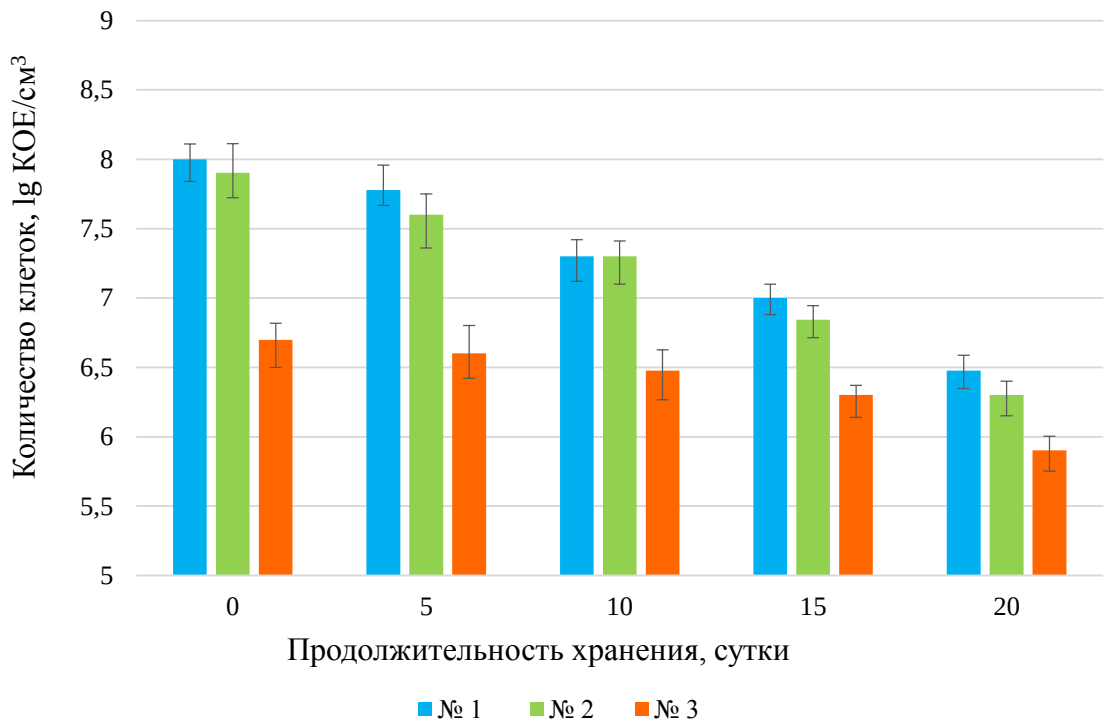


Рисунок 26 – Изменение количества клеток *L. reuteri* LR1 в процессе хранения образцов продукта

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

Динамика изменения количества клеток *L. helveticus* NK1 + *S. thermophilus* 159 в процессе хранения продуктов представлена на рисунке 27.

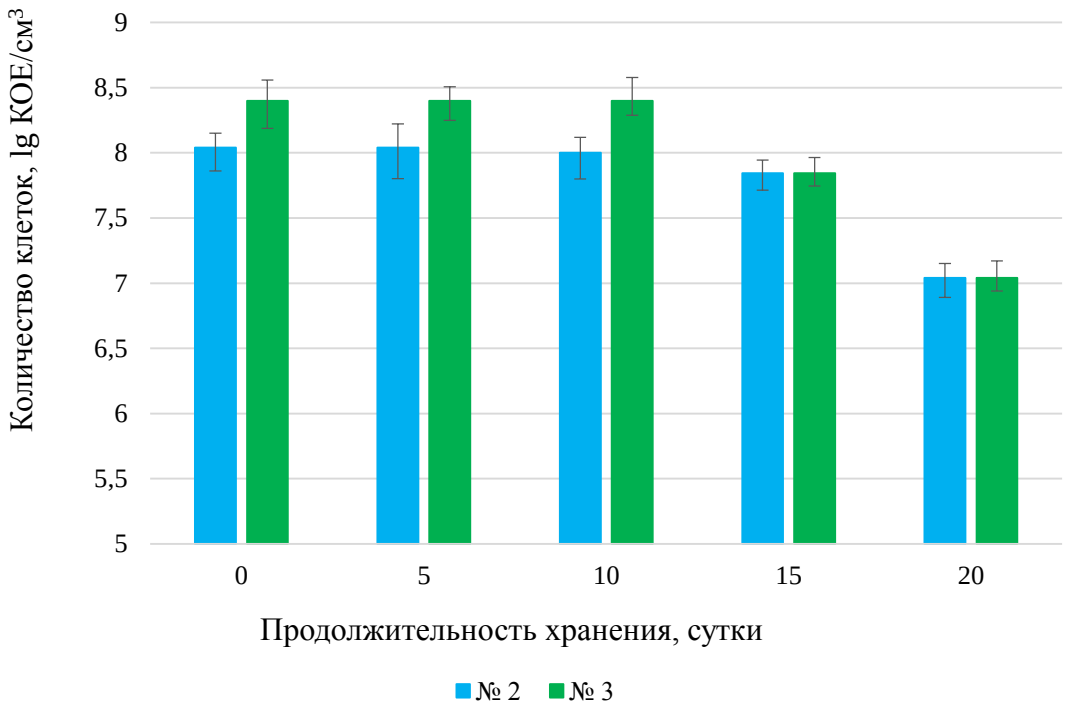


Рисунок 27 – Изменение количества клеток *L. helveticus* NK1 и *S. thermophilus* 159 в процессе хранения образцов продукта

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

Остальные микробиологические показатели готового продукта соответствовали нормам, изложенным в ТР ТС 033/2013 на протяжении всего срока хранения.

Данные по изменению активной кислотности вариантов кисломолочных продуктов представлены на рисунке 28.

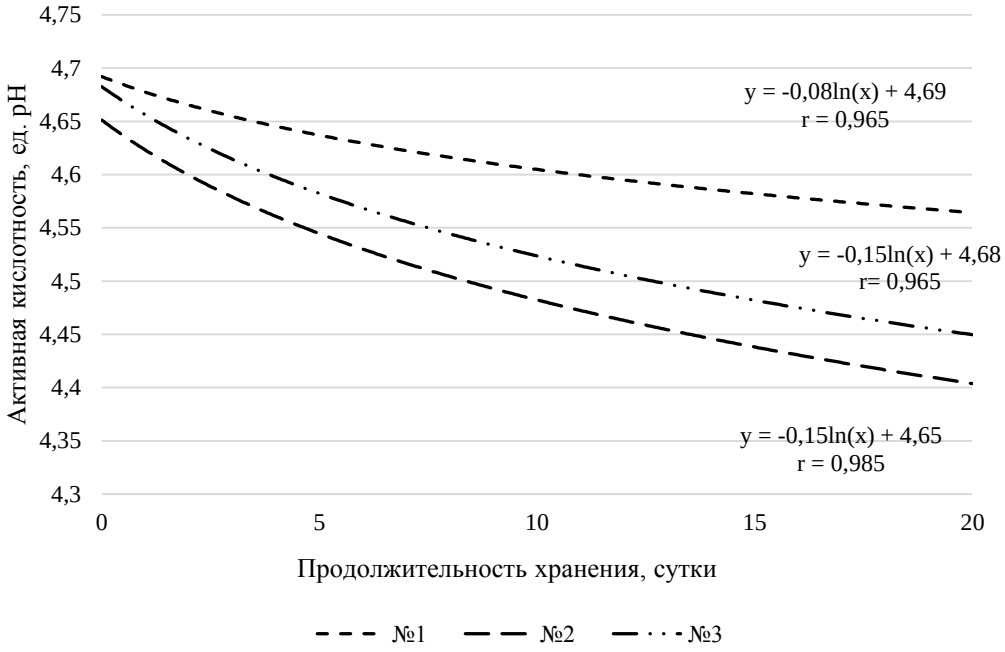


Рисунок 28 – Изменение активной кислотности в процессе хранения

Согласно полученным данным в образце №1 активная кислотность при хранении в течение 20 суток снижалась незначительно с 4,68 до 4,55 ед.pH. В образце № 2 активная кислотность снизилась с 4,64 до 4,41 ед. pH, а в образце № 3 – с 4,66 до 4,43 ед.pH.

Динамика изменения титруемой кислотности кисломолочых продуктов в процессе хранения представлена на рисунке 29.

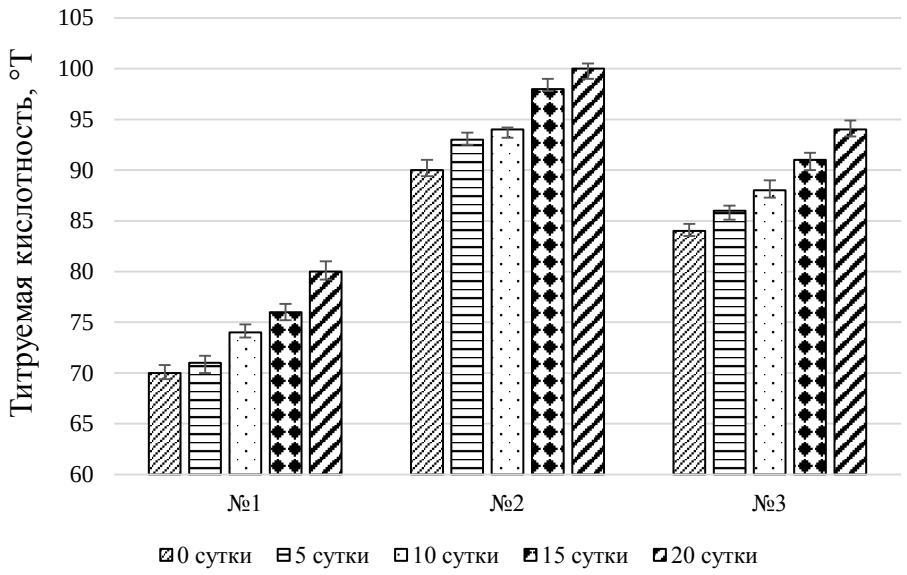


Рисунок 29 – Изменение титруемой кислотности в процессе хранения

Установлено, что титруемая кислотность в процессе хранения образцов увеличивается.

На основании проведенных исследований определены рекомендуемые сроки годности кисломолочных продуктов, вработанных разными способами. Рекомендуемый срок годности образцов №1 и №2 составляет 15 суток, образца № 3 – 10 суток.

5.4 Исследоваие функциональных свойств разработанного кисломолочного продукта

Исследование антагонистической активности разработанного кисломолочного продукта

Одним из показателей характеризующим функциональные свойства продукта является его антагонистическая активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. По совокупности полученных данных для исследования функциональных свойств был выбран образец кисломолочного продукта №2.

На рисунке 30 представлены результаты исследований по определению антагонистической активности разработанного кисломолочного продукта с использованием созданной закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1.

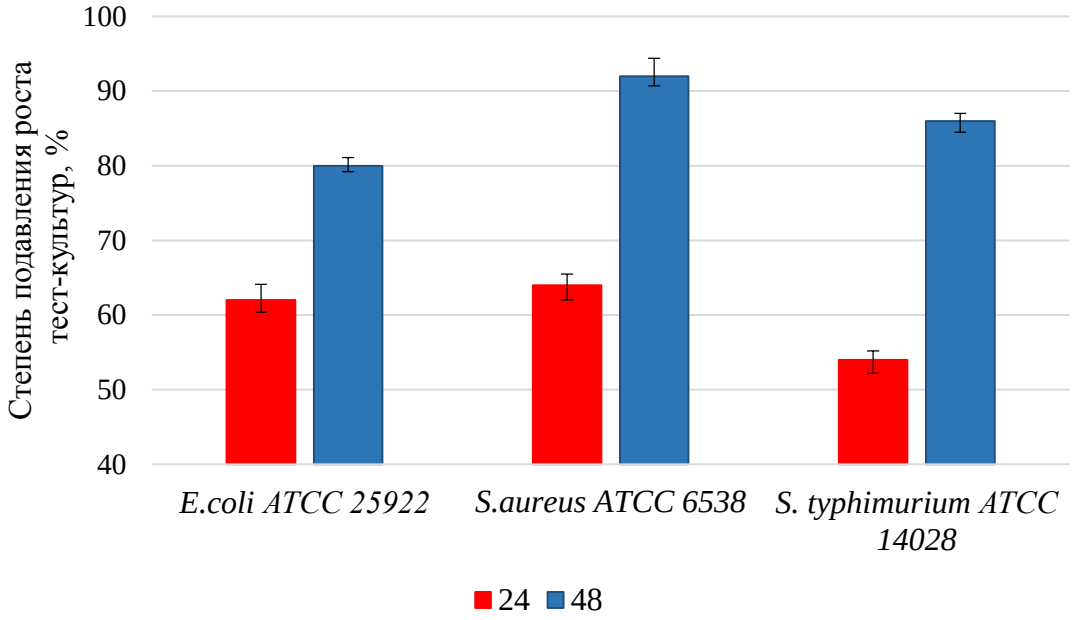


Рисунок 30 – Антагонистическая активность разработанного кисломолочного продукта

Как показали проведенные исследования, разработанный КП обладает выраженной антагонистической активностью. по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Степень подавления тест-штаммов при сокультивирования 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 кисломолочного продукта

Медико-биологическую оценку разработанного кисломолочного продукта в условиях *in vivo* проводили на белых крысах линии Wistar (с исходной массой тела 160 ± 10 г, n = 10 в каждой группе). Состояние животных до начала эксперимента находилось в пределах физиологической нормы. Крысы активно поедали корм: полное потребление исследуемых образцов, как контрольных, так и опытных.

Сохранность животных на протяжении эксперимента была 100 %. В течение всего периода наблюдения за животными не было отмечено никаких признаков изменения клинического состояния. Состояние животных до начала эксперимента находилось в пределах физиологической нормы. Сохранность животных на протяжении эксперимента была 100%. Наблюдения за животными в течение 30 дней кормления изучаемыми кисломолоч ными продуктами свидетельствовали о том, что отклонений в состоянии здоровья и поведении крыс не отмечалось. У крыс, потреблявших с рационом кисломолочные продукты «Опыт» и «Контроль», прибавка массы тела была выше показателя интактных животных (на 11 % и 6% соответственно), хотя калорийность рационов интактных, опытных и контрольных крыс различалась незначительно (2 ккал).

Введение в рацион исследуемых образцов не сказывалось на поведении, состоянии кожи, шерстного покрова и видимых слизистых оболочек подопытных животных, также различий в потреблении корма и воды отмечено не было. На протяжении всего эксперимента динамика изменения массы тела животных была положительной (рисунок 31).

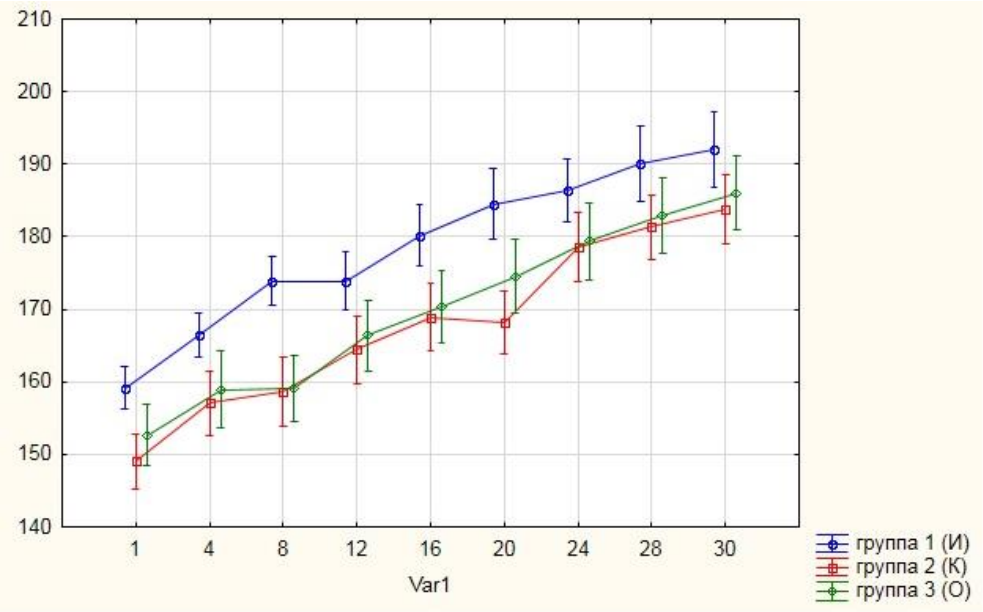


Рисунок 31 – Динамика изменения массы животных в процессе эксперимента

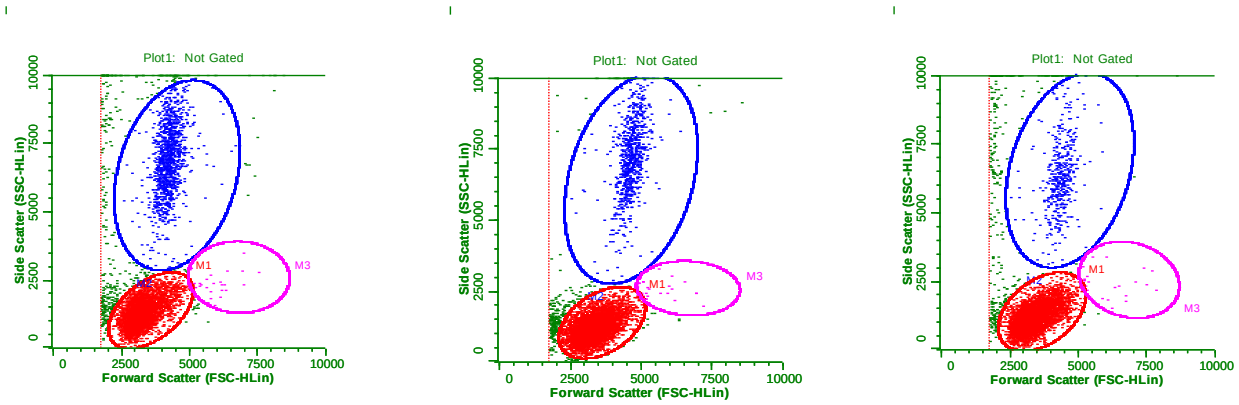
Максимальные привесы были отмечены у крыс, потреблявших кисломолочный продукт «контроль» – 23,3 %, у крыс, в рацион которых вводили кисломолочный продукт «опыт» – 21,9 %, у интактных животных этот показатель составил 20,6 % по отношению к исходной массе животных.

У животных всех групп содержание лейкоцитов и их распределение по популяциям находилось в пределах физиологической нормы. У крыс 2 группы, получавших кисломолочный продукт «опыт», наблюдалось снижение содержания лейкоцитов и лимфоцитов на 37,7% и 31,1%, по сравнению с контролем. При этом у крыс этой группы и группы 2 выявлено достоверное снижение содержания гранулоцитов на 42,2% и 61,8%, соответственно (таблица 16).

Таблица 16– Цитометрический анализ крови крыс в течение эксперимента

Показатели	Нормы [81]	Группы животных		
		Интакт	Контроль	Опыт
Лейкоциты, 10^9/л	1,13-11,06	4,80±0,74	4,50±0,68	2,99±0,40
Лимфоциты, 10^9/л	0,82-9,45	3,74±0,64	3,88±0,67	2,58±0,36
Содержание смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток, 10^9/л	0,03-1,5	0,04±0,01	0,04±0,01	0,02±0,00
Гранулоциты, 10^9/л	0,15-1,89	1,02±0,18	0,59±0,08	0,39±0,04
Лимфоциты, %	44,7-90	76,92±3,46	82,93±4,00	85,80±0,75
Моноциты, %	0,6-9,2	0,90±0,24	0,79±0,09	0,65±0,07
Относительное содержание гранулоцитов,%	9,0-49,3	22,18±3,45	16,29±4,02	13,55±0,75

Снижение концентрации гранулоцитов отразилось на относительном содержании лимфоцитов и гранулоцитов (рисунок 32) у животных 2 и 3 группы: относительное содержание лимфоцитов возросло на 7,8% и 11,5%, относительное содержание гранулоцитов снизилось на 26,6% и 38,9%, соответственно.



ИНТАКТ КОНТРОЛЬ ОПЫТ

Рисунок 32– Относительное распределение популяций лейкоцитов. Условные обозначения: красный – популяция лимфоцитов, синий – популяция гранулоцитов, розовый – популяция смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток.

У животных всех групп гематологические показатели, характеризующие функциональное состояние эритроцитов и тромбоцитов (таблица 17), находились в пределах физиологической нормы – значимых отклонений между группами не отмечалось.

Таблица 17 – Гематологический анализ крови крыс, характеризующий функциональное состояние эритроцитов и тромбоцитов

Показатели	Нормы [81]	Группы животных		
		Интакт	Контроль	Опыт
Эритроциты, 10^{12}/л	7,07-9,99	8,13±0,10	8,12±0,12	7,84±0,10
Гемоглобин, г/л	136-174	145,8±1,6	145,2±2,0	141,5±1,6
Гематокрит, %	37,9-52,0	41,85±0,50	41,93±0,55	41,15±0,45
Ср. объем эритроцита, мкм^3	46,3-58,3	51,50±0,34	51,65±0,29	52,55±0,20
Ср. содержание гемоглобина в эритроците, пг	16,3-20,9	17,94±0,12	17,89±0,10	18,06±0,07
Ср. концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	319-385	348,4±1,2	346,6±1,1	343,6±1,1
Ширина распр-я эритроцитов, %	10,5-16,2	14,87±0,10	15,04±0,17	15,00±0,09
Тромбоциты, 10^9/л	574-1253	701,5±19,4	696,2±16,0	706,7±14,5
Тромбокрит, %	-	0,43±0,01	0,43±0,01	0,44±0,01
Ср. объем тромбоцита, мкм^3	6,1-9,8	6,11±0,08	6,22±0,06	6,15±0,03
Распределение тромбоцитов, %	-	31,97±0,16	31,96±0,22	32,31±0,20

При биохимическом исследовании крови подопытных животных (таблица 18), установлено, что у крыс 3 группы при отсутствии достоверных изменений со стороны общего белка, альбумина и креатинина, выявлено статистически значимое увеличение концентрации мочевины на 28,9 % (относительно интакта) и 26,5 % (относительно контроля). Также у животных этой группы отмечено увеличение активности аланинаминотрансферазы (на 20,7% ($p<0,05$) и 30,8% ($p<0,05$) по отношению к интактным и контрольным животным, соответственно) и щелочной фосфатазы (на 39,5% ($p<0,05$) по сравнению с контролем). У крыс 2 группы, потреблявших продукт «контроль» выявлено достоверное увеличение уровня гамма-глутамилтранспептидазы на 44,1% по сравнению с интактом.

Таблица 18 – Биохимический анализ сыворотки крови крыс

Показатели	Нормы [93]	Группы животных		
		Интакт	Контроль	Опыт
Общий белок, г/л	52-76	65,12±0,78	66,94±0,59	66,19±0,85
Альбумин, г/л	34-48	41,27±0,24	42,87±0,37	42,43±0,55
Креатинин, мкмоль/л	9,0-70,0	59,15±1,69	61,00±1,33	59,05±1,19
Мочевина, ммоль/л	4,28-8,57	6,99±0,23	7,12±0,30	9,01±0,24
Билирубин (общ.), мкмоль/л	0,7-3,42	2,25±0,12	2,31±0,15	2,11±0,10
АсАт, Е/л	63-175	84,35±4,54	82,08±3,82	91,65±6,35
АлАт, Е/л	18-48	31,20±1,43	28,80±1,70	37,67±1,97
Щелочная фосфатаза, Е/л	62-230	143,6±9,0	116,9±3,4	163,1±14,4
ГГТ, Е/л	0-4	2,11±0,19	3,04±0,23	2,58±0,17
ЛДГ, Е/л	50-700	206,6±24,1	196,8±25,4	185,6±24,5
Холестерин, ммоль/л	0,962-2,47	1,83±0,07	1,83±0,06	1,28±0,11
Триглицериды, ммоль/л	0,22-1,76	1,09±0,07	0,71±0,05*	1,06±0,14
Глюкоза, ммоль/л	3,92-12,21	10,93±1,50	11,10±1,17	10,12±1,07

Со стороны биохимических показателей, характеризующих липидный обмен, у крыс, потреблявших кисломолочный продукт «опыт», показано снижение

концентрации холестерина (до 30% (p<0,05) относительно интакта и контроля). У животных контрольной группы содержание триглицеридов снизилось на 34,9 % (p<0,05) по сравнению с интактом.

Изучение видового состава и количественных уровней основных микробных по-пуляций микробиома кишечника крыс и их функциональной активности показало положительное влияние кисломолочного продукта на основе закваски прямого внесения *L. reuteri* LR1 и ХТС, проявляющееся в повышении общего числа анаэробных бактерий, уровней защитных популяций лактобактерий и энтеробактерий, а также в снижении численности условно-патогенных микроорганизмов, что может быть связано с действием пробиотиков, входящих в состав продукта. Данные по изучению видового состава и количественных уровней основных микробных популяций микробиома кишечника крыс представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Состав микробиома кишечника крыс после включения в их рацион кисломолочного продкта (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

Было выявлено, что у крыс, потреблявших разработанный пробиотический кисломолочный продукт, отмечалось увеличение относительного содержания

бифидобактерий в фекальных массах животных, что свидетельствует о способности стимулировать рост полезных симбиотических микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте *in vivo*.

Таким образом, проведенный комплекс исследований по изучению пробиотических свойств разработанного кисломолочного продукта позволил отнести разработанный кисломолочный продукт к продуктам с доказанными функциональными свойствами.

На основании комплекса проведенных исследований разработана нормативно-техническая документация на кисломолочный продукт СТО 00419785–047–2020 «Продукты кисломолочные «Релакт».

5.5 Опытно-промышленная выработка кисломолочного продукта «Релакт»

При производстве кисломолочного продукта «Релакт» СТО 00419785-047-2020 была использована разработанная закваска прямого внесения *L. reuteri* LR1 СТО 00419785-045-2020 «Закваска прямого внесения *Lactobacillus reuteri* LR1»

Закваску прямого внесения *L. reuteri* LR1 и 5% закваски ХТС (*L. helveticus* NK1 +*S. thermophilus* 159) вносили одновременно в пастеризованную при температуре (87 ± 2) °С в течение 10 минут и охлажденную до температуры заквашивания (37 ± 1) °С нормализованную смесь, перемешивали в течение 30 минут. Продолжительность сквашивания составила 8 часов, кислотность сгустка - (88 ± 2) °Т. Органолептические, физико-химические и микробиологические показатели полученного продукта представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Органолептические, физико-химические и микробиологические показатели кисломолочного продукта «Релакт»

Наименование показателя	Выработанный кисломолочный продукт	Норма для кисломолочного продукта «Релакт»
Внешний вид и консистенция	Однородная с нарушенным сгустком	Однородная с нарушенным сгустком На поверхности продукта допускается незначительное отделение сыворотки. Допускается газообразование в виде отдельных глазков, вызванных развитием *L.reuteri* LR1
Вкус и запах	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный без посторонних привкусов и запахов. С выраженным вкусом и ароматом, свойственным пастеризованному продукту
Цвет	Молочно-белый, равномерный по всей массе	Молочно-белый, равномерный по всей массе
Массовая доля жира, %	3,2±0,1	3,2
Массовая доля белка, %	2,8±0,08	2,8
Массовая доля СОМО, %	7,8±0,03	7,8
Кислотность, °Т	88±2	От 85 до 120 включительно
Количество молочнокислых микроорганизмов на конец срока годности, КОЕ/см^3	7×10^7	1×10^7
Количество *L.reuteri* LR1 КОЕ/см^3, не менее	7×10^6	1×10^6
Количество плесневых грибов, КОЕ/см^3, не более	Отсутствуют в 1,0 см^3	50
Количество дрожжей, КОЕ/см^3, не более	Отсутствуют в 1,0 см^3	50
Бактерии группы кишечных палочек (БГКП)	Отсутствуют в 0,1 см^3	Отсутствие в 0,1 см^3
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы	Отсутствуют в 25 см^3	Отсутствие в 25 см^3
S. aureus	Отсутствуют в 1,0 см^3	Отсутствие в 1,0 см^3

Наименование показателя	Выработанный кисломолочный продукт	Норма для кисломолочного продукта «Релакт»
Микроскопический препарат	Стрептококки, цепочки стрептококков, палочки тонкие короткие, средней длины и крупные, одиночные и в коротких цепочках	Для «Релакта (форте)» - палочки тонкие короткие и средней длины, одиночные и в коротких цепочках; для «Релакта» - стрептококки, цепочки стрептококков, палочки тонкие короткие, средней длины и крупные, одиночные и в коротких цепочках

Результаты опытно-промышленной выработки представлены в акте производственной проверки (Приложение 8). Все показатели соответствуют СТО 00419785-047-2020 «Продукты кисломолочные «Релакт»

Выводы

1. 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 см^3/дм^3, дрожжевой экстракт – 15 г/дм^3, CH_3COONa – 5 г/ дм^3, цистеин – 0,25 г/дм^3, KH_2PO_4 – 2 г/дм^3, $MgSO_4$ – 0,2 г/ дм^3, $MnSO_4$ – 0,05 г/ дм^3, дистиллированная вода до 1 дм^3. 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±0,1) ед. pH, количество инокулята – (6,0±0,5)%;

температура культивирования – (37±1)°С; продолжительность культивирования (7,0±0,5) 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.

Библиографичекий список

1. Банникова, Л. А. Микробиологические основы молочного производства / Л. А. Банникова, Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина. – Москва: Агропромиздат. – 1987. – 400с.
2. Банникова, Л.А. Изучение и отбор культур молочнокислых стрептококков / Л.А. Банникова, С.Б. Задояна, И.Н. Пятницына // Молочная промышленность. – 1976. – №6. – С.7 – 11.
3. Банникова, Л.А. Различные условия сохранения молочнокислых бактерий / Л.А. Банникова // Труды ВНИМИ. – 1953. – №15. – С.57 – 61.
4. Банникова, Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова. – М.: Пищевая промышленность. – 1975. – 255с.
5. Банникова, Л.А. Сухие закваски на основе бактериального концентрата / Л.А. Банникова, И.Н. Пятницына, Л. Казанцева // Молочная промышленность. – 1964. – №11. – С. 39 – 42.
6. Бондаренко, В.М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией / В.М. Бондаренко, А.А. Воробьев // Журн. микробиол. – 2004. – №1. – С.84 – 92.
7. Бордин, Д.С. Доказательная база эффективности *Lactobacillus reuteri* при лечении заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori* / Д.С. Бордин // Экспериментальная гастроэнтерология. – 2016 – №8. – С.82 – 87.
8. Булатова, Е.М. Кишечная микробиота: современные представления / Е.М. Булатова, Н.М. Богданова, Е.А. Лобанова, Т.В. Габрусская // Педиатрия. – 2009. – Т.87. – №3. – С.104 – 110.
9. Вековцев, А.А. Разработка, оценка потребительских свойств и эффективность пищевых продуктов пробиотического назначения: автореф. канд. техн. наук: 05.18.15. / Вековцев А.А. – Кемерово. – 2003. – 18 с.
10. Волкова Г.С. Изучение производственных свойств отдельных штаммов молочнокислых бактерий для создания пробиотиков / Г.С. Волкова, Е.В. Куксова, Е.М. Серба // Пищевая промышленность. – 2020. – № 3. – С.8 – 11.

11. Волкова, Г.С. Биотехнологические свойства закваски на основе консорциума промышленных штаммов молочнокислых бактерий / Г.С. Волкова, Е.М. Серба // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2020. – № 4(376). – С.73 – 77.
12. Ганина, В.И. Изучение стабильности свойств молочнокислых бактерий / В.И. Ганина, Н.В. Ананьева, Л.А. Борисова, Е.Ю. Жаркова // Молочная. – 2006. – №10. – С.39 – 40.
13. Ганина, В.И. Кисломолочный синбиотический напиток / В.И. Ганина, Л.В. Калинина, Е.Н. Терешина, С.И. Перминов // Молочная промышленность. – 2008. – №10. – С.85.
14. Ганина, В.И. Определение пробиотического потенциала некоторых представителей рода Lactobacillus / В.И. Ганина, И.В. Ким, У. Джинтендра, Т.Н. Рогожина // В сборнике: Разработка и широкая реализация современных технологий производства, переработки и создания пищевых продуктов. Материалы международной научно-практической конференции. ВНИТИ ММС и ППЖ Россельхозакадемии; Волгоградский государственный технический университет. – 2009. – С.332 – 333.
15. Ганина, В.И. Техническая микробиология продуктов животного происхождения / В.И. Ганина, Н.С. Королева, С.А. Фильчакова. – М.: ДеЛи принт. – 2008. – 352 с.
16. Глушанова, Н.А. Биологические свойства лактобацилл / Н.А. Глушанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4.
17. ГОСТ Р 52349 – 2005 Продукты пищевые. Продукты функциональные. Термины и определения. - М.: Изд-во «Стандартинформ». – 2006. – 10 с.
18. Готшалк, Г. Метаболизм бактерий / Г. Готшалк. – М.: Мир. – 1982. – 310 с.
19. Карпунина, Т.И. Повышение эффективности терапевтического действия пробиотиков / Т.И. Карпунина, Э.С. Горовиц, А.Н. Чиненкова //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1998. – №2. – С.104 – 107.
20. Королева, Н. С. Симбиотические закваски термофильных бактерий в производстве кисломолочных продуктов / Н. С. Королева, М. С.

Кондратенко. – Москва: Пищевая промышленность; София: Техника. – 1978. – 168с.

21. Кушугулова, А.Р. Актуальные вопросы исследований и производства пробиотической продукции / А. Р. Кушугулова // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. – № 2. – С. 25 – 31.
22. Лянная, А.М. Методология селекции бифидобактерий, перспективных для создания на их основе эубиотиков и продуктов функционального питания / А.М. Лянная // Медицинские аспекты микробной экологии. – 1994. – С.181 – 184.
23. МУ 2.3.2.2789-10 Методические указания, по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 104 с.
24. МУК 4.2.1847-04 Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов. Методические указания - М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 31 с.
25. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. - М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
26. Патент RU2053781C1, Препарат из живых лактобактерий / В.В. Поспелова, Н.Г. Рахимова, Н.Н. Ворошилина, Г.И. Ханина, Ю.К. Зацепин, М.П. Халенева, Н.С. Королева, И.В. Лагода // Опубл. 10.02.1996.
27. Патент RU2083666C1, Способ получения сухого бактериального препарата «БИФАЦИД» / В.Ф.Семенихина, В.Ф. Иноземцева, Р.П. Чупринина, М.Б. Сундукова // Опубл. 10.07.1997.
28. Перт, С. Д. Основы культивирования микроорганизмов клеток / С. Д. Перт. – М.: Мир. – 1978. – 330 с.

29. Попова, Е.Н. Возможности применения пробиотиков в антивозрастном аспекте / Е.Н. Попова, А.С. Орлова, А.Б. Пономарев, С.Л. Безродный, А.Н. Суворов, Б.А. Шендеров // В книге: МИКРОБИОТА. под редакцией Е.Л. Никонова и Е.Н. Поповой.: Москва. –2019. – С.198 – 215.
30. Поспелова, В.В. Изучение вариантов пробиотика ацилакт на живых моделях / В.В. Поспелова, Ю.В. Черепанова, В.М. Лахтин, Е.В. Криворучко, Л.П. Ульянова, Т.Е. Гвоздик, И.М. Аршба // Вестник. – 2009. – №1. – С.5 – 10.
31. Раскошная, Т.А. Совершенствование биотехнологии бактериального концентрата ацидофильных молочнокислых палочек для производства кисломолочных продуктов: автореф. дис. канд. техн. наук: 05.18.04 / Т.А. Раскошная; Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова. Москва, 2012. – 27 с.
32. Свириденко, Г.М. Lactobacillus acidophilus как компонент бактериальных заквасок для ферментированных молочных продуктов, в том числе сыров / Г.М. Свириденко, О.М. Шухалова, Е.Е. Ускова // Молочная промышленность. – 2020. – №10. – С.40 – 43.
33. Свириденко, Г.М. Анализ особенностей микроорганизмов вида *Lactobacillus casei* с целью их использования в составе бактериальных заквасок / Г.М. Свириденко, О.М. Шухалова, Д.С. Вахрушева // Молочная промышленность. – 2019. – № 9. – С.38 – 40.
34. Семенихина В.Ф. Биотехнологические аспекты производства кисломолочных пробиотических продуктов / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова // Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции «Современные биотехнологии переработки сельскохозяйственного сырья и вторичных ресурсов» / Рос. акад. с.-х. наук, Отделение хранения и перераб. с.-х. продукции. – Углич. – 2009. – С.199 – 202.
35. Семенихина В.Ф. Создание кисломолочных продуктов различного функционального назначения / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова // Волгогр. науч.-исслед. технол. ин-т мясомолоч. скотоводства и перераб. продукции животноводства РАСХН. – Волгоград. – 2006. – Ч.1. – С.230 – 232.

36. Семенихина, В.В. Новые достижения в технологии кисломолочных продуктов / В. Ф. Семенихина, И. В. Рожкова // Мол. пром. – 2002. – №9. – С.41 – 43.
37. Семенихина, В.Ф. Исследование некоторых параметров процесса периодического культивирования бифидобактерий с целью получения бактериальной массы / В.Ф. Семенихина, Я.А. Яркина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2004. – № 12. – С.48
38. Семенихина, В.Ф. Развитие микробиологии кисломолочных продуктов / В.Ф. Семенихина // Молочная промышленность. –1994. – №1. – С.9 – 11.
39. Семенихина, В.Ф. Штамм бифидобактерий Bifidobacterium adolescentis МС-42, используемый для приготовления кисломолочных продуктов и способ получения закваски бифидобактерий для кисломолочных продуктов / В.Ф. Семенихина, М.Б. Сундукова // Авторское свидетельство SU 863639 A1, 15.09.1981. Заявка №2900607 от 25.12.1979.
40. Сорокина, Н.П. Бактериальные концентрата / Н.П. Сорокина // Сыроделие и маслоделие. – 2004. – №3. – 16 с.
41. Сорокина, Н.П. Изменение таксономии и номенклатуры видов микроорганизмов рода Lactobacillus / Н.П. Сорокина, И.В. Кучеренко, Е.С. Масежная // Молочная промышленность. – 2020. – №7. – С. 40 – 43
42. Сорокина, Н.П. Производство ферментированных молочных продуктов и сыров: состав и свойства заквасочной микрофлоры / Н.П. Сорокина, И.В. Кучеренко // Молочная промышленность. – 2013. – №7. – С.54 – 57.
43. Степаненко, П. П. Микробиология молока и молочных продуктов: учеб. для ВУЗов / П. П. Степаненко. – Сергиев Посад: ООО «Все для вас – Подмосковье», 1999. – 145 с.
44. Суржик, А.В. Влияние пробиотической культуры Lactobacillus rhamnosus GG на иммунный ответ организма/ А.В. Суржик // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – Т.8. –№ 2. – С. 54 – 58.

45. Тамим, А.Й. Йогурты и другие кисломолочные продукты / А.Й. Тамим, Р.К. Робинсон; под научным ред. д-ра техн. наук, проф. Л.А. Забодаловой. – Санкт-Петербург: Профессия. – 2003. – 661с.
46. Тутельян, В.А Оптимальное питание – основа здорового образа жизни / В.А. Тутельян, Н.Ф. Герасименко, Д.Б. Никитюк, А.В. Погожева // В книге: Здоровье молодежи: новые вызовы и перспективы. – Москва. – 2019. – С.228 – 249.
47. Тутельян, В.А. Питание в борьбе за выживание/ В.А.Тутельян, Б.П. Суханов, М.М.Г. Гаппаров, В.А. Кудашева. - М. «Академкнига». - 2003. – 448 с.
48. Хамагаева, И.С. Биотехнлогия заквасок пропионовокислых бактерий / И.С. Хамагаева, Л.М. Кочанина, С.М. Тумурова //Улан-Уде. – ВСГТУ. – 2006. – С.3 – 5.
49. Червинец, Ю.В. Современные представления о биотехнологическом потенциале симбиотической микробиоты человка / Ю.В. Червинец, В.М. Червинец, Б.А. Шендеров // Верхневолжский медицинский журнал. – 2018. – Т. 17. – №1. – С.19 – 26.
50. Шендеров, Б.А Микробиоценоз человека и функциональное питание / Б.А. Шендеров // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – Т.11. – №4. – С.78.
51. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель; пер. с нем Л.В. Алексеевой и др. – М.: Мир. – 1987. – 576 с.
52. Aasen, I.M. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by Lactobacillus sakei CCUG 42687 / I.M. Aasen, T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson, I. Størrø // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2000. – V.53 – P.159 – 166.
53. Abadias, M. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent Candida sake using different protective and rehydration media / M. Abadias, N. Teixido, J. Usall, A. Benabarre, I. Vinas // Journal of Food Protection. – 2001. – V.64(6) – P.856 – 861.

54. Aguilar-Toalá, J.E. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific Lactobacillus plantarum strains / J.E. Aguilar-Toalá, L. Santiago-López, C.M. Peres, C. Peres, H.S. Garcia, B. Vallejo-Cordoba, A.F. González-Córdova, A. Hernández-Mendoza // Journal of Dairy Science. – 2017. – V.100 – №1. – P.65 – 75.
55. Ahotupa, M. Antioxidative properties of Lactobacillus GG / M. Ahotupa, M. Saxelin, R. Korpela // Nutr. Today Suppl. – 1996. – V.31. – P.51 – 52.
56. Ali, E. Use of Mass Spectrometry to Profile Peptides in Whey Protein Isolate Medium Fermented by Lactobacillus helveticus LH-2 and Lactobacillus acidophilus La-5 / E. Ali, S.D. Nielsen, S.A.-E. Aal, A. El-Leboudy, E. Saleh, G. Lapointe // Front. Nutr. – 2019. – V.6 – P.152.
57. Alvaro, E. Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt / E. Alvaro, C. Andrieux, V. Rochet, L. Rigottier-Gois, P. Lepercq, M. Sutren, J. Doré // British Journal of Nutrition. – 2007. – V.97. – №1. – P.126 – 133.
58. Aquilina, G. Guidelines on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance / G. Aquilina, G. Bories, A. Chesson, P.S. Cocconcelli, J. Knecht, N.A. Dierick, M.A. Gralak, J. Gropp, I. Halle, C. Hogstrand, L. Leng, S.L. Puente, A-K. Lundebye Haldorsen, A. Mantovani, G. Martelli, M. Mézes, D. Renshaw, M. Saarela, K. Sejrsen, J. Westendorf // EFSA Journal. – 2012. – V. 10(6). – P. 2740-2750. DOI:10.2903/j.efsa.2012.2740
59. Axelsson, L.T. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by Lactobacillus reuteri / L.T. Axelsson, T.C. Chung, W.J. Dobrogosz // Microb. Ecol. Hlth. Dis. – 1989. – №2. – P. 131 – 136.
60. Babu, V. Effect of tomato juice addition on the growth and activity of Lactobacillus acidophilus / V. Babu, BK. Mital, SK. Garg //. Int J Food Microbiol. – 1992. – V.17 – P.67 – 70.
61. Bäckhed, F. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage / F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, LV. Hooper, GY. Koh, A. Nagy, CF.

Semenkovich, JI. Gordon // Proceedings of the National Academy of Sciences Nov. – 2004. – V.101. – №44. – P.15718 – 15723.

62. Battino, M. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases : the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species / M. Battino, P. Bullon, M. Wilson, H. Newman // Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. – 1999. – V.10(4). – P.458 – 476.
63. Beltrán-Barrientos, L.M. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food / L.M. Beltrán-Barrientos, A. Hernández-Mendoza, M.J. Torres-Llanez, A.F. González-Córdova, B. Vallejo-Córdoba// Journal of Dairy Science. – 2016. – V.99 (6). – P.4099.
64. Benthin, S. Amino acid utilization by Lactococcus lactis subsp. cremoris FD1 during growth on yeast extract or casein peptone / S. Benthin, J. Villadsen // J Appl Bacteriol. – 1996. – V.80 – P.65.
65. Bozoglu, T.F. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying / T.F. Bozoglu, M. Ozilgen, U. Bakir // Enzyme Microbiology Technology. – 1987. – V.9 – P.531 – 537.
66. Broadbent, R. J. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of lactococcus lactis to freezing and lyophilization. / R. J. Broadbent, C. Lin. // Cryobiology. – 1999. – V.39 – P.88 – 102. DOI: 10.1006/cryo.1999.2190.
67. Bruce, K.D. The development origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome / K.D. Bruce, M. Hanson //J. Nutr. – 2010. – V.140. – P.648 – 652.
68. Burns, P. Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli / P. Burns, G. Vinderola, F. Molinari, J. Reinheimer // Int J Dairy Technol. – 2008. – V.61 – P.156 – 164.
69. Capela, P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt / P. Capela, TKC. Hay, NP. Shah // Food Res Intern. – 2006. – V.39 – P.203 – 211.
70. Carr, F.J. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey / F.J. Carr, D. Chill, N. Maida // Crit. Rev. Microbiol. – 2002. – V.28. – №4. – P.281 – 370.

71. Carvalho, A.S. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus / A.S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F.X. Malcata, P. Gibbs // Biotechnology Progress. – 2004. – V.20 – P.248 – 254.
72. Carvalho, A. S. Effect of various growth media upon survival during storageof freeze-dried Enterococcus faecalis and Enterococcus durans / A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata, P. Gibbs // J. Appl. Microbiol. – 2003. – V.94 – P.947-952. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01853.x.
73. Carvalho, A. S. Protective effectof sorbital and monosodium glutamate duringstorag of freeze-dried Lactic acid bacteria / A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata, P. Gibbs // Lait. – 2003. – V.83 – P.203 – 210.
74. Carvalho, A. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria / A. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F.X. Malcata, P. Gibbs //International Dairy Journal. – 2004. – V.14(10) – P.835 – 847. DOI:10.1016/j.idairyj.2004.02.001.
75. Castro, H.P. Changes in the cell membrane of Lactobacillus bulgaricus during storage following freeze-drying / H.P. Castro, P.M. Teixeira, R. Kirby // Biotechnol Lett. – 1996. – V.18 – P.99 – 104. DOI: 10.1007/BF00137819.
76. Chen, G. Influence of conditions on reuterin accumulation by the resting cell biotransformation process / G. Chen, D. Yang, Y. Xiao, H. Chen // Chinese journal of chemical engineering. – 2011. – №19(6). – P.1023 – 1027.
77. Cherbut, C. Effects of short chain fatty acids on gastrointestinal motility / C. Cherbut, A.C. Aube, H.M. Blottiere, J.P. Galmiche // Scand J Gastroenterology. – 1997. – P.58 – 61.
78. Chobanian, A.V. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure / A.V. Chobanian, G.L. Bakris, H.R. Black, W.C. Cushman, L.A. Green, J.L. Izzo, D.W. Jones, B.J. Materson, S. Oparil, J.T. Wright, E.J. Roccella, Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure, and national high blood pressure education program coordinating committee // (JNC

7). Hypertension. – 2003. – V.42(6). – P.1206 – 1252. DOI: 10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2.

79. Chun, J. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes / J. Chun, A. Oren, A. Ventosa, H. Christensen, DR. Arahal // Int J Syst Evol Microbiol. – 2018. – V.68. – P.461 – 466.
80. Chung, T.C. In vitro studies on synthesis by Lactobacillus reuteri / T.C. Chung, L. Axelsson, S.E. Lindgren, W.J. Dobrogosz // Microb. Ecol. Hlth. Dis. – 1989. – №2. – P.137 – 144.
81. Clinical Laboratory Parameteres for Rats. – Charles River. – 2008. – 14p.
82. Contreras, M.D.M. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity / M.D.M. Contreras, R. Carrón, M.J. Montero, M. Ramos, I. Recio // Int. Dairy J. – 2009. – V.19 – P.566 – 573.
83. Corcoran, B.M. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances /.M. Corcoran, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, C. Stanton // Journal of Applied Microbiology. – 2004. – V.96 – P.1024 – 1039.
84. Costa, E. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of Pantoea agglomerans strain CPA-2 subjected to freeze drying / E. Costa, J. Usall, N. Teixido, N. Garcia, I. Vinas // Journal of Applied Microbiology. – 2000. – V.89 – P.793 – 800.
85. Cotter, P.D. Bacteriocins: developing innate immunity for food / P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross // Nat. Rev. Microbiol. – 2005. – V.3. – № 10. – P.777 – 788.
86. Daien, V. Treatment of hypertension with renin-angiotensin system inhibitors and renal dysfunction: a systematic review and meta-analysis / V. Daien, Y. Duny, J. Ribstein, G. Cailar, A. Mimran, M. Villain, JP. Daures, P. Fesler // Am J Hypertens. – 2012. – V.25 (1). – P.126 – 32. DOI: 10.1038/ajh.2011.180.
87. De Man, J. C. A medium for the cultivation of lactobacillus / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bact. – 1960. – №1. – P.130 – 135.
88. De Valdez, G.F. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria / G. F. De Valdez, G. S. De Giori, A.P. De Ruiz

Holgado, G. Oliver // Applied and Environmental microbiology. – 1985. – P.413 – 415.

89. Dexian, Z. Lactobacillus reuteri ATCC 55730 and L22 display probiotic potential in vitro and protect against Salmonella-induced pullorum disease in a chick model of infection/ Z. Dexian, L. Rui, L. Jichang // Research in Veterinary Science. – 2012. – V. 93(1) – P. 366 – 373. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.06.020.
90. Donkor, O.N. ACE-inhibitory activity of probiotic yogurt / O.N. Donkor, A. Henriksson, T.K. Singh, T. Vasiljevic, N.P. Shah //Int. Dairy J. – 2007. – V.17. – P.1321 – 1331.
91. Edwards, C. Intestinal flora during the first months of life: New perspectives / C. Edwards, A. Parrett // British Journal of Nutrition. – 2002. – V.88. – P.11 – 18.
92. Elli, M. Growth requirements of Lactobacillus johnsonii in skim and UHT milk / M. Elli, R. Zink, R. Reniero, L. Morelli // Int Dairy J. – 1999. – V.9 – P.507 – 513.
93. Evans, G.O. Animal Clinical Chemistry: A Practical Handbook for Toxicologistsand Biomedical Researchers. Second Edition/ G.O. Evans, A. George // Owenand Company CRCPress, UK. – 2009. – 368 p.
94. Fonseca, F. Collapse temperature of freeze-dried Lactobacillus bulgaricus suspensions and protective media / F. Fonseca, S. Passot, O. Cunin, M. Marin //. Biotechnol Prog. – 2004. – V.20 – P. 229 – 238.
95. Foster, J.A. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome / J.A. Foster, L. Rinaman, J.F. Cryan // Neurobiol. Stress. – 2017. – V. 7. – P. 124 – 136. DOI:10.1016/j.ynstr.2017.03.001
96. Freeman, H.J. Effects of differing purified cellulose, pectin and hemicellulose fiber diets on fecal enzymes in 1,2 – dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis / H.J. Freeman // Cancer Research. – 1986. – V.46 (11). – P. 5529 – 5532.
97. Frese, S.A. Molecular characterization of host-specific biofilm formation in a vertebrate gut symbiont / S.A. Frese, D.A. Mackenzie, D.A. Peterson, R. Schmaltz, T. Fangman, Y. Zhou // PLoS Genet. – 2013. – V.9(12): e1004057. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004057

98. Fry, R. M. The survival of bacteria during and after drying / R.M. Fry, R. I. M. Greaves // J. Hyg. – 1999. – №49. – P.20-246.

99. Fuglsang, A. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo / A. Fuglsang, FP. Rattray, D. Nilsson, NC. Nyborg // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2003. –V.83 (1). – P.27 – 34. DOI: 10.1023/a:1022993905778.

100. Gänzle, MG. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage / MG. Gänzle // Curr Opin Food Sci. – 2015. – V.2 – P.106 – 117.

101. Gardiner, G. E. Comparative survival rates of human-derived probiotic Lactobacillus paracasei and L. salivarius strains during heat treatment and spray drying / G. E. Gardiner, E. O'Sullivan, J. Kelly, M. A. Auty, G. F. Fitzgerald, J. K. Collins, R. P. Ross, C. Stanton // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V.66 – P.2605 – 2612.

102. Georges, B. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance 2 prepared by the panel on additives and products or substances used in/ B. Georges, P. Brantom, J. Brufau, A. Chesson, PS. Cocconcelli, B. Debski, N. Dierick, A. Franklin, J. Gropp, I. Halle, C. Hogstrand, J. Knecht // EFSA J. – 2008. – V.732.

103. Giknis M.L.A. Clinical Laboratory Parameteres for Rats / M.L.A. Giknis, C.B. Clifford, D.V.M., Ph.D. // Charles River. – 2008. – 14p.

104. Guergoletto K.B. Survival of Lactobacillus casei (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers / K.B. Guergoletto, M. Magnani, J.S. Martin, C.G.T.de.J. Andrade, S. Garcia // Innovat Food Sci Emerg Technol. – 2010. – V.11 – P.415 – 421.

105. Guilio, B.P. Use of alginate and cryoprotective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying / B.P. De Guilio, P. Orlando, G. Barba, R. Coppola, M. De Rosa, A. Sada, P. P De Prisco, F. Nazarro // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – V.21 – P.739 – 746.

106. Hatakka, K. Probiotics in intestinal and non-intestinal infectious diseases – clinical evidence / K. Hatakka, M. Saxelin // Curr. Pharm. Des. – 2008. – №14. – P.1351 – 1367.

107. Hernández-Ledesma, B. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation to foods / B. Hernández-Ledesma, M. Contreras, I. Recio // Colloid Interface Sci. – 2011. – V.165. – P.23 – 35.

108. Hooper, L. Molecular analysis of commensal host6microbial relationships in the intestine / L. Hooper, M.Wong, A. Thelin // Science. – 2001. – V.291. – P.881 – 884.

109. Hori, G. Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers / G. Hori, MF. Wang, YC. Chan, T. Komatsu, YC. Wong, TH. Chen, K. Yamamoto, S. Nagaoka, S. Yamamoto // Biosci Biotechnol Biochem. – 2001. – V.65 – P.72 – 78.

110. Hou, C. Study and use of the probiotic Lactobacillus reuteri in pigs: a review / C. Hou, X. Zeng, F. Yang // J. Animal Sci. Biotechnol. – 2015. – V.6. – P.14. DOI:10.1186/s40104-015-0014-3.

111. Hoy-Schulz, YE. Safety and acceptability of Lactobacillus reuteri DSM 17938 and Bifidobacterium longum subspecies infantis 35624 in Bangladeshi infants: a phase I randomized clinical trial / YE. Hoy-Schulz, K. Jannat, T. Roberts, SH. Zaidi, L. Unicomb, S. Luby, J. Parsonnet // BMC Complement Altern Med. – 2016. – V.16 – P.44. DOI: 10.1186/s12906-016-1016-1.

112. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms / Z. Hubalek // Cryobiology. – 2003. – V.46 – P.205 – 229.

113. Ito, M. Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice / M. Ito, K. Ohishi, Y. Yoshida, W. Yokoi, H. Sawada // J Agric Food Chem. – 2003. – V.51(15). – P.4456 – 4460.

114. Jacobsen, C.N. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans / C.N. Jacobsen, V. Rosenfeldt Nielsen, A.E. Hayford, P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A. Pærregaard, B. Sandstöm, M. Tvede,

M. Jakobsen // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – № 65. – P. 4949 – 4956.

115. Jäkälä, P. Antihypertensive peptides from milk proteins / P. Jäkälä, H. Vapaatalo // Pharmaceuticals. – 2010. – V.3. – P.251 – 272.

116. Kandler, O. Lactobacillus reuteri sp. nov. a new species of heterofermentative lactobacilli / O. Kandler, K. Stetter, R. Kohl // Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie. – 1980. – V.1. – №3. – P.264 – 269. DOI:10.1016/S0172-5564(80)80007-8.

117. Kerry, R.G. Benefaction of probiotics for human health: A review / R.G. Kerry, J.K. Patra, S. Gouda, Y. Park, H.-S. Shin, G. Das // J. Food Drug Anal. – 2018. – V.26. – №3. – P.927 – 939. DOI:10.1016/j.jfda.2018.01.002.

118. Kim, E-Y. Selection of Lactobacillus sp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs / E-Y. Kim, Y-H. Kim, M-H. Rhee, J-C. Song, K-W. Lee, K-S. Kim, S-P. Lee, I-S. Lee, S-C. Park // The Journal of General and Applied Microbiology. – 2007. – V.53. – №2. – P.111 – 117. DOI:10.2323/jgam.53.111.

119. Kim, S. Effects of fermented milk peptides supplement on blood pressure and vascular function in spontaneously hypertensive rats / S. Kim, S. Park, R. Choue // Food Sci. Biotechnol. – 2010. – V.19. – P.1409 – 1413.

120. King, VAE. Dehydration of Lactobacillus acidophilus / VAE. King, JT. Su // Process Biochem. – 1994. – V.28 – P.47 – 52.

121. Klantschitsch, T. Lactobacillus reuteri: A newcomer in dairy technology / T. Klantschitsch, H. Spillmannand, Z. Puhan // Mljekarstvo. – 1996. – № 46(3). – P.183 – 196.

122. Klayraung, S. Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of Lactobacillus fermentum isolated from Miang / S. Klayraung, S. Okonogi // Braz J Microbiol. – 2009. – V.40(4). – P.757 – 766. DOI: 10.1590/S1517-83822009000400005.

123. Konstantinidis, KT. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes / KT. Konstantinidis, JM. Tiedje // J Bacteriol. – 2005 – V.187 – P.6258 – 6264.

124. Korhonen, H. Technological options for the production of health-promoting proteins derived from milk and colostrums / H. Korhonen, A. Pihlanto // Curr. Pharm. Des. – 2007. – V. 13. – P. 829 – 843.

125. Kullisaar, T. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics / T. Kullisaar, M. Zilmer, M. Mikelsaar, T. Vihalemm, H. Annuk, C. Kairane, A. Kilk // International Journal of Food Microbiology. – 2002. –V.72(3). – P.215 – 224.

126. Kundu, P. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self / P. Kundu // Cell. Elsevier Inc. – 2017. – V.171. – № 7. – P.1481 – 1493.

127. Larena, I. Drying of conidia of Penicillium oxalicum, a biological control agent against Fusarium wilt of tomato / I. Larena, P. Melgarejo, A. Cal // Journal of Phytopathology. – 2003. – V.151 – P.600 – 606.

128. LeBlanc, J.G. Effect of pH on Lactobacillus fermentum growth, raffmose removal, a-galactosidase activity and fermentation products / J.G. LeBlanc, M.S. Garro, G. Savoy de Giori // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 65 (1). – P.119 – 123.

129. Lee, J. Characterization of the anti-inflammatory Lactobacillus reuteri BM36301 and its probiotic benefits on aged mice / J. Lee, W. Yang, A. Hostetler // BMC Microbiol. – 2016. – V.16 – P.69. DOI: 10.1186/s12866-016-0686-7.

130. Lee, K.W. Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces / K.W. Lee, J.Y. Park, H.R. Jeong, H.J. Heo, N.S. Han, J.H. Kim //Anaerobe. – 2012. – V.18 – P.96 – 102.

131. Leroy, F. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry / F. Leroy, L. D. Vuyst // Trend in Food Science and Technology. – 2004. – №15. – P.67 – 78. DOI:10.1016/j.tifs.2003.09.004.

132. Leslie, SB. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying / SB. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, JH. Crowe, LM. Crowe // Appl Environ Microbiol. – 1995. – V.61 – P.3592 – 3597.

133. Li, B. Effects of cryoprotectants on viability of Lactobacillus reuteri CICC6226 / B. Li, F. Tian, X. Liu, J. Zhao, H. Zhang, W. Chen // Appl Microbiol Biotechnol. – 2011. – V.92(3) – P.609 – 616. DOI:10.1007/s00253-011-3269-4.

134. Lievense, LC. Mechanism of dehydration inactivation of Lactobacillus plantarum / LC. Lievense, MAM. Verbreek, A. Noomen, K. Riet // Appl Microbiol Biotechnol. – 1994. – V.41 – P.90 – 94.

135. Lim, HJ. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use/ HJ. Lim, SY. Kim, WK. Lee // J Vet Sci. – 2004. – V.5 (4) – P.391 – 395.

136. Liu, Y. Human-derived probiotic Lactobacillus reuteri strains differentially reduce intestinal inflammation / Y. Liu, NY. Fatheree, N. Mangalat, JM. Rhoads // Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. – 2010. – V.299(5) – P.1087 – 96.

137. Luo, M. Preventive effect of Lactobacillus reuteri on melanoma / M. Luo, M. Hu, X. Feng, W. XiaoLi, D. Dong, W. Wang // Biomed Pharmacother. – 2020. – V.126 – P.109929. DOI:10.1016/j.biopha.2020.109929.

138. Macori, G. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods / G. Macori, P.D. Cotter // Curr. Opin. Biotechnol. – 2018. – V. 49. – P. 172 – 178. DOI:10.1016/j.copbio.2017.09.002.

139. Mangiapane, E. Ten years of subproteome investigations in lactic acid bacteria: A key for food starter and probiotic typing / E. Mangiapane, R. Mazzoli, A. Pessione, B. Svensson, K. Riedel, E. Pessione // J Proteomics. – 2015. – V.127. – P. 332 – 339.

140. Manguy, J. Peptigram: A Web-Based Application for Peptidomics Data Visualization / J. Manguy, P. Jehl, E.T. Dillon, N.E. Davey, D.C. Shields, T.A. Holton // J. Proteome Res. – 2017. – V.16 – P.712 – 719. DOI:10.1021/acs.jproteome.6b00751.

141. Mann, G.V. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai/ G.V. Mann //American Journal of Clinical Nutrition. – 1974. – V.27 – P.464 – 469.

142. Marco, M.L Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond / M.L. Marco, D. Heeney, S. Binda, C.J. Cifelli, P.D. Cotter, B. Foligné, M. Gänzle,

R. Kort, G. Pasin, A. Pihlanto, E.J. Smid, R. Hutkins // Curr. Opin. Biotechnol. – 2017. – V.44. – P. 94 – 102. DOI:10.1016/j.copbio.2016.11.010.

143. Marshall, VM. A yogurt-like product made by fermenting ultrafiltered milk containing elevated whey proteins with Lactobacillus acidophilus / VM. Marshall, WM. Cole, JR. Vega //J Dairy Res. – 1982. – V.49 – P.665 – 671.

144. Meei-Yn, L. Antioxidative ability of lactic acid bacteria / L. Meei-Yn, Y. Chyuan-Liang //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1999. – V.47(4). – P.1460 – 1466.

145. Miller, B. Possibilities of shortened fermentation of acidophilus milk / B, Miller, Z. Puhan // Schweiz. Milchw. Forschung. – 1981. – V.9 – P.49 – 55.

146. Miremadi, F. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria / F. Miremadi, M. Ayyash, F. Sherkat, L. Stojanovska // J. Funct. Foods. – 2014. – V.9 – P.295 – 305.

147. Moore, J. Effects of Solid-state enzymatic treatments on the antioxidant properties of wheat bran / J. Moore, Z. Cheng, L. Su, L. Yu // J. Agric. Food Chem. – 2006. – V.54. – P.9032 – 9045.

148. Morgan, C.A. Preservation of microorganisms by drying / C.A. Morgan, N. Herman, P.A. White, G. Vesey // Journal of Microbiological Methods. – 2006. – V. 66(2) – P.183 – 193 DOI:10.1016/j.mimet.2006.02.017.

149. Nejati, F. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I conerting enzyme (ACE)-inhibiting peptides and -aminobutyric acid / F. Nejati, C.G. Rizzello, R. DiCagno, M. Sheikh-Zeinoddin, A. Diviccaro, F. Minervini, M. Gobbetti // LWT – Food Sci. Technol. – 2012. – V. 51. – P.183 – 189.

150. Neu, H.C. The crisis in antibiotic resistance / H.C. Neu // Science. – 1994. – V. 257. – P.1064 – 1073.

151. Nielsen, S.D. Milk bioactive peptide database: a comprehensive da-ta-base of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization / S.D. Nielsen, R.L. Beverly, Y. Qu, D.C. Dallas // Food Chem. – 2017. – V. 232 – P.673 – 682.

152. O'Connor, P.M. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective / P.M. O'Connor // Curr. Opin. Food Sci. Elsevier Ltd. – 2015. – V. 2. – P.51 – 57.

153. Oh, PL. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as result of host-driven evolution / PL. Oh, AK. Benson, DA. Peterson, PB. Patil, EN. Moriyama, S. Roos, J. Walter // ISME J. – 2010. – V. 4(3). – P. 377 – 387. DOI:10.1038/ismej.2009.123.

154. Oldenhof, H. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried Lactobacillus bulgaricus: an in situ Fourier transform infrared spectroscopy study / H. Oldenhof, W.F. Wolkers, F. Fonseca, S. Passot, M. Marin // Biotechnol. – 2005. – V. 21 – P.885 – 892.

155. Orla-Jensen, S. The lactic acid bacteria / S. Orla-Jensen // Copenhagen: Andr Fred Høst and Son. – 1919.

156. Ou, B. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe / B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior // J. Agric Food Chem. – 2001. – V. 49. – P.4619 – 4626.

157. Palmfeldt, J. Influence of culture pH on survival of Lactobacillus reuteri subjected to freeze-drying / J. Palmfeldt, B. Hahn-Hagerdal // International Journal of Food Microbiology. – 2000. – V. 55 – P.235 – 238.

158. Pancheniak, E. Molecular characterization and biomass and metabolite production of Lactobacillus reuteri LPB P01-001: A potential probiotic/ E. Pancheniak, M.T. Maziero, J.A. Rodriguez-Leon, J.L. Parada, M.R. Spier, C.R. Soccol // Brazilian Journal of Microbiology. – 2012. – P.135 – 147.

159. Park, Y.H. Effect of dietary inclusion of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats / Y.H. Park, G.K. Jong, W.S. Young, H.K. Sae, Y.W. Kwang // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 17 – P.655 – 662.

160. Patent WO2004/015125, Peptides with antihypertensive properties / Hansen's Lab., B. Flambard // Pub.Date 19.02.2004

161. Penner, R. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases / R. Penner, R.N. Fedorak, K.L. Madsen // Current Opinion in Pharmacology. – 2005. – V. 5(6). – P. 596 – 603.

162. Perpetuo, E.A. Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptides obtained from tryptic hydrolysis of casein / E.A. Perpetuo, L. Juliano, I. Lebrun // Journal of Protein Chemistry. – 2003. – V. 22 – P. 601 – 606.

163. Pfeiler, E.A. The genomics of lactic acid bacteria / E.A. Pfeiler, T.R. Klaenhammer // Trends Microbiol. – 2007. – V.15. – №12. – P.546 – 553.

164. Pihlanto, A. Bioactive peptides and proteins / A. Pihlanto, H. Korhonen // Adv Food Nutr Res. – 2003. – V. 47. – P. 175 – 276. DOI: 10.1016/s1043-4526(03)47004-6.

165. Poutahidis, T. Microbial reprogramming inhibits Western diet-associated obesity / T. Poutahidis, M. Kleinewietfeld, C. Smillie, T. Levkovich, A. Perrotta, S. Bhela, BJ. Varian, YM. Ibrahim, JR. Lakritz, SM. Kearney, A. Chatzigiagkos, DA. Hafler, EJ. Alm, SE. Erdman // PLoS One. – 2013. – V. 10(7) – P. 685 – 696. DOI:10.1371/journal.pone.0068596

166. Prior, R.L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples / R.L. Prior, H. Hoang, X.Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsh-Woodill, D. Huang, B. Ou, R. Jacob // J. Agric Food Chem. – 2003. – V. 51 – P. 3273 – 3279.

167. Quinto, E.J. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review / E.J. Quinto // Food Nutr. Sci. – 2014. – V. 5. – №18. – P. 1765 – 1775.

168. Rana, R. Effect of basal medium and pH on the growth of Lactobacillus acidophilus / R. Rana, DN. Gandhi // Indian. J Dairy Sci. – 2000. – V. 53 – P. 338 – 342.

169. Reuter, G. Das vorkommen von laktobazillen in lebensmitteln und ihr verhalten im menschlichen intestinaltrakt / G. Reuter // Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene: international journal of microbiology

and hygiene: Abteilung 1. Originale. B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, präventive medizin. – 1965. –V. 197. – №4. – P. 468 – 487.

170. Ricke, S. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials / S. Ricke // Poult. Sci. – 2003. – V. 82. – № 4. – P. 632 – 639.

171. Rival, S.G. Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties / S.G. Rival, S. Fornaroli, C.G. Boeriu, H.J. Wichers // J. Agric. Food Chem. – 2001. – V. 49. – P. 287 – 294.

172. Saguir, FM. Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for Oenococcus oeni growth / FM. Saguir, MC. Manca de Nadra // J Appl Microbiol. – 2002. – V. 93 – P. 295 – 301.

173. Saito, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese / T. Saito, T. Nakamura, H. Kitazawa, Y. Kawai, T. Itoh // J. Dairy Sci. – 2000. – V. 83 – P. 1434 – 1440.

174. Sanchez B. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease / B. Sanchez, S. Delgado, A. Blanco-Miguez, A. Lourenco, M. Gueimonde, A. Margolles // Mol. Nutr. Food Res. – 2017. – V. 61. – №1. – P. 160 – 240. DOI:10.1002/mnfr.201600240

175. Santivarangkna, C. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures / C. Santivarangkna, U. Kulozik, P. Foerst // Biotechnol Prog. – 2007. – V. 23(2) – P. 302 – 315.

176. Santos, F. Effect of amino acid availability on vitamin B12 production in Lactobacillus reuteri / F. Santos, B. Teusink, D. Molenaar, M. Heck, M. Wels, S. Sieuwerts, W. Vos, J. Hugenholtz // Appl Environ Microbiol. – 2009. – № 75 (12). – P. 3930 – 3936.

177. Sauer, M. The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production / M. Sauer // Trends Biotechnol. Elsevier. – 2017. – V. 35. – № 8. – P. 756 – 769.

178. Schleifer, KH. Molecular systematics of prokaryotes / KH. Schleifer, E. Stackebrandt // Annu Rev Microbiol. – 1983. – V. 37 – P. 143 – 187.

179. Schwab, C. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of Lactobacillus reuteri TMW1.106 during freeze-drying / C. Schwab, R. Vogel, M.G. Gänzle // Cryobiology. – 2007. – V. 55(2) – P. 108 – 114. DOI:10.1016/j.cryobiol.2007.06.004.

180. Scott, W.J. The effect of residual water on the survival of dried bacteria during storage / W. Scott // J. Gen. Microbiol. – 1958. – №19. – P. 624 – 633.

181. Selmer-Olsen, E. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized Lactobacillus subjected to drying, storage and rehydration / E. Selmer-Olsen, S.-E. Birkeland, T. Sørhaug // Journal of Applied Microbiology. – 1999. – V. 87 – P. 429 – 437. DOI:10.1046/j.1365-2672.1999.00839.x.

182. Shaper, A.G. Serum lipids in the three nomadic tribes of Northern Kenya / A.G. Shaper, K.W. Jones, J. Kyobe //American Journal of Clinical Nutrition. – 1963. – V. 13 – P. 135 – 146.

183. Shengyu, L. Antioxidant activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from traditional Chinese fermented foods / L. Shengyu, Z. Yujuan, Z. Li, Z. Xue, H. Li, L. Da, N. Chunhua, Y. Zhennai, W. Qiang // Food Chemistry. – 2012. – V. 135(3). – P. 1914 – 1919.

184. Snell, E.E. Growth factors for bacteria. Some nutritive requirements of Lactobacillus delbrueckii / E.E. Snell, L. Tatume, H. Petersonw // J. Bact. – 1937. – V. 33. – P. 207.

185. Solieri, L. Peptidomic study of casein proteolysis in bovine milk by Lactobacillus casei PRA205 and Lactobacillus rhamnosus PRA331 / L. Solieri, L. De Vero, D. Tagliazucchi // International Dairy Journal. – 2018. – V. 85 – P. 237 – 246.

186. Stark, PL. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life/ PL. Stark, A. Lee // J. Med. Microbiol. –1982. – V. 15 (2) – P. 189 – 203.

187. Stoyanova, L.G. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties / L.G. Stoyanova, E.A. Ustyugova, A.I. Netrusov // Appl.

Biochem. Microbiol. – 2012. – V. 48. – P. 229 – 243. DOI:10.1134/S0003683812030143.

188. Ström, K. Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid / K. Ström // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68. – № 9. – P. 4322 – 4327.

189. Takao, M. Inhibition of binding of Helicobacter pylori to the glycolipid receptors by probiotic Lactobacillus reuteri / M. Takao, A. Tomoko, S. Eri, M. Kenichi, M. Mitsuyo, O. Hitoshi // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2002. – № 32. – P. 105 – 110.

190. Talarico, T.L. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri / T.L. Talarico, W.J. Dobrogosz // Antimicrob. Agents Chemother. – 1989. – №33. – P. 674 – 679.

191. Tamang, J.P. Functional properties of microorganisms in fermented foods / J.P. Tamang, D-H. Shin, S-J. Jung, S-W. Chae // Front Microbiol. – 2016. – V. 7. – P. 578. DOI:10.3389/fmicb.2016.00578.

192. Tang W. H. Gut microbiota in cardiovascular health and disease / W. H. Tang, T. Kitai, S. L. Hazen // Circ. Res. – 2017. – V. 120. – № 7. – P. 1183 – 1196. DOI:10.1161/circresaha.117.309715.

193. Teixeira, PC. Survival of Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus following spray-drying / PC. Teixeira, MH. Castro, FX. Malcata, RM. Kirby // J Dairy Sci. – 1995. – V. 78 – P. 1025 – 1031.

194. To, BCS. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species / BCS. To, MR. Etzel // J Food Sci. – 1997. – V. 62 – P. 576 – 585.

195. Toba, T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by Lactobacillus reuteri LA 6 / T. Toba, S. K. Samant, E. Yoshioka, T. Itoh // Lett. Appl. Microbiol. – 1991. – 13. – P. 281 – 286.

196. Udenigwe, C. Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition / C. Udenigwe, A. Mohan // Journal of Functional Foods. – 2014. – V. 8. – P. 45 – 52.

197. Urbańska, M. The efficacy of Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence / M. Urbańska, H. Szajewska // European journal of pediatrics. – 2014. – V. 173 – №10. – P. 1327 – 1337. DOI:10.1007/s00431-014-2328-0.

198. Valeur, N. Colonization and immunomodulation by Lactobacillus reuteri ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract / N. Valeur, P. Engel, N. Carbajal //Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – №2. – P. 1176 – 1181. DOI:10.1128/aem.70.2.1176-1181.2004

199. Wang C.-Y. Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage / C.-Y. Wang, P.-R. Lin, C.-C. Ng, Y.-T. Shyu //Anaerobe. – 2010. – V. 16 – P. 578 – 585.

200. WHO. 2011. Enfermedades cardiovasculares. World Health Organization. Accessed Apr. 12, 2012

201. Xie, Y. Hypocholesterolemic effects of Kluyveromyces marxianus M3 isolated from Tibetan mushrooms on diet- induced hypercholesterolemia in rat / Y. Xie, H. Zhang, H. Liu, L. Xiong, X. Gao, H. Jia, Z. Lian, N. Tong, T. Han // Brazil. J. Microbiol. – 2015. – V. 46 – P. 389 – 395.

202. Yaeshima, T. Benefits of bifidobacteria to human health. In: Bulletin of the IDF No 313 / T. Yaeshima // International Dairy Federation. – 1996. – P. 36 – 41.

203. Zheng, J. A genomic view of lactobacilli and pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology / J. Zheng, L. Ruan, M. Sun, M. Gänzle // Appl Environ Microbiol. – 2015. – V. 81 – P. 7233 – 7243.

204. Zoumpopoulou G. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health / G. Zoumpopoulou, B. Pot, E. Tsakalidou, K. Papadimitriou // Int. Dairy J. – 2017. – V. 67. – P. 46 – 60. DOI:10.1016/j.idairyj.2016.09.010

Приложение 1

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

1. Видовое название культуры: *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*)

2. Номер или наименование штамма: LR 1

3. Родословная штамма:

4. Способ получения штамма (найден в естественных условиях, где, когда, кем; получен селекционным путем; получен как мутант и т.п.) выделен из содержимого кишечника здорового взрослого человека

5. Где (наименование организации и ее адрес) идентифицирован микроорганизм, данные на основании которых было сделано заключение о родовой/видовой принадлежности микроорганизма, должны прилагаться к паспорту): штамм *Lactobacillus reuteri* выделен в Центральной лаборатории микробиологии ФГБНУ ВНИМИ (г. Москва, ул. Люсиновская 35 корп. 7) по тестам идентификации молочнокислых бактерий, изложенных в Сборнике инструкций по селекции молочнокислых бактерий и бифидобактерий и подбору заквасок для кисломолочных продуктов, утвержденных Минмясомолпромом СССР и согласованных с Минздравом СССР 1985г

6. Сведения о безопасности использования штамма

Штамм *L. reuteri* не является генетически модифицированным, штамм *L. reuteri* относится к микроорганизмам непатогенным для человека согласно классификации микроорганизмов, приведенных в Санитарных правилах СП 1.2.731-99. Работа со штаммом *L. reuteri* не требует специальных мер предосторожности.

7. Культурально-морфологические особенности штамма: гетероферментативная палочка, развивается при наличии в молоке или питательной среде 5% желчи и

устойчива к фенолу (0,4%), продуцирует молочную кислоту, уксусную кислоту и д.р. и продуцирует спирт из глюкозы. Штамм продуцирует бактериоциноподобное вещество реутерин.

8. Биохимическая идентификация *L.reuteri* LR1

Контроль	-	Эскулин железа цитрат	-
Глицерин	-	Салицин	-
Эритрол	-	D-целлобиоза	-
D-арабиноза	-	D-мальтоза	+
L-арабиноза	+	D-лактоза (бычья)	+
D-рибоза	+	D-мелибиоза	+
D-ксилоза	+	D-сахароза	+
L-ксилоза	-	D-трегалоза	-
D-адонитол	-	Инулин	-
Метил-βD-ксилапиранозид	-	D-мелецитоза	-
D-галактоза	+	D-раффиноза	+
D-фруктоза	-	Гликоген	-
D-манноза	-	Ксилит	-
L-сорбоза	-	Гентиобиоза	-
L-рамноза	-	D-тураноза	-
Дульцитол	-	D-ликсоза	-
Инозит	-	D-тагатоза	-
D-маннит	-	D-фукоза	-
D-сорбит	-	L-фукоза	-
Метил-αD-маннопиранозид	-	D-арабит	-
Метил-αD-гдюкопиранозид	-	L-арабит	-
N-ацетилпиранозид	-	Калия глюконат	-
Амигдалин	-	Калия 2-кетоглюконат	-
Арбутин	-	Калия 5-кетоглюконат	-

9. Молекулярно-генетическая идентификация *L. reuteri* LR1

Ближайший гомолог по данным BLASTN			Ближайший гомолог другого вида по данным BLASTN		
Вид, штамм	Идентификатор в GenBank	% идентичных нуклеотидов	Вид, штамм	Идентификатор в GenBank	% идентичных нуклеотидов
L. reuteri MM2-3 SD2112 DSM 20016 JCM 1112 CF48-3A	NZ_GG693764.1 NC_015697.1 NC_009513.1 NC_010609.1 NZ_GG693685.1	1458/1462 (99%), Gaps = 2/1462 (0%) 1456/1462 (99%), Gaps = 2/1462 (0%) 1373/1373 (100%), Gaps = 0/1373 (0%)	L. antri DSM 16041 L.vaginalis ATCC 49540	NZ_GG700732.1 NZ_GG693419.1	1396/1463 (95%), Gaps = 4/1463 (0%) 1309/1337 (98%), Gaps = 1/1337 (0%)

Результат ПЦР-анализа секвенирования последовательностей 16S рРНК с помощью BLAST показал, что данный штамм принадлежит к *L. reuteri*.

10. Антагонистическая активность: антагонистически активен в совместно развивающихся культурах по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам (*Salmonella spp., S. aureus, E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*)

11. Устойчивость к антибиотикам: гентамицину, канамицину, бензилпенициллину, оксациллину, левофлоксацину, пефлоксацину, доксициклину, тетрациклину, азитромицину, фосфомицину

12. Среды для культивирования: MRS, ГМК-2, Блаурокка, обезжиренное молоко дрожжевым экстрактом

13. Условия и время инкубации: анаэробные при температуре (37±1)°С в течение 16-20 часов.

14. Метод хранения: лиофильно высушенная культура

15. Условия хранения: минус (18±2)°С

16. Область применения: перспективен в качестве продуцента при производстве фармацевтических препаратов и продуктов питания пробиотической направленности.

17. Форма депонирования: Штамм хранится в отраслевой коллекции молочнокислых и пробиотичкских микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» (Москва, ул. Люсиновская 35, корп.7)

Приложение 2

Перечень пептидов, идентифицированных в белково-пептидной фракции исходного обезжиренного молока

Белок предшественник	**Пептид**
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVES(+79.97)LS(+79.97)SS(+79.97)EESITRINK.K
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPG.E
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVES(+79.97)LS(+79.97)S(+79.97)S(+79.97)EESITRINK.K
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELN.V
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVES(+79.97)L.S
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQSEEQQQT(+79.97)EDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQS(+79.97)EEQQQTEDELQDK.I
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQS(+79.97)EEQQQTEDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQSEEQQQTEDELQDK.I
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQS(+79.97)EEQQQTED.E
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQS(+79.97)EEQQ.Q
P02666|CASB_BOVIN	K.IEKFQS(+79.97)EEQQQTEDELQDK.I
P02666|CASB_BOVIN	E.DELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	D.ELQDKIHPF.A

P02666|CASB_BOVIN	D.KIHPFAQTQ.S
P02666|CASB_BOVIN	F.AQTQSLVYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	F.AQTQSLVYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGV.S
P02666|CASB_BOVIN	V.VVPPFLQPEVMGV.S
P02666|CASB_BOVIN	M.GVSKVKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	V.SKVKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	V.SKVKEAMAPKHK.E
P02666|CASB_BOVIN	V.SKVKEAMAP.K
P02666|CASB_BOVIN	V.SKVKEAMAPKH.K
P02666|CASB_BOVIN	S.KVKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	K.VKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	K.VKEAMAPKHK.E
P02666|CASB_BOVIN	V.KEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	K.HKEMPFPKYPVEPFTESQSL.T
P02666|CASB_BOVIN	K.HKEMPFPKYPVEPF.T
P02666|CASB_BOVIN	K.EMPFPKYPVEPFTESQSL.T
P02666|CASB_BOVIN	L.TLTDVEN.L
P02666|CASB_BOVIN	F.LLYQEPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	L.LYQEPVLGPVRGPFPIIV

P02666|CASB_BOVIN	Q.EPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	E.PVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	V.LGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	L.GPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	G.PVRGPFPIIV
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLL.R
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFF.V
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLN.E
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF.F
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLR.F
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNEN.L
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEV.L
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKH.Q
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQ.E
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLP.Q
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVL.N
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQ.G
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQE.V
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIK.H

P02662|CASA1_ BOVIN	A.RPKHPIKHQGL.P
P02662|CASA1_ BOVIN	A.RPKHPIKHQG.L
P02662|CASA1_ BOVIN	P.KHPIKHQGLPQEVLNENLLRF.F
P02662|CASA1_ BOVIN	P.KHPIKHQGLPQEVLNENLLRFF.V
P02662|CASA1_ BOVIN	P.KHPIKHQGLPQEVLNEN.L
P02662|CASA1_ BOVIN	P.KHPIKHQGLPQEVLNENLLR.F
P02662|CASA1_ BOVIN	P.KHPIKHQGLPQ.E
P02662|CASA1_ BOVIN	P.KHPIKHQ.G
P02662|CASA1_ BOVIN	F.FVAPFPEVFGKEKV.N
P02662|CASA1_ BOVIN	F.VAPFPEVFGKEKV.N
P02662|CASA1_ BOVIN	V.APFPEVFGKEKV.N
P02662|CASA1_ BOVIN	N.S(+79.97)VEQKHIQKEDVPSERYL.G
P02662|CASA1_ BOVIN	K.HIQKEDVPSER.Y
P02662|CASA1_ BOVIN	K.HIQKEDVPSERYL.G
P02662|CASA1_ BOVIN	K.HIQKEDVPSE.R
P02662|CASA1_ BOVIN	K.HIQKEDVPSERY.L
P02662|CASA1_ BOVIN	K.HIQKEDVPS.E
P02662|CASA1_ BOVIN	D.VPSERYL.G
P02662|CASA1_ BOVIN	Y.YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW

P02662|CASA1_ BOVIN	Y.YVPLGTQYTDAPSF.S
P02662|CASA1_ BOVIN	Y.YVPLGTQY.T
P02662|CASA1_ BOVIN	Y.TDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_ BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_ BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSENSEKTTM(+15.99)PLW
P02662|CASA1_ BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW(+15.99)
P02662|CASA1_ BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSEN.S
P02662|CASA1_ BOVIN	P.SFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_ BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_ BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTM(+15.99)PLW
P02662|CASA1_ BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTMP.L
P02662|CASA1_ BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKT.T
P02662|CASA1_ BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEK.T
P02662|CASA1_ BOVIN	S.DIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_ BOVIN	D.IPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_ BOVIN	D.IPNPIGSENSEKTTMPLW(+15.99)
P02662|CASA1_ BOVIN	N.PIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_ BOVIN	N.PIGSENSEKTTMPLW(+15.99)
P02662|CASA1_ BOVIN	N.PIGSENSEKTTM(+15.99)PLW(+15.99)

P02662|CASA1_BOVIN	N.PIGSENSEK.T
P02662|CASA1_BOVIN	P.IGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	P.IGSENSEKT.T
P02662|CASA1_BOVIN	G.SENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	S.ENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	N.SEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	N.SEKTTMPLW(+15.99)
P02662|CASA1_BOVIN	N.SEKTTM(+15.99)PLW
P02662|CASA1_BOVIN	T.TMPLW
P02668|CASK_BOVIN	D.S(+79.97)PEVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	D.SPEVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	S.PEVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	P.EVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	N.TVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	T.VQVTSTAV
P02754|LACB_BOVIN	A.LIVTQTMKGLDIQKVAGTWY.S
P02754|LACB_BOVIN	N.PTQLEEQCHI
P80195|GLCM1_BOVIN	A.ILNKPEDETHLEAQPTDASAQFIR.N
P80195|GLCM1_BOVIN	A.ILNKPEDETHLEAQPTDASAQFIRN.L

P80195|GLCM1_BOVIN	A.ILNKPED.E
P80195|GLCM1_BOVIN	R.SSRQPQSQNPKLPLSILKEKHL.R
P02663|CASA2_BOVIN	A.KNTMEHVS(+79.97)S(+79.97)S(+79.97)EESIISQETYKQEK.N
P02663|CASA2_BOVIN	N.PWDQVKRNAVPITPT.L
P02663|CASA2_BOVIN	N.PWDQVKR.N
P02663|CASA2_BOVIN	R.NAVPITPT.L
P02663|CASA2_BOVIN	T.LNREQLS(+79.97)TS(+79.97)EEN.S
P02663|CASA2_BOVIN	T.LNREQLSTS(+79.97)EEN.S
P02663|CASA2_BOVIN	T.LNREQLS(+79.97)TSEENSK.K
P02663|CASA2_BOVIN	K.TKLTEEEKN.R
P02663|CASA2_BOVIN	K.LTEEEKNR.L
P02663|CASA2_BOVIN	K.TVYQHQK.A
P02663|CASA2_BOVIN	K.AMKPWIQPKTKVIPYVRYL
P02663|CASA2_BOVIN	K.TKVIPYVRYL
P31096|OSTP_BOVIN	Y.GLKSRSKKF.R
P81265|PIGR_BOVIN	K.AAPAGAAIQS.R

Приложение 3

Перечень пептидов, идентифицированных в белково-пептидной фракции обезжиренного молока, сквашенного штаммом *L. reuteri* LR1

Белок предшественник	**Пептид**
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVES(+79.97)LS(+79.97)S(+79.97)S(+79.97)EESITRINK.K
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVES(+79.97)LS(+79.97)S(+79.97)S(+79.97) EESITRINKKIEKFQSEEQQQT(+79.97)EDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVESLS(+79.97)S(+79.97)S(+79.97)EESITRINK.K
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVES(+79.97)LS(+79.97)S(+79.97)SEESITRINK.K
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGE.I
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELN.V
P02666|CASB_BOVIN	A.RELEELNVPGEIVES(+79.97)L.S
P02666|CASB_BOVIN	N.KKIEKFQS(+79.97)EEQQQTEDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQS(+79.97)EEQQQTEDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQS(+79.97)EEQQQTEDELQDK.I
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQSEEQQQT(+79.97)EDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	K.KIEKFQSEEQQQTEDELQDK.I
P02666|CASB_BOVIN	K.IEKFQS(+79.97)EEQQQTEDELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	D.ELQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	D.ELQDKIHPFAQTQS.L

P02666|CASB_BOVIN	D.ELQDKIHPFAQTQ.S
P02666|CASB_BOVIN	E.LQDKIHPF.A
P02666|CASB_BOVIN	I.HPFAQTQS.L
P02666|CASB_BOVIN	V.YPFPGPIPN.S
P02666|CASB_BOVIN	N.SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGV.S
P02666|CASB_BOVIN	Q.NIPPLTQTPVVVPPFLQPEVM(+15.99).G
P02666|CASB_BOVIN	V.SKVKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	V.SKVKEAMAPKHK.E
P02666|CASB_BOVIN	V.SKVKEAMAPKH.K
P02666|CASB_BOVIN	S.KVKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	S.KVKEAMAP.K
P02666|CASB_BOVIN	K.VKEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	V.KEAMAPK.H
P02666|CASB_BOVIN	K.HKEMPFPKYPVEPFTESQSL.T
P02666|CASB_BOVIN	K.HKEM(+15.99)PFPKYPVEPFTESQSL.T
P02666|CASB_BOVIN	K.HKEMPFPKYPVEPF.T
P02666|CASB_BOVIN	K.HKEMPFPKYPVEPFTESQ.S
P02666|CASB_BOVIN	K.EMPFPKYPVEPFTESQSL.T
P02666|CASB_BOVIN	E.MPFPKYPVEPFTESQSL.T

P02666|CASB_BOVIN	L.TLTDVENL.H
P02666|CASB_BOVIN	L.TLTDVEN.L
P02666|CASB_BOVIN	M.HQPHQPLPPT.V
P02666|CASB_BOVIN	A.VPYPQRDMPIQA.F
P02666|CASB_BOVIN	A.VPYPQRDMPIQ.A
P02666|CASB_BOVIN	A.VPYPQRDMPIQAF.L
P02666|CASB_BOVIN	D.MPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	F.LLYQEPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	L.LYQEPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	L.YQEPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	L.YQEPVLGPVRGPFP.I
P02666|CASB_BOVIN	Y.QEPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	Y.QEPVLGPVRGPFP.I
P02666|CASB_BOVIN	Q.EPVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	Q.EPVLGPVRGPFP.I
P02666|CASB_BOVIN	E.PVLGPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	E.PVLGPVRGPFP.I
P02666|CASB_BOVIN	L.GPVRGPFPIIV
P02666|CASB_BOVIN	L.GPVRGPFP.I

P02666|CASB_BOVIN	G.PVRGPFPIIV
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF.F
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLN.E
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLL.R
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQ.E
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLR.F
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNEN.L
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFF.V
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIK.H
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKH.Q
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQGLPQE.V
P02662|CASA1_BOVIN	A.RPKHPIKHQ.G
P02662|CASA1_BOVIN	P.KHPIKHQGLPQEVLNENLLR.F
P02662|CASA1_BOVIN	P.KHPIKHQGLPQEVLNENLLRF.F
P02662|CASA1_BOVIN	P.KHPIKHQGLPQ.E
P02662|CASA1_BOVIN	K.HPIKHQGLPQEVLN.E
P02662|CASA1_BOVIN	K.HPIKHQGLPQ.E
P02662|CASA1_BOVIN	K.HPIKHQGLPQE.V
P02662|CASA1_BOVIN	K.HPIKHQGLPQEV.L

P02662|CASA1_BOVIN	K.HPIKHQGLPQEVLNEN.L
P02662|CASA1_BOVIN	K.HQGLPQEVLNENLLR.F
P02662|CASA1_BOVIN	K.HQGLPQE.V
P02662|CASA1_BOVIN	Q.EVLNENLLR.F
P02662|CASA1_BOVIN	Q.EVLNENLLRF.F
P02662|CASA1_BOVIN	E.VLNENLLR.F
P02662|CASA1_BOVIN	E.VLNENLLRF.F
P02662|CASA1_BOVIN	V.LNENLLR.F
P02662|CASA1_BOVIN	F.VAPFPEVFGKEKV.N
P02662|CASA1_BOVIN	F.VAPFPEVFGK.E
P02662|CASA1_BOVIN	V.APFPEVFGKEKV.N
P02662|CASA1_BOVIN	V.APFPEVFGK.E
P02662|CASA1_BOVIN	V.APFPEVFG.K
P02662|CASA1_BOVIN	A.PFPEVFGKEKV.N
P02662|CASA1_BOVIN	P.EVFGKEKV.N
P02662|CASA1_BOVIN	N.S(+79.97)VEQKHIQKEDVPSERYL.G
P02662|CASA1_BOVIN	K.HIQKEDVPSER.Y
P02662|CASA1_BOVIN	K.HIQKEDVPSE.R
P02662|CASA1_BOVIN	K.HIQKEDVPS.E

P02662|CASA1_BOVIN	Q.KEDVPSE.R
P02662|CASA1_BOVIN	D.VPSERYL.G
P02662|CASA1_BOVIN	F.YPELFRQ.F
P02662|CASA1_BOVIN	Y.YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	Y.VPLGTQYTDAPSF.S
P02662|CASA1_BOVIN	Y.TDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSENSEKTTMP.L
P02662|CASA1_BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSENSEKTTM(+15.99)PLW
P02662|CASA1_BOVIN	D.APSFSDIPNPIGSEN.S
P02662|CASA1_BOVIN	P.SFSDIPNPIGSENSEKTTMP.L
P02662|CASA1_BOVIN	P.SFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	P.SFSDIPNPIGSENSEKTTM(+15.99)PLW
P02662|CASA1_BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTM(+15.99)PLW
P02662|CASA1_BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTMP.L
P02662|CASA1_BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTMPL.W
P02662|CASA1_BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKT.T
P02662|CASA1_BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEK.T

P02662|CASA1_BOVIN	F.SDIPNPIGSENSEKTTMP(+15.99).L
P02662|CASA1_BOVIN	S.DIPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	D.IPNPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	D.IPNPIGSENSEKTTMP.L
P02662|CASA1_BOVIN	D.IPNPIGSENSEKTTM(+15.99)PLW
P02662|CASA1_BOVIN	D.IPNPIGSENSEKTTM(+15.99)P.L
P02662|CASA1_BOVIN	I.PNPIGSENSEKTTMPL.W
P02662|CASA1_BOVIN	P.NPIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	N.PIGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	N.PIGSENSEKTTMPLW(+15.99)
P02662|CASA1_BOVIN	N.PIGSENSEKTTMP.L
P02662|CASA1_BOVIN	N.PIGSENSEKTTM(+15.99)P.L
P02662|CASA1_BOVIN	P.IGSENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	G.SENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	S.ENSEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	N.SEKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	S.EKTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	E.KTTMPLW
P02662|CASA1_BOVIN	K.TTMPLW

P02668|CASK_BOVIN	D.S(+79.97)PEVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	D.SPEVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	S.PEVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	P.EVIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	E.VIESPPEIN.T
P02668|CASK_BOVIN	E.VIESPPEINTVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	N.TVQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	N.TVQVTST.A
P02668|CASK_BOVIN	T.VQVTSTAV
P02668|CASK_BOVIN	V.QVTSTAV
P02754|LACB_BOVIN	N.PTQLEEQCHI
P80195|GLCM1_BOVIN	A.ILNKPEDETHLEAQPTDASAQFI.R
P80195|GLCM1_BOVIN	A.ILNKPEDETHLEAQPTDASAQFIR.N
P80195|GLCM1_BOVIN	R.SSRQPQSQNPKLPLSILKEKHL.R
P02663|CASA2_BOVIN	N.PWDQVKRNAVPITPT.L
P02663|CASA2_BOVIN	R.NAVPITPT.L
P02663|CASA2_BOVIN	K.AMKPWIQPKTKVIPYVRYL
P02769|ALBU_BOVIN	R.RHPYFYAPELLYYANK.Y
P02465|CO1A2_BOVIN	N.P(+15.99)GPAGPAGPR.G

P02453|CO1A1_BOVIN	R.GAP(+15.99)GDRGEP(+15.99)GP(+15.99)PGPAG.F
P02453|CO1A1_BOVIN	N.AGPP(+15.99)GPP(+15.99)GPAGKEG.S
P02453|CO1A1_BOVIN	N.AGPP(+15.99)GP(+15.99)PGPAGKEG.S

Приложение 4

ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ

«ПРОГРАММА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И РАСЧЕТА СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО МИКРООРГАНИЗМА LACTOBACILLUS REUTERI»

Листов 4

Авторы:

Семенихина Вера Филатовна,

Рожкова Ирина Владимировна,

Раскошная Татьяна Александровна,

Бегунова Анна Васильевна,

Семипятный Владислав Константинович.

Правообладатель:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГБНУ «ВНИМИ»), 2015

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2015617178

ПРОГРАММА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И РАСЧЕТА СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО МИКРООРГАНИЗМА LACTOBACILLUS REUTERI

Правообладатель: ***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГБНУ «ВНИМИ») (RU)***

Авторы: ***см. на обороте***

Заявка № **2015613764**

Дата поступления **06 мая 2015 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ ***02 июля 2015 г.***

Врио руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий

Авторы: ***Семенихина Вера Филатовна (RU), Рожкова Ирина Владимировна (RU), Раскошная Татьяна Александровна (RU), Бегунова Анна Васильевна (RU), Семипятный Владислав Константинович (RU)***

молоко Гидрализованное	49.79%	0.5	
экстракт Дрожжевой	2.987%	0.03	
MnSO4 4H2O	0.004979%	0.00005	
MgSO4 7H2O	0.01992%	0.0002	
CH3COONa	0.4979%	0.005	{Общая цена за кило, }
Вода	46.%	0.462	
Инулин	0.2987%	0.003	
KH2PO4	0.1992%	0.002	
Цитрат аммония	0.1992%	0.002	

4

Добавить показатель | Удалить показатель

Добавить компонент | Удалить компонент

Таблица компонентов

	Наименование	Белок	Углеводы	Вода	азот Аминный	"MnSO4 4H2O"	"MgSO4 7H2O"	"CH3COONa"	"KH2PO4"	Цитрат аммония	
	Результат	3.6	2.95	91.9	0.63	0.005	0.02	0.5	0.2	0.2	
✓	молоко Гидрализованное	3	4.7	91.4	0.9	0	0	0	0	0	
✓	экстракт Дрожжевой	70	10	0	6	0	0	0	0	0	
✓	"MnSO4 4H2O"	0	0	0	0	100	0	0	0	0	
✓	"MgSO4 7H2O"	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
✓	"CH3COONa"	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
✓	Вода	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
✓	Инулин	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
✓	"KH2PO4"	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
✓	Цитрат аммония	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0

Ограничения по жиру

Из масла не более, %

Рассчитать цену

Рассчитать

Вид интерфейса программы

Приложение 5

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

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ **СТО 00419785–045– 2019**

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора
ФГАНУ «ВНИМИ»
_____ А.Г.Галстян
«___» _____ 2019 г.

ЗАКВАСКА ПРЯМОГО ВНЕСЕНИЯ *LACTOBACILLUS REUTERI* LR1

Технические условия

РАЗРАБОТАНО

Зав. Центральной
лабораторией микробиологии
ФГАНУ «ВНИМИ»
_____ И.В. Рожкова

Научный сотрудник
Центральной лаборатории
микробиологии ФГАНУ
«ВНИМИ»
_____ А.В. Бегунова

Москва
2019

Приложение 6

Утверждаю

Директор ООО «Лактосинтез»

_____Корнев О.П.

21.01. _____2020 г

АКТ

Опытно-промышленной выработки закваски прямого внесения

Lactobacillus reuteri LR1

Нами, начальником производства ООО «Лактосинтез» Бавиной Ж.В., заведующей Центральной лабораторией микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ» Рожковой И.В., научным сотрудником Центральной лаборатории микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ» Бегуновой А.В., был составлен настоящий акт о том, что на производстве ООО «Лактосинтез» проводилась опытно-промышленная выработка закваски прямого внесения пробиотической культуры *Lactobacillus reuteri* LR1 в соответствии с СТО 00419785-045-2019 «Закваска прямого внесения *L. reuteri* LR1».

При производстве закваски прямого внесения использовали культуру *Lactobacillus reuteri* LR1, выделенную в ФГАНУ «ВНИМИ», идентифицированную современными молекулярно-генетическими методами и хранящуюся в коллекции культур в Центральной лаборатории микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ».

Процесс развития культуры контролировали по расходу нейтрализатора и микроскопическому препарату в конце культивирования. По окончании культивирования культуральную среду с накопленными клетками охлаждали до температуры (4±2)°С и проводили отделение клеток на бактофуге фирмы «Westfalia» (Германия). Степень отделения бактериальных клеток контролировали по прозрачности жидкости, отходящей от бактофуги и по микроскопическому препарату. Полученную бактериальную биомассу смешивали с защитной средой и разливали в стерильные лотки толщиной слоя (5±2) мм.

Сухую закваску прямого внесения измельчали в условиях, приближенных к асептическим. Сухую закваску прямого внесения проверяли на соответствие требованиям СТО 00419785-045-2019 «Закваска прямого внесения *L. reuteri* LR1» по физико-химическим и микробиологическим показателям.

В результате производственной выработки была получена закваска прямого внесения с количеством клеток *Lactobacillus reuteri* LR1 5×10^{10} КОЕ/см^3(г). Массовая доля влаги в закваске прямого внесения – 4,8 %.

Характеристика выработанной закваски прямого внесения

Наименование показателя		Выработанная закваска прямого внесения *L.reuteri* LR1	
		Выработанная закваска прямого внесения *L.reuteri* LR1	Норма для закваска прямого внесения *L.reuteri* (СТО 00419785-045-2019)
Внешний вид и консистенция		Однородный сухой порошок	Однородный сухой порошок
Цвет		От кремоватого до светло-коричневого по всей массе порошка	От кремоватого до светло-коричневого по всей массе порошка
Микроскопический препарат		Палочки тонкие короткие и средней длины, одиночные и в коротких цепочках	Палочки тонкие короткие и средней длины, одиночные и в коротких цепочках
Количество *L. reuteri*, КОЕ/г, не менее		5×10^{10}	10^{10}
Количество дрожжей и плесневых грибов, КОЕ/г, не более		Не обнаружены	5,0
Масса закваски прямого внесения в г, в которой не допускаются	БГКП (колиформы)	Отсутствуют в 1,0 г	1,0
	S.aureus	Отсутствуют в 1,0 г	1,0
	Патогенные, в том числе сальмонеллы	Отсутствуют в 10,0 г	10,0

Начальник производства ООО «Лактосинтез» — Бавина Ж.В

Заведующая Центральной лабораторией микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ» — Рожкова И.В

Научный сотрудник Центральной лаборатории микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ» — Бегунова А.В.

Приложение 7

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

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ **СТО 00419785–047– 2020**

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора
ФГАНУ «ВНИМИ»
_____ А.Г.Галстян
«____» _____ 2020 г.

ПРОДУКТЫ КИСЛОМОЛОЧНЫЕ «РЕЛАКТ»

Технические условия

РАЗРАБОТАНО

Зав. Центральной
лабораторией микробиологии
ФГАНУ «ВНИМИ»
_____ И.В. Рожкова

Научный сотрудник
Центральной лаборатории
микробиологии ФГАНУ
«ВНИМИ»
_____ А.В. Бегунова

Москва
2020

Приложение 8

Утверждаю
Генеральный директор
ООО «МОЛОДЕЛ»
М.А. Голубков

АКТ

опытно-промышленной выработки продукта кисломолочного «Релакт»

24 марта 2021 г. МО, Коломенский р-н, д. Зарудня

От ООО «МОЛОДЕЛ»:

Главный технолог – Артюх Г. А.

Руководитель ОКК – Золотарёв Н. А.

От ФГАНУ «ВНИМИ»:

Соискатель – Бегунова Анна Васильевна

Мы, нижеподписавшиеся составили настоящий акт о том, что на ООО «МОЛОДЕЛ» 24 марта 2021 г. осуществлён выпуск образцов кисломолочного продукта «Релакт». Выработка осуществлялась согласно технологии, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ» (СТО 00419785-047-2020 Продукты кисломолочные «Релакт» Технические условия).

Для выработки продукта в качестве сырья использовали:

- молоко коровье сырое кислотностью не более 19 °Т по ГОСТ 31449, ГОСТ Р 52054;
- закваску прямого внесения *Lactobacillus reuteri* LR1 по СТО 00419785-045-2019;
- закваски ацидофильных молочнокислых палочек *Lactobacillus acidophilus (L. helveticus)* «АД» и термофильного молочнокислого стрептококка *S. thermophilus* «ТНВп», по ТУ 9229-369-00419785, приготовленные в соответствии с требованиями «Технологической инструкции по приготовлению и применению заквасок и бактериальных концентратов для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности», утвержденной в установленном порядке.

Технологический процесс производства кисломолочного продукта «Релакт» состоял из следующих операций:

- приемка и подготовка сырья;
- нормализация, очистка нормализованной смеси;
- гомогенизация, пастеризация и охлаждение нормализованной смеси;
- приготовление закваски;
- заквашивание и сквашивание смеси при одновременном внесении закваски прямого внесения *Lactobacillus reuteri* LR1 «СР» (СТО 00419785-045-2019 Закваска прямого внесения *Lactobacillus reuteri* LR1) и производственной закваски, состоящей из ацидофильных молочнокислых палочек *Lactobacillus acidophilus (L. helveticus)* «АД» и термофильного молочнокислого стрептококка *S. thermophilus* «ТНВп»;
- охлаждение и перемешивание;
- розлив и упаковывание;
- и доохлаждение готового продукта до температуры (4±2)°С.

По физико-химическим, органолептическим и микробиологическим показателям опытно-промышленные образцы кисломолочного продукта соответствовали требованиям **СТО 00419785-047-2020 Продукты кисломолочные «Релакт» Технические условия.**

_____ Артюх Г. А.

_____ Золотарёв Н. А.

_____ Бегунова А. В.