

*На правах рукописи*



**ГОЛОВИН МИХАИЛ АНАТОЛЬЕВИЧ**

**РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ С ВЫСОКОЙ  
СПОСОБНОСТЬЮ К РЕДУКЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств»

**Научный руководитель:** **Ганина Вера Ивановна**  
доктор технических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Стойнова Лидия Григорьевна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, кафедра микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Жиленкова Ольга Геннадьевна**  
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория биологии бифидобактерий ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

**Ведущая организация:** государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «28» апреля 2015 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, биологический факультет, ауд. М-1.

Тел.: 8 (495) 939-54-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Пискункова Нина Федоровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В приоритетных направлениях Технологических платформ «Здоровое питание» и «БиоТех 2030» предусматривается разработка продуктов питания, которые способствуют оздоровлению населения, уменьшению риска возникновения заболеваний и медикаментозной нагрузки. Важная роль в решении поставленных задач отводится функциональным и лечебно-профилактическим продуктам питания. Разработка и производство такой продукции обусловлены тем, что у населения наблюдается увеличение алиментарных заболеваний, приводящих к понижению производительности труда и, в целом, влияющих на развитие экономики в стране. Одним из факторов, вызывающих возникновение ряда заболеваний (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инсульты, гипертония и др.), является нарушение уровня холестерина в крови. Повышенный уровень холестерина в крови человека играет существенную роль в генезе атеросклероза – одного из основных звеньев механизма развития сердечно-сосудистых заболеваний, смертность от которых постоянно возрастает. Для регулирования уровня холестерина в крови человека применяют химические препараты. Однако лечение при этом может сопровождаться серьезными побочными эффектами. Другим направлением регулирования уровня холестерина в крови может быть использование биообъектов. В частности, в последнее десятилетие ученые все больший интерес проявляют к пробиотическим микроорганизмам, имеющим длительную историю безопасного использования и входящим в перечень микроорганизмов, рекомендуемых IDF/EFFCA, способным участвовать не только в восстановлении полезной микробиоты, но и в обмене веществ, включая холестерин, в организме человека.

**Степень разработанности темы исследований.** Теоретические и практические основы в области создания фармпрепаратов, продуктов питания с применением пробиотических микроорганизмов и использования биологических активных веществ сырья животного происхождения заложены в трудах отечественных и зарубежных ученых: Артюховой С.И., Гавриловой Н.Б., Ганиной В.И., Громовых Т.И., Донской Г.А., Евдокимова Е.А., Забодаловой Л.А., Нетрусова А.И., Нефедовой Н.В., Остроумова Л.А., Поспеловой В.В., Рябцевой С.А., Семенихиной В.Ф., Стояновой Л.Г., Титова Е.И., Устюговой Е.А., Хамагаевой И.С., Харитоновой В.Д., Храмцова А.Г., Эрвольдер Т.М., Ouwehand A.C., Sipola M., Zheng Y. и др.

Вопросы изучения способности к редукции (снижению концентрации) холестерина микроорганизмов представлены в трудах отечественных и зарубежных авторов: Алёшкина В.А., Амерхановой А.М., Близнякова Е.Г., Бондаренко В.М., Лазаренко Л.Н., Машенцевой Н.Г., Петухова В.А., Старовойтовой С.А., Тимошка Н.А., Шендерова Б.А., Bordoni A., Kumar M., Mahrous H., Liong M.T., Lye H.S., Lee do K., Tahri K., Tanaka H., Taranto M.P., Ziarno M. и др.

Проблема сердечно-сосудистых заболеваний и появление новых данных о биообъектах и продуктах их жизнедеятельности обуславливают актуальность

исследований в области изучения и применения пробиотических микроорганизмов для создания продукции профилактического и лечебного назначения, в частности, способствующей регулированию уровня холестерина в организме, и, в целом, оздоровлению населения.

**Цель и задачи исследований.** Целью диссертационной работы являлось создание пробиотической композиции с высокой способностью к снижению концентрации холестерина на основе специально подобранных штаммов по комплексу показателей и обоснование условий их биотехнологии.

Для достижения поставленной цели решали следующие основные задачи:

1. Теоретически и экспериментально обосновать состав пробиотической композиции, изучить ее свойства и способность к снижению концентрации холестерина в условиях *in vitro* и *in vivo*.

2. Выделить новые и отобрать из коллекции микроорганизмов МГУПП штаммы пробиотических бактерий, обладающие потенциально высокой способностью к снижению концентрации холестерина и адгезионными свойствами.

3. Исследовать функционально-технологические свойства новых штаммов пробиотиков, включая антагонизм к условно-патогенным тест-культурам, выживаемость в условиях желудочно-кишечного тракта.

4. Определить условия биотехнологии изучаемых штаммов пробиотических бактерий для получения биомассы с высокой способностью к снижению концентрации холестерина.

5. Провести апробацию биотехнологии пробиотических штаммов, снижающих концентрацию холестерина, в промышленных условиях и разработать технологическую инструкцию на производство биомассы.

6. Изучить показатели качества и возможность применения разработанной пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, в технологии молочной продукции.

#### **Научная новизна:**

– теоретически и экспериментально обоснован штаммовый состав и создана пробиотическая композиция, снижающая концентрацию холестерина, с подтвержденным спектром технологических и функциональных свойств. Композиция включает *Bifidobacterium bifidum* GG-72, *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44, *Lactobacillus fermentum* LFM-2, *Lactobacillus plantarum* ГВИ-1, *Lactobacillus rhamnosus* LC-52GV;

– выделен, идентифицирован и изучен комплекс свойств нового штамма *Bifidobacterium bifidum* GG-72, что позволило его рекомендовать в качестве перспективного пробиотика. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП «ГосНИИгенетика» под номером ВКПМ Ас-1884;

– установлена высокая способность изученных штаммов пробиотических бактерий прикрепляться к клеткам кишечника человека на лабораторной модели клеток CaCo-2, которая составляла «высокий» уровень для штаммов *B. bifidum* GG-72, *L. rhamnosus* LC-52GV; «средний» уровень для *L. acidophilus*

ACT-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1; «низкий» уровень для *L. acidophilus* ACT-41, *L. acidophilus* 887.

– установлена зависимость между составом среды культивирования, возрастом культуры и способностью культуры снижать концентрацию холестерина: питательная среда для бифидобактерий – Блаурокка; для лактобактерий – MRS-бульон; культивирование при  $37 \pm 1$  °C до начала стационарной фазы.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в выдвижении гипотезы о возможности создания бактериальной композиции, участвующей в регулировании концентрации холестерина в крови человека, на основании отбора штаммов пробиотиков с данным свойством, и обоснования условий ее биотехнологии.

**Практическая значимость** работы состоит в следующем:

- разработаны состав и условия биотехнологии пробиотической композиции с высокой способностью к снижению концентрации холестерина;
- разработанная пробиотическая композиция, снижающая концентрацию холестерина, рекомендуется для обогащения продуктов питания, создания биологически активных добавок и пробиотических препаратов;
- разработана технологическая инструкция на получение биомассы пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина;
- проведена промышленная апробация биотехнологии штаммов и пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, что подтверждено положительным актом выработки;
- результаты исследований внедрены в учебный процесс: использованы в дисциплинах «Стартовые культуры в технологии продуктов питания» – для студентов направления 260200.68 «Продукты питания животного происхождения» и «Технология молока и молочных продуктов» – для студентов специальности 260303.65.

Работа осуществлялась в рамках проектов № 4209 и № 9353 «Коллекция культур бактерий, бактериофагов, дрожжевых и мицелиальных грибов как база для научно-образовательного процесса, сохранения биоразнообразия и развития современной биотехнологии», гранта № 14.577.21.0044 «Разработка новых энергосберегающих технологий и процессов для вакуумной сублимационной сушки широкого спектра термолабильных материалов, создание на их основе опытно-промышленного образца сушильного устройства для пищевой промышленности и прикладной биотехнологии» (уникальный идентификатор RFMEFI57714X0044) (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»).

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертации являются труды отечественных и зарубежных ученых в области выявления ценных свойств у пробиотических микроорганизмов и их применения в биотехнологии профилактической и лечебной продукции.

При организации и проведении экспериментальных исследований применялись микробиологические, физико-химические, генетические, спектрофотометрические, органолептические и оригинальные методы определения показателей исследуемых объектов, а также методы математической статистики.

**Степень достоверности результатов работы** подтверждается 3–5-кратной повторностью экспериментов с применением стандартных методов исследований; использованием современных приборов и оборудования, имеющих установленный предел отклонений; полученными данными со статистически достоверными различиями ( $p < 0,05$ ), использованием компьютерных программ Statistika-10.0, Microsoft Excel 2007.

### **Апробация работы**

Основные положения работы и результаты исследований доложены и представлены на VIII Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» (Москва, 2010); VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011); IX Международной научно-практической конференции «Технологии и продукты здорового питания. Функциональные продукты питания» (Москва, 2011); Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012); XIII Всероссийской научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологий» (Тула, 2013); V Международной научно-технической конференции «Безопасность и качество продуктов питания. Наука и образование» (Москва, 2014).

Научная работа отмечена грамотой X Юбилейной международной научно-практической конференции «Технологии и продукты здорового питания. Функциональные пищевые продукты» в рамках конференции молодых ученых «Инновационные технологии продуктов здорового питания» (Москва, 2012).

**Публикации.** По материалам исследований опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы, включающего 213 источника (в том числе 126 на иностранном языке). Работа изложена на 133 страницах текста, содержит 29 таблиц, 42 рисунка и 8 приложений.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** изложена общая характеристика проблемы создания функциональных продуктов и биологических препаратов с применением пробиотических микроорганизмов, обоснованы актуальность, научная новизна и практическая значимость работы, сформулированы цель и задачи исследований.

**В первой главе «Аналитический обзор литературы»** представлен анализ научно-технической литературы, в которой рассмотрены современные тенденции рынка продуктов здорового питания, перспективные направления

исследований в области дальнейшего изучения свойств пробиотических бактерий и особенностей их биотехнологии. Показаны перспективы исследований возможности использования пробиотиков, способных участвовать в снижении концентрации холестерина, для создания профилактических продуктов питания.

**Во второй главе «Организация эксперимента, материалы и методы исследования»** дана характеристика объектов исследований, описаны методы исследований, применяемые в работе.

Исследования проводили на кафедре «Технология мясных и молочных продуктов» ФГБОУ ВПО «МГУПП», отдельные работы были проведены на базе КГКУ «Краевая ветеринарная лаборатория», ФГУП «ГосНИИгенетика», ООО «Дом соусов», ФБУН МНИИЭМ имени Габричевского.

В соответствии с целью и задачами работы объектами исследований являлись пробиотические культуры из коллекции МГУПП: *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41 (ВКПМ В-9644); *L. acidophilus* АСТ-44 (ВКПМ 9647); новый штамм *Lactobacillus acidophilus* 887; *Lactobacillus fermentum* LFM-2 (ВКПМ В-10368); *Lactobacillus plantarum* ГВИ-1 (ВКПМ 8556); *Lactobacillus rhamnosus* LC-52GV (ВКПМ В-9475); *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 (ВКПМ Ас-1742), новые штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72; созданная пробиотическая композиция, пастеризованный молочно-соковый напиток, обогащенный разработанной пробиотической композицией.

В работе использовали для определения: антагонистической активности – метод лунок, метод совместного культивирования; адгезионной активности – метод с использованием лабораторной линии эпителиальных клеток CaCo-2; концентрации холестерина – метод Златкиса-Зака; совместимости культур – метод перпендикулярных штрихов; определения видовой принадлежности микроорганизмов – микробиологические методы, методы ПЦР, гель-электрофореза, секвенирования; непатогенности – на лабораторных белых мышах.

Получение биомассы проводили на базе ООО «Дом соусов» в соответствии с внутренними стандартными процедурами в ферментере вертикальном (модель «Биор-01», ОАО «ОКБ ТБМ», г. Кириши), биомассу концентрировали на сепараторе УКВ-202К-01 (ОАО «Уралхиммаш», г. Екатеринбург), лиофильно высушивали на установке LZ-45 (Frigera г. Колин, Чехия).

Определение сроков годности сухой биомассы проводили по МУК 4.2. 1847-04, обогащенного пастеризованного молочно-сокового продукта по ГОСТ Р 52687-2006.

В соответствии с поставленной целью и задачами исследований была разработана схема организации и проведения исследований, представленная на рис. 1.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**В третьей главе «Выделение и изучение новых штаммов. Изучение функциональных свойств пробиотических культур»** представлены результаты изучения свойств выделенных штаммов *B. bifidum* GG-71 и

*B. bifidum* GG-72, исследований функциональных характеристик выделенных и коллекционных штаммов, в частности антагонистической активности, адгезионной способности и способности к снижению концентрации холестерина в условиях *in vitro* и *in vivo*.

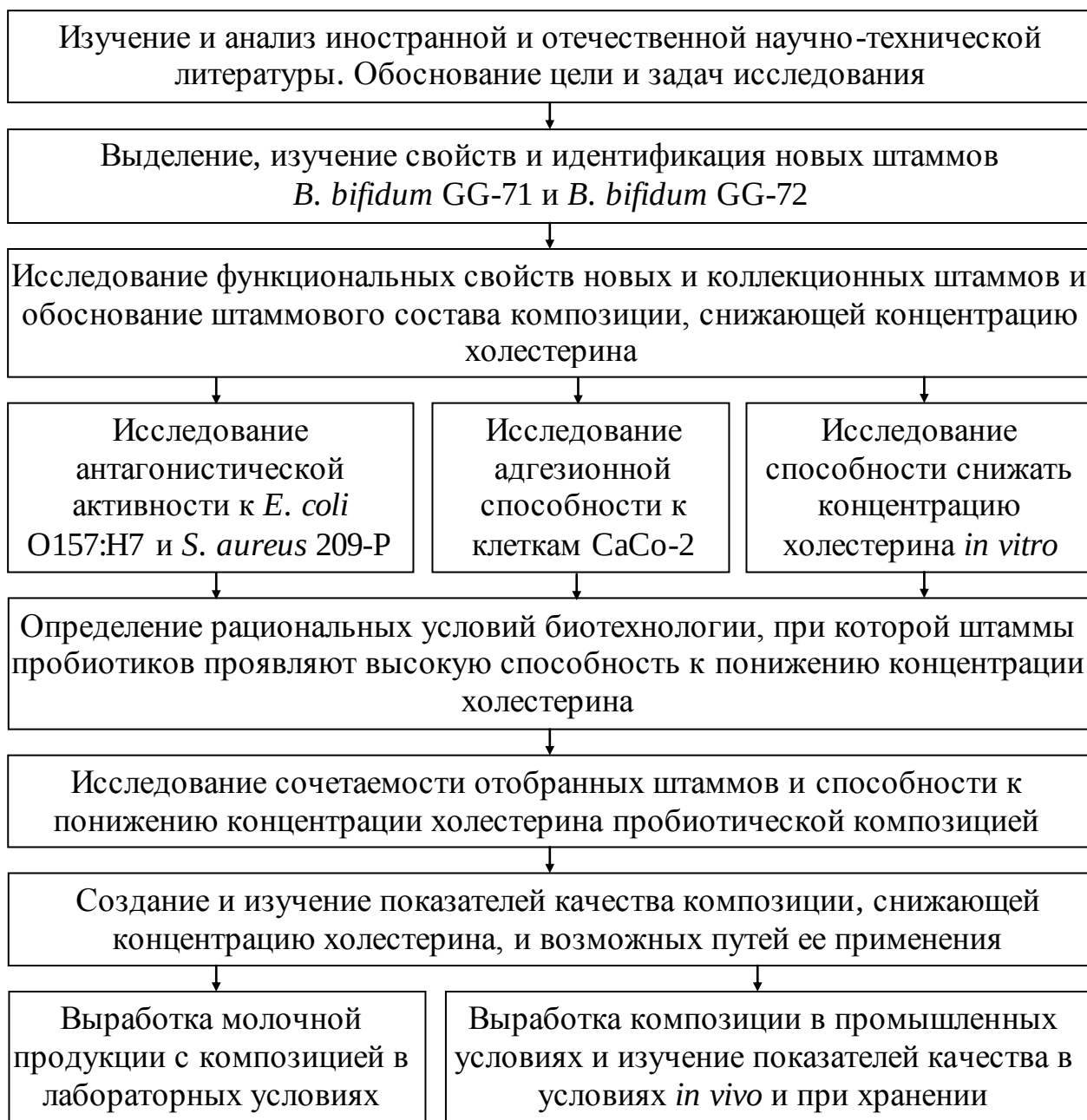


Рисунок 1 – Схема проведения экспериментальных исследований

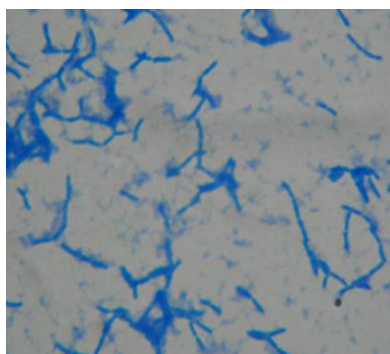
Для исследования на основании аналитического обзора литературы были выбраны пробиотические микроорганизмы следующих видов: *Bifidobacterium* ssp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*.

Новые штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 были выделены из фекасов здоровых людей, не подвергались генетическому модифицированию, носят природный характер и относятся к группе микроорганизмов, имеющих длительную историю безопасного использования и входящих в перечень микроорганизмов, рекомендуемых IDF/EFFCA.



Предварительно перед изучением свойств проводили очистку штаммов от присутствия возможной посторонней микрофлоры с применением антибиотика диклоксациллин, а также первичную идентификацию по фенотипическим и культурально-морфологическим признакам.

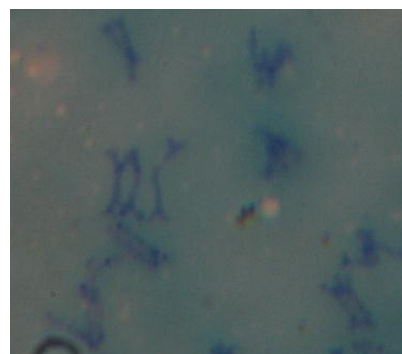
Выявлено, что штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 имели основные для данного рода культурально-морфологические и тинкториальные характеристики. Характер роста на полужидкой тиогликолевой питательной среде представлен на рис. 2 и 3.



*B. bifidum* GG-71

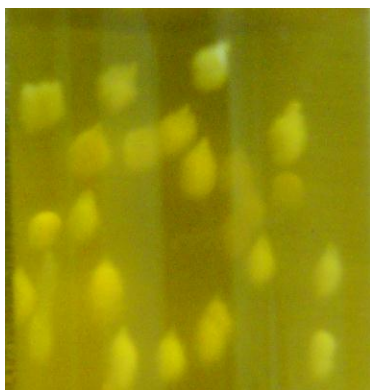


*B. bifidum* GG-72

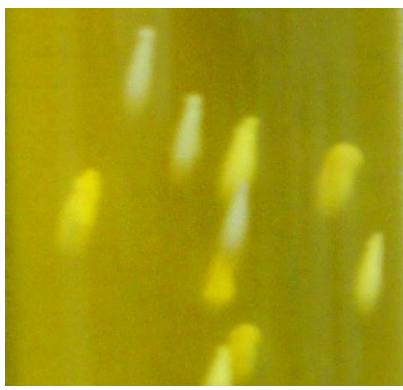


*B. adolescentis* BGV-11

Рисунок 2 – Микроскопия штаммов бифидобактерий (окраска метиленовым синим, увеличение 900×, световая микроскопия)



*B. bifidum* GG-71



*B. bifidum* GG-72



*B. adolescentis* BGV-11

Рисунок 3 – Колонии штаммов бифидобактерий на полужидкой тиогликолевой питательной среде

Полученные данные позволяют заключить, что штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 обладают типичными для рода *Bifidobacterium* признаками и представляют собой грамположительные клетки с бифуркациями, располагающиеся одиночно или в группах, клеточная стенка с неравномерными утолщениями. На поверхности плотной питательной среды штаммы образуют мелкие и точечные колонии (1 мм и менее) молочно-белого цвета, слегка тянущейся консистенции с характерным уксусно-кисломолочным запахом.

Выделенные штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 дают рост на типичных для своего рода питательных средах: Блаурокка, тиогликолевая, ГМК-1, ГМК-2, MRS (с 0,05 % L-цистеина).

Одной из основных характеристик, которая служит показателем возможности использования штамма пробиотических микроорганизмов, являются его функционально-технологические свойства. Определение функционально-технологических показателей новых штаммов, косвенно характеризующих выживаемость клеток в желудочно-кишечном тракте, проводили в сравнении с коллекционным штаммом *B. adolescentis* BGV-11 (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели, косвенно характеризующие способность штаммов пробиотиков выживать в условиях желудочно-кишечного тракта

| Штамм \ Условия               | NaCl, % |   |     | Фенол, % | Желчь, % |    | pH  |     |     |
|-------------------------------|---------|---|-----|----------|----------|----|-----|-----|-----|
|                               | 2       | 4 | 6,5 | 0,4      | 20       | 40 | 5,5 | 7,2 | 8,3 |
| <i>B. bifidum</i> GG-71       | ±       | — | —   | ±        | ±        | —  | ±   | +   | +   |
| <i>B. bifidum</i> GG-72       | +       | — | —   | ±        | ±        | —  | +   | +   | +   |
| <i>B. adolescentis</i> BGV-11 | +       | ± | —   | ±        | ±        | ±  | ±   | +   | +   |

Таким образом, вновь выделенные штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 выдерживают изменение pH среды от 5,5 до 8,3 единиц; устойчивы в питательной среде с добавлением поваренной соли в концентрации 2 %; некоторые клетки популяции штаммов способны выживать в питательной среде с добавлением 0,4 % фенола и 20 % желчи. Результаты исследований новых штаммов позволяют сделать заключение о проявлении довольно высокой их устойчивости к действию неблагоприятных факторов, возникающих в желудочно-кишечном тракте организма человека.

К числу наиболее важных показателей качества пробиотических микроорганизмов относят их способность проявлять антагонистическую активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

Результаты исследований антагонистической активности, представленные на рис. 4(а), свидетельствуют о проявлении выраженной антагонистической активности изученных штаммов по отношению к тест-культуре *E. coli* O157:H7. Следует отметить, что новый штамм *B. bifidum* GG-72 обладает таким же выраженным действием на *E. coli* O157:H7, как и штамм *B. adolescentis* BGV-11, эффективность которого ранее подтверждена клиническими испытаниями на животных и людях.

Результаты совместного культивирования штаммов бифидобактерий *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 в сравнении с штаммом *B. adolescentis* BGV-11 с условно-патогенной тест-культурой *S. aureus* 209-Р представлены на рис. 4(б). В данном случае можно говорить о более выраженной антагонистической активности штамма *B. bifidum* GG-72 – наблюдали уменьшение количества *S. aureus* 209-Р более чем на 4 порядка, в то время как

штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. adolescentis* BGV-11 уменьшали количество патогенного тест-микроорганизма более чем на 3 порядка.

Антагонистическая активность новых штаммов бифидобактерий была также подтверждена методом лунок с и без нейтрализации супернатанта. Показано, что супернатанты с нейтрализованной кислотностью проявляли подавляющее действие на тест-культуры. Такой эффект позволяет сделать заключение о способности к синтезу антибиотико-подобных веществ исследуемыми пробиотическими микроорганизмами, что увеличивает ценность их прикладного использования.

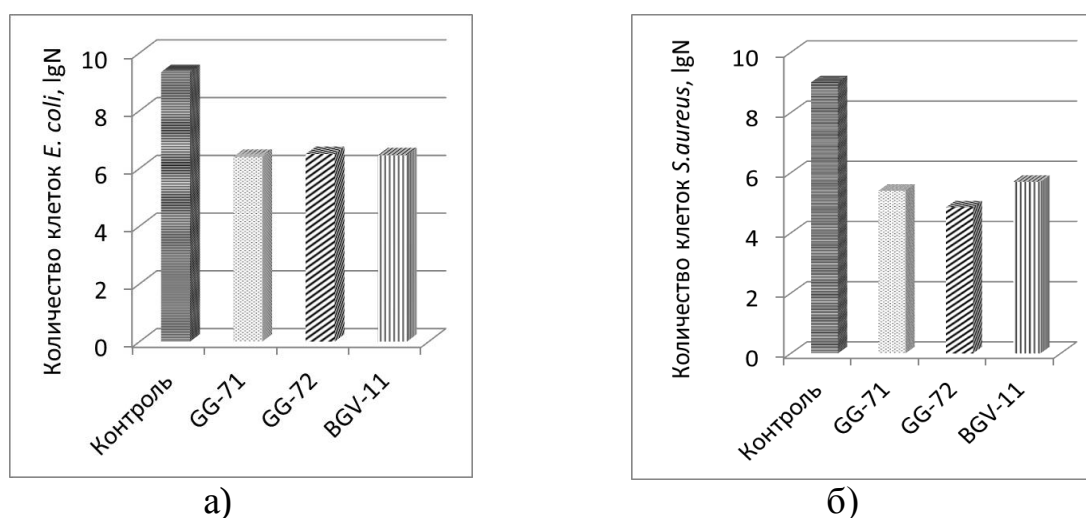


Рисунок 4 – Антагонистическая активность пробиотических штаммов *B. bifidum* GG-71, *B. bifidum* GG-72 и *B. adolescentis* BGV-11 к условно-патогенным штаммам: а) *E. coli* O157:H7; б) *S. aureus* 209-P;

N – количество клеток бактерий, КОЕ/см<sup>3</sup>;

контроль – чистая культура; опыт – *E. coli* O157:H7 или *S. aureus* 209-P + штамм бифидобактерий

В результате изучения антагонистических свойств штаммов *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 в сравнении с хорошо изученным штаммом *B. adolescentis* BGV-11 было показано, что количество клеток *E. coli* O157 в модельных образцах со всеми штаммами бифидобактерий уменьшалось на 3 порядка. Подавление штаммами бифидобактерий роста *S. aureus* 209-P несколько различалось и было следующим: *B. bifidum* GG-71 – 3,6 порядка; *B. bifidum* GG-72 – 4,15; *B. adolescentis* BGV-11 – 3,3. Установлено, что новые штаммы бифидобактерий обладают выраженной антагонистической активностью по отношению к *E. coli* O157:H7, *S. aureus* 209-P, поэтому их использовали в дальнейших исследованиях.

В соответствии с вышепредставленными данными, штаммы *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 проявляют достаточно высокую устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов, которые могут влиять на штамм при прохождении клеток через желудочно-кишечный тракт организма человека.

Однако было отмечено, что штамм *B. bifidum* GG-72 давал рост на питательных средах за 18-24 ч, а *B. bifidum* GG-71 – 36-48 ч. Следовательно,

штамм *B. bifidum* GG-72 более технологичен, и его использовали в дальнейших исследованиях.

Генетическая идентификация штамма *B. bifidum* GG-72 была проведена на базе ФГУП «ГосНИИгенетика». Проведена амплификация последовательности гена, кодирующего 16S рРНК с помощью консервативных праймеров в ходе ПЦР. Варибельные участки гена 16S рРНК секвенированы, и получена их нуклеотидная последовательность. Первичный скрининг по базе данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам: домен *Bacteria*; отдел *Firmicutes*; тип *Actinobacteria*; класс *Actinobacteria*; подкласс *Actinobacteridae*; порядок *Bifidobacteriales*; семейство *Bifidobacteriaceae*; род *Bifidobacterium*.

Результаты обработки нуклеотидных последовательностей при помощи компьютерной программы, находящейся на сайте RDB II (Ribosomal Database Project II), предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев, представлены на рис. 5 в графическом виде. Идентифицируемый штамм обозначен как «unknown».

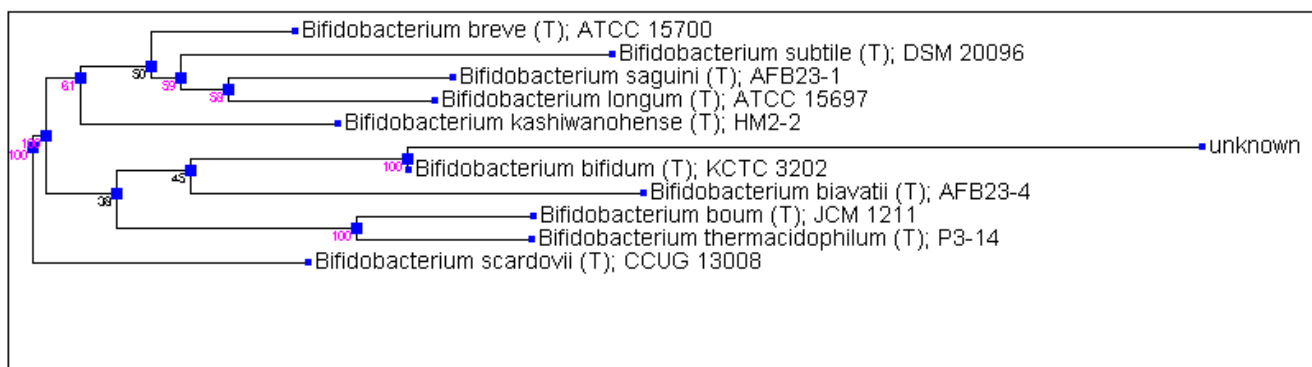


Рисунок 5 – Филогенетическое дерево штамма *B. bifidum* GG-72 (обозначен «unknown») с гомологичными штаммами бифидобактерий

Установлено, что гомология с видом *bifidum* составляет 98 %, т. е. штамм GG-72 относится к *Bifidobacterium bifidum*.

Отнесение штамма GG-72 к *B. bifidum* носит позитивный характер. Это обосновано принадлежностью вида к группе бифидобактерий истинно «человеческого» происхождения, при этом содержание *B. bifidum* может достигать до 51,9 % от общего объема микрофлоры ЖКТ у детей, находящихся на грудном вскармливании. Эти факты усиливают нашу уверенность в обоснованности выбора штамма для дальнейшего изучения с позиций его возможного применения в качестве функционального компонента в профилактической продукции.

Далее была проведена экспертиза культуры *B. bifidum* GG-72 на отсутствие патогенных свойств, которую осуществляли на линии белых мышей. Применение в корме белых мышей нового штамма *B. bifidum* GG-72 на протяжении стандартного периода времени не выявило никаких изменений, как в поведении, так и в структуре внутренних органов животных.

Результаты экспертизы показали, что новый выделенный штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 не обладает патогенными свойствами (результаты подтверждены справкой).

Таким образом, новый штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* GG-72 обладает ценными свойствами для пробиотиков, на основании чего штамм принят на Национальное патентное депонирование во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов в ФГУП «ГосНИИгенетика» с присвоением коллекционного номера Ас-1884, что подтверждено соответствующей справкой и паспортом штамма.

Одним из существенных показателей перспективности пробиотических культур служит их способность закрепляться на клетках кишечника. Косвенным показателем такой способности является адгезия клеток пробиотических культур на клетках CaCo-2, представленная на рис. 6. Полученные данные о количестве клеток изучаемых штаммов пробиотиков, способных к адгезии к модельным клеткам эпителия кишечника CaCo-2, приведены на рис. 7.

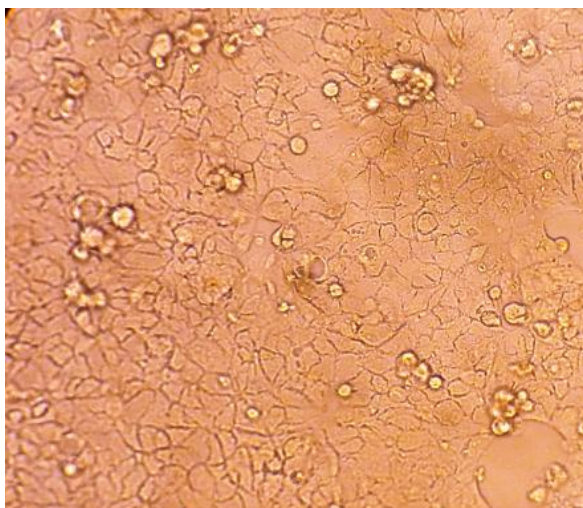


Рисунок 6 – Клетки CaCo-2, увеличение 330×, световая микроскопия

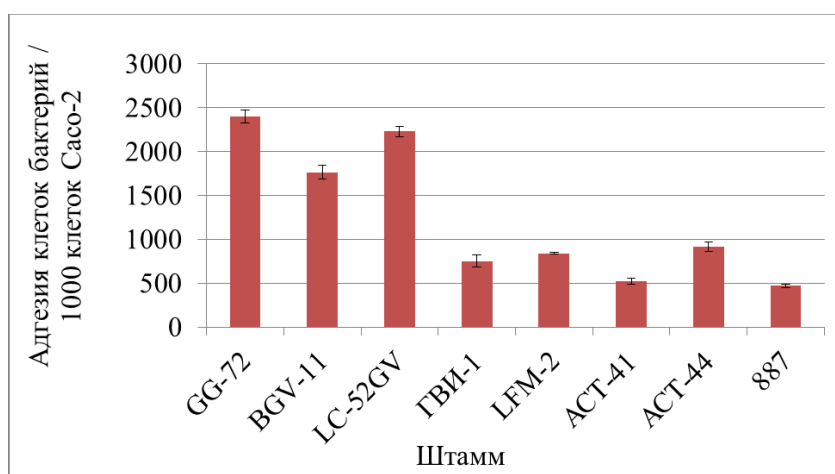


Рисунок 7 – Адгезия исследуемых пробиотических штаммов на лабораторной линии эпителиальных клеток CaCo-2



В соответствии с методикой, уровень адгезии оценивали на основании количества бактериальных клеток, прикрепившихся к 1000 клеток CaCo-2: *B. bifidum* GG-72, *B. adolescentis* BGV-11, *L. rhamnosus* LC-52GV – «высокий» уровень (более 1010 клеток); *L. plantarum* ГВИ-1, *L. fermentum* LFM-2, *L. acidophilus* АСТ-44 – «средний» уровень адгезии (более 500 клеток); *L. acidophilus* АСТ-41, 887 – «низкий» уровень адгезии (более 210, менее 500 клеток). Наиболее перспективными уровнями считаются «высокий» и «средний», который проявили штаммы: *B. adolescentis* BGV-11, *B. bifidum* GG-72, *L. acidophilus* АСТ-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. rhamnosus* LC-52GV.

На основании анализа научно-технической литературы и результатов проведенных экспериментальных исследований по изучению характеристик вновь выделенных двух штаммов бифидобактерий и дополнительного изучения способности к адгезии коллекционных штаммов пробиотиков разных таксономических групп было сделано заключение о целесообразности изучения способности к снижению концентрации холестерина у следующих штаммов: *B. adolescentis* BGV-11, *B. bifidum* GG-72, *L. acidophilus* АСТ-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. rhamnosus* LC-52GV.

#### Четвертая глава «Изучение способности пробиотических штаммов микроорганизмов к снижению концентрации холестерина»

Перед проведением экспериментов по изучению способности к снижению концентрации холестерина рассматриваемых штаммов был проверен характер их роста в опытной среде культивирования, содержащей холестерин с эмульгирующим агентом. Анализ полученных результатов позволил сделать заключение об отсутствии отрицательного влияния компонентов опытной среды на численность клеток изучаемых культур (рис. 8).

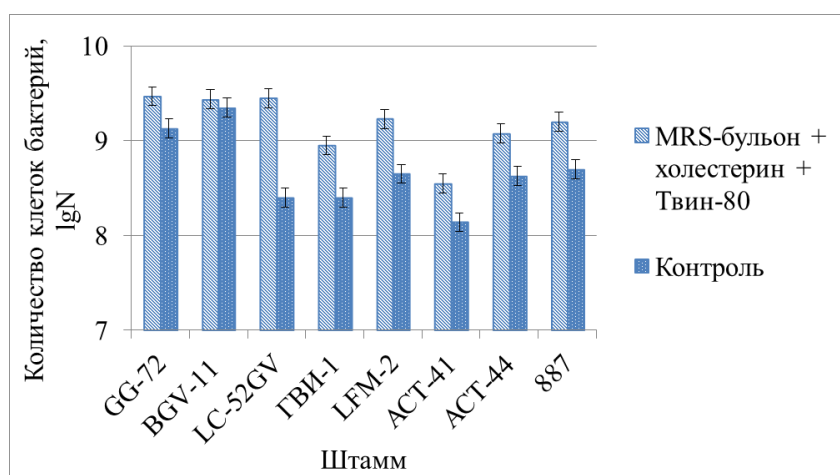


Рисунок 8 – Влияние компонентов среды на численность клеток пробиотических штаммов (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см<sup>3</sup>)

Результаты показали наличие разной способности к снижению концентрации холестерина у исследуемых штаммов (рис. 9). Выявлено, что наибольшей способностью к снижению концентрации холестерина в данных условиях обладали штаммы *B. adolescentis* BGV-11, *B. bifidum* GG-72,

*L. acidophilus* ACT-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. rhamnosus* LC-52GV, наименьшей *L. acidophilus* ACT-41, *L. acidophilus* 887.

Полученные результаты не противоречат литературным данным [M. Ziarno, H. Mahrous, S. Sieladie, N. Xie, и др.] о возможности воздействия пробиотических микроорганизмов на концентрацию холестерина *in vitro* через различные механизмы снижения концентрации холестерина.

На основании полученных данных об адгезионных свойствах и способности к снижению концентрации холестерина отобраны штаммы для создания пробиотической композиции (рис. 10). Среди штаммов были выбраны следующие: *B. adolescentis* BGV-11, *B. bifidum* GG-72, *L. rhamnosus* LC-52GV, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. fermentum* LFM-2, *L. acidophilus* ACT-44.

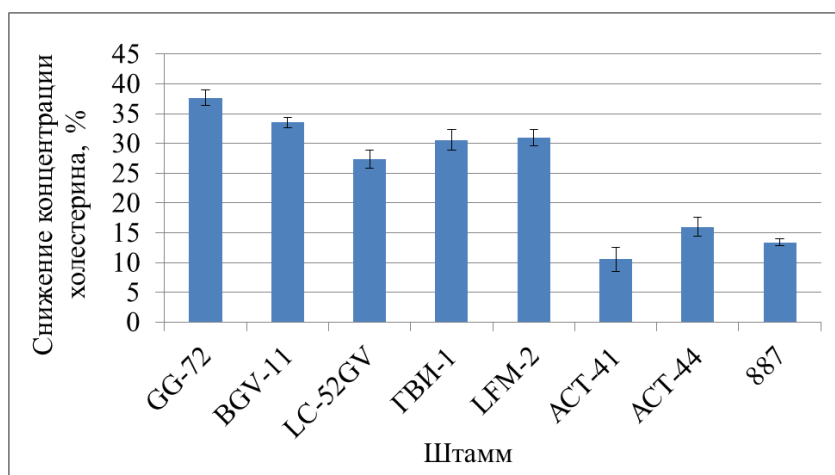


Рисунок 9 – Снижение концентрации холестерина в среде культивирования пробиотическими штаммами, %

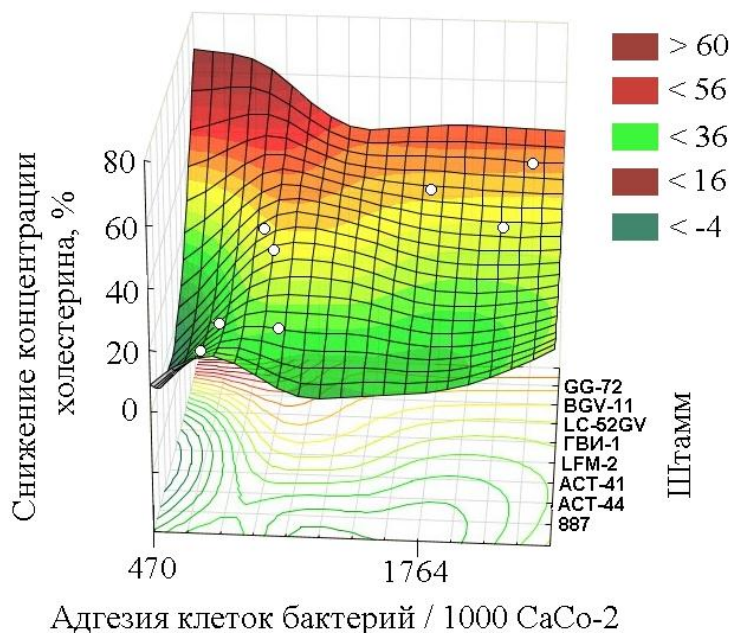


Рисунок 10 – Сравнительная поверхность снижения концентрации холестерина и адгезии пробиотических штаммов

Далее представлялось интересным изучить возможность усиления целевой активности – снижения концентрации холестерина у штаммов

пробиотиков. Известно, что состав питательной среды и условия культивирования, фаза развития микроорганизмов влияют на их метаболизм. Однако информации о влиянии перечисленных факторов на способность клеток пробиотиков к снижению концентрации холестерина нами не обнаружено, поэтому на первом этапе сравнивали влияние различных питательных сред. Для лактобактерий были выбраны две основные стандартные питательные среды, широко применяемые в микробиологической практике: MRS-бульон и среда для лактобактерий, которые отличаются источниками азота и солями. Показано, что рассматриваемые штаммы проявили наибольшую способность к снижению концентрации холестерина на MRS-бульоне. Штамм *L. fermentum* LFM-2 проявлял практически одинаковую способность к снижению концентрации холестерина как на MRS-бульоне, так и на среде для лактобактерий (таблица 2).

Таблица 2 – Способность штаммов лактобактерий к снижению концентрации холестерина на питательных средах различного состава

| Наименование штамма          | Способность штаммов к снижению концентрации холестерина, % |                         |
|------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------|
|                              | MRS-бульон                                                 | Среда для лактобактерий |
| <i>L. rhamnosus</i> LC-52GV  | 27,4±1,5                                                   | 23,1±1,8                |
| <i>L. plantarum</i> ГВИ-1    | 30,61±1,7                                                  | 19,77±1,4               |
| <i>L. fermentum</i> LFM-2    | 30,95±1,4                                                  | 29,97±1,6               |
| <i>L. acidophilus</i> АСТ-44 | 15,99±1,6                                                  | 12,14±1,6               |

При изучении влияния состава питательных сред на снижение концентрации холестерина штаммами бифидобактерий *B. adolescentis* BGV-11, *B. bifidum* GG-72 использовали следующие питательные среды: MRS-бульон с добавлением 0,05 % L-цистеина, ГМК-2, Блаурокка (таблица 3). Анализ результатов показал, что способность к снижению концентрации холестерина у изучаемых штаммов бифидобактерий в большей степени проявлялась при их развитии на среде Блаурокка, которая главным образом отличается содержанием печоночного экстракта.

Таблица 3 – Способность штаммов бифидобактерий к снижению концентрации холестерина на питательных средах различного состава

| Наименование штамма           | Способность штаммов к снижению концентрации холестерина, % |          |           |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------|----------|-----------|
|                               | MRS-бульон, 0,05 % L-цистеин                               | ГМК-2    | Блаурокка |
| <i>B. adolescentis</i> BGV-11 | 33,6±1,5                                                   | 27,4±1,6 | 39,0±1,5  |
| <i>B. bifidum</i> GG-72       | 37,6±1,3                                                   | 25,9±1,5 | 43,1±1,4  |

Далее была изучена интенсивность снижения концентрации холестерина пробиотических штаммов на разных этапах их развития. Результаты исследования зависимости снижения концентрации холестерина на примере



изучаемых штаммов *B. bifidum* GG-72 и *L. plantarum* ГВИ-1 от стадии роста представлены на рис. 11, 12. Аналогичные данные были получены для всех изучаемых штаммов пробиотических бактерий.

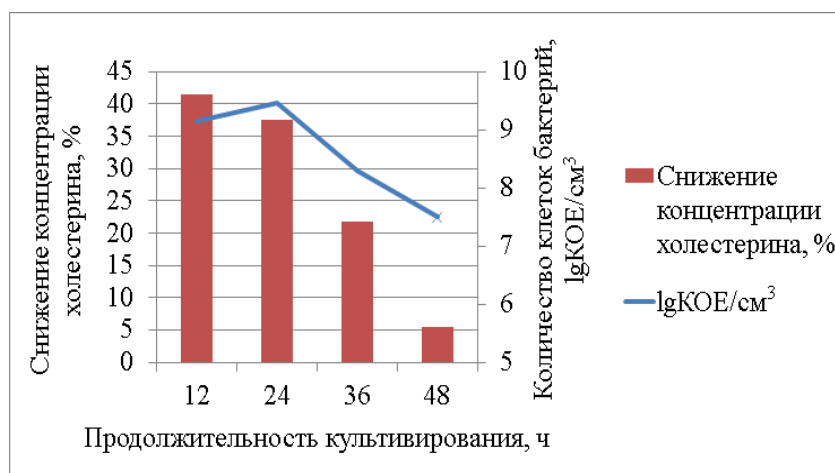


Рисунок 11 – Зависимость способности штамма *B. bifidum* GG-72 к снижению концентрации холестерина от продолжительности развития на питательной среде (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см<sup>3</sup>)

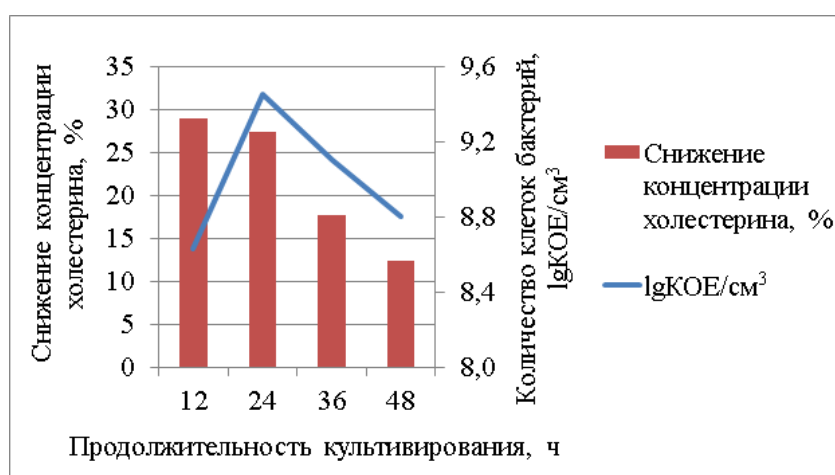


Рисунок 12 – Зависимость способности штамма *L. plantarum* ГВИ-1 к снижению концентрации холестерина от продолжительности развития на питательной среде (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см<sup>3</sup>)

Таким образом, была установлена зависимость способности пробиотических штаммов к снижению концентрации холестерина от стадии роста: наибольшая способность отмечалась в конце фазы логарифмического роста – начале стационарной фазы. Разная интенсивность снижения концентрации холестерина в зависимости от возраста культуры, по-видимому, обусловлена различиями в интенсивности метаболизма и адсорбирующей способности клеточных стенок.

В результате проведенных исследований определены рациональные условия биотехнологии штаммов пробиотических бактерий, проявляющих способность к снижению концентрации холестерина: питательная среда для бифидобактерий – Блаурокка; для лактобактерий – MRS-бульон; культивирование при  $37 \pm 1$  °C до начала стационарной стадии.

На основе выбранных штаммов пробиотиков были созданы две композиции, потенциально эффективные к снижению концентрации холестерина, обозначенные как «a1» и «b1» (таблица 4).

Таблица 4 – Состав пробиотических композиций «a1» и «b1»

| Состав штаммов композиции «a1» | Состав штаммов композиции «b1» |
|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>B. adolescentis</i> BGV-11  | <i>B. bifidum</i> GG-72        |
| <i>L. acidophilus</i> ACT-44   | <i>L. acidophilus</i> ACT-44   |
| <i>L. fermentum</i> LFM-2      | <i>L. fermentum</i> LFM-2      |
| <i>L. plantarum</i> ГВИ-1      | <i>L. plantarum</i> ГВИ-1      |
| <i>L. rhamnosus</i> LC-52GV    | <i>L. rhamnosus</i> LC-52GV    |

Составленные композиции, кроме способности к снижению концентрации холестерина, характеризуются тем, что включают в себя штаммы, обладающие выраженной антагонистической активностью по отношению к *Escherichia coli* O157 и *Staphylococcus aureus* 209-P и высокой способностью к адгезии к клеткам эпителия кишечника человека.

Для формирования пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, была исследована сочетаемость выбранных штаммов пробиотических бактерий. Результаты исследований приведены на рис. 13.

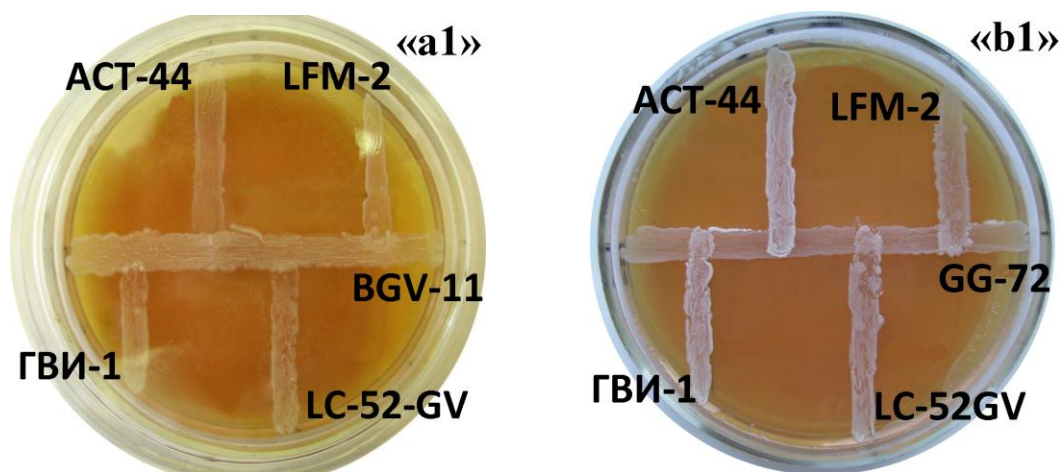


Рисунок 13 – Совместный рост культур внутри композиций «a1» и «b1»

Колонии пробиотических штаммов в виде штрихов в зоне их пересечения оказались равномерными без явных зон ингибирования роста. Установлена возможность их сосуществования и, таким образом, возможность их совместного присутствия в пробиотической композиции.

После установления возможности совместного сочетания исследуемых пробиотических штаммов проводили сравнение способности к снижению концентрации холестерина у композиций «a1» и «b1» (рис. 14).

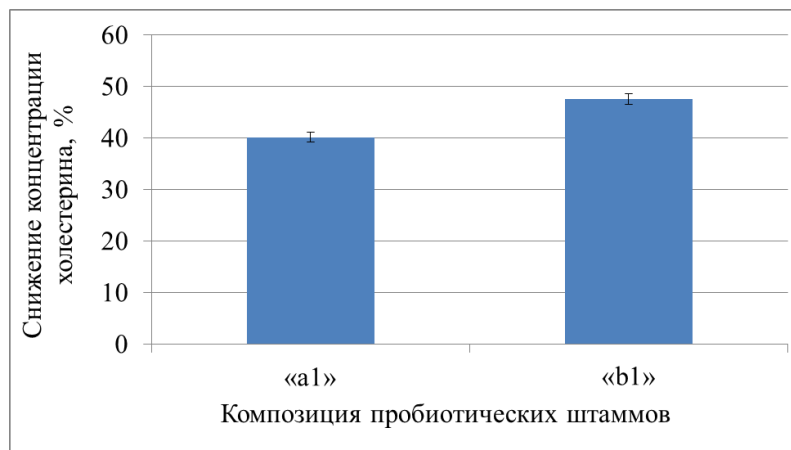


Рисунок 14 – Способность к снижению концентрации холестерина у пробиотических композиций «a1» и «b1»

Выявлено, что в составе композиции штаммы пробиотиков проявляли усиление способности к снижению концентрации холестерина. Более активно проявила себя композиция «b1», содержащая штамм *B. bifidum* GG-72.

Исходя из выше указанных данных, можно сделать вывод о наибольшей перспективности композиции «b1», содержащей штамм *B. bifidum* GG-72, а также штаммы *L. rhamnosus* LC-52GV, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. fermentum* LFM-2, *L. acidophilus* АСТ-44.

Для проверки условий биотехнологии изученных штаммов пробиотиков, снижающих концентрацию холестерина, была проведена их выработка в промышленных условиях. Результаты производственной проверки подтверждены актом и свидетельствуют о возможности реализации биотехнологии штаммов пробиотиков, обладающих способностью к снижению концентрации холестерина.

Результаты исследований, представленные в данной главе, позволили выявить штаммы пробиотиков, которые способны снижать концентрацию холестерина; определить рациональные условия их биотехнологии и создать пробиотическую композицию, снижающую концентрацию холестерина.

#### **Пятая глава «Изучение показателей качества и возможных путей применения пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина»**

Выработанные в производственных условиях образцы сухой биомассы штаммов пробиотиков, вошедшие в состав композиции «b1», были перемешаны в равных пропорциях, герметично упакованы в многослойный полимерный материал, заложены на хранение при температуре  $4 \pm 2$  °C и минус  $18 \pm 2$  °C. В ходе хранения биомассы изучали физико-химические, микробиологические, органолептические показатели, способность штаммов к снижению концентрации холестерина и антагонистическую активность к условно-патогенным микроорганизмам.

В таблицах 5, 6 представлены результаты определения показателей качества опытной партии пробиотической композиции с высокой способностью

к снижению концентрации холестерина в процессе хранения, а именно: количества клеток бифидобактерий и лактобактерий, массовой доли влаги.

Таблица 5 – Показатели качества пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, при температуре хранения  $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

| Месяц    | Снижение концентрации холестерина, % | Количество клеток, lg КОЕ/см <sup>3</sup> |                       | Массовая доля влаги, % |
|----------|--------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|------------------------|
|          |                                      | Бифидобактерии                            | Молочнокислые палочки |                        |
| контроль | 47,51 $\pm$ 0,4                      | 10,12 $\pm$ 0,04                          | 10,31 $\pm$ 0,03      | 4,16 $\pm$ 0,04        |
| 1        | 46,12 $\pm$ 0,7                      | 9,75 $\pm$ 0,04                           | 10,04 $\pm$ 0,06      | 4,16 $\pm$ 0,05        |
| 2        | 44,62 $\pm$ 0,5                      | 9,38 $\pm$ 0,05                           | 9,66 $\pm$ 0,04       | 4,16 $\pm$ 0,05        |
| 3        | 43,42 $\pm$ 0,6                      | 9,01 $\pm$ 0,04                           | 9,35 $\pm$ 0,04       | 4,16 $\pm$ 0,04        |
| 4        | 41,72 $\pm$ 0,4                      | 8,69 $\pm$ 0,06                           | 8,95 $\pm$ 0,03       | 4,22 $\pm$ 0,05        |
| 5        | 40,42 $\pm$ 0,4                      | 8,31 $\pm$ 0,04                           | 8,65 $\pm$ 0,05       | 4,22 $\pm$ 0,04        |
| 6        | 39,75 $\pm$ 0,4                      | 8,04 $\pm$ 0,03                           | 8,54 $\pm$ 0,04       | 4,22 $\pm$ 0,04        |

Таблица 6 – Показатели качества пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, при температуре хранения минус  $18\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

| Месяц    | Снижение концентрации холестерина, % | Количество клеток, lg КОЕ/см <sup>3</sup> |                       | Массовая доля влаги, % |
|----------|--------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|------------------------|
|          |                                      | Бифидобактерии                            | Молочнокислые палочки |                        |
| контроль | 47,51 $\pm$ 0,4                      | 10,12 $\pm$ 0,04                          | 10,31 $\pm$ 0,03      | 4,16 $\pm$ 0,03        |
| 1        | 47,29 $\pm$ 0,7                      | 10,08 $\pm$ 0,03                          | 10,27 $\pm$ 0,05      | 4,16 $\pm$ 0,04        |
| 2        | 46,98 $\pm$ 0,6                      | 9,95 $\pm$ 0,05                           | 10,22 $\pm$ 0,06      | 4,16 $\pm$ 0,05        |
| 3        | 46,74 $\pm$ 0,4                      | 9,85 $\pm$ 0,04                           | 10,20 $\pm$ 0,04      | 4,22 $\pm$ 0,05        |
| 4        | 46,51 $\pm$ 0,6                      | 9,84 $\pm$ 0,05                           | 10,17 $\pm$ 0,04      | 4,22 $\pm$ 0,04        |
| 5        | 46,28 $\pm$ 0,6                      | 9,79 $\pm$ 0,02                           | 10,10 $\pm$ 0,04      | 4,22 $\pm$ 0,05        |
| 6        | 46,15 $\pm$ 0,4                      | 9,76 $\pm$ 0,03                           | 10,06 $\pm$ 0,05      | 4,22 $\pm$ 0,04        |

Анализ полученных данных показал, что хранение пробиотической композиции при температуре  $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  приводило к более интенсивному уменьшению количества клеток бифидобактерий - в 120 раз, лактобактерий – в 60 раз, тогда как хранение при температуре минус  $18\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  приводило к небольшому изменению количества клеток бифидобактерий (на половину порядка количество клеток лактобактерий практически оставалось на исходном уровне. Снижение концентрации холестерина в питательной среде при развитии пробиотической композиции коррелировало со снижением количества клеток бактерий.

Одним из основных показателей функциональной ценности пробиотических культур является антагонистическая активность, сохранение которой в ходе хранения представлено на рис. 15. Способность штаммов к снижению концентрации холестерина и к антагонизму также сохраняется лучше при более низкой температуре, что объясняется большим количеством клеток пробиотических культур.

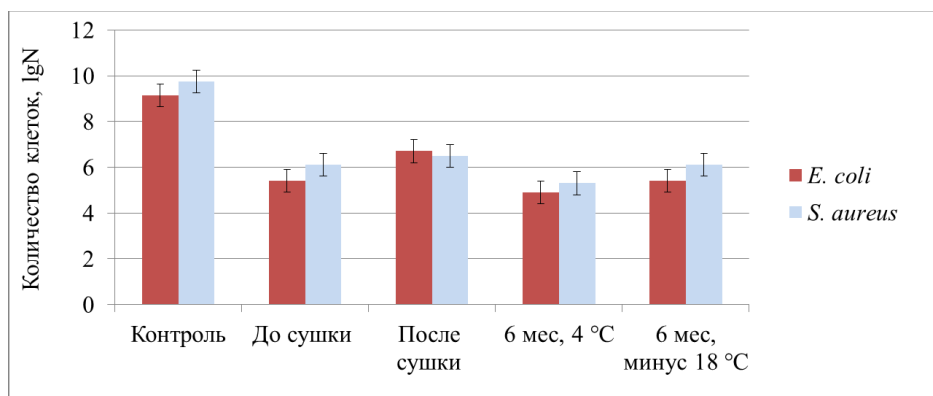


Рисунок 15 – Антагонистическая активность сублимированной пробиотической композиции после 6 месяцев хранения при температуре  $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  и минус  $18\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см<sup>3</sup>)

Таким образом, был обоснован срок годности пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина: при температуре  $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 3 месяца; при температуре минус  $18\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 6 месяцев.

Для подтверждения проявления у пробиотической композиции способности к снижению концентрации холестерина были проведены исследования в условиях *in vivo* на линии белых мышей на базе ФБУН «МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора. В ходе проведения исследований выявлена способность пробиотической композиции снижать концентрацию холестерина в сыворотке крови белых мышей следующим образом. Средняя концентрация общего холестерина снизилась на 25,8 %, липопротеинов низкой плотности - на 17,2 %, липопротеинов высокой плотности - увеличилась на 7,5 %, триглицеридов - снизилась на 16,2 %. Концентрация общего холестерина, ЛПНП и триглицеридов приблизилась к группе белых мышей со стандартной диетой, т. е. к норме. Концентрация ЛПВП увеличилась, что может быть объяснено увеличением метаболизма холестерина в организме лабораторных животных при применении созданной пробиотической композиции.

С целью исследования возможности практического применения пробиотической композиции было предложено использовать ее в технологии пастеризованного молочно-сокового напитка ввиду повышения актуальности подобной линейки продуктов среди потребителей.

Были составлены модельные системы пастеризованного молочно-сокового напитка, в состав которых вводили пробиотическую композицию с таким расчетом, чтобы количество клеток составляло не менее  $1,0\times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Количество клеток в исходной сухой биомассе пробиотических бактерий составляло  $3\times 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>, при внесении в продукт количество клеток составило  $7\times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. По истечении хранения напитка при температуре  $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 15 суток определяли показатели качества.

Органолептические показатели пастеризованного молочно-сокового напитка в процессе хранения представлены на рис. 16, на котором видно, что на 0-е сутки у контрольного и обогащенного пробиотической композицией «b1»

пастеризованного молочно-сокового напитка все органолептические показатели (цвет, запах, вкус и консистенция) не отличались. На 6-е сутки цвет, запах и консистенция контрольного напитка не изменились, в то время как вкус обогащенного напитка приобрел легкую кислую нотку.

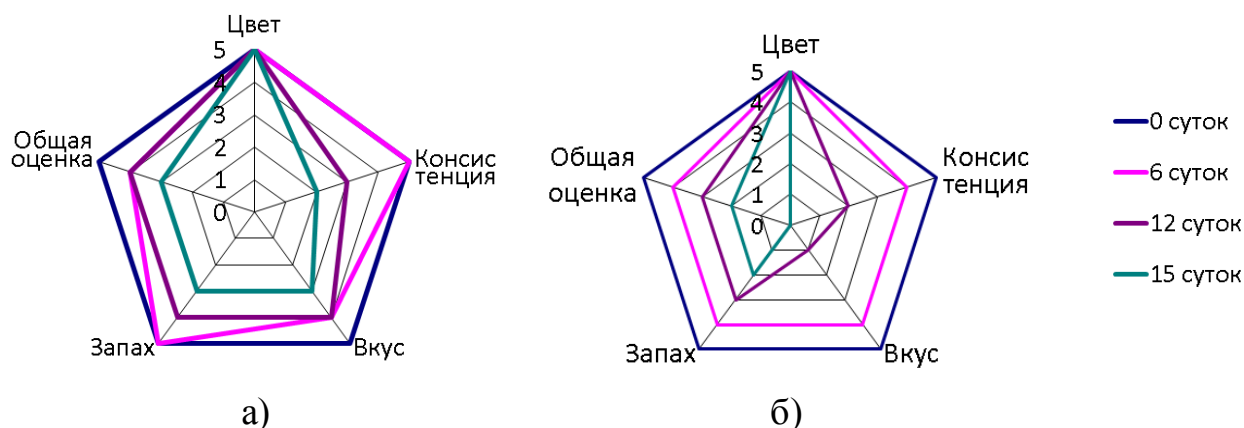


Рисунок 16 – Органолептические показатели пастеризованного молочно-сокового напитка в процессе хранения: а) контроль; б) напиток, обогащенный пробиотической композицией «b1»

Цвет остался неизменным – белый с легким кремовым оттенком, а консистенция стала более вязкой и немного отличалась от консистенции контрольного напитка. На 15-е сутки у контрольного образца напитка незначительно ухудшились показатели консистенции, вкуса и запаха, в то время как цвет остался неизменным. Показатели обогащенного напитка по сравнению с контролем ухудшались более интенсивно: консистенция стала хлопьевидной, вкус и запах стали кислыми, цвет по-прежнему не изменился. Более интенсивное изменение органолептических показателей в опытном образце подтверждает присутствие жизнеспособных клеток пробиотических бактерий, внесённых при обогащении продукции.

Результаты определения количества клеток бифидобактерий и лактобактерий в пастеризованном молочно-соковом напитке представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Количество клеток *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в пастеризованном молочно-соковом напитке в зависимости от продолжительности хранения

| Время хранения, суток | Количество клеток, КОЕ/см <sup>3</sup> |                       |
|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------|
|                       | Бифидобактерии                         | Молочнокислые палочки |
| 0                     | $1,8 \times 10^8$                      | $7,5 \times 10^8$     |
| 6                     | $1,3 \times 10^8$                      | $7,1 \times 10^8$     |
| 12                    | $4,0 \times 10^7$                      | $3,4 \times 10^8$     |

Количество бифидобактерий и молочнокислых бактерий в пастеризованном молочно-соковом напитке составляло соответственно: от  $1,8 \times 10^8$  до  $4,0 \times 10^7$  и от  $7,5 \times 10^8$  до  $3,8 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>, БГКП не содержались в 0,01 см<sup>3</sup>, что отвечало требованиям Федерального закона № 88 «Технический регламент на молоко и молочную продукцию», при нормируемом количестве

бифидобактерий не менее  $1 \times 10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup>; лактобактерий – не менее  $1 \times 10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Результаты изучения показателей качества пастеризованного молочно-сокового напитка, обогащенного новой пробиотической композицией, снижающей концентрацию холестерина, показали, что напиток может храниться в течение 7 суток при  $t = 4 \pm 2$  °С (с учетом коэффициента запаса).

Таким образом, был показан способ практического применения новой пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, в технологии обогащенного пастеризованного молочно-сокового напитка.

Полученные результаты показали эффективность и целесообразность применения созданной пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, в продуктах профилактической направленности.

### Основные заключения по работе:

1. Теоретически и экспериментально обоснован состав пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, в которую включены следующие штаммы: *B. bifidum* GG-72, *L. acidophilus* АСТ-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. rhamnosus* LC-52GV.
2. Выделен и идентифицирован новый безопасный штамм бифидобактерий *B. bifidum* GG-72, обладающий высокой способностью к снижению концентрации холестерина и адгезии к эпителиальным клеткам, выраженной антагонистической активностью по отношению к *Escherichia coli* O157 и *Staphylococcus aureus* 209-Р функциональными и технологическими свойствами. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП «ГосНИИгенетика» под номером ВКПМ Ас-1884.
3. Получены новые данные для выделенных и коллекционных штаммов пробиотических бактерий по адгезии к клеткам кишечника, которая составляла «высокий» уровень для штаммов *B. bifidum* GG-72, *L. rhamnosus* LC-52GV; «средний» уровень для *L. acidophilus* АСТ-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1; «низкий» уровень для *L. acidophilus* АСТ-41, *L. acidophilus* 887.
4. Разработаны условия биотехнологии ассоциированного пробиотика на основе штаммов, обладающих высокой способностью к снижению концентрации холестерина: *B. bifidum* – 37,6 %; *L. rhamnosus* – LC-52GV – 27,4 %; *L. plantarum* – ГВИ-1 – 30,6 %; *L. fermentum* LFM-2 – 29,6 %.
5. Обоснованы сроки годности пробиотической композиции с сохранением показателей качества и способностью к снижению концентрации холестерина, при  $4 \pm 2$  °С – 3 месяца, при минус  $18 \pm 2$  °С – 6 месяцев. Показана возможность применения пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, для обогащения молочной продукции.
6. Проведена апробация биотехнологии в производственных условиях, что показало возможность ее реализации в промышленности для получения пробиотической композиции с высокой способностью к снижению концентрации холестерина, разработана технологическая инструкция на производство биомассы.



7. Показана эффективность применения разработанной пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, в условиях *in vivo* на белых мышах.

## ОПУБЛИКОВАННЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК РФ:

1. **Головин, М.А.** Новый штамм бифидобактерий как фактор повышения биобезопасности пищевых продуктов питания [Текст] / М.А. Головин, В.И. Ганина // Техника и технологии пищевых производств. – 2012. – № 4. – С. 139–144.
2. **Данильчук, Т.Н.** Низколактозные молочные продукты. Пути получения / Т.Н. Данильчук, В.И. Ганина, М.А. Головин // Молочная промышленность. – 2013. – № 11. – С. 41–42.
3. **Головин, М.А.** Холестерин-редуцирующие пробиотические бактерии в молочной продукции / М.Г. Головин, В.И. Ганина, Н.Г. Машенцева // Молочная промышленность. – 2014. – № 5. – С. 46–47.

Публикации в сборниках научных трудов

4. **Головин, М.А.** Аспекты изучения механизмов биопотенциала бифидобактерий / М.Г. Головин, В.И. Ганина, С.Н. Янов // Материалы VIII Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения». – М: МГУПБ, 2010. – С. 5–7.
5. **Головин, М.А.** Бактериоцины бифидобактерий как перспективные биоконсерванты продуктов питания / М.А. Головин, В.И. Ганина // Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М, 2011. – С. 172–173.
6. **Головин, М.А.** Изучение ингибирующего биопотенциала новых штаммов бифидобактерий по отношению к возбудителям кишечных инфекций / М.А. Головин, В.И. Ганина // Материалы IX Международной научно-практической конференции «Технологии и продукты здорового питания. Функциональные продукты питания». – М: МГУПП, 2011. – С. 161–163.
7. **Головин, М.А.** Биопотенциал пептидов малой молекулярной массы пробиотических микроорганизмов для создания биофармацевтических препаратов / М.А. Головин, В.И. Ганина // Материалы Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ имени Д.И. Менделеева, 2012. – С. 69 – 70.
8. **Головин, М.А.** Перспективы получения биомассы холестерин-редуцирующих штаммов пробиотических микроорганизмов в промышленных объемах // М.А. Головин, В.И. Ганина, Е.Ю. Королева // Материалы XIII Всероссийской научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологий». – М: Изд-во «Инновационные технологии», 2013. – С. 92 – 94.
9. **Головин, М.А.** Применение холестерин-редуцирующих пробиотических микроорганизмов как безопасный метод снижения уровня холестерина в крови человека / М.А. Головин, В.И. Ганина, И.И. Ионова // Материалы V Международной научно-технической конференции «Безопасность и качество продуктов питания. Наука и образование», часть II. – М: МГУПП, 2014. – С.18-21.