

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ»**

На правах рукописи

Головин Михаил Анатольевич

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

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
Ганина Вера Ивановна

Москва, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Влияние пробиотических микроорганизмов на организм человека.....	11
1.1.1. Восстановление нормальной микробиоты	14
1.1.2. Антагонизм к условно-патогенным микроорганизмам.....	15
1.1.3. Нормализация пищеварения.....	18
1.1.4. Регуляция концентрации холестерина	19
1.1.5. Антиоксидантная активность.....	22
1.1.6. Антиканцерогенная активность	23
1.2. Биологически активные вещества пробиотических микроорганизмов.....	24
1.2.1. Бактериоцины	24
1.2.2. Пептиды малой молекулярной массы казеина.....	27
1.2.3. Внеклеточные пептиды и протеины.....	28
1.2.4. Полисахариды.....	28
1.3. Адгезионная способность пробиотических микроорганизмов	29
1.4. Исследования возможности усиления свойств пробиотических бактерий.	30
Заключение по литературному обзору.....	32
ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	35
2.1. Организация эксперимента	35
2.1. Объекты исследований	35
2.2. Материалы и методы исследований.....	36
ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ. ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР.....	53
3.1. Изучение культурально-морфологических, тинкториальных характеристик и динамики развития новых штаммов бифидобактерий	53
3.2. Исследование функционально-технологических свойств новых штаммов бифидобактерий.....	58

3.3. Генетическая идентификация штаммов <i>B.bifidum</i> GG-72.....	62
3.4. Исследование адгезии штаммов бифидобактерий и лактобактерий	65
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ К СНИЖЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА	68
4.1. Исследование способности штаммов пробиотических бактерий разных родов к снижению концентрации холестерина в условиях <i>in vitro</i>	68
4.2. Определение условий биотехнологии для получения биомассы штаммов пробиотических бактерий, снижающих концентрацию холестерина	72
4.3. Экспериментальное обоснование состава ассоциированной пробиотической композиции, способной к снижению концентрации холестерина	80
4.4. Проверка биотехнологии штаммов пробиотических бактерий, способных к снижению концентрации холестерина в производственных условиях	83
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ	89
5.1. Изучение показателей качества созданной пробиотической композиции при хранении.....	89
5.2. Изучение действия созданной пробиотической композиции в условиях <i>in vivo</i>	91
5.3. Изучение возможности применения созданной пробиотической композиции для обогащения молочной продукции	101
ОСНОВНЫЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ ПО РАБОТЕ	106
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	108
ПРИЛОЖЕНИЯ	134

ВВЕДЕНИЕ

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 (рисунок 1) [33; 66; 73].



Рисунок 1 – Приоритетные направления развития биотехнологии

Разработка и производство такой продукции обусловлены тем, что у населения наблюдается увеличение алиментарных заболеваний, приводящих к снижению производительности труда и, в целом, влияющих на развитие экономики в стране [53]. Одним из факторов, вызывающих возникновение ряда заболеваний (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инсульты, гипертония и др.), является нарушение уровня холестерина в крови. Повышенная концентрация холестерина в крови человека играет существенную роль в генезе атеросклероза – одного из основных звеньев механизма развития сердечно-сосудистых заболеваний, смертность от которых велика [20; 118; 206]. 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 [152; 185; 213].

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 И.А., Забодаловой Л.А., Нетрусова А.И., Нефедовой Н.В., Остроумова Л.А., Поспеловой В.В., Рогова И.А., 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: Алешкина 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 холестерин, в промышленных условиях и разработать технологическую инструкцию на производство биомассы.

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 кишечнику человека на лабораторной модели клеток кишечника человека CaCo-2, 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.

– 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 ± 1 °С 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 (приложение 7);

– 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»).

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 г. (приложение 1).

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.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Влияние пробиотических микроорганизмов на организм человека

Пробиотические микроорганизмы представляют собой естественные симбиотические микроорганизмы человека. Они играют главную роль среди других представителей кишечной микробиоты человека и являются его неотъемлемой частью [1; 77; 90; 164; 192]. Неблагоприятные изменения в количественном и качественном составе индигенной микробиоты, в норме находящейся в позитивных симбиотических отношениях с макроорганизмом, приводят к неблагоприятным последствиям для здоровья человека и, в целом, способно влиять на качество и продолжительность его жизни [52; 103; 178].

Среди положительных действий пробиотических микроорганизмов на организм человека выделяют следующие: восстановление состава полезной микробиоты, антагонизм в отношении инфекционных агентов, участие в регулировании концентрации холестерина в крови человека, облегчение лактозной непереносимости, снижение аутоинтоксикации организма, облегчение течения хронических воспалительных заболеваний, стимуляция перистальтики, иммуностимуляция, пищеварительная, синтетическая активности, снижение вероятности развития зубного кариеса, астмы, аллергии, антидиабетическое воздействие, а также снижение риска развития рака желудочно-кишечного тракта и др. (таблица 1.1) [76; 90; 99; 144; 168; 169; 186; 212].

Пробиотические микроорганизмы вырабатывают множество полезных для человека веществ, способных всасываться в кишечнике и использоваться для поддержания функций в организме. Среди основных веществ можно назвать органические кислоты, витамины, аминокислоты, многоатомные спирты, газы (H_2 , CO_2 , CH_4 , H_2O_2 , NH_4 , NO), целлюлоза (таблица 1.2, 1.3) [18; 19; 29; 40; 65; 83].

Таблица 1.1 – Основные положительные функции микробиоты

Функция	Пути реализации
Инфекционная защита	Антагонистическая активность, препятствие проникновению клеток возбудителя в кровяное русло
Иммуномодуляция	Стимуляция работы иммунной системы: индукция синтеза различных иммунных агентов
Вывод из организма токсинов, препятствие мутагенезу и канцерогенезу	Гидролиз продуктов метаболизма пищевых веществ, модификация желчных и жирных кислот, подавление активности гистамина, экзогенных не природных веществ и предшественников канцерогенов
Синтетическая	Синтеза разного рода биологически активных веществ
Пищеварительная	Стимуляция работы пищеварительных ферментов, стимуляция перистальтики

Таблица 1.2 - Основные метаболиты, выделяемые молочнокислыми пробиотическими микроорганизмами

Витамины	Кислоты	Ферменты	
✓ К	✓ молочная	✓ протеазы	гликозидазы
✓ В1	✓ уксусная	✓ амилазы	✓ α- и β-гликозидазы
✓ В2	✓ муравьиная	✓ липазы	✓ α- и β-галактозидазы
✓ В6	✓ янтарная	✓ целлюлазы	✓ β-глюкуронидазы
✓ В12	✓ пантотеновая		✓ гемицеллюлазы
	✓ никотиновая		
	✓ фолиевая		

Анализ многочисленных публикаций по длительному применению пробиотиков на основе молочнокислых микроорганизмов десятками миллионов людей в течение длительного времени в различных странах, включая Россию, свидетельствует об отсутствии каких-либо побочных явлений [77; 78].

Таблица 1.3 – Основные физиологические эффекты метаболитов бифидобактерий и лактобактерий

Метаболиты	Эффект
Масляная кислота, бутират	<p>Энергообеспечение эпителия</p> <p>Летучие жирные кислоты обеспечивают до 20 % ежедневной энергетической потребности организма и являются более предпочтительным источником энергии для колоноцитов, чем глюкоза и другие субстраты</p> <p>Регуляция ионного обмена (поддержание водно-электролитного баланса)</p> <p>Всасывание масляной кислоты способствует увеличению абсорбции Na⁺ и H₂O, секреции K⁺ и бикарбонатов в просвет кишки</p>
Бутират	<p>Регуляция пролиферации и дифференцировки эпителия</p> <p>Повышение митотической активности энтероцитов крипт и скорости их миграции по микроворсинкам</p>
Молочная, уксусная, муравьиная, пропионовая, масляная кислоты	<p>Регулирование моторной активности кишечника</p> <p>Закисление и повышение осмолярности кишечного содержимого стимулирует перистальтику</p>
Пропионовая, масляная кислоты	<p>Поддержание анаэробноза</p> <p>Абсорбция ЛЖК через слизистую оболочку кишечника сопровождается связыванием кислорода, поступающего в эту область по капиллярам</p>
Пропионовая, масляная и молочная кислоты, перекись водорода, мурамидаза, антибиотикоподобные вещества	<p>Антибактериальный эффект</p> <p>В кислой среде антагонизм бифидо- и лактобактерий к потенциальным патогенам усиливается</p>

[4; 11; 18; 78; 26].

Можно заключить, что пробиотические микроорганизмы и их продукты обмена обладают весьма полезным и широким спектром функционального действия на организм человека, а также обладают высоким

потенциалом для исследований и применения для улучшения здоровья людей с целью снижения медикаментозной нагрузки [22; 30; 31; 45; 68; 75].

1.1.1. Восстановление нормальной микробиоты

Бифидобактерии и лактобактерии – нормальные представители кишечника человека, заселяющие его при грудном вскармливании с первых дней жизни. Нарушение нормального состояния кишечной микробиоты способно вызывать: диареи, нарушение пищеварения и работы прочих систем организма. Нарушение нормобиоты сопровождается развитием гнилостных и болезнетворных микроорганизмов, выделяющих соответственно продукты гнилостного разложения пищи, которые зачастую ядовиты для организма человека [27; 55; 78; 81; 86].

Имеются сведения о значительном снижении количества бифидобиоты у детей раннего возраста, которое нередко сопровождается возникновением острой диареи. Такое состояние возможно исправить путем применения *B. bifidum* в комплексе с *Streptococcus thermophilus*, что снижает частоту возникновения диареи. Таким же эффектом обладают препараты на основе других представителей пробиотических микроорганизмов. Например, *Bifidobacterium breve* BBG–1 в комбинации с *Lactobacillus casei* или применение Бифидус–йогурта [61; 176].

Ученые отмечают, что возможность разных пробиотиков останавливать диарею зависит от причины возникновения заболевания. Замечено, что *B. longum* и *L. acidophilus* способны нормализовать кишечную микробиоту, нарушаемую не только разными видами антибиотиков, но и даже радиацией [3; 5; 38; 142; 165].

Исчезновение диареи при применении пробиотиков объясняется продукцией ими антибиотикоподобных веществ, летучих жирных кислот (ЛЖК), участии в метаболизме желчных кислот и утилизации муцина,

активно участвующих в регуляции водного и электролитного обмена [2; 61; 176].

ЛЖК играют одну из важнейших ролей в нормализации микробиоты кишечника. Они способствуют улучшению слизистой оболочки толстой кишки, являются дополнительным источником энергии для эпителия кишечника и играют некоторые другие полезные функции, поддерживающие микробиоту ободочной кишки (таблица 1.3) [19; 39; 83].

Свойство пробиотических микроорганизмов противодействовать гнилостной микробиоте кишечника, улучшать его состояние, нормализовать пищеварение является одним из основных их свойств. Посредством именно нормализации микробиологического статуса кишечника происходят первые улучшения в состоянии организма человека под действием пробиотической микробиоты.

1.1.2. Антагонизм к условно-патогенным микроорганизмам

Обитание в современных условиях города сопряжено с учащением контакта человека с патогенными микроорганизмами. Воздействие посторонних микроорганизмов на человека привело к появлению ряда мощных защитных систем. Одной из таких защитных систем организма человека является его нормальная микробиота, заселяющая человека при его рождении, и реализующая множество тонких механизмов противoinфекционной защиты [3; 28; 52; 67].

Представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* способны оказывать положительный эффект при назначении препаратов на их основе больным с острыми гастроэнтеритами спровоцированными представителями родов *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium* и другими известными возбудителями кишечных инфекций [27; 48; 49; 50; 61; 111; 176].

Пробиотические микроорганизмы препятствуют колонизации кишечного тракта патогенами за счет таких механизмов как конкуренция за

важнейшие питательные вещества и за сайты прикрепления на клетках кишечника; продукция антибактериальных веществ. Бактериальные антимикробные вещества обладают бактерицидным или бактериостатическим эффектом в отношении к целому ряду Грам-положительных и Грам-отрицательных патогенных бактерий [13; 14; 16; 28; 55; 78; 86; 119; 151; 209].

Применение пробиотических препаратов на основе молочнокислых микроорганизмов имеет особое значение в наше время для детей раннего возраста. Это также связано с уменьшением содержания или полным отсутствием кишечной бифидобиоты и видоизменением ее видового состава в сравнении с показателями 60–80-х годов прошлого века, даже при исключительно грудном вскармливании [61]. Примером может послужить применение для грудных детей бифидобактерий совместно с *Streptococcus thermophilus*, что способно понижать частоту возникновения ротавирусной инфекции [177]. В отношении ротавирусной инфекции также существует эффективные отечественные препараты [49, 50].

Пробиотические микроорганизмы являются дополнительным барьером от возбудителей инфекционных заболеваний в добавок к собственной иммунной системе организма человека, что само по себе служит причиной их широкого применения для оздоровления людей разного возраста. В наше время данная способность пробиотических микроорганизмов также не теряет своей актуальности.

Подавление *Helicobacter pylori*. На сегодняшний день *Helicobacter pylori* широко распространенный патогенный микроорганизм. Этот вид признают причиной язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, и считается фактором риска возникновения злокачественных опухолей в кишечном тракте. У большинства людей заселение *Helicobacter pylori* проходит без проявления симптомов и остается без должного внимания.

Лечение антибиотиками бывает не всегда эффективным из-за развития антибиотикоустойчивости и слабого соблюдения схем приема антибиотиков.

По мнению многих исследователей, лечение инфекционных процессов, вызванных *H. pylori*, возможно с помощью заместительной микробной терапии пробиотическими препаратами. При таком подходе пробиотики рассматриваются как альтернативное решение вопроса повышения контроля над *H. pylori*.

В этом направлении получено немало положительных результатов, показывающих действенность родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [87; 89; 131; 183]. Клинические испытания на разных возрастных группах людей показали, что пробиотики способствуют снижению концентрации *H. pylori* в желудке [121].

Среди механизмов подавления роста *H. pylori* называют выработку молочнокислыми микроорганизмами бактериоцинов, короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) и препятствие адгезии на эпителиальных клетках. Количество молочной кислоты, продуцируемой штаммами *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Pediococcus*, (50–156 mM) коррелирует с их ингибиторным эффектом по отношению к *H. pylori* [94; 156].

Среди бактериоцинов пробиотиков сильный эффект в отношении *H. pylori* проявляли лактицин А164 и лактицин ВН5. Эффект этих бактериоцинов оказался сильнее по сравнению с низином А, педиоцином РО₂, лейкоцином К [136].

Кроме того, в отношении подавления роста *H. pylori*, была показана эффективность бактерицидного действия аутолизата *L. acidophilus* CRL 639 и аутолизата *L. johnsonii* La1 [148; 155].

Helicobacter pylori возбудитель серьезного и весьма распространенного в наше время заболевания – язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. В отношении устранения или угнетения *Helicobacter pylori*, как источника заболевания, можно использовать пробиотические

микроорганизмы и их продукты обмена, обладающие бактериостатическим или бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*.

1.1.3. Нормализация пищеварения

На значительную роль лактобацилл и бифидобактерий в биохимических процессах, протекающих в кишечнике, впервые указывал еще И.И. Мечников [115]. Лактобактерии и бифидобактерии заселяют организм новорожденного в раннем постнатальном периоде. Лактобациллы распространяются по различным отделам желудочно-кишечного тракта [5; 34; 79].

Молочнокислая микробиота оказывает существенное действие в стабилизации барьерной функции желудка, препятствии воспалительным процессам в желудочно-кишечном тракте, способствует ферментативному расщеплению белков, липидов, высокомолекулярных углеводов, нуклеиновых кислот, клетчатки, солей желчных кислот. Молочнокислые микроорганизмы участвуют в обмене электролитов, детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов, выполняют функцию «биосорбента», стимулируют перистальтику кишечника [5; 38; 192].

Вырабатываемые лактобиотой молочная и другие кислоты создают идеальную среду для работы кишечника, представляя собой ценный энергетический субстрат для клеток кишечника. Эти кислоты способствуют усвоению ионов кальция, железа, витамина D. Уксусная кислота принимает участие в регуляции моторики кишечника и активной кислотности [78; 82, 83, 84].

Таким образом, можно заключить, что молочнокислые микроорганизмы и вырабатываемые ими органические кислоты играют немаловажную роль в улучшении работы желудочно-кишечного тракта, выполняя в нем различные функции, принимая участие в разных биохимических и физиологических процессах.

1.1.4. Регуляция концентрации холестерина

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из главных причин смертности среди средней и старшей возрастных групп людей в разных странах мира. Повышенная концентрация липидов в крови признана основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний, в частности коронарной болезни сердца, и других нарушений здоровья в развивающихся странах. Прежде всего, клинические испытания показывают связь между уровнем холестерина и риском возникновения коронарной болезни сердца [20; 118; 206].

Современные стратегии питания, направленные на предупреждение сердечно-сосудистых заболеваний, пропагандируют соблюдение диет с низким содержанием жиров. Нет сомнений в том, что диеты с пониженным содержанием жиров представляют собой эффективный способ понижения холестеринемии. На практике это оказывается менее эффективным во многом по причине неприемлемости данных диет для потребителей из-за существенного ухудшения вкусовых свойств.

Применение диет, включающих ферментированные молочные продукты или продукты, обогащенные пробиотическими микроорганизмами, выявило потенциал к снижению уровня сывороточного холестерина. При данной стратегии решения проблемы были использованы различные подходы, включая использование пробиотических бактерий, особенно *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. В последние годы способность воздействовать на липидный обмен организма человека представляет собой одно из новых и наиболее широко обсуждаемых свойств пробиотических микроорганизмов [18; 51; 71; 144].

Пробиотические микроорганизмы влияют на уровень холестерина по данным исследователей следующим образом:

- 1) включение в метаболизм бактерий в ходе их роста и развития (ассимиляция);

- 2) адсорбция на клеточной поверхности;
- 3) деконъюгация желчных кислот с помощью гидролазы желчных кислот – образование деконъюгированных желчных кислот;
 - 3.1) вывод из организма деконъюгированных желчных солей, использование холестерина на восполнение утраченных желчных кислот;
 - 3.2) потеря способности солюбилизовать холестерин и другие липиды пищи, снижение усвоение пищевого холестерина организмом;
 - 3.3) копреципитации деконъюгированных желчных кислот с холестерином, экскреция их из организма;
- 4) продукты брожения молочнокислых бактерий ингибируют ферменты синтеза холестерина в организме человека;
- 5) перевод холестерина в нерастворимую форму – копростанол под действием холестерин-редуктазы кишечной микробиоты, что приводит к экскреции холестерина из организма [46; 123; 144; 150; 172].

Как следствие вышеуказанных механизмов происходят следующие эффекты: 1) препятствие проникновению в кровяное русло холестерина и продуктов его превращений; 2) вывод из организма холестерина и его продуктов; 3) стимуляция переработки холестерина в организме в желчные кислоты; 4) препятствие выработки холестерина организмом человека [100; 124; 144; 145; 147; 191].

Бифидобактерии как в фазе роста, так и в фазе покоя, способны преципитировать холестерин в окружающей среде в присутствии солей желчных кислот при рН ниже значения 5,4 за счет действия гидролазы желчных кислот. Это подтверждается возможностью экстрагирования холестерина из растущих клеток бифидобактерий.

В организме человека метаболизм холестерина тесно связан с образованием солей желчных кислот (рисунок 1.1), которые представляют собой водорастворимые конечные продукты переработки холестерина. Их роль

состоит в поддержании холестерина в растворимом состоянии.

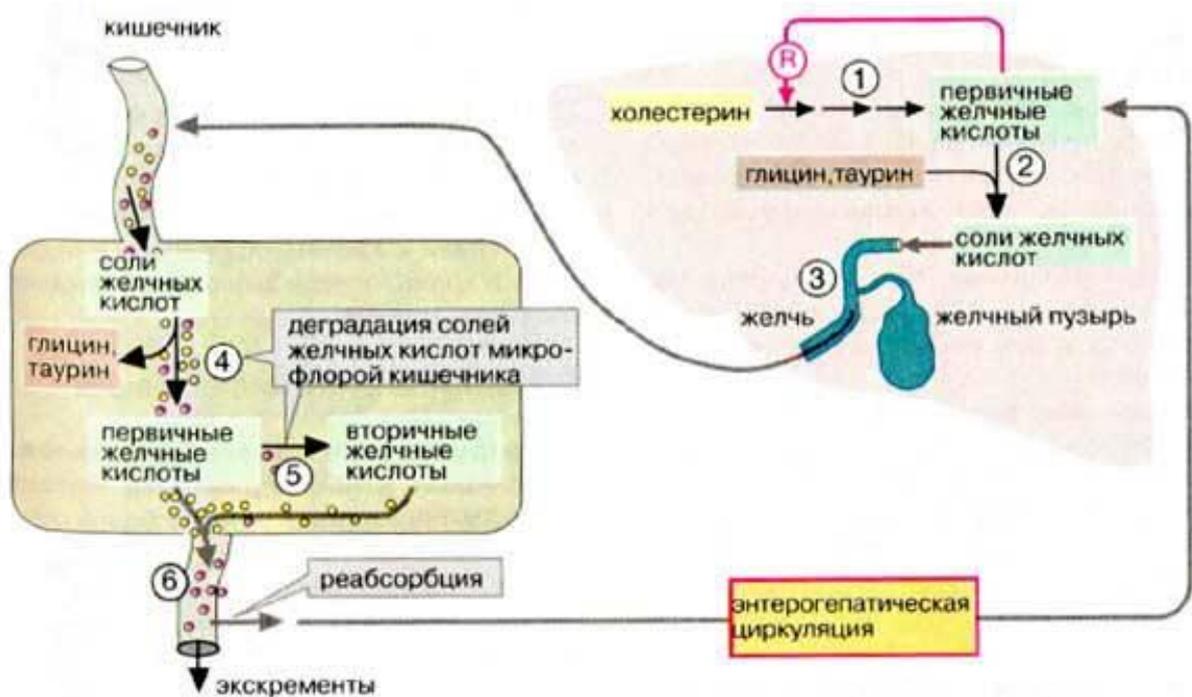


Рисунок 1.1 – Метаболические превращения желчных кислот [18; 39].

Желчные кислоты вырабатываются в печени, в составе желчи хранятся в желчном пузыре, далее переходят в кишечник, эмульгируют липиды, всасываются в кровяное русло, в печени освобождаются от холестерина и других липидов и снова переходят в желчь. Весь этот цикл называют энтерогепатической рециркуляцией. В печени желчные кислоты конъюгируют с аминокислотой глицином или таурином, которые повышают их растворимость. Эти аминокислоты отщепляются гидролазой желчных кислот (ГЖК) с образованием деконъюгированных желчных кислот. Некоторые авторы сообщают, что активность ГЖК также подтверждается исследованиями *in vitro* на среде MRS [147; 189; 190; 197].

По данным зарубежных и отечественных исследователей пробиотические микроорганизмы способны положительно влиять на холестерин низкой и высокой плотности в организме человека. Культуры *B. longum* SPM1207 проявляли в эксперименте способность понижать концентрацию холестерина в среде низкой плотности, а также незначительно повышали концентрацию холестерина высокой плотности. Как известно,

именно холестерин низкой плотности служит причиной появления холестериновых отложений в сосудах [125; 145; 194].

По литературным данным наиболее перспективными видами пробиотиков, влияющими на концентрацию холестерина, могут быть виды *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* (таблица 1.4).

Таблица 1.4 – Перспективные пробиотические виды бактерий, снижающие концентрацию холестерина

Вид	Основание выбора вида
<i>B. adolescentis</i>	A. Bordoni, 2013; M. Kumar, 2012; D.K.Lee, 2009
<i>B. bifidum</i>	S.A. Starovoitova, 2012; M. Ziarno, 2007; G.-B. Kim, 2004
<i>L. acidophilus</i>	M. Kumar, 2012, H.S. Lye, 2012; H. Mahrous, 2011; N. Xie, 2011; Y.H. Park, 2007; A.A. Al-Saleh, 2006; U. Schillinger, 2005
<i>L. fermentum</i>	M. Kumar, 2012; N. Xie, 2011; L.A. Simons, 2006
<i>L. plantarum</i>	M. Kumar, 2012; L.D. Guo, 2011; H. Mahrous, 2011; D.V. Sieladie, 2011; N. Xie, 2011; Guo, L. -D., 2011
<i>L. rhamnosus</i>	M. Kumar, 2012; K. Hatakka, 2008; Y. Bao, 2010; M. Ziarno, 2007

В этой связи существует необходимость расширения исследований в области выделения и поиска новых штаммов пробиотиков, участвующих в метаболизме холестерина.

1.1.5. Антиоксидантная активность

В настоящее время немаловажным остается вопрос об антиоксидантной активности молочнокислых микроорганизмов. Исследования в данном направлении не теряют своей актуальности.

Примером пробиотических микроорганизмов ярко проявляющих антиоксидантный эффект могут быть представители рода *Lactobacillus* [69]. Представители рода *Lactobacillus* способны снижать окислительный стресс и повреждения печени экспериментально индуцированные у лабораторных животных. При введении штамма подопытным животным в течение 8 дней

происходила нормализация активности антиоксидантных ферментов, и ферментов, ответственных за переработку ксенобиотиков, происходила нормализация антиоксидантного цитозоля печени. Также авторами работы отмечается сохранение активности гемоксигеназы и некоторых генов, ответственных за ответ на окислительные стрессы [63].

Существуют также исследования антиоксидантной активности бифидобактерий. Результаты показывают, что культуральный супернатант, интактные клетки и внутриклеточный экстракт могут эффективно бороться со свободными радикалами, особенно усиливать активность антиоксидантных ферментов и уменьшать уровень малонового диальдегида (маркер перекисного окисления жиров, оксидативного стресса, мутаген-предшественник), пигмента старения липофусцина и моноаминоксидазы (метаболизм опасных биологически-активных веществ) [184].

Отдельный интерес в качестве антиоксидантов представляют экзополисахариды бифидобактерий. В условиях *in vitro* и *in vivo* на примере белых мышей экзополисахариды показывают значительный антиоксидантный эффект по многим характеристикам [207].

Результаты исследований ученых указывают, что представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и их полисахариды обладают антиоксидантным эффектом. Такие данные широко получены при исследованиях *in vitro* и при использовании лабораторных животных. Таким образом, пробиотические бактерии рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* обладают потенциалом к развитию их применения в антиоксидантных пищевых системах, что также усиливает интерес к новым штаммам пробиотиков.

1.1.6. Антиканцерогенная активность

Употребление продуктов, содержащих пробиотические микроорганизмы, способно снижать риск возникновения онкологических заболеваний. Такие данные были получены на примере *Lactobacillus*

bulgaricus, которые широко используются для приготовления йогурта и других кисломолочных продуктов, и способны демонстрировать выраженную профилактическую противоопухолевую активность [17]. Имеются данные о способности пробиотических лактобактерий снижать активность ферментов, связанных с формированием канцерогенных соединений кишечника [47].

Касательно бифидобактерий также была установлена способность ингибировать процессы канцерогенеза кишечника, печени и молочных желез, индуцированных мутагенами пищевого происхождения. Так, например, *B. longum* в виде лиофилизированного препарата были способны понижать у животных риск возникновения онкологических заболеваний прямой кишки, индуцированный различными мутагенами [102; 143; 173; 188].

Точный механизм антиканцерогенной активности пробиотических микроорганизмов до конца не ясен. Предполагаются следующие онкоподавляющие факторы: 1) усиление иммунного ответа хозяина; 2) прямое связывание и деградация потенциальных канцерогенов; 3) снижение количества кишечной микробиоты, которая производит предполагаемые канцерогены; 4) изменение физикохимических свойств полости прямой кишки; 5) продукция антимутагенных веществ. [128; 171; 186].

Таким образом, проявление пробиотическими бактериями в организме человека различных функций инициирует проведение дальнейших исследований в данной области, в частности, синтеза биологически активных веществ.

1.2. Биологически активные вещества пробиотических микроорганизмов

1.2.1. Бактериоцины

Бактериоцины представляют собой сложные соединения, в состав которых входит белковый или пептидный компонент, выполняющий

бактерицидное действие в отношении того же или близкородственных видов. Существуют бактериоцины со спектром действия на гнилостные, условно-патогенные и патогенные микроорганизмы. Многие исследователи признают, что способность вырабатывать бактериоцины – явление характерное для большинства бактерий, но зависит от свойств конкретного штамма [42; 44; 48; 64; 80].

Основным бактериоцином, широко используемым в прикладных исследованиях в настоящее время, является низин [35; 36; 43; 44; 60]. Количество известных в настоящее время бактериоцинов гораздо шире. В их число входят: бифидоцин Б, бифилонг, бифидин, плантарицин, плантацин, ацидоцин, лактацин F, лактоцин, диацетин, курвацин и многие другие [19; 37; 209].

Бактериоцины молочнокислых бактерий – гетерогенная группа соединений с молекулярным весом от простых (несколько тысяч дальтон) до сложных протеиновых структур, которые, могут иметь в своем составе углеводные или липидные составляющие [120; 162; 204].

Бактериоцины разделены на три основные категории:

I. Лантибиотики. Небольшие пептиды (< 5 кДа), в состав которых входят редкие серосодержащие аминокислоты, такие как лантионин и β -метиллантионин. Лантибиотики синтезируются на рибосомах и подвергаются пост-трансляционной модификации (изменению химической структуры после биосинтеза).

II. Не содержащие лантионин термоустойчивые пептиды. Пептиды, синтезируемые на рибосомах и подвергавшиеся минимальной пост-трансляционной модификации. Они подразделяются на три основные группы: Ia – одинарные пептиды, Ib – дипептидные бактериоцины и Ic – тиол-активированные пептиды [138; 161].

III. Термоустойчивые белки. Они сравнительно мало распространены среди антибактериальных соединений, продуцируемых молочнокислыми бактериями.

IV. Бактериоцины, содержащие, помимо белковых, липидные или углеводные компоненты [42].

Многие изученные бактериоцины, продуцируемые молочнокислыми бактериями, относятся к I или II классу. Тот факт, что они термоустойчивы, делает их перспективными для использования в качестве консервантов продуктов питания. Ряд исследователей сообщают о положительном эффекте действия пробиотиков на качество продукции [10; 12; 23; 24; 25; 26; 32; 43; 44; 55; 70].

Механизм действия ряда бактериоцинов связан с нарушением проницаемости цитоплазматических мембран. Например, механизм действия бактериоцинов лактококков – это образование пор в цитоплазматической мембране чувствительных клеток. Поры дают выход гидрофильным растворам с молекулярной массой вплоть до 0,5 кДа. Формирование пор в клеточных мембранах приводит и к неконтролируемому выходу наружу ионов калия, в результате которого происходит снижение мембранного потенциала. Перенос ионов калия через поры в клеточных мембранах в норме осуществляется с участием фермента K^+ -АТФазы. Фермент K^+ -АТФаза гидролизует молекулы АТФ и использует энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ, для переноса ионов калия через клеточную мембрану. В конце концов, клетка погибает от энергетического истощения. Некоторые исследователи предполагают, что молочнокислые бактерии участвуют в сообразовании пептидов малой молекулярной массы [42].

1.2.2. Пептиды малой молекулярной массы казеина

Молочнокислые бактерии утилизируют белки молока, особенно казеин, как источник аминокислот при их росте [134]. При этом из казеина возможно образование биологически активных пептидов малой молекулярной массы.

Впервые пептиды молока были выделены из гидролизата казеина с помощью очищенных протеиназ *L. helveticus* CP790 и при сквашивании молока этими же бактериями. На тот момент был отмечен их гипотензивный эффект [208].

В качестве примера пептидов казеина называют два трипептида Ile-Pro-Pro и Val-Pro-Pro [105]. Они были обнаружены в первичной структуре β -казеина (74-76 Ile-Pro-Pro и 84–86 Val-Pro-Pro) и κ -казеин (108–110 Ile-Pro-Pro) [160]. Данные лактотрипептиды проявили гипотензивный эффект на примере разных видов лабораторных животных и при клинических испытаниях. Среди механизмов гипотензивного эффекта пептидов малой молекулярной массы называют способность повышать защитные функции эндотелия кровеносных сосудов и поддержание эластичности артерий человека.

К видам пробиотических бактерий, способных производить биоактивные пептиды, кроме *Lactobacillus helveticus* относят *Lactococcus lactis* [113]. Высказывают мнение о возможности выделения, очистки и самостоятельного использования протеолитических ферментов этих и других пробиотических микроорганизмов. Самостоятельное использование подобных ферментов предоставляет перспективу более эффективного применения биоактивных пептидов казеина [157]. Использование доступных коммерческих микробных протеиназ и мембраной ультрафильтрации не требует больших затрат и повышает выход продукта. Такой подход экономически обосновывает использование пептидов казеина в производстве функциональных продуктов питания [45; 141]. Другие ученые сообщают о внеклеточных пептидах пробиотиков.

1.2.3. Внеклеточные пептиды и протеины

В начале XXI века было проведено большое количество исследований внеклеточных пептидов пробиотических бактерий. Результатом их было открытие широкого спектра различных по структуре пептидов.

Внеклеточные пептиды подразумевают под собой пептиды, активно транспортируемые бактериями в окружающую среду через их цитоплазматическую мембрану, а также, отщепляемые от бактериальной поверхности.

Примером внеклеточного пептида может служить олигопептид р(CHWPR), регулирующий экспрессию нескольких генов человека, влияющих на противовоспалительные процессы и предотвращение заболевания оксалурии [92; 117; 179; 198].

Внеклеточные протеины могут выступать сигнальными молекулами при определенных взаимодействиях, начиная с клеток слизистой поверхности кишечника, заканчивая клетками иммунной системы человека [179; 181]. Полагают, что внеклеточные протеины могут быть разделены на две группы. К первой группе относят протеины, содержащие N-терминальную часть последовательности, для специфического механизма трансмембранного переноса. Ко второй группе относят поверхностно-ассоциированные протеины, которые отщепляются от бактерий при нормальном обновлении клеточной стенки [9; 110; 180; 199]. Функции пробиотических микроорганизмов обусловлены не только бактериоцинами и пептидами, но и синтезом экзополисахаридов.

1.2.4. Полисахариды.

Выработка экзополисахаридов молочнокислыми микроорганизмами является хорошо изученным явлением [116; 140; 203], а стартерные культуры штаммов-продуцентов экзополисахаридов предлагают применять в пищевой промышленности для повышения выхода и улучшения текстуры продукта

[25; 195; 205]. Образование олигосахаридов, дисахаридов было описано еще более чем 50 лет тому назад и не потеряло интерес исследователей и в настоящее время [127; 130]. Признанию огромного потенциала олигосахаридов для пищевой отрасли способствовали следующие факты: стимуляция иммунитета, развитие концепции пребиотиков, концепция использования олигосахаридов в качестве ложных сайтов адгезии для патогенных микроорганизмов, концепция использования гликозидов как пищевой добавки и криопротектора [6; 107; 137; 139; 170].

По результатам анализа научной литературы можно сказать, что изучение полисахаридов пробиотических бактерий в наше время не так широко распространено и имеет перспективы для интереса исследователей, т.к. полисахариды участвуют в адгезии бактерий и в других важных процессах, важных для здоровья человека.

Таким образом, пробиотические бактерии обладают комплексом полезных функциональных свойств, но для использования их биопотенциала важными представляются исследования, направленные на сохранение и усиление проявляемых ими свойств.

1.3. Адгезионная способность пробиотических микроорганизмов

Для реализации своих функциональных способностей пробиотические микроорганизмы должны обладать достаточной адгезией к клеткам эпителия кишечника человека. Адгезионная способность обеспечивает взаимодействие с организмом хозяина, колонизацию и иммуномодуляцию, играет роль в антагонизме к патогенам и тесно связана с выполнением других важных функций [93; 101; 108; 163; 210]. Адгезионная способность относится к одним из основных критериев выбора новых пробиотических штаммов [7; 93; 106].

Штаммы с сильной адгезивной способностью существенно препятствуют колонизации патогенов в кишечнике. Это объясняют конкуренцией за сайты адгезии, вытеснением и предотвращением адгезии

патогенных микроорганизмов, а также блокированием внеклеточных белков возбудителей инфекции. Пробиотические микроорганизмы способны в разы ингибировать адгезию широкого спектра патогенов, включая представителей рода *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* и *Rotavirus* [7; 85; 93; 98; 104; 129; 153; 154; 158; 159; 183].

В настоящее время одним из наиболее распространенных подходов к исследованию адгезионных свойств бактерий является использование лабораторной линии Caco-2 клеток, полученных из эпителия кишечника человека [85; 114; 196; 211]. Такой подход способен предоставлять максимально полное представление о возможных результатах взаимодействия бактерий с эпителием кишечника в условиях *in vivo* [109; 201].

1.4. Исследования возможности усиления свойств пробиотических бактерий

Один из путей получения новых пробиотиков с повышенным потенциалом к проявлению ценных для здоровья человека свойств – это выделение при эубиозе кишечника. При этом необходимо учитывать родовую и видовую принадлежность выделенного штамма бактерий.

Считают, что антагонистическая активность, и выработка соответствующих метаболитов, может быть усилена несколькими путями. Одним из них может быть использование клеточных экстрактов и культуральной жидкости симбионтных или условно-патогенных бактерий. Для этого могут быть использованы штаммы *S. aureus*, *Kl. pneumoniae* и *C. albicans*. Однако, при использовании культуральной жидкости *E. faecium* и компонентов *E. coli* возможно ослабление антагонизма [21]. В литературе сообщается, что на синтез бактериоцинов оказывают действие компоненты питательной среды, рН, температура, время инкубации, а также присутствие достаточного количества веществ, необходимых для клеточного и

энергетического обмена, основными из которых являются углеводы и фосфаты. Чтобы выявить оптимальные условия культивирования, необходимы тщательные исследования влияния температуры, pH, компонентов среды культивирования на эффективность синтеза бактериоцинов конкретным штаммом микроорганизмов. Так, в трудах Л.Г. Стояновой, сообщается об увеличении эффективности синтеза бактериоцина на 58,5 % (6500 МЕ/мл) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Синтез увеличили, изменив состав среды культивирования: уменьшили содержание фосфатов, заменили углеводный компонент, а также проводили стабилизацию pH среды в процессе культивирования [59; 60].

Следующим способом, получающим все большее распространение в настоящее время, являются методы генной-инженерии [120] и методы ненаправленного мутагенеза: ультрафиолетовое излучение, ДНК-тропные вещества, перекиси и другие химические агенты. Также предлагают использовать метод слияния протопластов, как метода гибридизации. При этом соединяются полные геномы и цитоплазмы родительских штаммов с целью передачи наследственной информации по интересующему признаку. При таком подходе в популяции микробной культуры появляются мутанты, которые могли бы возникнуть спонтанно в природе. Затем у полученных мутантов исследуют усиление необходимого свойства. Однако, подход получения мутантов сопряжен с современным негативным отношением общественности к генно-инженерным микроорганизмам и запретом на их использование во многих странах.

Усиление определенных свойств пробиотических бактерий возможно и методами классической селекции, включающими следующие этапы:

- получение природных диких штаммов;
- скрининг природных штаммов на предмет усиления необходимого свойства;

– поиск подходов и методов для усиления необходимого свойства при культивировании (варьирование условий культивирования).

Подводя итоги выше написанного, можно сказать, что наиболее перспективным направлением в настоящее время является метод направленного изменения последовательности генов, отвечающих за определенную функцию изучаемого штамма [58]. Хотя такой подход ведет к изменениям только в определенном гене и функции, нельзя исключать из внимания факт современных опасений общества перед генно-модифицированными микроорганизмами. В виду этого, наиболее широко используемыми методами получения микроорганизмов с усиленными определенными свойствами остаются классические методы селекции и метод варьирования условий культивирования [71].

Заключение по литературному обзору

Проведенный анализ отечественной и зарубежной литературы показывает основные направления современных исследований пробиотических бактерий. Данная группа бактерий остается признанно безопасной и полезной для здоровья человека по множеству показателей. Такой интерес к пробиотическим микроорганизмам обусловлен и физиологичностью, отсутствием побочных эффектов и возможностью применения с первых дней жизни. Широкий спектр функциональных свойств пробиотических микроорганизмов не теряет своей актуальности для современного человека, подвергающегося стрессовым воздействиям в постоянно изменяющейся экосистеме [8; 54; 74; 75].

Пробиотические микроорганизмы не теряют своего потенциала и интереса ученых в таких направлениях, как восстановление нормальной микробиоты кишечника, антагонизм к болезнетворным и гнилостным микроорганизмам, нормализация пищеварения, участие в снижении регулировании концентрации холестерина в крови человека, антиоксидантная активность, антиканцерогенная активность, синтез

специфических биологически активных веществ и другим свойствам, благотворно влияющим на организм человека.

Наиболее современным способом влияния на свойства микроорганизмов остаются методы генетики, но все возможные побочные эффекты и варианты влияния на организм человека остаются до конца не изученными. По этой причине такое направление улучшения свойств пробиотиков остается в наши дни не самым приемлемым.

Современные условия жизни у многих людей связаны прежде всего с малоподвижностью, а рационы питания зачастую излишне богаты жирами. Повышенное количество липидов в пище людей является основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний. В свою очередь сердечно-сосудистые заболевания – это главная причина смертности среди населения. Сердечно-сосудистые заболевания «молодеют», т.е. увеличивается число больных среди людей среднего и молодого возраста. Повышенное количество холестерина в крови человека признано основным фактором, вызывающим сердечно-сосудистые заболевания человека. Для регулирования концентрации холестерина в крови существуют химические фармпрепараты, но они бывают дорогостоящи и обладают многими серьезными побочными эффектами. Современные ученые исследуют возможность регулирования уровня холестерина с применением пробиотических микроорганизмов. Такой подход представляется менее дорогостоящим и более безопасным. Таким образом, изучение способности пробиотических бактерий коллекции ФГБОУ ВПО «МГУПП» влиять на концентрацию холестерина является весьма перспективным направлением исследований.

Подводя итоги выше изложенного можно сформулировать цель диссертационной работы: создание пробиотической композиции с высокой способностью к снижению концентрации холестерина на основе специально подобранных штаммов по комплексу показателей, в том числе 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.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Организация эксперимента

Микробиологические исследования проводили на кафедре «Технология мясных и молочных продуктов» ФГБОУ ВПО «МГУПП». Исследование безопасности нового штамма проводили в КГКУ «Краевая ветеринарная лаборатория», идентифицировали новый штамм в ФГУП «ГосНИИгенетика», биомассу нарабатывали, лиофильно сушили и упаковывали в многослойный полимерный материал на базе многопрофильного биотехнологического предприятия ООО «Дом соусов»; изучение действия созданной пробиотической композиции в условиях *in vivo* проводили на базе ФБУН «МНИИЭМ им. Габричевского» Роспотребнадзора.

2.1. Объекты исследований

Объектами исследований служили:

- культуры пробиотических микроорганизмов из коллекции кафедры «Технологии молока и молочных продуктов» МГУПП:
 - *Lactobacillus acidophilus* АСТ-41 (ВКПМ В-9644);
 - *Lactobacillus 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);
 - новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-71;
 - новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72.

Bifidobacterium adolescentis BGV-11 (ВКПМ Ас-1742) – применяли для сравнения свойств новых штаммов бифидобактерий. Штамм *B. adolescentis* BGV-11 обладает выраженными антагонистическими свойствами против широкого спектра патогенных и гнилостных микроорганизмов, успешно прошел полный цикл клинических испытаний и рекомендован для использования в пищевой и фармацевтической промышленности [27].

- разработанная пробиотическая композиция и её биомасса;
- пастеризованный молочно-соковый напиток, обогащенный разработанной пробиотической композицией.

Построенная схема исследований (рисунок 2.1) предусматривает упорядоченное выполнение обозначенных пунктов.

2.2. Материалы и методы исследований

Микробиологические методы

Выделение новых штаммов

Новые штаммы были выделены из фекалий здоровых людей. Материал разводили в ряду десятикратных разведений в физрастворе и высевали на плотную питательную среду MRS (Merck KGaA, Германия) с добавлением антибиотика диклоксациллина (Sigma-Aldrich, США) и 0,05 % L-цистеина (Serva Electrophoresis GmbH, Германия).

Анаэробные условия создавали с помощью анаэропача «AnaeroPack» (Mitsubishi Gas Chemical Company, Япония), газогенераторов «GENbox anaer» (bioMérieux, Франция). Наличие анаэробных условий контролировали индикаторами анаэробности (Oxoid Ltd., Англия) (рисунок 2.2, 2.3) [15; 95; 201].

Чашки Петри с посевами культивировали в термостате ТСО-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ») при 37 ± 1 °С в течение 72 ± 2 часов.



Рисунок 2.1 – Схема проведения экспериментальных исследований

Получали индивидуальные колонии, готовили микроскопические препараты, окрашивали метиленовым синим и по Граму, проводили микроскопию (микроскоп Биомед 4, г. Санкт-Петербург) препаратов в иммерсионной системе с 900-кратным увеличением.



Рисунок 2.2 – Подготовка материалов для анаэробного культивирования пробиотических микроорганизмов с индикацией анаэробной атмосферы



Рисунок 2.3 – Создание анаэробных условий

Изучение динамики роста бифидобактерий

Для изучения динамики роста бифидобактерий пассировали исходные культуры бифидобактерий и культивировали в течение 18-20 ч при

температуре 37 °С. Культуры разводили в физрастворе до 1×10^6 КОЕ/см³ и вносили в MRS-бульон с 0,05 % L-цистеина, и культивировали 24 ч, при 37±1 °С. Количество клеток определяли путем посевов разведений на питательную среду MRS-агар (Merck KGaA, Германия), культивировали 24 ч, при 37±1 °С в анаэроостате (Mitsubishi Gas Chemical Company, Япония).

Одновременно определяли оптическую плотность культур во время развития, для этого использовали фотоколориметр КФК-3-01-«ЗОМЗ» (г. Сергиев Посад), активную кислотность измеряли с помощью рН-метра «рН-150МИ» с электродом «ЭСК-10605/7» (ООО НПО «Измерительная техника, г. Москва).

Исследование выживаемости бифидобактерий в желудочно-кишечном тракте

Эксперимент по оценке выживаемости в желудочно-кишечном тракте проводили путем культивирования изучаемого штамма бифидобактерий в высоком столбике питательной среды ГМК-2 (ООО «Биокомпас-С», г. Углич). Питательная среда была модифицирована для создания следующих характеристик:

- NaCl: 2 %, 4 %, 6,5 %;
- Фенол: 0,4 %;
- Желчь: 20 %, 40 %;
- рН: 5,5; 7,2; 8,3.

Концентрации хлорида натрия достигали солью ЧДА (ОАО «Михайловский Завод Химических Реактивов», г. Барнаул). Фенол навешивали (ОАО "СИНТЕЗ", Дзержинск). Кислотность устанавливали асептически стерильными растворами 2 % HCl и 5 % NaOH. Содержание желчи 20 % и 40 % достигали внесением отфильтрованной стерильной желчи крупного рогатого скота.

Стерильные питательные среды с различными добавками инокулировали 5 % свежими культурами бифидобактерий после 18-20 ч

культивирования при 37 ± 1 °С. Контролем служили посевы штаммов в питательную среду без добавок. Опытные и контрольные образцы культивировали в пробирках со средой, разлитой по 10 см^3 , в термостате при 37 ± 1 °С в течение 36 ± 2 ч.

Результаты активности роста культур оценивали визуально по образуемой мутности в сравнении с контрольными образцами.

Изучение антагонистической активности бифидобактерий

Антагонистическую активность бифидобактерий определяли методом развивающихся смешанных популяций в сравнении с ростом тест-культур в монокультуре. В качестве тест-микроорганизмов использовали *E. coli* O157:H7 и *S. aureus* 209-P, полученные из ФГУН «ГИСК им. Л. А. Тарасевича». Суточную культуру бифидобактерий 2-й генерации на полужидкой среде ГМК-2 нейтрализовали 5 %-см раствором NH_4OH до pH 7.0-7.2, после чего разводили физиологическим раствором до густоты 5 единиц по стандарту мутности ФГУН «ГИСК им. Л. А. Тарасевича». Свежеприготовленные (18-20-часовые) культуры тест-микроорганизмов 2-й или 3-й генерации смывали со скошенной плотной питательной среды физиологическим раствором и разводили до густоты 5 единиц по стандарту мутности. В пробирки с 9 см^3 полужидкой ГМК-2 вносили по 1 см^3 суспензии каждого тест-микроорганизма. Для контроля роста тест-микробов в монокультурах засеянные указанным способом пробирки инкубировали при температуре 37 ± 1 °С в течение $18\pm 0,5$ ч. В опытные пробирки, засеянные тест-микробами тем же способом, дополнительно вносили исследуемую чистую культуру бифидобактерий в объеме 1 см^3 . Подготовленные таким образом смешанные посевы (опыт) инкубировали при температуре 37 ± 1 °С в течение $18\pm 0,5$ ч. По окончании инкубации из опытных и контрольных пробирок готовили ряды последовательных десятикратных разведений в физиологическом растворе. Из разведений делали поверхностный посев на чашки Петри со средами. Для *E. coli* O157:H7 использовали среду Эндо, для

S. aureus 209-P манит-солевой агар (Merck KGaA, Германия). Посевы термостатировали при температуре 37 ± 1 °C в течение 18-24 ч, после чего учитывали число колоний тест-микробов в контрольных и опытных образцах и по их разности определяли антагонистическую активность исследуемых штаммов.

Изучение антагонистической активности продуктов метаболизма бифидобактерий

Пробиотические культуры выращивали на MRS-бульоне и на ГМК-2 в течение 18-24 ч, а тест-культуры *E. coli* O157:H7 и *S. aureus* 209-P выращивали на скошенной плотной агаризованной мясопептонной питательной среде в течение 18-20 ч при 37 ± 1 °C. Затем пробиотические культуры центрифугировали при 3500 об/мин 15 мин., освобождая от клеток, и нейтрализовали кислотность супернатанта (рисунок 2.4).

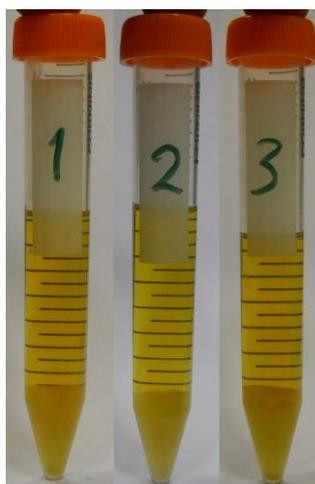


Рисунок 2.4 – получение супернатанта бифидобактерий на полужидкой питательной среде ГМК-2

Тест-культуры смывали с плотной питательной среды, разводили до 1×10^9 КОЕ/см³ по стандарту мутности ФГУН «ГИСК им. Л. А. Тарасевича». Суспензию тест-культуры разводили в физрастворе, и вносили в теплую агаризованную питательную среду с конечной концентрацией тест-культуры 1×10^6 КОЕ/см³. Питательную среду разливали по чашкам Петри, после затвердевания делали лунки $d=5$ мм. В лунки вносили супернатант

пробиотических культур с нейтрализацией кислотности и без, а также контроль. Чашки Петри выдерживали 30 мин при 4 ± 2 °С, затем 24 ч при 37 ± 1 °С. После чего учитывали результаты, измеряя радиус зоны лизиса [202].

Данные эксперименты проводили на базе Испытательного центра «Биотест» МГУПП.

Изучение безопасности нового штамма бифидобактерий

При исследовании штамма на патогенность субъектом исследования была лабораторная стерильная порода белых мышей. Исследование проведено на базе КГКУ «Краевая ветеринарная лаборатория» в г. Красноярск.

Изучение адгезионной способности

При исследовании адгезионной способности пробиотических бактерий использовали лабораторную линию CaCo-2 (ATCC HTB 37). Для проведения исследования выполняли следующие этапы:

1. Приготовление культуры CaCo-2.
2. Приготовление культур бактерий.
3. Культивирование монослоя CaCo-2 с пробиотическими бактериями.
4. Учет и оценка результатов.

Приготовление монослоя CaCo-2. При приготовлении монослоя CaCo-2 клеток использовали 6-ти луночные планшеты со специальной поверхностью для культивирования эукариотических клеток (Jet Biofil, США).

В лунки планшета вносили 2 мл среды, содержащей компоненты: DMEM, сыворотка эмбриональная бычья, пенициллин (ООО «БиолоТ», СПб), а также 0,5 мл культуры клеток CaCo-2, плавно перемешивали. Клетки культивировали 5-7 суток в CO₂-инкубаторе (MCO-15AC, Sanyo, Япония) при 37 °С, с 5 % CO₂. Полученный монослой контролировали подсчетом клеток в камере Горяева. Перед экспериментом среду удаляли и клетки промывали раствором Версена 0,02 % (ООО «БиолоТ», СПб).

Приготовление культуры бактерий. Готовили свежую культуру бактерий (18-20 ч культивирования). Культуру центрифугировали следующим образом: 20 мл культуры центрифугировали при 4000 об/мин, 15 мин., при 4 ± 1 °С (Eppendorf 5804, Германия). Затем полученный осадок клеток ресуспендировали в 2 мл физраствора. Концентрацию бактерий проверяли посевами на плотную MRS-среду.

Совместное культивирование CaCo-2 с культурой бактерий. В каждую лунку планшета вносили 2 мл среды (DMEM, сыворотка эмбриональная бычья), 1 мл культуры бактерий. Культивировали 1 ч при перемешивании при 37 ± 1 °С. Затем удаляли среду дозатором, отмывали физраствором дважды для удаления не прикрепившихся бактерий.

Учет результатов. Снятие монослоя со связанными бактериальными клетками проводили раствором Версена 0,02 % и трипсина 0,25 % в соотношении 3:1. Отбирали образцы по 1 мл.

Для определения адгезионных клеток бактерий производили посеvy на плотную MRS-среду. Также учитывали количество адгезионных клеток в камере Горяева [114]. Для этого добавляли раствор трипанового синего 0,4 % в образец адгезионных клеток бактерий с клетками CaCo-2. Количество адгезионных клеток на 1 мл подсчитывали с помощью формулы:

$$N = N_{25} \times 250 \times V_{\text{среды}}, \text{ где}$$

N – количество клеток в 1 мл среды;

N_{25} – среднее количество клеток, подсчитанное с помощью камеры Горяева;

$V_{\text{ср}}$ – объем среды, л.

Учет результатов в методе с использованием CaCo-2 клеток предполагает учет количества бактериальных клеток прикрепившихся к 1000 клеток линии CaCo-2. За высокий уровень адгезии принимают штаммы, клетки которых прикрепляются в количестве от 1010 до 3000, средний от 210 до 1000, низкий от 0 до 200. [122; 146; 200].

Изучение способности штаммов пробиотиков к снижению концентрации холестерина *in vitro*

Приготовление питательной среды с холестерином. Питательную среду с холестерином готовили на основе MRS-бульона по модифицированной методике M. Ziarno [213]. На один литр питательной среды добавляли:

- 0,75 г – холестерина (Panreac, Испания);
- 250 мл – Твин 80 (ООО «Лабтех», г. Москва);
- 0,5 г – L-цистеина (при изучении бифидобактерий).

Далее среду стерилизовали при стандартном режиме для среды MRS.

Культивирование. В питательную среду с холестерином добавляли 1 мл исследуемой культуры (1×10^9 КОЕ/см³), культивировали 24 ч при 37 ± 1 °С совместно с контрольными образцами. После культивирования содержимое пробирок центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4 ± 1 °С. В супернатанте исследовали по методу Златкиса-Зака концентрацию холестерина. Метод предусматривает образование цветного комплекса холестерина с хлоридом железа (III) в присутствии концентрированных серной и уксусной кислот [96].

Приготовление цветного реагента. Раствор цветного реагента готовили, растворяя 10 мл FeCl₃ в 100 %-ном CH₃COOH. Затем 2 мл раствора аккуратно вносили при перемешивании в 200 мл H₂SO₄ (конц.).

Определение концентрации холестерина. В 3,0 мл ледяной уксусной кислоты добавляли 0,1 мл пробы, перемешивали, не допуская образования пузырьков. Раствор охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность опытных проб против стерилизованной MRS-среды (холостая проба) при $\lambda = 560$ нм и длине оптического пути кюветы $l = 10$ мм. Стерилизованная среда MRS с холестерином и Твин 80 – нулевая точка.

Концентрацию холестерина D , % рассчитывали по формуле:

$$D = 100 - \frac{E_{on}}{E_{нул}} \times 100 \%, \text{ где}$$

D – снижение концентрации холестерина, %;

E_{on} – значение OD опытной пробы;

$E_{нул}$ – значение OD нулевой пробы [62].

Исследование сочетаемости пробиотических штаммов

Исследование сочетаемости штаммов в пробиотической композиции изучали в соответствии с МУК 4.2.2602-10. 4.2. «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. Методические указания», п.4.8.1. – Тест на антагонистическую активность методом отсроченного антагонизма.

Изучение действия созданной пробиотической композиции в условиях *in vivo*

Изучение действия созданной пробиотической композиции в условиях *in vivo* проводили на базе ФБУН «МНИИЭМ им. Габричевского». Испытания разработанной пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, проведены на 33 белых мышах SHK - линии обоего пола. Животные были доставлены из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, имеют Сертификат № 02891 от 04.11.2014 до 24.12.2014 и ветеринарное свидетельство 250№0610299 от 05.11.2014. Перед отправкой из филиала мыши карантинировались 30 дней.

Для исследования отбирали клинически здоровых белых мышей, с хорошей упитанностью, активных, подвижных, хорошо обволощенных, с нормальной окраской слизистых оболочек и оформленным стулом.

До начала исследований методом свободной выборки были отобраны 3 животных – животные до начала эксперимента (группа «Фон»). Животные присыплялись, обескровливались, вскрывались, был отделен кишечник. Сыворотку крови мышей передавали на биохимический анализ. Содержимое тонкого и толстого кишечника проанализировали по микробиологическим и

биохимическим показателям. Остальные животные были разделены на 3 группы: одна экспериментальная группа из 10 мышей («ГХД+К») и 2 контрольные группы по 10 мышей в каждой (рисунок 2.5).

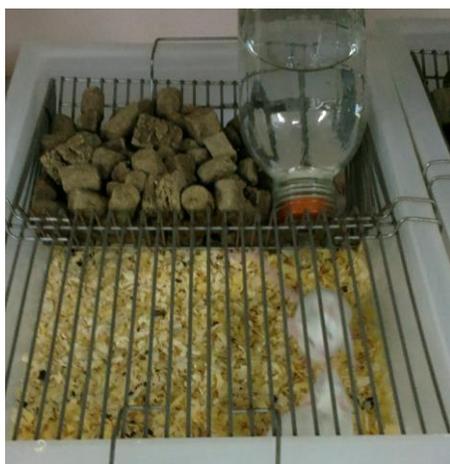


Рисунок 2.5 – три бокса с лабораторными мышами в ходе исследований

Животные сравниваемых групп подбирались методом свободной выборки по весу. Животные контрольной группы содержались на брикетированном корме производства ООО «Лабораторкорм». Комбикорм, предназначенный для лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков), имеет Сертификат соответствия № РОСС RU. ПР 98 Д00497 до 07.02.2016 г. Корм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам, изготовлен из высококачественных компонентов. Опытные животные получали брикетированный корм с повышенным содержанием холестерина 2% (AppliChem BioChemica, Германия) (гиперхолестериновая диета). Корм был составлен на основе корма для конвенционального содержания мелких грызунов, сбалансирован по белкам, жирам, аминокислотам, витаминам и микроэлементам (таблица 2.1). Гиперхолестериновая диета сбалансирована по аминокислотному составу, минеральным веществам, витаминам и дополнительно содержит холестерин. Животные получали пробиотическую композицию перорально в течение 21 дня. Пробиотическая суспензия давалась животным в разведенном виде (стерильной водой) вместо воды (в поилках) – замена раствора пробиотической композиции осуществлялась 2 раза в сутки утром и вечером (рисунок 2.6).

Таблица 2.1 – Состав гиперхолестериновой диеты (на 100г)

Наименование	Показатель	Наименование	Показатель
Обменная энергия, ккал/100г	300	Витамин В4, мг	1500
Сырой протеин не менее, %	19	Витамин В5, мг	72
Сырой жир не менее, %	4	Витамин В6, мг	16
Сырая клетчатка не более, %	4	Витамин Вс, мг	36
Зола не более, %	7	Витамин В12, мг	0,07
Кальций не менее, %	0,9	Витамин С, мг	63
Фосфор не менее, %	0,6	Витамин Н, мг	0,3
Лизин не менее, %	1.2	Марганец, мг	51
Метионин-цистин не менее,%	0,7	Цинк, мг	48
Витамин А, МЕ/кг тыс.	25	Железо, мг	90
Витамин Е, МЕ/кг	112	Медь, мг	8
Витамин Д3, МЕ/кг тыс.	1.38	Йод, мг	1,1
Витамин К3, мг	510	Кобальт, мг	1
Витамин В1, мг	42	Селен, мг	0,15
Витамин В2, мг	18	Холестерин,%	2
Витамин В3, мг	70		



А)



Б)

Рисунок 2.6 – Примеры условий проведения эксперимента по изучению действия созданной пробиотической композиции в условиях *in vivo*: А) содержание и поение; Б) взвешивание животных;

Хранение при температуре 4 ± 2 °С. Раствор суспензии хранился не более 2 суток, затем готовился новый.

В ходе всего эксперимента проводилось динамическое наблюдение за состоянием животных с фиксацией следующих показателей:

1. состояние шерсти;
2. активность животного;
3. окраска слизистых оболочек;
4. масса тела;
5. характер стула;
6. количество съеденного корма;
7. объем выпитой жидкости.

После окончания исследований животных присыпляли, обескровливали, вскрывали, отделяли кишечник. Сыворотку крови мышей отдавали на биохимический анализ. Содержимое тонкого и толстого кишечника анализировали по микробиологическим и биохимическим показателям.

Группа «СД» (контрольная) получала брикетированный корм производства ООО «Лабораторкорм», предназначенный для лабораторных животных, и воду в течение 21 дня.

Группа «ГХД» (контрольная) содержалась на гиперхолестериновой диете, т.е. получала брикетированный корм с повышенным содержанием холестерина 2 % и воду в течение 21 дня.

Группа «ГХД+Пр» (опытная) содержалась на гиперхолестериновой диете (ГХД), т.е. получала брикетированный корм с повышенным содержанием холестерина 2 %, и раствор пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина. Композиция включала *Bifidobacterium bifidum* GG-72, *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44, *Lactobacillus fermentum* LFM-2, *Lactobacillus plantarum* ГВИ-1, *Lactobacillus rhamnosus*

LC-52GV. Концентрация бифидобактерий в суспензии составляла 10^9 КОЕ/мл, лактобактерий – 10^8 КОЕ/мл.

Генетические методы

Видовая идентификация нового штамма бифидобактерий

Культуру рассевали до отдельной колонии и получения биомассы для анализа 16S рРНК. Выделяли ДНК в соответствии с коммерческим набором (Bio-Rad, США). Для наработки гена, кодирующего 16S рРНК проводили выбор праймеров и режимов ПЦР [112; 132; 201]. Были выбраны консервативные праймеры:

8f – aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r – ccg tca att cct ttr agt tt

1492r – ggt tac cct tgt tac gac tt

с режимами реакции:

1. 95 °С -3 мин.

2. 35 циклов

а. 95 °С -30сек.

б. 57 °С -30 сек.

с. 72 °С -1мин. 30 сек.

3. 72 °С -5 мин.

Электрофорез продуктов ПЦР был проведен при следующих условиях: 1,0 % агарозный гель, напряженность электрического поля 5 В/см [132].

Секвенирование последовательности гена 16S рРНК проведено на автоматическом секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США). Выравнивали полученные последовательности с последовательностями ближайших видов базы GenBank. Секвенсы обрабатывали при помощи программы сайта Ribosomal Database Project II, определяли родство микроорганизмов, строили филогенетические деревья [166; 175].

Выработка биомассы в производственных условиях

Получение биомассы, сушку и упаковку проводили на базе ООО «Дом

соусов». Культивирование проводили на ферментере «Биор-01» (ОАО «ОКБ ТБМ», г. Кириши) (рисунок 2.7).

Полученную в ходе ферментации культуральную жидкость сепарировали на сепараторе УКВ-202К-01 (ОАО «Уралхиммаш», г. Екатеринбург) при 8000 об/мин, диаметр ротора 200 мм. Затем биомассу смешивали с криозащитной средой для подготовки к сублимационной сушке. В состав криозащитной среды: желатин – 5 %; сахароза – 10 %; глютомат натрия – 0,5 %.

Сублимационную сушку проводили на установке LZ-45 (Frigeria г. Колин, Чехия) (рисунок 2.8). На первом этапе смешанную с защитной средой биомассу равномерно распределяли стерильным шпателем на поддонах из нержавеющей стали. Помещали поддоны с биомассой в морозильную камеру NZ 280/75А (Frigeria г. Колин, Чехия) с температурой минус 40 °С, замораживали в течение 4-6 часов. На втором этапе помещали поддоны с замороженной биомассой в сублимационную сушку. Сушка проходила при вакууме от 0,5 Па до 0,8 Па в течение 32 часов, температура в это время равномерно возрастала от минус 40 °С до 25 °С.



Рисунок 2.7 – Ферментер «Биор-01», 100 л (ОАО «ОКБ ТБМ», г. Кириши)

Исследование показателей качества пробиотической композиции во время хранения

Лиофильно высушенную биомассу штаммов, снижающих концентрацию холестерина, смешивали в равных пропорциях, упаковывали в полимерный многослойный материал и помещали на хранение при температуре $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и минус $18\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. В ходе хранения биомассы изучали показатели качества: физико-химические, микробиологические, органолептические и способность к снижению концентрации холестерина.



А)



Б)

Рисунок 2.8 – А) морозильная камера NZ 280 с температурой минус $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,
Б) сублимационная сушка LZ-45

Контроль количества бифидобактерий проводили посевами на плотную питательную среду MRS с диклоксациллином и 0,05 % L-цистеином. Количество лактобактерий контролировали посевами на плотную среду MRS, а также по ГОСТ 10444.11. В работе опирались на МУК 4.2. 1847-0 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и

условий хранения пищевых продуктов». Массовую долю влаги в сухой биомассе определяли по ГОСТ 8764.

Изучение возможных путей применения пробиотической композиции в технологии молочной продукции

При выработке продукта контролировали несколько показателей. Активную кислотность определяли по ГОСТ 26.781-85 «Молоко. Метод измерения рН». Титруемую кислотность определяли по ГОСТ 3524-92. Количество лактобактерий контролировали в соответствии с ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов». Количество бифидобактерий определяли по МУК 4.2.999-00 «Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах питания». Органолептические показатели пастеризованного молочно-сокового напитка определяли органолептически с применением метода сенсорного анализа. Были использованы шкала, утвержденная Американской Ассоциацией по молочным продуктам (таблица 2.2), и построение профилограмм по полученным результатам. Срок годности обогащенного пастеризованного молочно-сокового продукта определяли по ГОСТ Р 52687-2006.

Таблица 2.2 – Шкала сенсорной оценки

Параметр	Балл
Вкус и аромат	10
Консистенция	5
Внешний вид	5
Всего	20

Математические методы

Математическую обработку полученных данных по результатам экспериментов в 3-5-кратной повторности проводили с использованием компьютерных программ Statistika-10.0, Microsoft Excel 2007.

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ. ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР

Одно из приоритетных направлений развития биотехнологии включает развитие пробиотиков и функциональных продуктов питания. Выделение и изучение новых штаммов позволяет расширять спектр действия и эффективность пробиотических добавок и функциональных продуктов. По этой причине нами были проведены исследования новых выделенных штаммов бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* GG-71, *Bifidobacterium bifidum* GG-72, которые проводили в сравнении с коллекционным штаммом *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11, прошедшим клинические испытания.

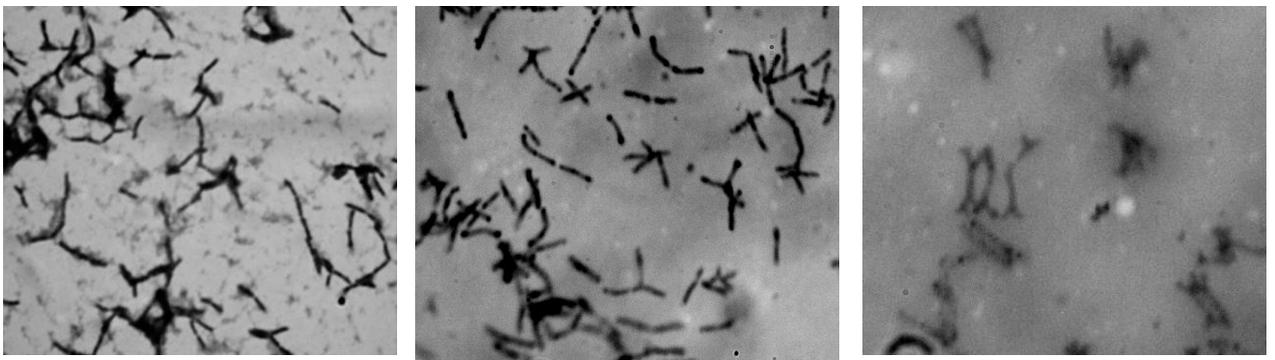
3.1. Изучение культурально-морфологических, тинкториальных характеристик и динамики развития новых штаммов бифидобактерий

Новые штаммы *Bifidobacterium bifidum* GG-71 и *Bifidobacterium bifidum* GG-72 были выделены из фекалий здоровых людей, не подвергались генетическому модифицированию, носят природный характер и соответствуют микроорганизмам группы GRAS. Более того данные штаммы можно отнести к группе микроорганизмов, доказавших свою безопасность за долгие годы их применения в пищевой промышленности по номенклатуре IDF (International Dairy Federation) и EFFCA (European Food & Feed Cultures Association).

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 *Bifidobacterium bifidum* GG-71, *Bifidobacterium bifidum* GG-72 имели основные для соответствующего рода культурально-морфологические и тинкториальные характеристики. Определен характер роста на полужидкой питательной среде (рисунок 3.1, 3.2).

Полученные данные позволяют заключить, что штаммы *Bifidobacterium bifidum* GG-71, *Bifidobacterium bifidum* GG-72 обладают типичными для *Bifidobacterium bifidum* 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 и мелкие колонии (от 1 мм до 3 мм) молочно-белого цвета (рисунок 3.3), слегка тянущейся консистенции с характерным уксусно-кисломолочным запахом.

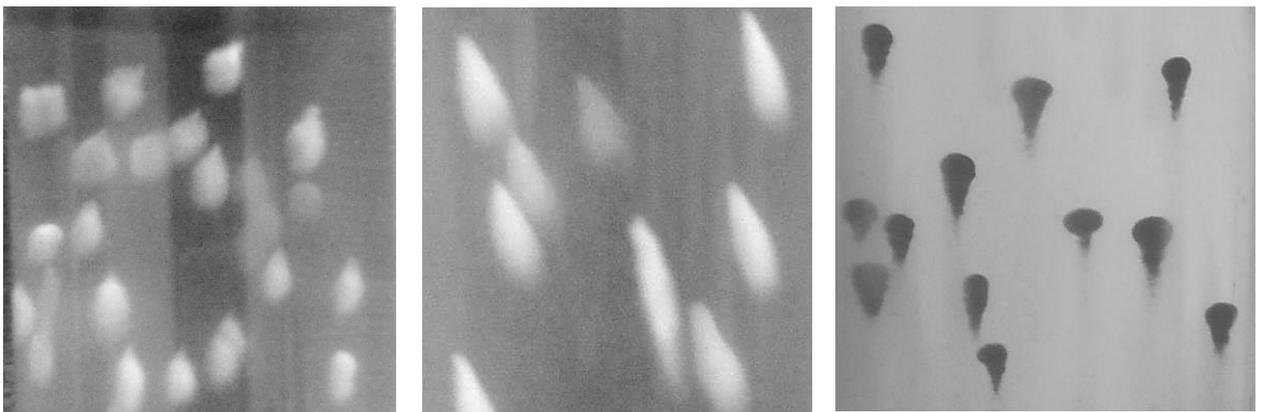


B. bifidum GG-71

B. bifidum GG-72

B. adolescentis BGV-11

Рисунок 3.1 – Микроскопия штаммов бифидобактерий (окраска метиленовым синим, увеличение 900×, световая микроскопия)



B. bifidum GG-71

B. bifidum GG-72

B. adolescentis BGV-11

Рисунок 3.2 – Колонии штаммов бифидобактерий на полужидкой тиогликолевой питательной среде

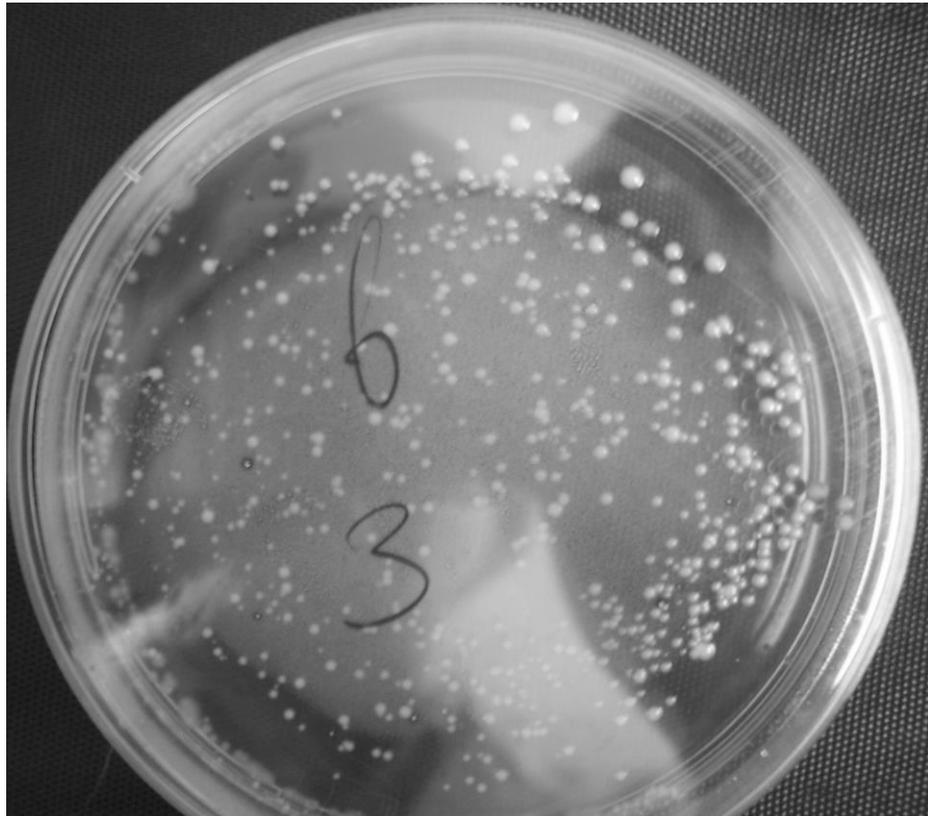


Рисунок 3.3 – Колонии *B. bifidum* GG-72 на агаризованной среде MRS

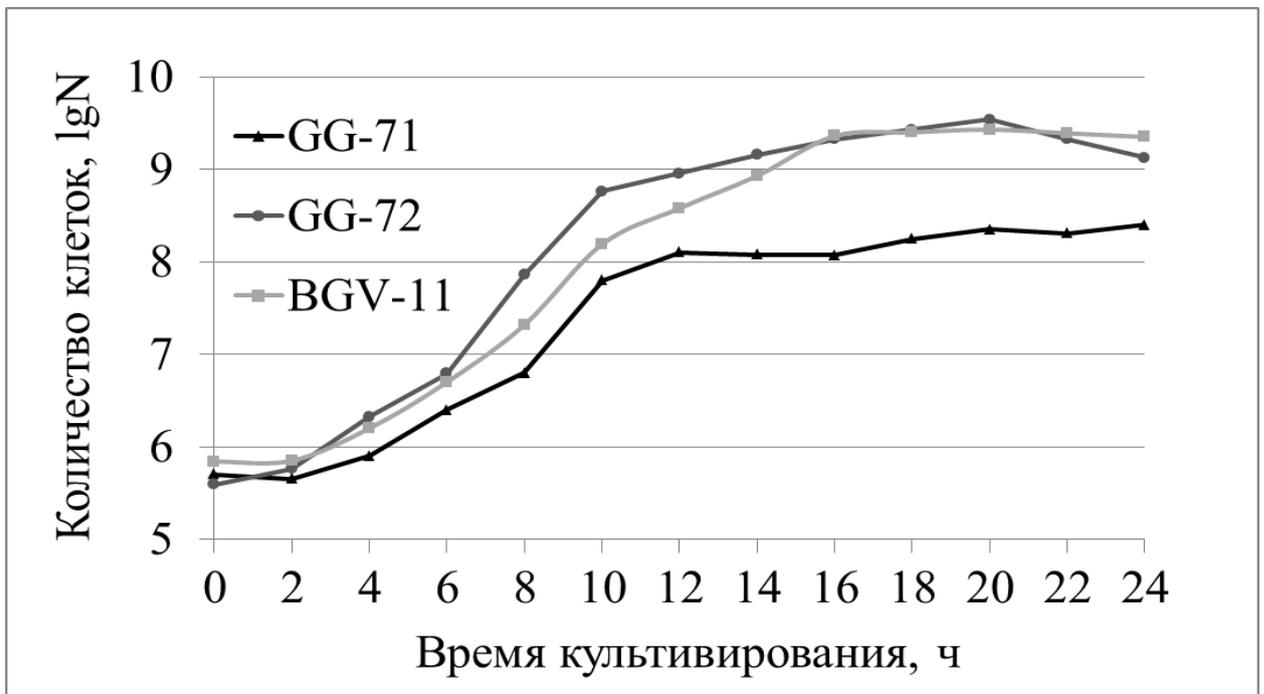


Рисунок 3.4 – Динамика изменения количества клеток, изучаемых штаммов бифидобактерий (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)

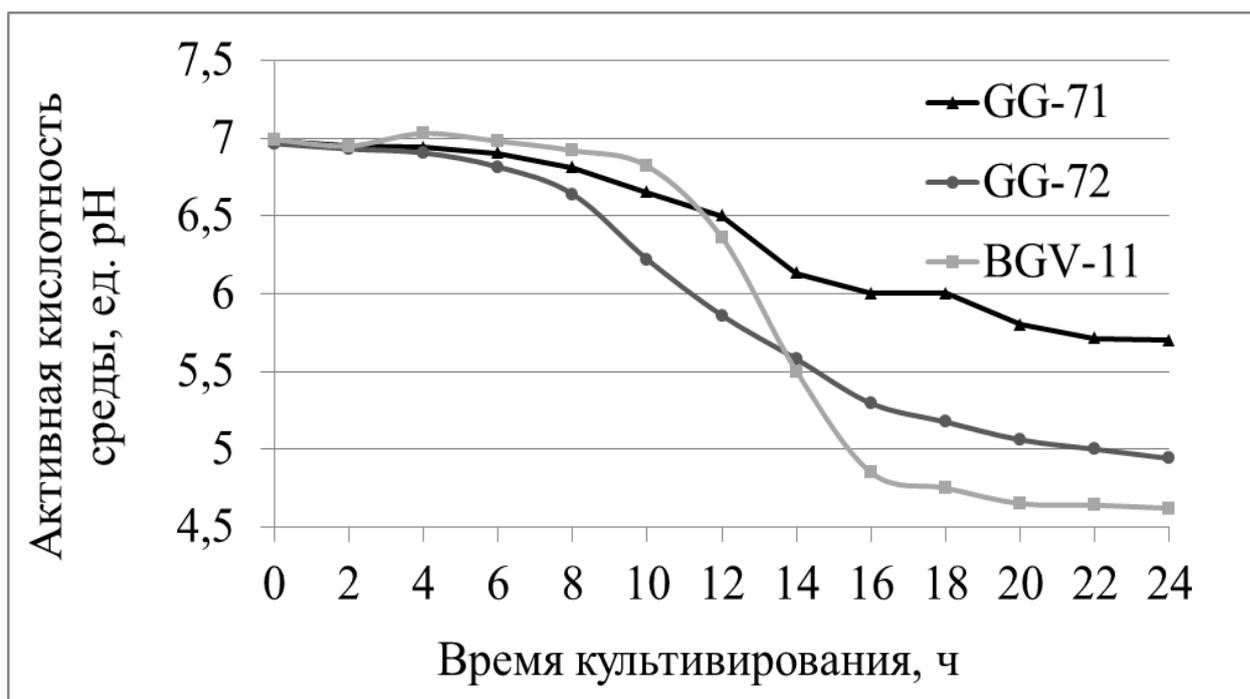


Рисунок 3.5 – Динамика изменения активной кислотности среды при культивировании штаммов бифидобактерий

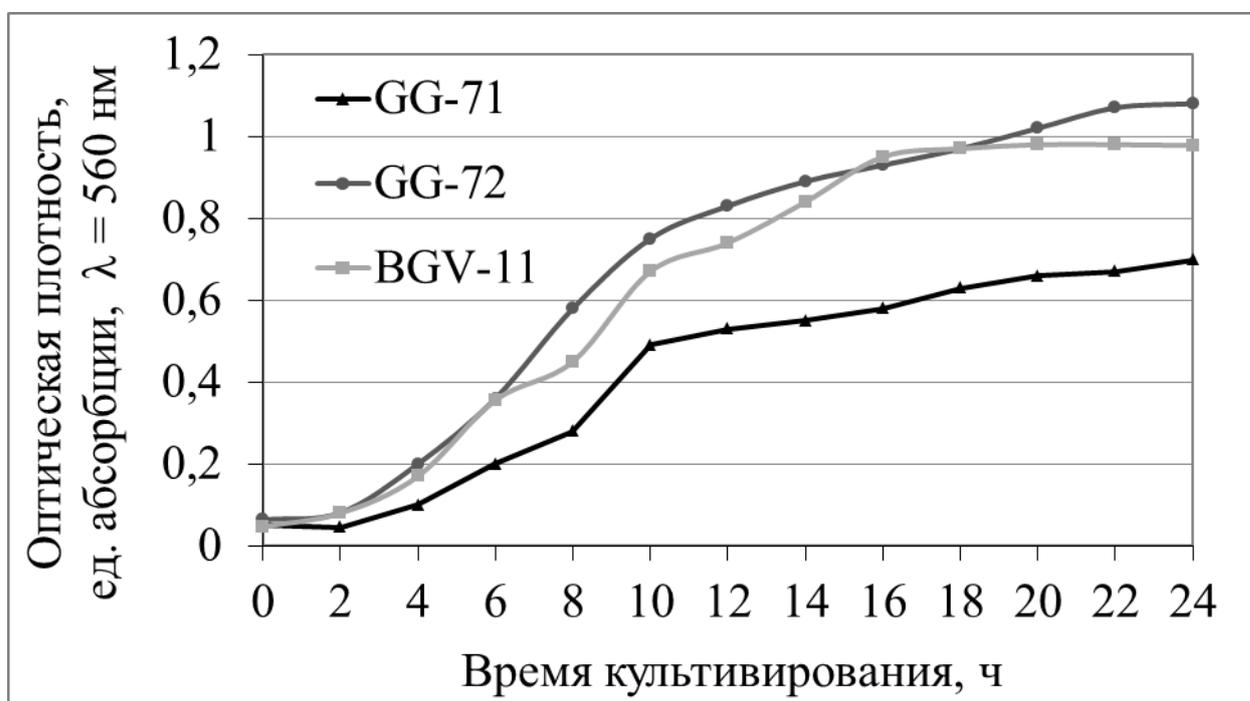


Рисунок 3.6 – Динамика изменения оптической плотности среды при культивировании штаммов бифидобактерий



Рисунок 3.7 – Пример роста, изучаемых культур на среде MRS в виде увеличивающейся мутности (слева направо: *B. adolescentis* BGV-11, *B. bifidum* GG-72, *B. bifidum* GG-71)

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

Изучение динамики роста проводили на среде MRS в течение 24 часов. По результатам изучения динамики роста, изменения pH среды и оптической плотности были построены соответствующие графики (рисунок 3.4, 3.5, 3.6, 3.7).

В ходе культивирования на среде MRS новые штаммы достигали следующего количества клеток:

B. adolescentis BGV-11 – $2,2 \times 10^9$ КОЕ/см³;

B. bifidum GG-71 – $7,1 \times 10^8$ КОЕ/см³;

B. bifidum GG-72 – $1,5 \times 10^9$ КОЕ/см³.

Динамика увеличения численности клеток была сходна у штаммов *B. bifidum* GG-72 и *B. bifidum* BGV-11. Штамм *B. bifidum* GG-71 существенно отставал в темпах роста и достигал максимальной концентрации $7,1 \times 10^8$ КОЕ/см³ только за 36-48 ч, в то время как *B. bifidum* GG-72 достигал большего значения $1,5 \times 10^9$ КОЕ/см³ за 18-24 ч.

Наибольшее снижение активной кислотности питательной среды к 24 ч культивирования проявил штамм *B. adolescentis* BGV-11 – 4,62 ед.; чуть

меньшую кислотообразующую активность проявил штамм *B. bifidum* GG-72 – 4,94 ед. Штамм *B. bifidum* GG-71 снизил активную кислотность среды только до 5,7 ед. и не совершил к этому времени выход на стационарную фазу роста.

Штаммы *B. bifidum* GG-71, *B. bifidum* GG-72 проявляют обычную для бифидобактерий способность понижать кислотность среды, но не на таком высоком уровне, как довольно сильный и хорошо зарекомендовавший себя штамм *B. adolescentis* BGV-11.

Полученные данные динамики роста способствуют контролируемому процессу получения биомассы изучаемых культур в ферментере.

3.2. Исследование функционально-технологических свойств новых штаммов бифидобактерий

Одними из важных свойств для практического применения пробиотических микроорганизмов являются функционально-технологические свойства. Определение функционально-технологических показателей новых штаммов, косвенно характеризующих выживаемость клеток в желудочно-кишечном тракте, проводили в сравнении с коллекционным штаммом *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11 (таблица 3.1).

Вновь выделенные штаммы *B. bifidum* GG-71, *B. bifidum* GG-72 хорошо 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

Таблица 3.1 – 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	+	±	–	±	±	±	±	+	+

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 и патогенных микроорганизмов, а также возбудителей порчи продуктов питания.

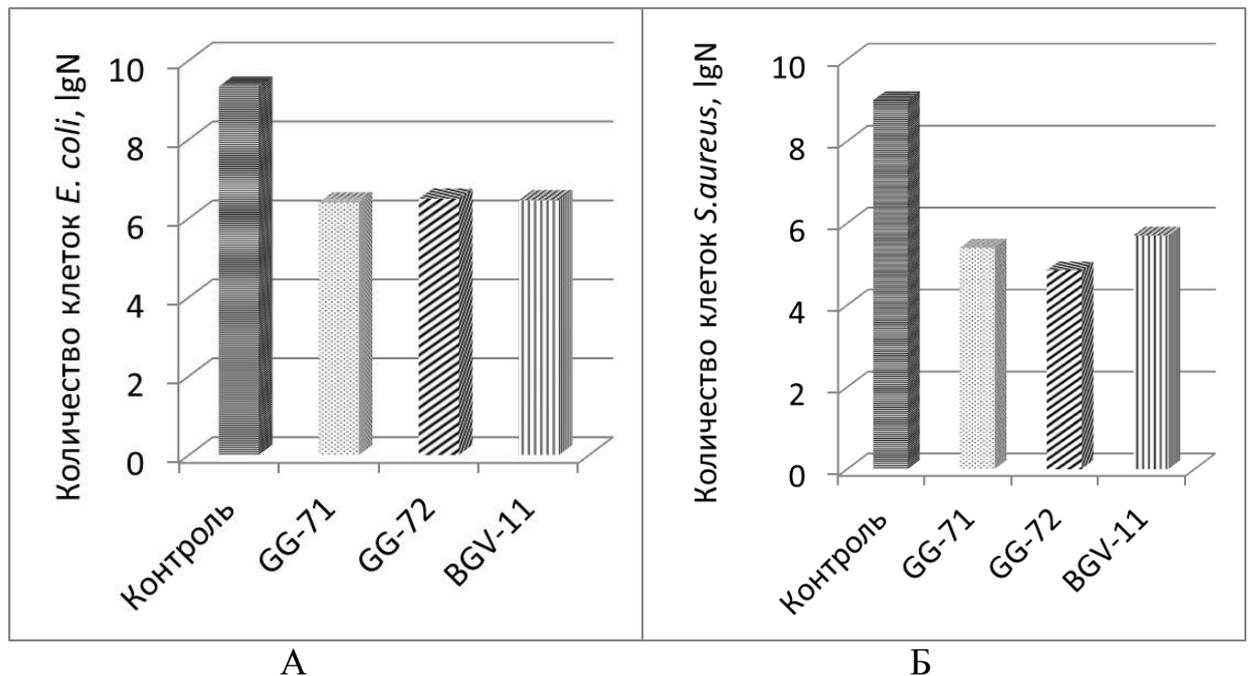


Рисунок 3.8 – Антагонистическая активность штаммов

B. bifidum GG-71 и *B. bifidum* GG-72, *B. adolescentis* BGV-11

по отношению к: а) *E. coli* O157:H7; б) *S. aureus* 209-P;

(N- количество клеток бактерий, КОЕ/см³; контроль – чистая культура

E. coli O157:H7 или *S. aureus* 209-P)

Полученные результаты исследований антагонистической активности методом совместного культивирования (рисунок 3.8 А) свидетельствуют о проявлении выраженного антагонизма изученных штаммов по отношению к тест-культуре *Escherichia coli* O157:H7. Рост тест-культуры *E. coli* O157:H7 снижался при совместном культивировании с штаммами бифидобактерий следующим образом:

<i>B. bifidum</i> GG-71 – $8,7 \times 10^2$ КОЕ/см ³	}	снижение роста тест-культуры <i>E. coli</i> O157:H7
<i>B. bifidum</i> GG-72 – $6,9 \times 10^2$ КОЕ/см ³		
<i>B. adolescentis</i> BGV-11 – $7,6 \times 10^2$ КОЕ/см ³		

То есть, было показано, что подавление роста тест-культуры *E. coli* O157:H7 для всех штаммов было одинаково и приближалось к уменьшению количества тест-культуры *E. coli* O157:H7 в 1000 раз. Следует отметить, что новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 обладает таким же выраженным действием на *Escherichia coli* O157, как и штамм *Bifidobacterium adolescentis* BGV-11, терапевтическое действие которого ранее подтверждено клиническими испытаниями на животных и людях.

Получены результаты совместного культивирования изучаемых штаммов бифидобактерий с патогенной тест-культурой *Staphylococcus aureus* 209-Р (рисунок 3.8 Б). Подавление штаммами роста *Staphylococcus aureus* 209-Р стабильно несколько различалось и было следующим для штаммов:

<i>B. bifidum</i> GG-71 – $4,0 \times 10^3$ КОЕ/см ³	}	снижение роста тест-культуры <i>S. aureus</i> 209-Р
<i>B. bifidum</i> GG-72 – $1,4 \times 10^4$ КОЕ/см ³		
<i>B. adolescentis</i> BGV-11 – $2,0 \times 10^3$ КОЕ/см ³		

В данном случае можно говорить о более выраженной антагонистической активности штамма *B. bifidum* GG-72 – под его воздействием наблюдали снижение количества *Staphylococcus aureus* 209-Р более чем на 4 порядка: $1,4 \times 10^4$ КОЕ/см³, в то время как другие два штамма бифидобактерий снижали количество патогенного тест-микроорганизма более чем на 3 порядка: $4,0 \times 10^3$ КОЕ/см³ – *B. bifidum* GG-71; *B. adolescentis* BGV-11 – $2,0 \times 10^3$ КОЕ/см³.

Антагонистическая активность новых штаммов бифидобактерий была также подтверждена методом лунок с и без нейтрализации супернатанта (таблица 3.2, 3.3).

Показано, что супернатанты с нейтрализованной кислотностью проявляли антагонистическое действие на тест-культуры. Зоны

ингибирования роста тест-культур супернатантом с нейтральной кислотностью у всех штаммов сходна и различается в пределах погрешностей, что может указывать на сходные механизмы антибиотической активности.

Таблица 3.2 – Зона ингибирования роста тест-микроорганизмов супернатантом культуральной жидкости штаммов бифидобактерий без нейтрализации супернатанта

Штамм	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>B. bifidum</i> GG-71	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1
<i>B. bifidum</i> GG-72	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1
<i>B. adolescentis</i> BGV-11	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1

Таблица 3.3 – Зона ингибирования роста тест-микроорганизмов супернатантом культуральной жидкости штаммов бифидобактерий с нейтрализацией кислотности супернатанта

Штамм	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>B. bifidum</i> GG-71	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
<i>B. bifidum</i> GG-72	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
<i>B. adolescentis</i> BGV-11	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1

Такой эффект позволяет сделать заключение о способности к синтезу антибиотико-подобных веществ, исследуемыми пробиотическими микроорганизмами, что увеличивает ценность их прикладного использования.

Таким образом, были изучены антагонистические свойства штаммов *B. bifidum* GG-71, *B. bifidum* GG-72 в сравнении с хорошо изученным штаммом *B. adolescentis* BGV-11.

Антагонистическая активность изучаемых штаммов по отношению к *E. coli* O157 была сходной, а на *S. aureus* 209-P наиболее сильное влияние оказывал штамм *B. bifidum* GG-72.

В соответствии с вышепредставленными данными, штаммы *B. bifidum* GG-71, *B. bifidum* GG-72 проявляют достаточно высокую устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов, которые могут влиять на штаммы в ходе биотехнологии и при прохождении пробиотических клеток через желудочно-кишечный тракт организма человека, а также обладают выраженной антагонистической активностью к тест-культурам *E. coli* O157 и *S. aureus* 209-P.

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.

По результатам исследований функционально-технологических свойств новых штаммов *B. bifidum* GG-71, *B. bifidum* GG-72 в сравнении с коллекционным и хорошо изученным штаммом *B. adolescentis* BGV-11, принято решение отбраковки штамма *B. bifidum* GG-71 и продолжении исследований видовой принадлежности штамма *B. bifidum* GG-72 с применением генетических методов.

3.3. Генетическая идентификация штаммов *B. bifidum* GG-72

Генетическая идентификация была осуществлена на базе ФГУП «ГосНИИгенетика». Проведена амплификация последовательности гена, кодирующего 16S рРНК с помощью консервативных праймеров в ходе ПЦР. Вариабельные участки гена 16S рРНК секвенированы, получена их следующая собранная нуклеотидная последовательность для исследуемого штамма:

```
GAACCCCCCACCACCCTCGCCCCACGCGGTGAGTAATGCGTGACCGAC
CTGCCCCATGCTCCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGA
TGTCTCCACATGATCGCATGTGATATGTGGGAAAGATCSTATCGCGCGT
GGGATGGGGTTCGCGTCSTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGG
```

GACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
 CCGCACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGG
 AGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTGTGGGAGCAAGCCTTCGGGTG
 AGTGTACSTTTCCGAATAAGCGCCGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGATCTTATTCGGGCGTAA
 AGGGCTGGTAGGCGGCTCGTNGCCGTNCGGTGTGAAAGTCCATCGCTT
 AACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTGCGGTAAGGGA

Первичный скрининг по базе данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемый штамм принадлежит к указанным ниже систематическим группам (таблица 3.4). Установлено, что гомология с видом *Bifidobacterium bifidum* составляет 98 %.

Последовательности были выравнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank.

Результаты обработки нуклеотидных последовательностей при помощи компьютерной программы, находящейся на сайте Ribosomal Database Project II, предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев, позволили представить данные в таблице 3.5 и на рисунке 3.9 [175]. Идентифицируемый штамм обозначен как «uknown».

Таблица 3.4 – Принадлежность к систематическим группам исследуемого штамма *B. bifidum* GG-72.

Таксон	Название
домен	<i>Bacteria</i>
отдел	<i>Firmicutes</i>
тип	<i>Actinobacteria</i>
класс	<i>Actinobacteria</i>
подкласс	<i>Actinobacteridae</i>
порядок	<i>Bifidobacteriales</i>
семейство	<i>Bifidobacteriaceae</i>
род	<i>Bifidobacterium</i>

Таблица 3.5 – Результаты обработки нуклеотидных последовательностей программой сайта Ribosomal Database Project II

S000086360	0,938	0,71	1296	<i>Bifidobacterium scardovii</i> (T); CCUG 13008;
S000381784	0,95	0,69	1429	<i>Bifidobacterium breve</i> (T); ATCC 15700; AB006658;
S000394076	0,938	0,666	1346	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> (T); ATCC27539;
S000397967	0,952	0,697	1415	<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> (T); P3-14;
S000414117	0,935	0,672	1412	<i>Bifidobacterium longum</i> (T); ATCC 15697; D86184;
S000414120	0,938	0,616	1413	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (T); JCM 1200;
S000414123	0,94	0,668	1398	<i>Bifidobacterium boum</i> (T); JCM 1211; D86190;
S000414231	0,948	0,677	1420	<i>Bifidobacterium subtile</i> (T); DSM 20096; D89378;
<u>S000437368</u>	<u>0,988</u>	<u>0,845</u>	<u>1379</u>	<u><i>Bifidobacterium bifidum</i> (T); KCTC 3202; U25952;</u>
S000616641	0,929	0,664	1354	<i>Bifidobacterium tsurumiense</i> (T); OVB115;

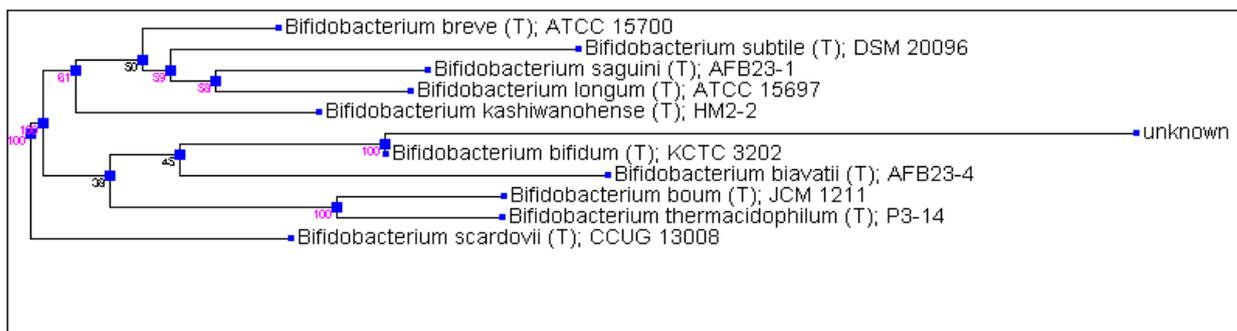


Рисунок 3.9 – Филогенетическое древо штамма *B. bifidum* GG-72 (обозначен «unknown») с гомологичными штаммами бифидобактерий

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97 %. По данному критерию исследуемый штамм можно отнести к виду *Bifidobacterium bifidum*. Отнесение штамма *B. bifidum* 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

микробиоты 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 корм белым мышам 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 (приложение 2).

Таким образом, новый штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 обладает ценными свойствами для пробиотиков, на основании чего было принято решение о его депонировании. Штамм *Bifidobacterium bifidum* GG-72 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 (приложение 3, 4).

3.4. Исследование адгезии штаммов бифидобактерий и лактобактерий

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 (рисунок 3.10). Были получены данные о количестве клеток изучаемых штаммов пробиотиков, способных к адгезии к модельным клеткам эпителия кишечника CaCo-2 (рисунок 3.11).

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, мене 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 (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Уровень адгезии исследуемых штаммов.

Вид	Адгезия клеток бактерий / 1000 клеток CaCo-2	Уровень адгезии
<i>B. bifidum</i> GG-72	2400 ± 77	Высокий
<i>B. adolescentis</i> BGV-11	1764 ± 81	Высокий
<i>L. rhamnosus</i> LC-52GV	2230 ± 61	Высокий
<i>L. plantarum</i> ГВИ-1	749 ± 70	Средний
<i>L. fermentum</i> LFM-2	840 ± 12	Средний
<i>L. acidophilus</i> АСТ-41	519 ± 35	Средний
<i>L. acidophilus</i> АСТ-44	915 ± 57	Средний
<i>L. acidophilus</i> 887	470 ± 22	Средний

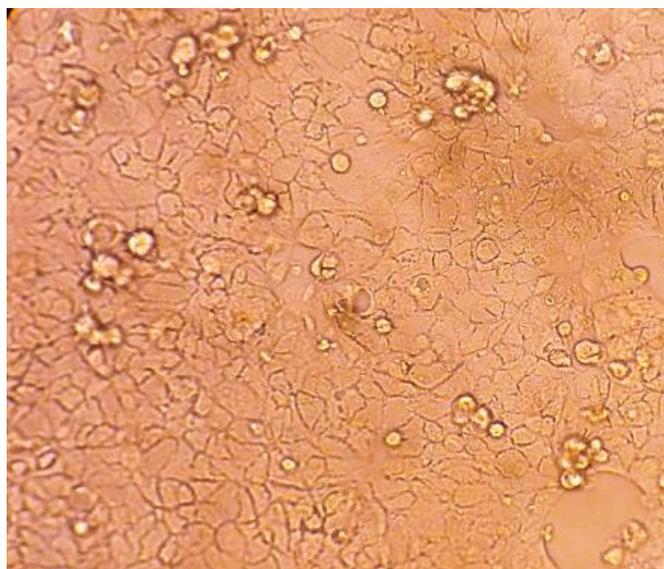


Рисунок 3.10 – Клетки CaCo-2, увеличение 330×, световая микроскопия

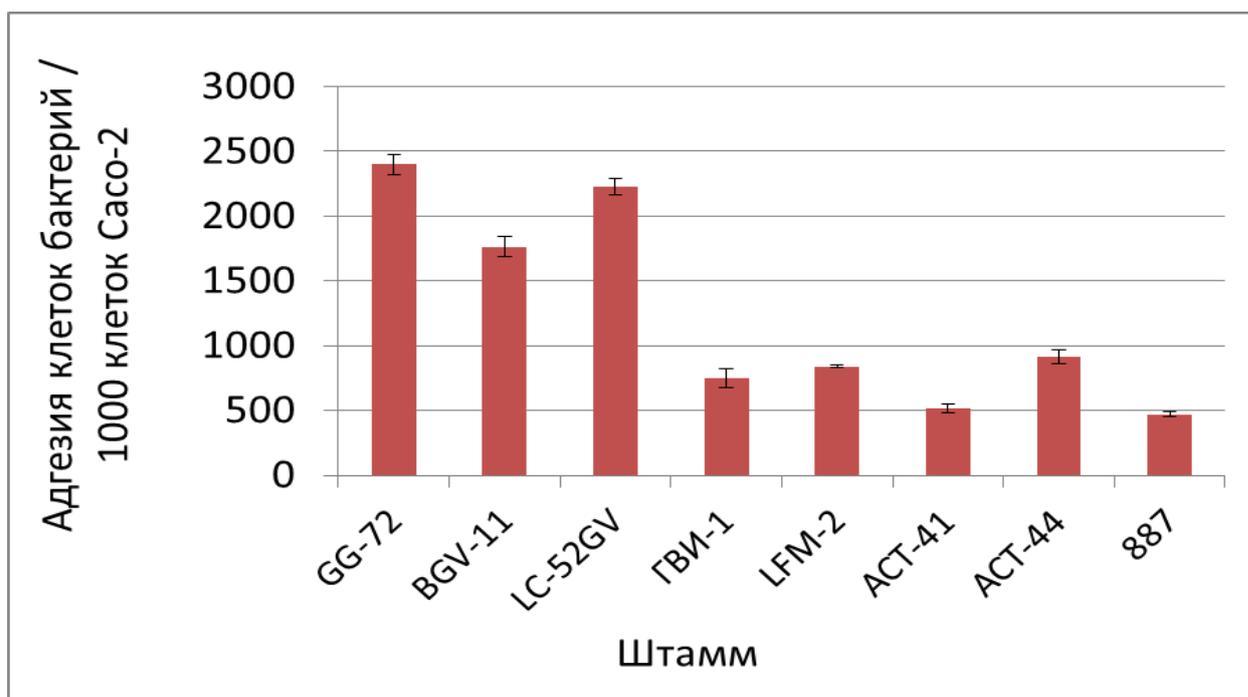


Рисунок 3.11 – Адгезия исследуемых пробиотических штаммов на лабораторной линии эпителиальных клеток CaCo-2

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.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ К СНИЖЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА

4.1. Исследование способности штаммов пробиотических бактерий разных родов к снижению концентрации холестерина в условиях *in vitro*

Перед проведением экспериментов по изучению способности изучаемых штаммов пробиотиков снижать концентрацию холестерина был проверен характер их роста в среде культивирования, содержащей холестерин с эмульгирующим агентом, обработанные данные были оформлены в виде диаграммы (рисунок 4.1). На диаграмме видно, что холестерин в сочетании с Твин-80 у всех штаммов увеличивает концентрацию клеток от 1,2 раза (*B. adolescentis* BGV-11) до 11,2 раза (*L. rhamnosus* LC-52GV). В среднем увеличение роста у всех изученных штаммов составило 3,8 раза. Новый выделенный нами штамм *B. bifidum* GG-72 увеличил рост в 2,2 раза в присутствии холестерина и Твин-80.

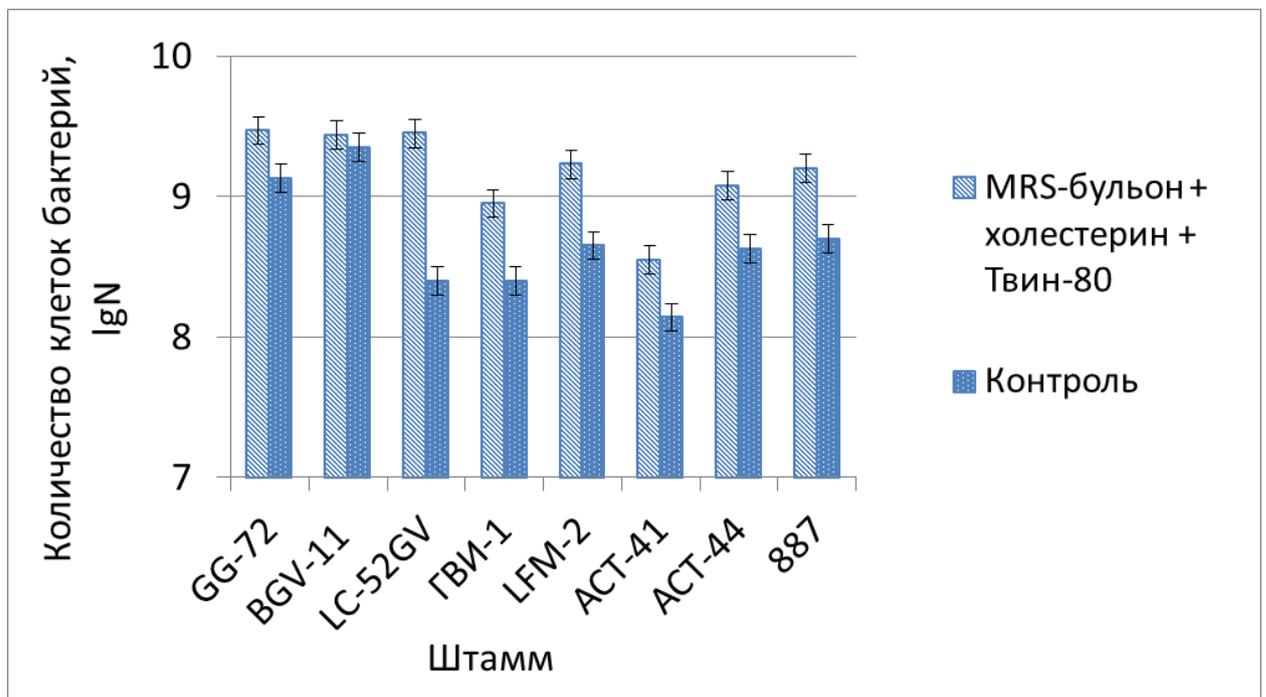


Рисунок 4.1 – Влияние компонентов среды на численность клеток пробиотических штаммов (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)

Анализ полученных данных позволил сделать заключение об отсутствии отрицательного влияния компонентов опытной среды на численность клеток изучаемых культур.

Результаты исследований показали наличие разной способности к снижению концентрации холестерина у изученных штаммов (рисунок 4.2, 4.3). Выявлено, что наибольшей способностью к снижению концентрации холестерина в данных условиях обладали штаммы: *B. adolescentis* BGV-11 – $33,6 \pm 0,9$ %, *B. bifidum* GG-72 – $37,6 \pm 0,38$ %; *L. acidophilus* АСТ-44 – $16,0 \pm 0,41$ %, *L. fermentum* LFM-2 – $29,6 \pm 0,73$ %; *L. plantarum* ГВИ-1 – $30,6 \pm 1,4$ %, *L. rhamnosus* LC-52GV $27,4 \pm 2,1$ %; наименьшей *L. acidophilus* АСТ-41 – $10,6 \pm 2$ %, *L. acidophilus* 887 – $13,4 \pm 0,6$ %.

Полученные результаты не противоречат литературным данным [213; Н. Mahrous, S. Sieladie, N. Xie, и др.] о возможности воздействия пробиотических микроорганизмов на концентрацию холестерина *in vitro* через различные механизмы понижения его концентрации.

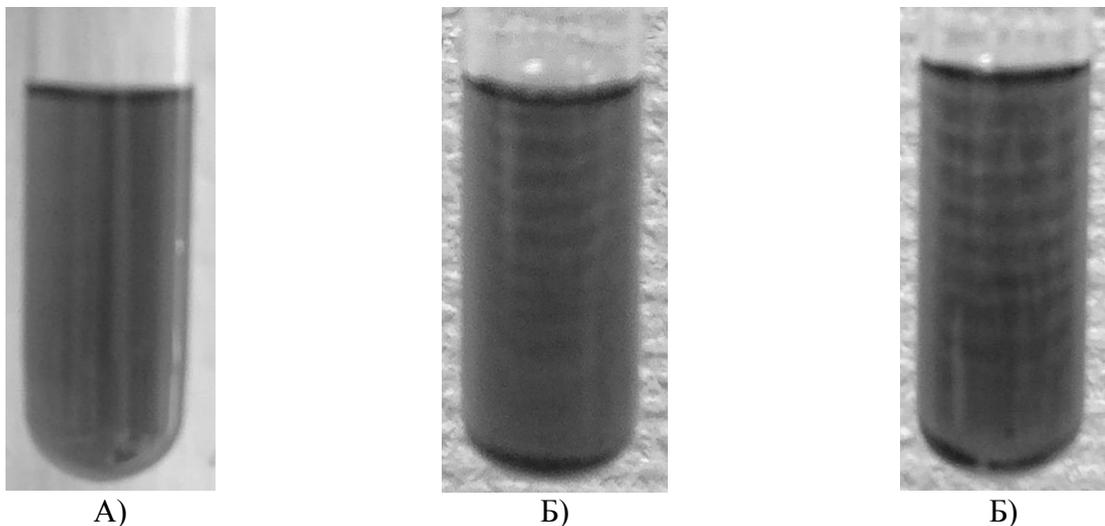


Рисунок 4.2 – Реакция Златкиса-Зака с холестерином в надосадочной жидкости пробиотических культур. А) Контроль; Б) *B. bifidum* GG-72; В) *B. adolescentis* BGV-11

По результатам математической обработки данных экспериментов по адгезии к клеткам CaCo-2 и снижению концентрации холестерина *in vitro* пробиотическими микроорганизмами была построена сравнительная поверхность отклика (рисунок 4.4).

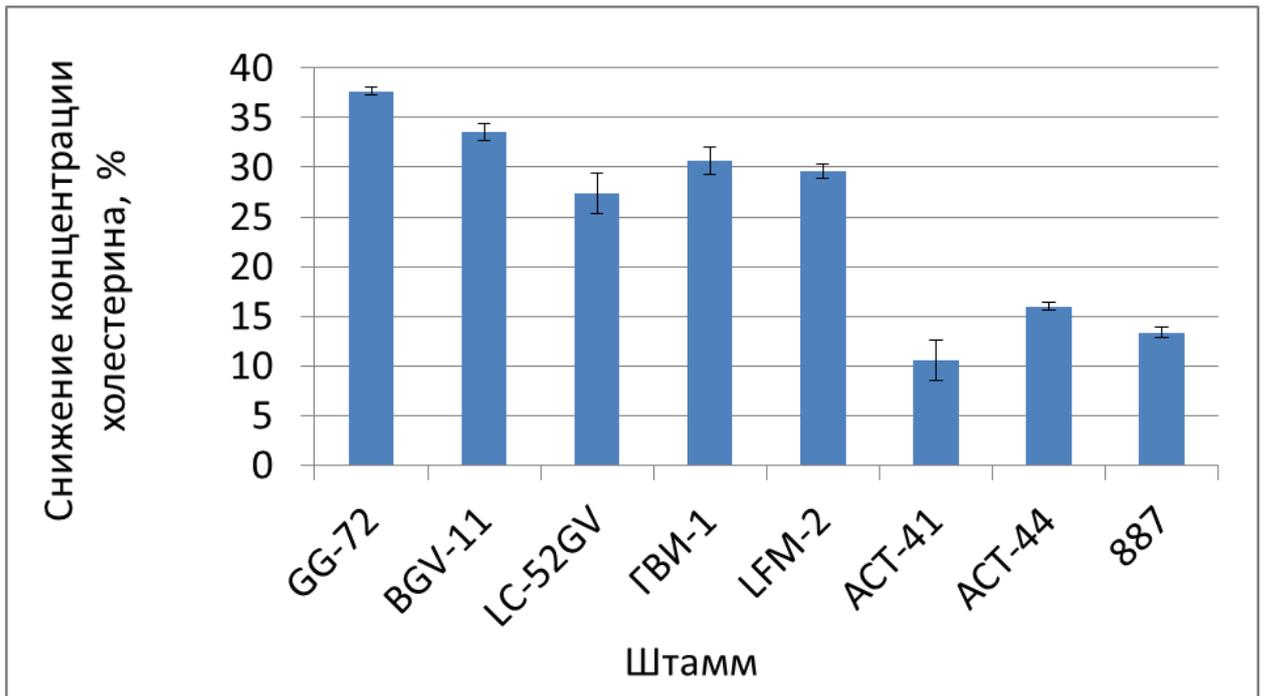


Рисунок 4.3 – Снижение концентрации холестерина в среде культивирования пробиотическими штаммами, %

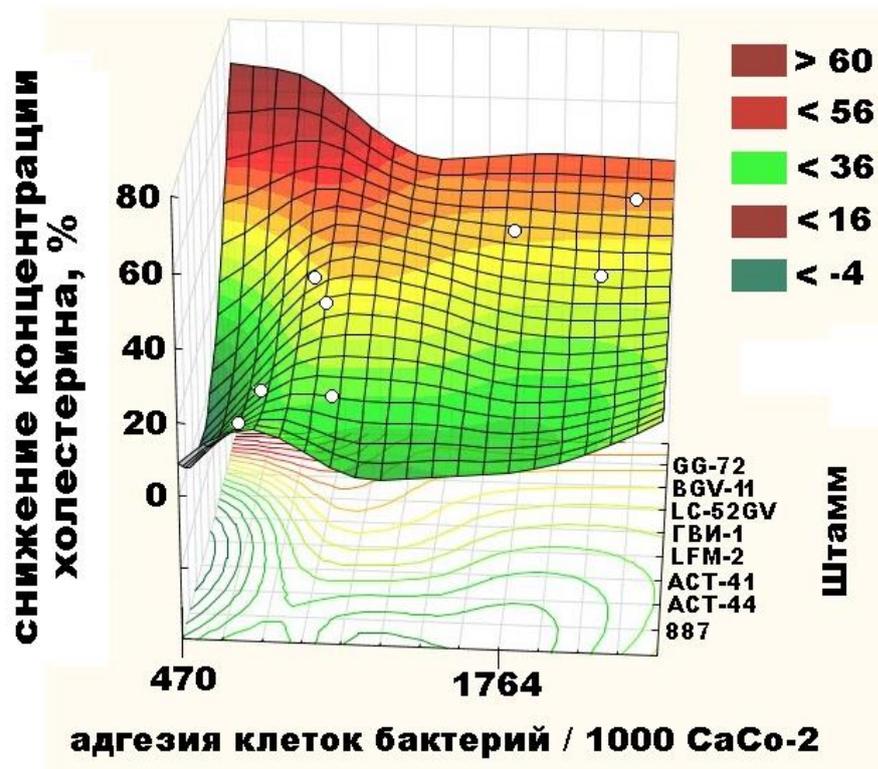


Рисунок 4.4 – Сравнительная поверхность снижения концентрации холестерина и адгезии пробиотических штаммов

Положение точек, обозначающих штаммы, в правой части поверхности обозначает усиление способности к адгезии к клеткам эпителия кишечника.

Расположение же точки в более высокой области указывает на более сильную способность к снижению концентрации холестерина *in vitro*. Построенная поверхность отклика иллюстрирует наш выбор штаммов исследуемых пробиотических бактерий, одновременно сильно проявляющих сразу два показателя – адгезия к эпителиальным клеткам кишечника CaCo-2 и снижение концентрации холестерина *in vitro*.

Таким образом, мы видим, что три штамма являются самыми перспективными сразу по двум показателям, их условные точки находятся в относительной близости друг от друга – это штаммы *B. bifidum* GG-72, *B. adolescentis* BGV-11, *L. rhamnosus* LC-52GV. На втором месте по перспективности оказались пробиотические штаммы: *L. plantarum* ГВИ-1, *L. fermentum* LFM-2. И наименее перспективными оказались три штамма: *L. acidophilus* АСТ-41, *L. acidophilus* АСТ-44; *L. acidophilus* 887. Хотя последние три штамма занимают последнее место по результатам построения математической поверхности, они относятся к «средней» группе адгезивности, а штамм *L. acidophilus* АСТ-44 проявил не самую низкую способность к снижению концентрации холестерина $16 \pm 0,41$ %. Поскольку ацидофильные молнокислые бактерии являются ценными с точки зрения выработки молочной кислоты, антагонизма к нежелательной микробиоте при производстве кисломолочных продуктов питания, то штамм *L. acidophilus* АСТ-44 представляется перспективным для его включения в пробиотическую композицию.

На основании обработки и анализа полученных данных по изучению адгезионных свойств и способности к снижению концентрации холестерина, отобраны штаммы для создания пробиотической композиции (рисунок 4.4). Среди штаммов были выбраны следующие: *B. adolescentis* BGV-11, *B. bifidum* GG-72; *L. acidophilus* АСТ-44; *L. fermentum* LFM-2; *L. plantarum* ГВИ-1, *L. rhamnosus* LC-52GV – их характеристики представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Значения адгезии и снижения концентрации холестерина *in vitro* изучаемых пробиотических штаммов бактерий

Штамм	Адгезия		Снижение концентрации холестерина, %
	Бактериальных клеток/1000 CaCo-2	Уровень	
<i>B. bifidum</i> GG-72	2400±77	Высокий	37,6±0,38 %;
<i>B. adolescentis</i> BGV-11	1764±81	Высокий	33,6±0,9 %,
<i>L. rhamnosus</i> LC-52GV	2230±61	Высокий	27,4±2,1 %
<i>L. plantarum</i> ГВИ-1	749±70	Средний	30,6±1,4 %
<i>L. fermentum</i> LFM-2	840±12	Средний	29,6±0,73 %
<i>L. acidophilus</i> АСТ-44	915±57	Средний	16,0±0,41 %

4.2. Определение условий биотехнологии для получения биомассы штаммов пробиотических бактерий, снижающих концентрацию холестерина

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.

В отношении варьирования условиями культивирования в русле исследования возможности усиления свойств пробиотических бактерий самым первым подходом представляется выбор питательных сред различного состава (таблица 4.2, таблица 4.3).

Для лактобактерий распространенными средами культивирования служат среда MRS и среда для лактобактерий, сравнительный состав которых приведен ниже (таблица 4.2). Из таблицы 4.2 видно, что питательные среды

Таблица 4.2 – Различие в составах питательных сред лактобактерий

Наименование	MRS-бульон	Среда для лактобактерий
Источник аминного азота	Протеозопептон	Панкреатический гидролизат казеина
Источник питательных веществ (аминокислоты, ростовые факторы, витамины, соли)	Мясной экстракт	Мясной экстракт
	Дрожжевой экстракт	Дрожжевой экстракт
Источник углеводов	Глюкоза	Глюкоза
Источник жирных кислот, нейтрализатор фенолов	Твин-80	Твин-80
Антиоксидант	Аммония цитрат	Аммония цитрат
	Натрия цитрат	–
Соли	Магния сульфат	Магния сульфат
	Марганца сульфат	Марганца хлорид
	Натрия гидрофосфат	Калия монофосфат
pH среды	6,5±0,2	5,6±0,3

MRS и среда для лактобактерий различаются по нескольким видам компонентов. Во-первых, эти среды отличаются источником аминного азота: протеозопептон у MRS и панкреатический гидролизат казеина у среды для лактобактерий. Во-вторых, они различны по редокс-понижающим компонентам: у MRS – это и натрия цитрат, у среды для лактобактерий – это только аммония цитрат. В-третьих, среда MRS и среда для лактобактерий отличаются составом солей и заявленной конечной кислотностью.

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 4.3).

Таблица 4.3 – 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.

Для бифидобактерий распространенными питательными средами являются среда MRS с добавлением 0,05 % L-цистеина, среда Блаурокка и ГМК-2 их сравнительный состав рассмотрен ниже (таблица 4.4).

Среды для бифидобактерий MRS-бульон с добавлением 0,05 % L-цистеина, Блаурокка и ГМК-2 различаются по большинству своих компонентов. Прежде это источник питательных веществ (аминокислот, ростовых факторов, витаминов, солей). Для MRS – мясной экстракт и дрожжевой экстракт; для Блаурокка – экстракт печени говяжьей; для среды ГМК-2 – кукурузно-молочная смесь. Источник аминного азота у них схож – пептон, который также дополнительно служит источником витаминов и солей. Источник углеводов у MRS – глюкоза; у Блаурокка и ГМК-2 – лактоза. Редокс-понижающими агентами или антиоксидантами среды также различаются: MRS – содержит аммония цитрат и натрия цитрат; Блаурокка –

Таблица 4.4 – Различие в составах питательных сред для бифидобактерий

Наименование	MRS-бульон, с 0,05 % L-цистеина	Блаурокка	ГМК-2
Источник питательных веществ (аминокислоты, ростовые факторы, витамины, соли)	Мясной экстракт, дрожжевой экстракт	Экстракт печени говяжьей	Кукурузно-молочная смесь
Источник аминного азота	Протеозопептон	Пептон сухой ферментативный	Пептон
Источник углеводов	Глюкоза	Лактоза	Лактоза
Антиоксидант	Аммония цитрат, натрия цитрат, L-цистеин	Цистин	Аскорбиновая кислота, натрий лимоннокислый (трехзамещенный)
Соли	Магния сульфат, марганца сульфат	Натрий хлористый	Магний сернокислый, калий фосфорнокислый (однозамещенный), натрий фосфорнокислый (двузамещенный)
Источник жирных кислот, нейтрализатор фенолов	Твин-80	-	-
pH	6,5±0,2	7,0 ±0,3.	7,2±0,1

- цистин; ГМК-2 - аскорбиновая кислота и натрий лимоннокислый. Среды различны по составу солей. Кроме того среда MRS в отличие от остальных двух сред содержит Твин-80, служащий в качестве источника жирных кислот и нейтрализатора фенолов. По различию питательных сред можно заключить, что среда MRS универсальна: обладает разнообразием компонентов, которые могут послужить для культивирования разнообразных пробиотических культур. Среда Блаурокка содержит не такое большое разнообразие компонентов, но отличается наличием богатого источника питательных веществ как экстракт печени говяжьей. Среда Блаурокка и

экстракт печени говяжьей являются классическими и хорошо себя зарекомендовавшими за долгие годы их использования в культивировании бифидобактерий. Среда ГМК-2 отличается от первых двух питательных сред по всем видам компонентов, кроме источника аминного азота – пептона. Среда ГМК-2 также является богатой и эффективной для культивирования бифидобактерий за счет наличия в своем составе богатых питательных компонентов и необходимых редокс-понижающих компонентов и солей.

Анализ результатов показал, что способность к снижению концентрации холестерина у изучаемых штаммов бифидобактерий в большей степени проявлялась при их развитии на среде Блаурокка (таблица 4.5). Среда Блаурокка главным образом отличается содержанием большого количества питательных веществ за счет особенностей состава, указанных выше.

Таблица 4.5– 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 пробиотическими штаммами на разных этапах их развития на выбранных средах. Полученные результаты исследования зависимости способности к снижению концентрации холестерина отобранных штаммом от стадии роста приведены на рисунках 4.5 – 4.9.



Рисунок 4.5 – Зависимость способности штамма *B. bifidum* GG-72 к снижению концентрации холестерина от продолжительности развития на питательной среде (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)

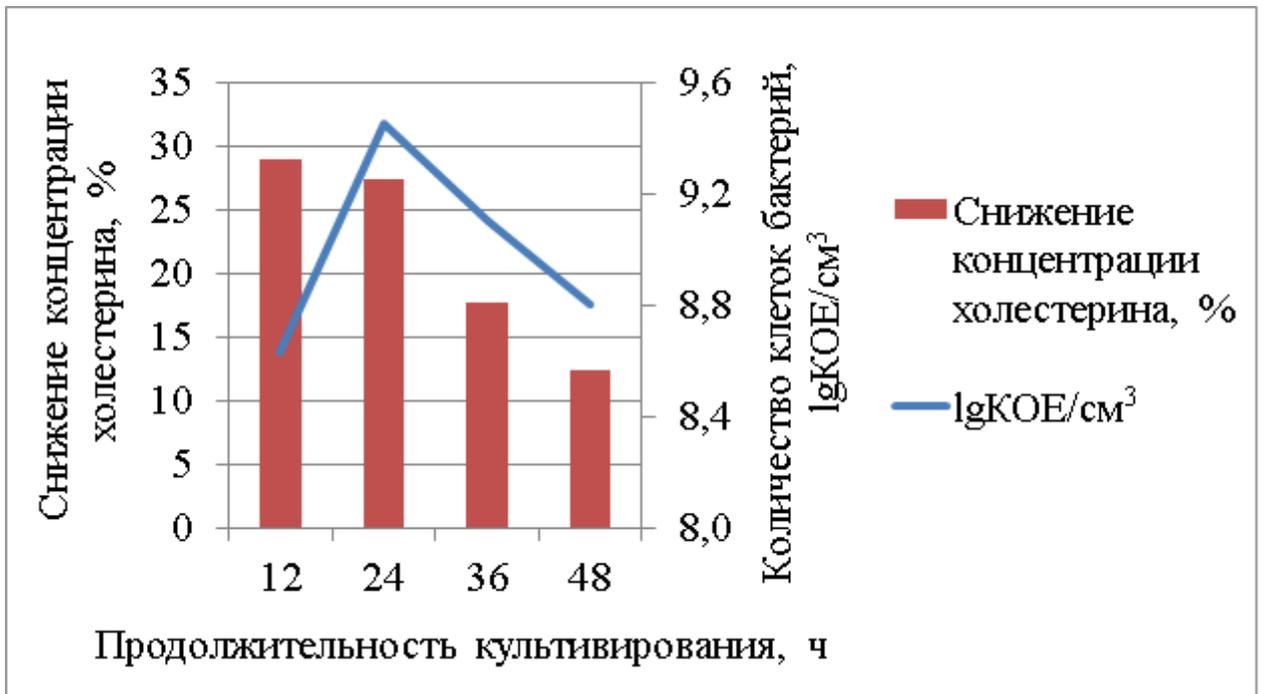


Рисунок 4.6 – Зависимость способности штамма *L. rhamnosus* LC-52GV к снижению концентрации холестерина от продолжительности развития на питательной среде (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)



Рисунок 4.7 – Зависимость способности штамма *L. plantarum* ГВИ-1 к снижению концентрации холестерина от продолжительности развития на питательной среде (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)

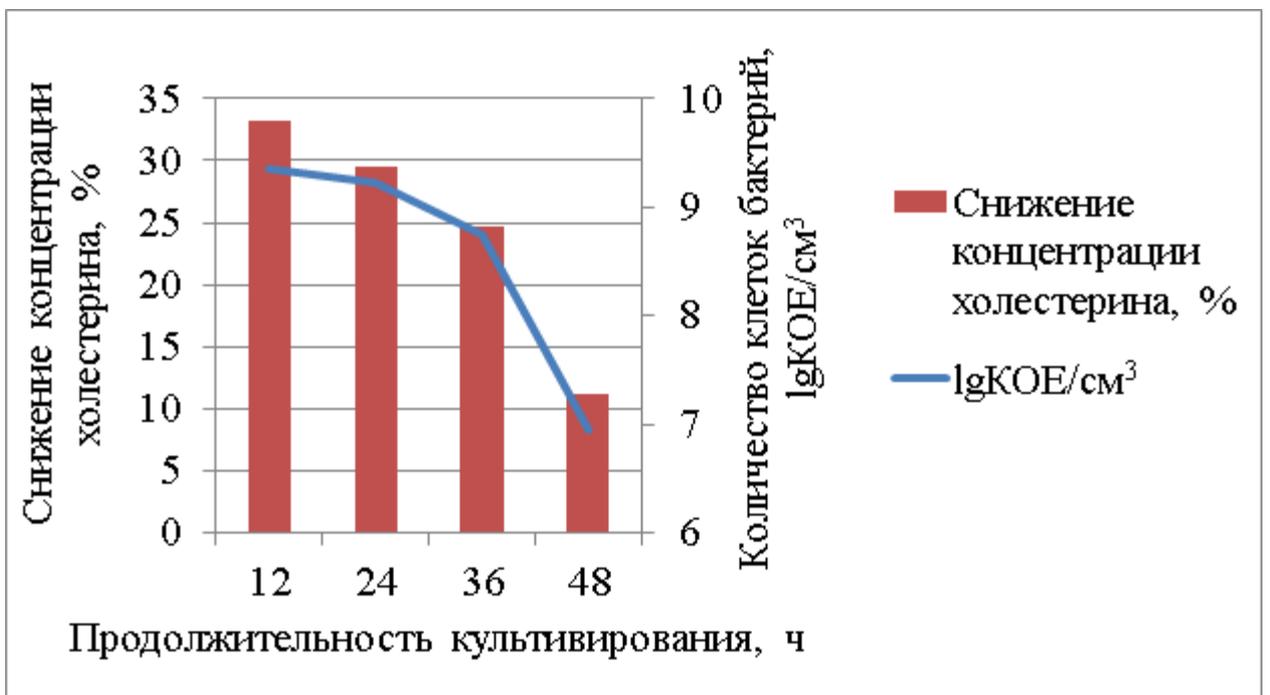


Рисунок 4.8 – Зависимость способности штамма *L. fermentum* LFM-2 к снижению концентрации холестерина от продолжительности развития на питательной среде (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)

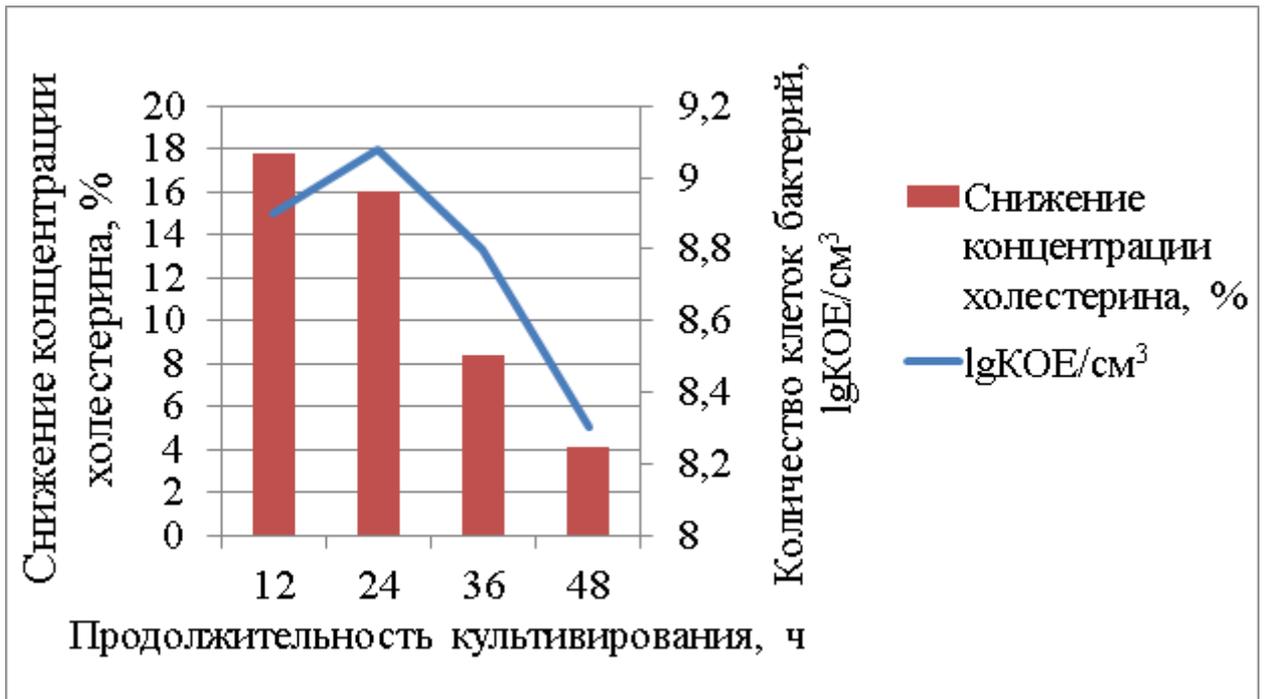


Рисунок 4.9 – Зависимость способности штамма *L. acidophilus* АСТ-44 к снижению концентрации холестерина от продолжительности развития на питательной среде (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что в течение развития культур пробиотических микроорганизмов наблюдается изменение их способности к снижению концентрации холестерина в среде культивирования. Способность к снижению концентрации холестерина в среде культивирования наибольшая в конце фазы логарифмического роста, в начале стационарной фазы роста.

Концентрации клеток в момент наибольшей способности к снижению концентрации холестерина у разных исследованных пробиотических штаммов были различны (таблица 4.6).

Способность к снижению концентрации холестерина была наиболее высока при окончании логарифмической фазы роста и в начале стационарной фазы роста. К 24 часам культивирования большинство культур находятся во второй половине стационарной фазы роста. В этот период рост культур не столь интенсивен, что может влиять на способность к снижению концентрации холестерина. При переходе в фазу отмирания, способность к

снижению концентрации холестерина существенно сокращается.

Таблица 4.6 – Количество клеток исследованных пробиотических штаммов при максимальной их способности к снижению концентрации холестерина

Штамм	Снижение концентрации холестерина, %	Количество клеток, КОЕ/см ³
<i>B. bifidum</i> GG-72	41,4	$1,4 \times 10^9$
<i>L. rhamnosus</i> LC-52GV	29	$4,0 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> ГВИ-1	30,61	$1,0 \times 10^9$
<i>L. fermentum</i> LFM-2	33,2	$2,2 \times 10^9$
<i>L. acidophilus</i> АСТ-44	17,8	$7,9 \times 10^8$

Таким образом, была установлена зависимость способности к снижению концентрации холестерина от стадии роста пробиотических штаммов: наибольшая способность отмечалась в конце фазы логарифмического роста – начале стационарной фазы. Разная способность к снижению концентрации холестерина, в зависимости от возраста культуры, может быть связана с различиями интенсивности метаболизма и разной адсорбирующей способностью 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 ± 1 °С. Полученные данные нашли отражение в проекте технологической инструкции (приложение 7).

4.3. Экспериментальное обоснование состава ассоциированной пробиотической композиции, способной к снижению концентрации холестерина

На основе ранее выбранных штаммов пробиотиков были созданы две потенциально способные к снижению концентрации холестерина композиции, обозначенные как «a1», «b1» (таблица 4.7).

Таблица 4.7 – Состав пробиотических композиций

Композиция «a1»	Композиция «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 характеризуются тем, что включают в себя штаммы, обладающие способностью к снижению концентрации холестерина, выраженной антагонистической активностью по отношению к *Escherichia coli* O157:H7 и *Staphylococcus aureus* 209-P, высокой способностью к адгезии к клеткам эпителия кишечника человека, а также другими функциональными свойствами.

Для формирования пробиотической композиции методом перпендикулярных штрихов была исследована сочетаемость выбранных штаммов пробиотических бактерий, полученные данные приведены на рисунке 4.10.

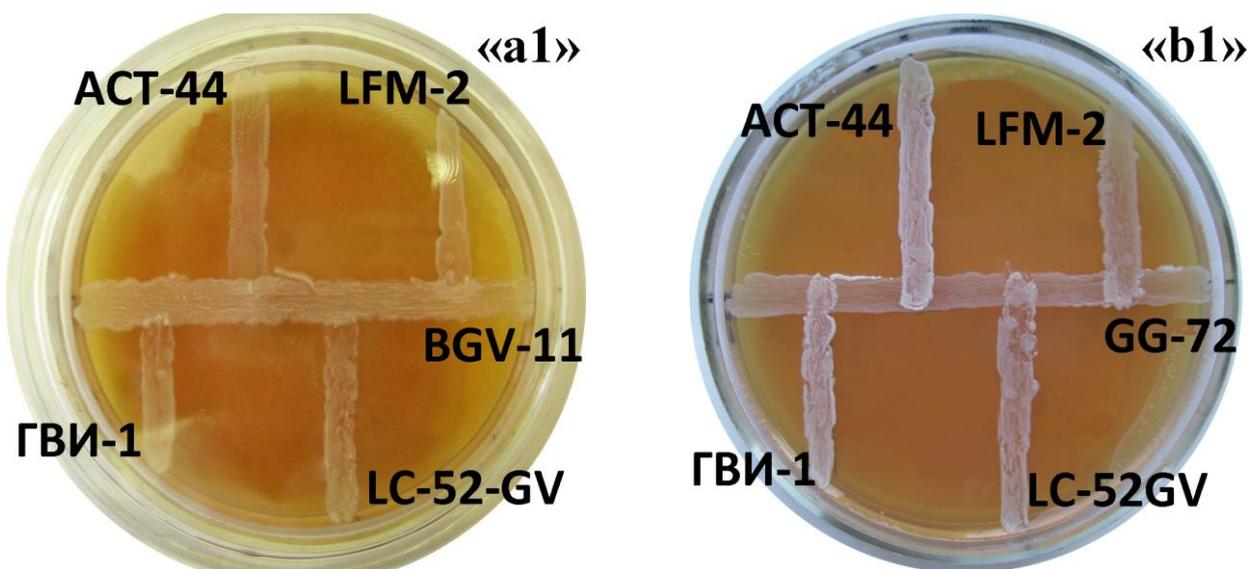


Рисунок 4.10 – Совместный рост культур внутри композиций «a1», «b1»

Колонии пробиотических штаммов в виде штрихов в зоне их пересечения оказались равномерными без явных зон ингибирования роста. Установлена возможность их сочетания 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 составленных композиций «a1» и «b1». Полученные результаты представлены на рисунках 4.11, 4.12.

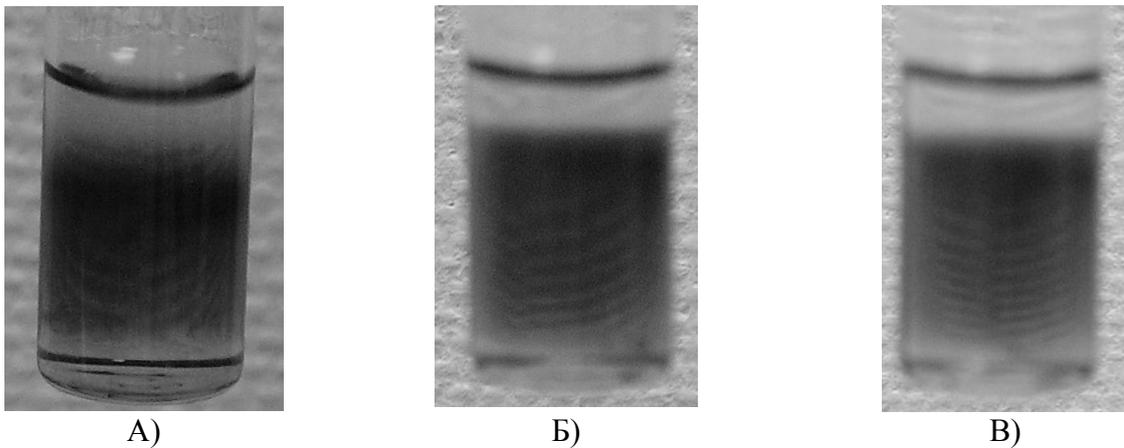


Рисунок 4.11 – реакция Златкиса-Зака в надосадочной жидкости микробных композиций: А) Контроль Б) композиция «a1»; В) композиция «b1»;

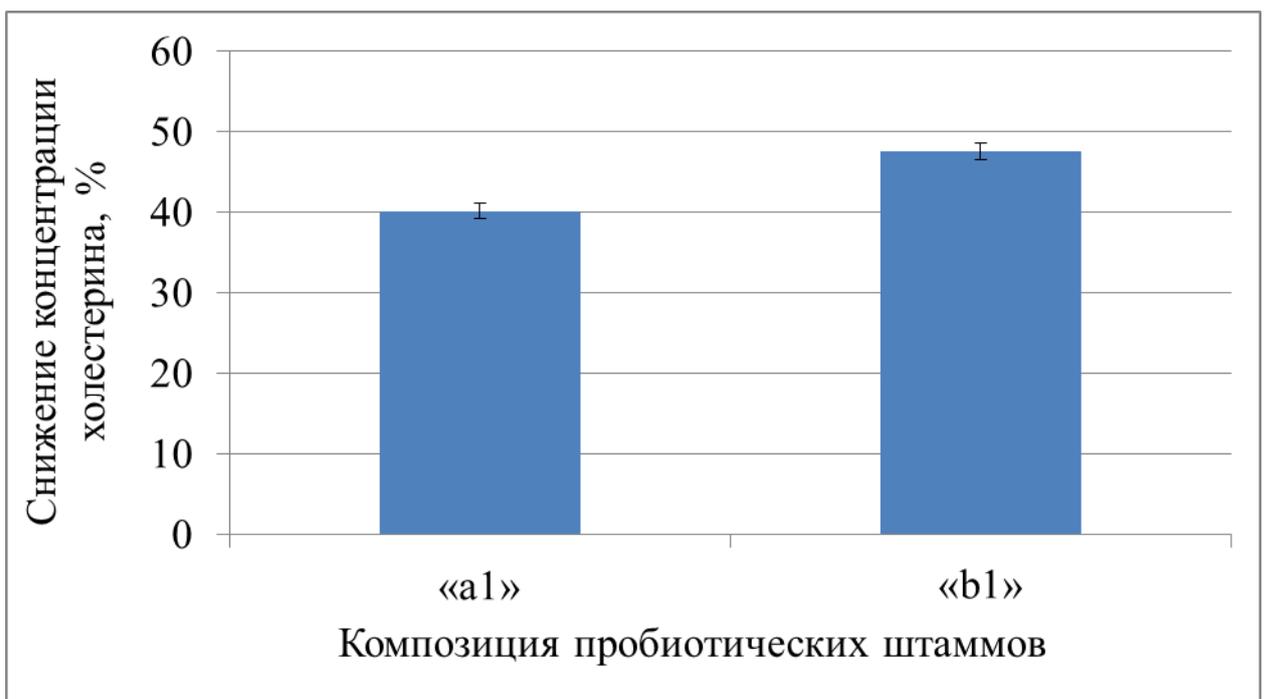


Рисунок 4.12 – Способность к снижению концентрации холестерина у пробиотических композиций «a1», «b1»

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. Композиция «b1» проявила способность снижать концентрацию холестерина в условиях *in vitro* на 47,6 %, что больше способности снижать концентрацию холестерина у любого отдельного изученного нами штамма в фазе логарифмического роста – 41,4 % у штамма *B. bifidum* GG-72.

Исходя из вышеуказанных 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. Композиция включает в себя пробиотические штаммы.

Результаты исследований, представленные в данной главе, позволили выявить штаммы пробиотиков, которые в большей степени обладали способностью к снижению концентрации холестерина; определить рациональные условия биотехнологии и создать пробиотическую композицию, проявляющую способность к снижению концентрации холестерина в условиях *in vitro*. Это позволило разработать проект технологической инструкции на получение биомассы штаммов пробиотиков, снижающих концентрацию холестерина (приложение 7).

4.4. Проверка биотехнологии штаммов пробиотических бактерий, способных к снижению концентрации холестерина в производственных условиях

Для проверки условий биотехнологии изученных штаммов пробиотиков, снижающих концентрацию холестерина, и, входящих в состав композиции «b1», проводили их выработку в промышленных условиях.

Результаты промышленной выработки согласуются с данными, полученными в лабораторных условиях, что подтверждается актом (приложение 6).

Изучение условий биотехнологий проводили для штаммов, входящих в композицию, проявляющую способность к снижению концентрации холестерина: *B. bifidum* GG-72, *L. acidophilus* АСТ-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. rhamnosus* LC-52GV.

Перед производственной выработкой получали лиофильно высушенные образцы каждого штамма с целью сохранения изученных свойств. Для каждого штамма были созданы лиофильно высушенные культуры с целью долгосрочного хранения (мастер-банк). На основе мастер-банка создавали рабочий банк, который непосредственно использовали в ходе наработки объема посевного материала для запуска процесса ферментации (рабочий банк).

При проверке биотехнологии штаммов пробиотических бактерий, способных к снижению концентрации холестерина в производственных условиях, были использованы стандартные операционные процедуры биотехнологического предприятия, на котором проводились исследования. Биотехнологическая схема и ее более подробное описание приведено в таблице 4.8, 4.9. Для первичной проверки возможности наработки биомассы каждого исследованного штамма была использована стандартная питательная среда предприятия:

- агар пищевой по ГОСТ 16280;
- вода питьевая по СанПиН 2.1.4.1074;
- молоко сухое обезжиренное по ГОСТ Р 52791;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- панкреатин медицинский по ТУ 49-619;
- пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805;

Все сырье и вспомогательные материалы, используемые для изготовления продукта, соответствовали Единым санитарным требованиям, гигиеническим требованиям безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, ФЗ № 88, СанПиН 2.3.2.1078, СанПиН 2.3.2.1290, и сопровождаться документами, подтверждающими их качество и безопасность.

Таблица 4.8 – Принципиальная схема биотехнологического процесса

№ п/п	Название стадии	Название полупродукта
1.	Получение инокулята	Рабочий банк
		Рабочая культура
		Маточная культура
		Посевной материал (инокулят)
2.	Ферментация, ферментер «Биор-1» г.Кириши	Культуральная жидкость
3.	Сепарация	Биомасса полужидкая
4.	Лиофильная сушка, LZ-45 (Чехия)	Биомасса порошкообразная
5.	Смешивание	Композиция пробиотических штаммов
6.	Упаковка	
7.	Хранение	

Таблица 4.9 – Характеристика стадий использованных условий биотехнологии

Название полупродукта	Объем/масса	Характеристика
Рабочий банк	1 г	10^{11} КОЕ/мл
Рабочая культура	0,07 л	10^8 КОЕ/мл
Маточная культура	0,7 л	10^8 КОЕ/мл
Посевной материал (инокулят)	7 л	10^8 КОЕ/мл
Культуральная жидкость	70 л	10^8 КОЕ/мл, рН $3,6 \pm 0,2$ (для <i>Lactobacillus</i>) рН $4,2 \pm 0,2$ (для <i>Bifidobacterium</i>)
Биомасса полужидкая	1,5 л	плотность $1,3 \text{ г/см}^3$; беловато-кремовый цвет, полужидкая консистенция, аромат:

		кисломолочный - для <i>Lactobacillus</i> ; уксусно-кисломолочный - для <i>Bifidobacterium</i> .
Биомасса порошкообразная	600±50 г	10 ¹⁰ КОЕ/см ³ для <i>Lactobacillus</i> ; 10 ¹¹ КОЕ/см ³ для <i>Bifidobacterium</i> ; порошок желтовато-кремового цвета (рисунок 4.13) с равномерно распределенными мелкими вкраплениями, обладающий свойством сыпучести, масса влаги не более 4,5 %
Смешанные штаммы, композиция пробиотических штаммов		Штаммы смешанные в равных массовых долях
Пробиотическая композиция в пакетах-саше	5,0±0,50 г	Концентрация <i>Lactobacillus</i> в пределах 10 ¹⁰ КОЕ/см ³ , <i>Bifidobacterium</i> 10 ¹¹ КОЕ/см ³



Рисунок 4.13 – Внешний вид лиофильно-высушенной биомассы разработанной пробиотической композиции

Полученная в производственных условиях пробиотическая композиция удовлетворяла требованиям микробиологической чистоты в соответствии с действующими нормами (таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Микробиологические показатели

Наименование показателя	Значение показателя	Метод контроля
КМАФАнМ, КОЕ/см ³ , не более	10,0	ГОСТ 10444.15-94
Дрожжи, КОЕ/г, не более	10,0	ГОСТ 10444.12-88
Плесени, КОЕ/г, не более	10,0	ГОСТ 10444.12-88
Следующие микроорганизмы не допускаются в 1 г		
БГКП (колиформы)	1,0	ГОСТ 30518-97
<i>E.coli</i>	5,0	ГОСТ 30726-2001
<i>S. aureus</i>	1,0	ГОСТ Р 52815-2007
Патогенные бактерии, в том числе бактерии рода <i>Salmonella</i>	10,0	ГОСТ Р 52815-2007

Замечено изменение способности изучаемых пробиотических штаммов к снижению концентрации холестерина при их культивировании в производственных условиях (рисунок 4.14). Такой эффект несколько предсказуем, поскольку проявление каждым штаммом способности к

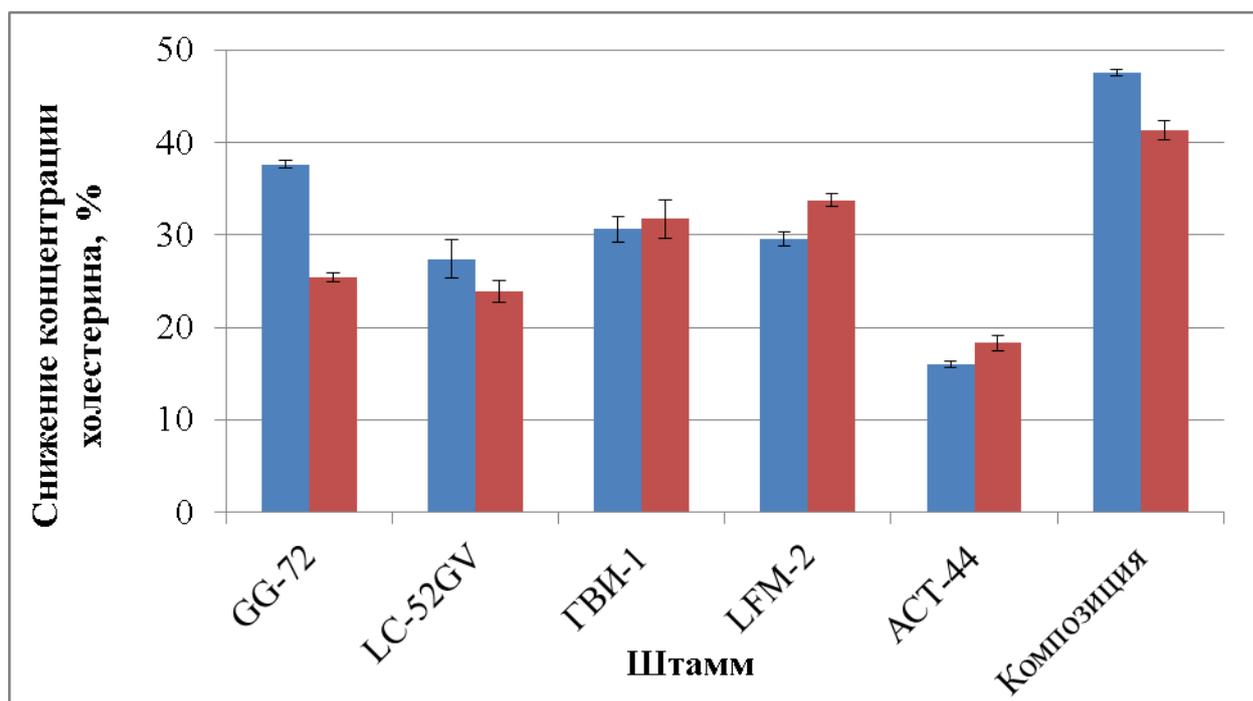


Рисунок 14 – Способность к снижению концентрации холестерина штаммами пробиотической композиции, наработанными в типовых условиях

снижению концентрации холестерина не может не зависеть от условий его культивирования. На данном этапе мы подтвердили возможность получения биомассы пробиотической композиции, способной снижать концентрацию

холестерина, а также сохранение целевого свойства на приемлемом уровне. Для дальнейшего внедрения созданной пробиотической композиции в производство с сохранением ключевого свойства на высоком уровне необходимо детальное и системное изучение влияния физических условий культивирования в биореакторе на способность штаммов-участников пробиотической композиции к снижению концентрации холестерина.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ

5.1. Изучение показателей качества созданной пробиотической композиции при хранении

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 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ и минус $18\pm 2^{\circ}\text{C}$. 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 5.1, 5.2 представлены результаты определения изучаемых показателей опытной партии пробиотической композиции с высокой способностью к снижению концентрации холестерина в процессе хранения: количество клеток бифидобактерий, количество клеток лактобактерий, массовой доли влаги.

На основании представленных данных о показателях качества пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, в процессе хранения можно сказать, что при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ количество бифидобактерий снижается в 120 раз, лактобактерий – в 60 раз. Хранение пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, при температуре минус $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ приводило к небольшому изменению количества клеток: бифидобактерий на половину порядка, тогда как количество клеток лактобактерий практически оставалось на исходном уровне.

Таблица 5.1 – Изменение показателей качества созданной пробиотической композиции при температуре хранения 4 ± 2 °С

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

Таблица 5.2 – Изменение показателей качества созданной пробиотической композиции при температуре хранения минус 18 ± 2 °С

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

Одним из основных показателей функциональной ценности пробиотических культур является антагонистическая активность. Результаты исследования через 6 месяцев хранения представлены на рисунке 5.1.

Способность штаммов к снижению концентрации холестерина и к антагонизму также сохраняется лучше при более низкой температуре, что объясняется большим количеством клеток пробиотических культур.

Показатели безопасности биомассы пробиотических бактерий отвечали требованиям для заквасок: БГКП не обнаружены в 1 см³, КМАФАнМ составляло не более 1×5 КОЕ/см³ и соответствовали федеральному закону № 88 «Технический регламент на молоко и молочные продукты».

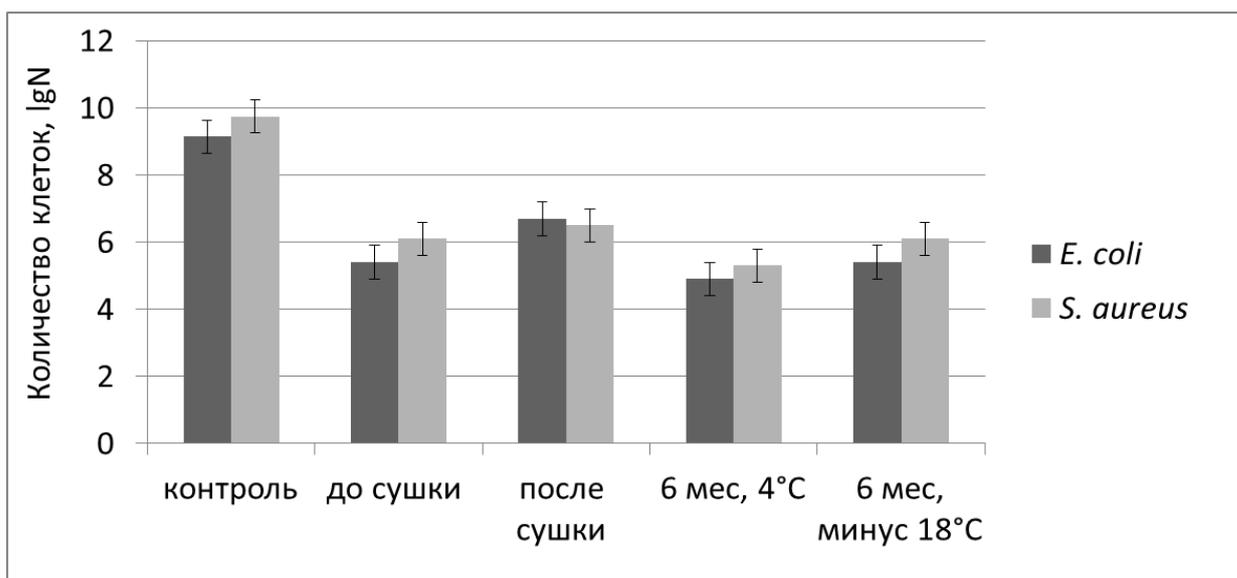


Рисунок 5.1 – Антагонистическая активность сублимированной пробиотической композиции после 6 месяцев хранения при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$ и минус $18\pm 2^\circ\text{C}$ (N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³)

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

5.2. Изучение действия созданной пробиотической композиции в условиях *in vivo*

После исследования возможности получения биомассы штаммов разработанной пробиотической композиции и изучения показателей качества во время хранения исследовали действие полученной композиции в условиях *in vivo*.

Для изучения действия созданной пробиотической композиции в условиях *in vivo* было использовано 3 группы лабораторных животных, отличающихся по типу питания: группа «СД» (контроль) – стандартная диета и вода; группа «ГХД» (контроль) – гиперхолестериновая диета и вода; группа «ГХД+К» (опытная) – гиперхолестериновая диета с суспензией пробиотической композиции. Перед экспериментом были отобраны методом случайной выборки 3 лабораторных животных (группа «Фон») для определения исходных фоновых значений массы тела мышей, концентрации

в крови общего холестерина, холестерина в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), холестерина в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов и состояния микробиоты кишечника.

Составленная нами гиперхолестериновая диета стабильно создавала гиперхолестеринэмию у исследованных белых мышей. Концентрация общего холестерина у мышей группы «ГХД» достигала концентрации 4,11 ммоль/л, что превышает верхнюю границу нормы в 4,0 ммоль/л.

В ходе всего эксперимента проводилось динамическое отслеживание с ежедневным общеклиническим наблюдением за состоянием животных. Во всех группах независимо от вида диеты одно животное поедало $4,3 \pm 0,2$ г корма, выпивало $5,4 \pm 0,1$ мл воды или $6,15 \pm 0,05$ мл суспензии пробиотика. Среднее увеличение массы тела во всех группах по окончании эксперимента составило $12,1 \pm 1,3$ г. Животные сохраняли активность, не изменялось состояние шерсти и окраска слизистых оболочек. При вскрытии мышей визуальных изменений внутренних органов обнаружено не было, лимфоузлы – без изменений.

Во всех трех группах не было замечено значительной разницы в приросте массы тела, в удельной массе съеденного корма или выпиваемого объема жидкости. Во время эксперимента не было установлено влияние на объем поедания и на прирост массы тела использованной гиперхолестериновой диеты или ее сочетания с пробиотической композицией. Суспензия пробиотика потреблялась больше воды в среднем на 13,9 %.

Результаты исследования способности созданной пробиотической композиции участвовать в регулировании концентрации холестерина в крови лабораторных животных представлены в таблице 5.3 и на рисунках 5.2 – 5.5.

Таблица 5.3 – Липидэмический профиль исследованных лабораторных животных

Группа	Фон	СД	ГХД	ГХД+К
Общий холестерин, ммоль/л	2,46±0,3	2,74±0,3	3,76±0,2	2,79±0,3
ЛПНП, ммоль/л	0,27±0,02	0,24±0,02	0,29±0,02	0,24±0,02
ЛПВП, ммоль/л	1,12±0,05	1,32±0,05	1,07±0,05	1,15±0,05
Триглицериды, ммоль/л	1,8±0,15	1,41±0,1	1,12±0,1	1,27±0,11

Математическая достоверность $p < 0,01$. Сокращения, использованные в таблице: ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности; Фон – группа для определения липидэмического профиля перед экспериментом; СД – стандартный корм; ГХД – гиперхолестериновая диета; ГХД+К – гиперхолестериновая диета с пробиотической композицией.

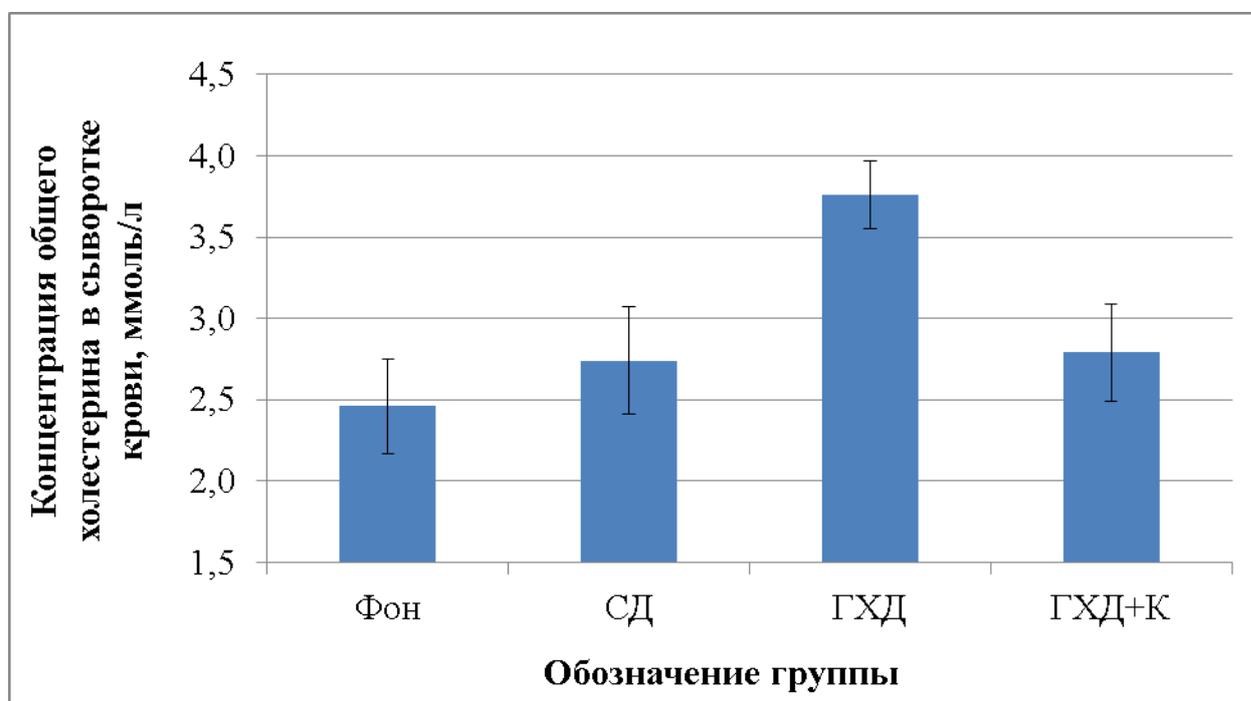


Рисунок 5.2 – Влияние разработанной пробиотической композиции на концентрацию общего холестерина в крови лабораторных животных

Концентрация общего холестерина в группе с созданной пробиотической композицией «ГХД+К» снизилась до 2,79±0,3 ммоль/л в сравнении с группой «ГХД» - 3,76±0,2 ммоль/л. Концентрация общего холестерина под действием пробиотической композиции приблизилась к концентрации 2,74±0,3 ммоль/л группы «СД» со стандартной диетой. Снижение концентрации холестерина созданной пробиотической композицией на фоне группы с «ГХД» составила 25,8 %.

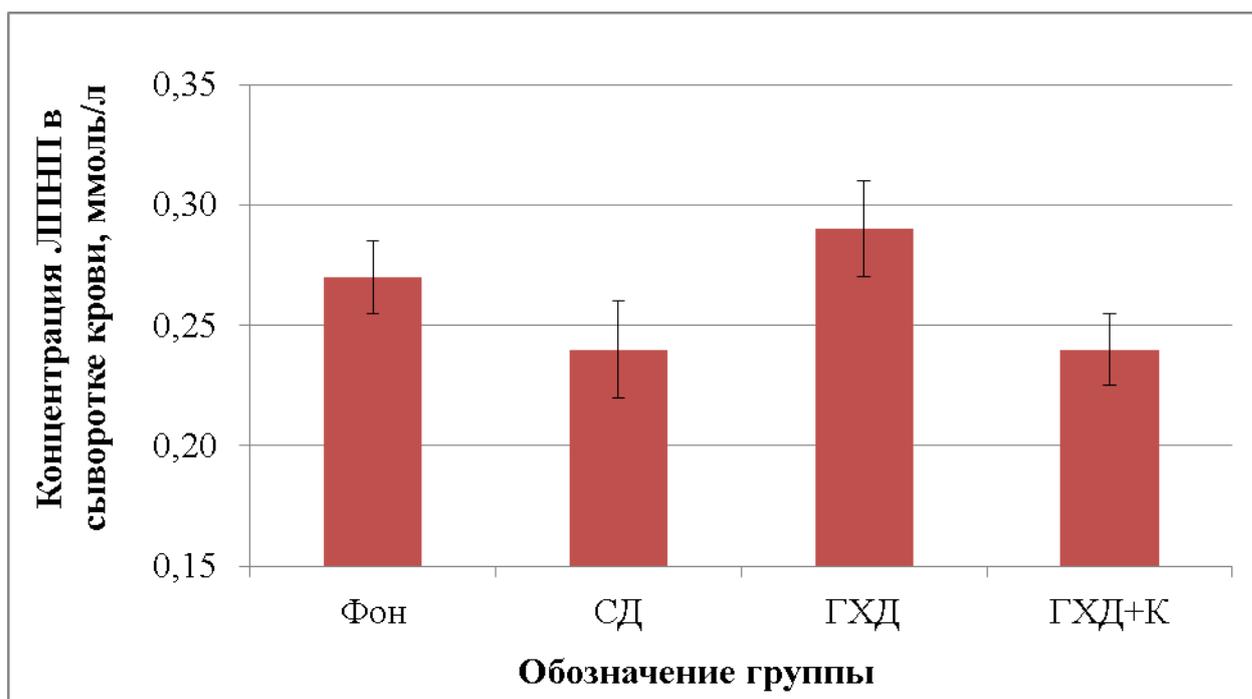


Рисунок 5.3 – Влияние разработанной пробиотической композиции на концентрацию холестерина в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в крови лабораторных животных

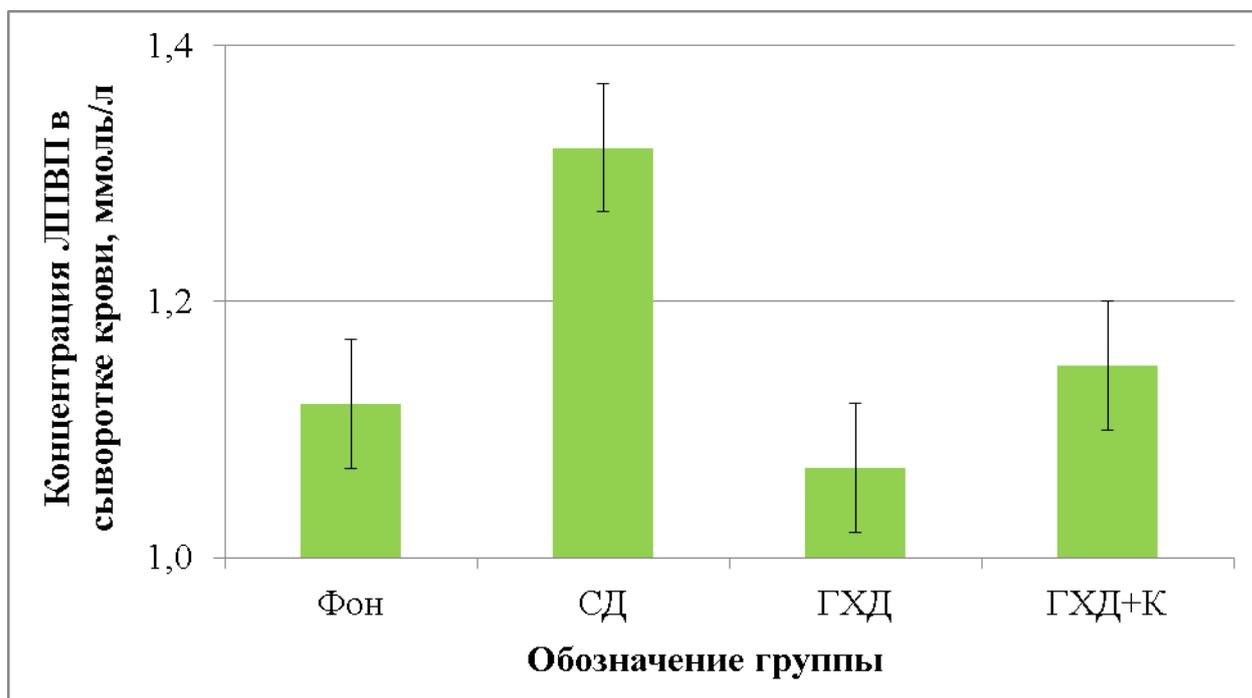


Рисунок 5.4 – Влияние разработанной пробиотической композиции на концентрацию холестерина в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в крови лабораторных животных

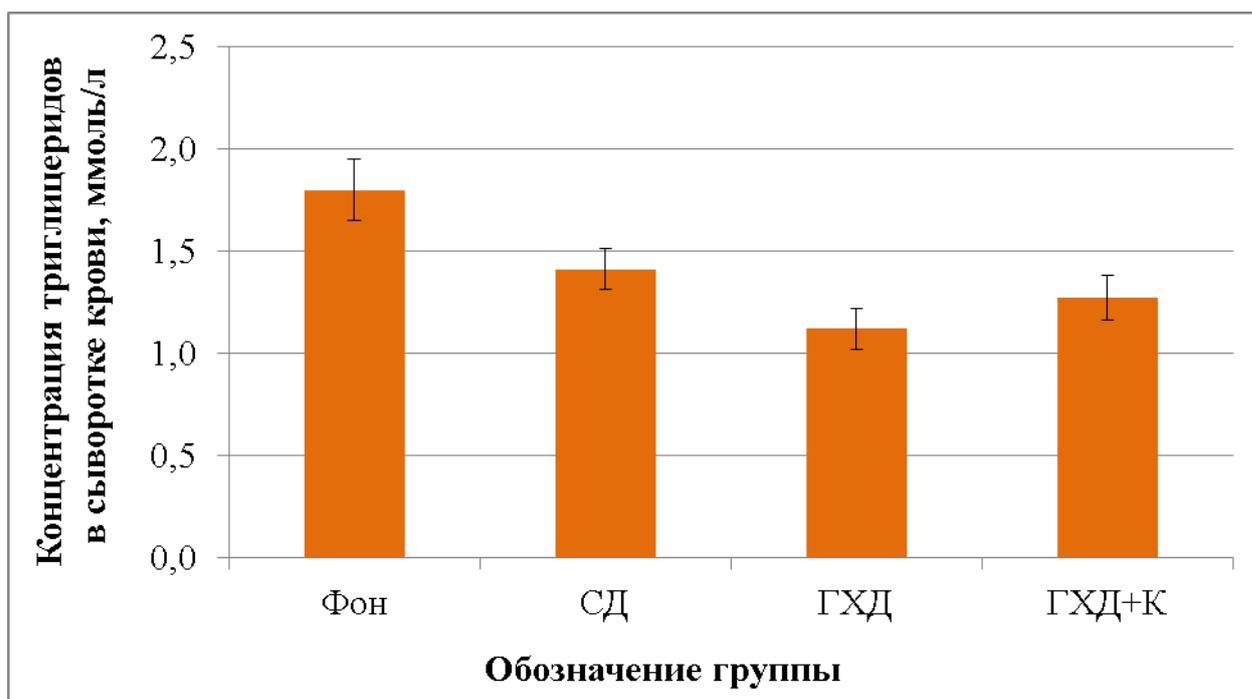


Рисунок 5.5 – Влияние разработанной пробиотической композиции на концентрацию триглицеридов в крови лабораторных животных

Концентрация ЛПНП под воздействием созданной пробиотической композицией снизилась со значения $0,29 \pm 0,02$ ммоль/л до $0,24 \pm 0,02$ ммоль, что составило снижение ЛПНП на 17,2 % в сравнении с группой «ГХД», принимавшей только гиперхолестериновую диету.

Концентрация ЛПВП под воздействием пробиотической композиции увеличилась до $1,15 \pm 0,05$ ммоль/л («ГХД+К») с $1,07 \pm 0,05$ ммоль/л («ГХД»). При этом концентрация ЛПВП в группе «СД» $1,32 \pm 0,05$ ммоль/л, что выше чем в обеих группах с гиперхолестериновой диетой. Увеличение концентрации ЛПВП составило 7,5 %.

Концентрация триглицеридов снизилась в группах с гиперхолестериновой диетой «ГХД» и «ГХД+К» до соответственно $1,12 \pm 0,1$ ммоль/л и $1,27 \pm 0,11$ ммоль/л в сравнении с группой со стандартной диетой. Концентрация триглицеридов в группе со стандартным питанием была $1,41 \pm 0,1$ ммоль/л.

При использовании в корм лабораторным животным созданной пробиотической композиции на фоне гиперхолестериновой диеты

происходило приближение концентрации общего холестерина к показателям группы со стандартной диетой (снижение на 25,8 %). Это говорит о способности созданной пробиотической композиции снижать концентрацию холестерина в условиях *in vivo*. Под воздействием пробиотической композиции выравнивалась концентрация ЛПНП в группе «ГХД+К» до значения группы «СД» 0,24 ммоль/л, т.е. до группы со стандартным типом питания, что говорит о снижении динамики распространения холестерина в организме животных из печени в ткани или даже сокращения поступления холестерина из желудочно-кишечного тракта в кровоток. В группе, принимавшей пробиотическую композицию с гиперхолестериновой диетой, концентрация ЛПВП $1,15 \pm 0,05$ ммоль/л превышает значение «ГХД» $1,07 \pm 0,05$ ммоль/л. Увеличение концентрации ЛПВП в сыворотке крови составило 7,5 % в сравнении с группой принимавшей гиперхолестериновую диету без пробиотической композиции. Повышение концентрации ЛПВП дает основание полагать, что в организме животных происходит отток холестерина из тканей обратно в печень. ЛПВП некоторые исследователи называют «полезным» переносчиком холестерина, т.к. он снижает его концентрацию в тканях. В нашем случае увеличение концентрации ЛПВП не столь велико – 7,5 %, что вероятно можно объяснить высокими показателями снижения в сыворотке крови общего холестерина – 25,8 % и ЛПНП – 17,2 %. Снижение концентрации общего холестерина и ЛПНП может приводить к изначальному снижению доступа холестерина к тканям. С другой стороны, некоторое увеличение под действием пробиотической композиции концентрации в сыворотке крови ЛПВП может говорить о наличии комплексного эффекта пробиотиков на регуляцию обмена холестерина в организме животных.

Пробиотическая композиция несколько приблизила концентрацию триглицеридов к значению группы «СД» $1,41 \pm 0,1$ ммоль/л. Концентрация триглицеридов увеличилась в группе «ГХД+К» с $1,12 \pm 0,1$ ммоль/л до $1,27 \pm 0,11$ ммоль/л. Созданная пробиотическая композиция на 13,4 %

увеличила концентрацию триглицеридов в группе «ГХД+К» в сравнении с группой, принимавшей только гиперхолестериновую диету без пробиотической композиции.

Присутствует явление понижения концентрации триглицеридов в присутствии холестерина – снижение концентрации триглицеридов в группе «ГХД» и «ГХД+К» в сравнении с контрольной группой «СД». Данные о снижении концентрации триглицеридов в сыворотке крови у животных с гиперхолестериновой диетой без добавления животных жиров присутствуют и у других авторов. Полученные данные согласуются с мнением А. Bordonì, А. Amaretti, А. Leonardi [97], которые также ссылаются на других авторов в связи с падением концентрации триглицеридов при присутствии в пище чистого холестерина. А. Bordonì и др. объясняют падение триглицеридов их использованием на построение липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), которые несут в своем составе большую часть триглицеридов плазмы крови. По всей видимости суть состоит в том, что гиперхолестериновая диета провоцирует необходимость в повышенном количестве переносчиков холестерина в крови от печени в ткани – это ЛПОНП и ЛПНП. При этом ЛПОНП состоит примерно на 47 % из триглицеридов. Вероятно гиперхолестериновая диета сформированная без животных жиров, а только через внесение холестерина (и желчных кислот) не восполняет потребность триглицеридов, которые организм использует в большом количестве для создания ЛПОНП и вероятно хиломикронов.

Таким образом, можно сделать заключение об участии пробиотической композиции в метаболизме холестерина у животных на фоне приёма корма с повышенным содержанием холестерина. Пробиотическая композиция снижала концентрацию общего холестерина в крови животных, что подтверждает гипотезу о возможности регулирования концентрации холестерина в крови пробиотическими микроорганизмами.

При исследовании микробиологических и копрологических показателей в ходе эксперимента были получены данные, представленные в таблицах 5.4, 5.5.

Таблица 5.4 - Изменение микробиоценоза кишечника лабораторных животных в исследуемых группах

Группа	Средний вес, г	Патогенные микроорганизмы	Бифидобактерии, КОЕ/г	Лактобактерии, КОЕ/г	Общее количество кишечной палочки, КОЕ/г	Лактозонегативная кишечная палочка, %	Кокковые формы в общей сумме микроорганизмов, %	Энтерококки, КОЕ/г	Клебсиелла, КОЕ/г	Энтеробактер, КОЕ/г	Дрожжеподобные грибы, КОЕ/г	Сапрофитный стафилококк, КОЕ/г	<i>Aspergillus</i> spp., КОЕ/г	<i>Bacillus</i> spp, КОЕ/г
Фон	16,0±1,5	нет	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁷	нет	нет	10 ⁴	нет	нет	нет	нет	нет	нет
«СД»	28,5±0,9	нет	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁴ -10 ⁷	3 животных из 10 (100%)	3,8	10 ⁷ -10 ⁸	нет	нет	нет	нет	нет	нет
«ГХД»	28,1±1,1	нет	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁵ -10 ⁸	2 из 10 животных (53 % и 100 %)	3,3	10 ⁵ -10 ⁸	нет	2 из 10 животных (10 ⁷ и 10 ⁸ КОЕ/г)	нет	нет	нет	3 из 10 животных (10 ⁴ и 10 ⁸ КОЕ/г)
«ГХД+К»	27,5±0,9	нет	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁴ -10 ⁷	нет	0,1	10 ⁶	нет	нет	нет	нет	нет	нет

Примечание: гемолитическая кишечная палочка, гемолизирующие стафилококки, протей, цитробактер, гафния, серратия, псевдомонады и другие неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы ни у одной мыши обнаружены не были.

Таблица 5.5 – Комплексный анализ микрофлоры кишечника у мышей группы в исследуемых группах

Группа	Общий уровень ЛЖК, моль/л	Структурный индекс	Индекс изокислот	Соотношения ЛЖК, %			Отношение изоформ к нормальным формам ЛЖК			Массовые концентрации ЛЖК, моль/л							
				Уксусная	Пропионовая	Масляная	Масляная	Валериановая	Капроновая	Уксусная	Пропионовая	Масляная	Изомасляная	Изовалериановая	Валериановая	Изокапроновая	Капроновая
Фон	42,26±8,4	0,49±0,05	0,13±0,04	69±2	13,3±0,7	17,3±1,7	0,07±0,02	0,76±0,17	1,00	28,41±6,5	5,40±0,9	7,0±0,6	0,5±0,1 1	0,42±0,2	0,49±	0,026± 0,005	0,07± 0,002
«СД»	10,41±1,75	0,65±0,08	0,268±0,09	65,4±2,33	18,4±1,49	16,4±2,6	0,092±0,037	1,44±0,43	1,00	7,75±3,04	2,14±0,75	1,89±0,65	0,16±0,06	0,34±0,10	0,23±0,02	0,014± 0,004	0,014± 0,004
«ГХД»	31,02±6,62	0,70±0,14	0,14±0,09	62±4,0	15±3,0	23±6,0	0,05±0,02	2,43±	1,00	18,71±4,01	4,29±2,22	6,76±1,71	0,32±0,15	0,38±0,12	0,45±0,19	0,04±0,01	0,04±0,01
«ГХД+К»	33,79±3,16	0,88±0,56	0,23±0,15	60,3±11,2	16,6±2,86	22,7±9,1	0,075±0,03	2,00±0,9	1,80±0,69	10,32±8,82	2,19±0,99	2,75±1,70	0,34±0,19	0,35±0,14	0,52±0,09	0,022± 0,009	0,012± 0,00041

Из таблицы 5.4 видно, что патогенные микроорганизмы не обнаружены во всех 3-х группах ни у одного животного. Во всех 3-х группах у всех животных в кишечной микробиоте регистрировались бифидобактерии в концентрации 10^9 КОЕ/г, лактобактерии 10^7 КОЕ/г, среднее общее количество кишечной палочки у животных составляло 10^7 КОЕ/г, не обнаружены клебсиелла, дрожжеподобные грибы, сапрофитный стафилококк и *Aspergillus* spp.

В группе «ГХД+К» лактозонегативная кишечная палочка не обнаружена ни у одного животного. Кокковые формы в общей сумме микроорганизмов составляли 0,1 %. Энтерококки определялись в количестве 10^6 КОЕ/г. Энтеробактер и *Bacillus* spp. не обнаружены ни у одного животного.

В группе «ГХД» лактозонегативная кишечная палочка обнаружена у 2-х животных из 10-ти (53 и 100%). Кокковые формы в общей сумме микроорганизмов составляли в среднем 3,3%. Энтерококки определялись в количестве 10^5 - 10^8 КОЕ/г. Энтеробактер был определен у 2-х мышей и составлял 10^7 и 10^8 КОЕ/г соответственно. *Bacillus* spp. высевался у 3-х из 10-и мышей – 10^4 - 10^8 КОЕ/г соответственно.

В группе «СД» лактозонегативная кишечная палочка была обнаружена у 3-х животных из 5-и и составляла 100 %. Кокковые формы в общей сумме микроорганизмов составляли в среднем 3,8 %. Энтерококки определялись в количестве 10^7 - 10^8 КОЕ/г. Энтеробактер и *Bacillus* spp. не были обнаружены ни у одного животного.

В отношении копрологического анализа (таблица 5.5) можно сказать следующее. В группе «ГХД+К» все копрологические показатели комплексного анализа микрофлоры кишечника мышей до и после эксперимента находятся на одном уровне. Показатели не указывают на нарушение по определенному копрологическому синдрому. Однако уровень метаболизма микрофлоры был снижен. Снижена концентрация масляной кислоты. Суммарная концентрация метаболитов находится в достаточном количестве. Активность протеолитической микрофлоры – в пределах

допустимых значений. Наблюдается баланс концентраций летучих жирных кислот.

В группе «ГХД» копрологические показатели не указывают на нарушения по определенному копрологическому синдрому. Уровень метаболизма микрофлоры снижен. Снижена концентрация масляной кислоты. Активность протеолитической микрофлоры в пределах допустимых значений. Наблюдается баланс концентраций летучих жирных кислот.

В группе «СД» копрологические показатели не указывают на нарушения по определенному синдрому. Активность протеолитической микрофлоры в пределах допустимых значений. Наблюдается баланс концентрации летучих жирных кислот. Снижены уровень метаболизма микрофлоры и концентрация масляной кислоты.

Таким образом, пробиотическая композиция, снижающая концентрацию холестерина, включающая *Bifidobacterium bifidum* GG-72, *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44, *Lactobacillus fermentum* LFM-2, *Lactobacillus plantarum* ГВИ-1, *Lactobacillus rhamnosus* LC-52GV в дозе 10^9 и 10^8 КОЕ/мл для бифидобактерий и лактобактерий соответственно, на фоне приёма гиперхолестериновой диеты (содержание холестерина 2%) по сравнению с контрольной группой способствовала у животных:

- снижению уровня общего холестерина и холестерина липидов низкой плотности;
- нормализации микробиоты кишечника: лактозонегативная кишечная палочка не высевалась, снизилось количество кокковых форм в общей сумме микроорганизмов до 0,1%;
- повышению суммарной концентрации метаболитов, при этом активность протеолитической микрофлоры находилась в пределах допустимых значений;
- восстановлению баланса концентраций летучих жирных кислот.

Полученные результаты подтверждены официальным заключением ФБУН «МНИИЭМ им. Габричевского» Роспотребнадзора (приложение 8).

5.3. Изучение возможности применения созданной пробиотической композиции для обогащения молочной продукции

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 [45].

При разработке технологии пастеризованного молочно-сокового напитка использовали молоко с растительным компонентом – сок.

Были составлены модельные системы пастеризованного молочно-сокового напитка, в состав которых вводили различные концентрации яблочного сока, который применяется наиболее широко. В состав составленных модельных систем вводили пробиотическую композицию с таким расчетом, чтобы количество клеток составляло не менее $1,0 \times 10^8$ КОЕ/см³.

Одним из важнейших и критичных показателей качества молочной продукции является титруемая кислотность. Полученные результаты определения титруемой кислотности модельных образцов приведены в таблице 5.6.

Представленные результаты изучения титруемой кислотности образцов модельных пастеризованных молочно-соковых напитков свидетельствуют о том, что смешение молока с соком в соотношении 1:1 привело к коагуляции молока, поэтому образец № 5 был отбракован.

Таблица 5.6 – Кислотность модельных образцов пастеризованных молочно-соковых напитков

№ образца	Рецептура образца	Титруемая кислотность, °Т*	Активная кислотность ед. рН**
1	Пастеризованное молоко (100 %) (контроль)	18±1	6,69±0,01
2	Пастеризованное молоко (90 %)+ сок (10 %)	21±1	6,34±0,01
3	Пастеризованное молоко	25±1	6,12±0,01

	(80 %)+ сок (20 %)		
4	Пастеризованное молоко (75 %)+ сок (25 %)	28±1	5,88±0,01
5	Пастеризованное молоко (50 %)+ сок (50 %)		

* – значение погрешности титруемой кислотности не превышало допустимых значений метода ± 1 ;

** – значение погрешности активной кислотности не превышало допустимых значений метода $\pm 0,01$;

Титруемая кислотность образцов № 2, 3, 4 с соком варьировала от 21 °Т до 28 °Т, при этом активная кислотность изменялась в пределах от 6,34 ед. рН до 5,88 ед. рН соответственно. Для выбора рецептуры напитка определяли органолептические показатели модельных образцов. Результаты, полученные с применением профильного метода оценки органолептических показателей, представлены на рисунке 5.6.

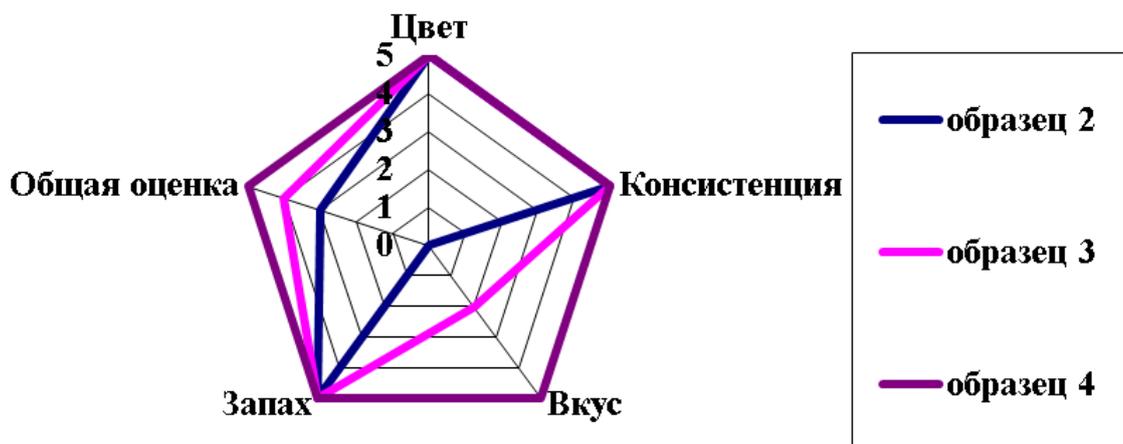


Рисунок 5.6 – Органолептические показатели модельных молочно-соковых напитков

Консистенция, цвет и запах у образцов № 2, 3 и 4 не отличались. Консистенция образцов была однородная по всей массе, без хлопьев, расслоения напитка не наблюдали.

Цвет был белый с легким кремовым оттенком. Образцы напитков имели запах пастеризованного молока. Вкус у всех образцов отличался: у образца № 2 отмечали невыраженный вкус яблочного сока (сок почти не ощущался), у образца № 3 слабовыраженный привкус яблочного сока, у

образца № 4 ярко выраженный вкус яблочного сока, очень приятный и освежающий.

Образцы исходного пастеризованного молока по микробиологическим требованиям соответствовали требованиям № 88-ФЗ и изменениям к нему от 22.07.20120 г. № 163-ФЗ: БГКП не были обнаружены в 1 см^3 , а КМАФАнМ составляло не более $1 \times 5 \text{ КОЕ/см}^3$.

Исходя из полученных значений кислотности и органолептических показателей, сделали вывод, что образец № 4 получил наибольшее количество баллов, поэтому было предложено использовать данную рецептуру за основу модельного пастеризованного молочно-сокового напитка.

При определении возможности применения пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, для обогащения пастеризованного молочно-сокового напитка применяли композицию в концентрации 1 г в 100 см^3 напитка.

Количество клеток в исходной сухой биомассе пробиотических бактерий составляло $10,48 \pm 0,4 \lg \text{ КОЕ/см}^3$, при внесении в продукт количество клеток составило $8,69 \pm 0,4 \lg \text{ КОЕ/см}^3$.

По истечении хранения напитка при температуре $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 суток определяли показатели качества.

Анализ органолептических показателей пастеризованного молочно-сокового напитка в процессе хранения (рисунок 5.7) показал, что на 0 сутки у контрольного и обогащенного созданной пробиотической композицией «b1» пастеризованного молочно-сокового напитка все органолептические показатели (цвет, запах, вкус и консистенция) не отличались. На 6 и 12 сутки цвет, запах и консистенция контрольного напитка не изменялись, в то время как вкус обогащенного напитка приобрел легкий кисловатый привкус. 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.

При обогащении молочных продуктов молочнокислыми бактериями в них регламентируется количество полезной микрофлоры. По этой причине определяли количества клеток бифидобактерий и лактобактерий в пастеризованном молочно-соковом напитке (таблица 5.7).

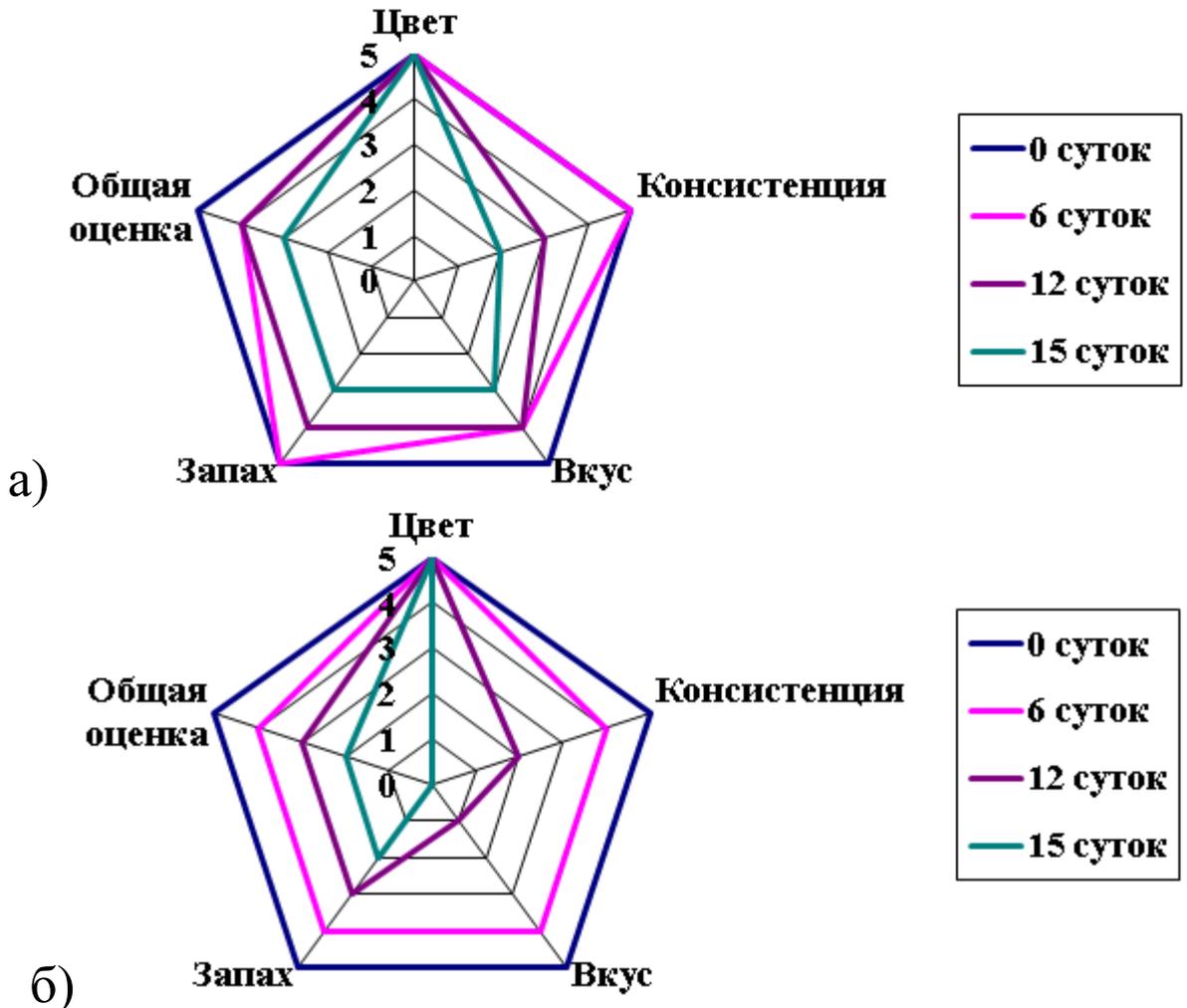


Рисунок 5.7 – Органолептические показатели пастеризованного молочно-сокового напитка в процессе хранения: а) контроль; б) напиток, обогащенный пробиотической композицией «b1»

Количество бифидобактерий и молочнокислых бактерий в пастеризованном молочно-соковом напитке составляло $3,8 \times 10^8$ КОЕ/см³, что отвечало требованиям федерального закона № 88 «Технический регламент на молоко и молочную продукцию», при нормируемом количестве бифидобактерий не менее 1×10^6 КОЕ/см³; лактобактерий – не менее 1×10^6 КОЕ/см³; БГКП не обнаружены в 0,01 см³.

Таблица 5.7 – Изменение количества клеток бифидобактерий и лактобактерий в пастеризованном молочно-соковом напитке в зависимости от продолжительности хранения

Время хранения, суток	Количество клеток, lgN*	
	Бифидобактерии	Молочнокислые палочки
0	8,25±0,3	8,85±0,4
6	8,10±0,5	8,60±0,3
12	7,69±0,3	8,48±0,4

* Примечание: N – количество клеток бактерий, КОЕ/см³

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 $t = 4 \pm 2^\circ \text{C}$ (с учетом коэффициента запаса).

Таким образом, был показан способ практического применения новой пробиотической композиции «b1» 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-P 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 $4\pm 2^\circ\text{C}$ – 3 месяца, при минус $18\pm 2^\circ\text{C}$ – 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.

Библиографический список

1. Алешкин, В.А. Пробиотики, пребиотики, синбиотики и их роль в поддержании иммуномикробиологического статуса человека [Текст] / В.А. Алешкин [и др.] // *Materia Medica*. – 2006. – С. 43-57.
2. Алешкин, В.А. Становление пробиотикотерапии в России [Текст] / В.А. Алешкин [и др.] // *Вестник РАМН*. – 2005. – № 12. – С. 3-13.
3. Алешкин, В.А. Новые подходы к конструированию препаратов-пробиотиков / В.А. Алешкин, А.М. Амерханова, А.К. Бандоян [Текст] // *Клиническая геронтология*. – 2001. – Т.7, № 8. – С.74-75.
4. Амерханова, А.М. Научно-производственная разработка новых препаратов-синбиотиков и клинико-лабораторная оценка их эффективности [Текст] : автореферат диссертации ... доктора биологических наук : 03.00.07, 03.00.23 / А.М. Амерханова. – М.: ФГУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора», 2010. – 49 с.
5. Амерханова, А.М. Роль пробиотических микроорганизмов в современных технологиях профилактической и восстановительной медицины и возможности повышения эффективности препаратов на их основе [Текст] / А.М. Амерханова [и др.] // *Новые лекарственные средства*. – 2007. – № 4. – С. 4-7.
6. Ананьева, Н.В. Влияние экзополисахаридов на стрессоустойчивость пробиотических культур [Текст] / Н.В. Ананьева, В.И. Ганина // *Клиническое питание, № 1-2: материалы Международного конгресса «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты, 15-16 мая, 2007.* – С. 20.
7. Ананьева, Н.В. Оценка методов исследования взаимодействия бактерий с клетками животных [Текст] / Н.В. Ананьева, В.И. Ганина, Е.М. Ленченко, Н.Н. Ванина // *Доклады РАСХН*. – 2007. – № 3. – С. 53-55.

8. Анисимов, Г.С. Биокисломолочное мороженое с функциональными свойствами [Текст] / Г.С. Анисимов [и др.] // Молочная промышленность. – 2013. - № 8. – С.51-52.
9. Анохина, И.В. Характеристика поверхностных адгезинов лактобактерий, используемых при изготовлении препаратов пробиотиков [Текст] / И.В. Анохина [и др.] // Бюлл. Эксп. Биол. и Мед. – 2006. – Т.141. № 6 – С. 716-719.
10. Артюхова, С.И. Разработка технологии производства функционального биопродукта «Целебный» в сублимированной форме / С.И. Артюхова, Т.Т. Толстогузова // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11. – С. 1557-1561.
11. Артюхова, С.И. Научно-экспериментальное обоснование биотехнологий синбиотических молочных продуктов : диссертация ... диссертация ... доктора технических наук : 03.00.23 [Текст] / Артюхова Светлана Ивановна; [Место защиты: ГОУ ВПО «Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Восточно-Сибирский Государственный Технологический Университет»]. – Улан-Удэ, 2006. – 433.
12. Артюхова, С.И. Использование пробиотиков в биотехнологии домашнего сыра для функционального питания: Монография [Текст] / С.И. Артюхова, Н.В. Лашина. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2005. – 82 с.
13. Баранова, Е.А. Использование в технологии мясных продуктов стартовых культур, синтезирующих бактериоцины [Текст] / Е.А. Баранова [и др.] // Материалы VI Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения». – М.: МГУПБ, 2007. – С. 156-158.
14. Баранова, Е.А. Изучение молочнокислых микроорганизмов, продуцентов бактериоцинов [Текст] / Е.А. Баранова [и др.] // Материалы Четвертого Московского международного конгресса

- «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 12-16 марта, 2007 г.). – М.: ЗАО «Экспо-биохимтехнологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. – С. 15-22.
15. Биологические и микробиологические факторы. Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах: МУК 4.2.999-00: утв. Главным гос. сан. врачом РФ, Первым заместителем Министра здравоохранения, 08. 11. 2000 : введ. в действие с 08.02.2001.
 16. Блинкова, Л.П. Биотехнологические условия синтеза бактериоцинов / Л.П. Блинкова [Текст] // Микробиология. – 2006. – № 2. – С. 83-89.
 17. Богданов, И.Г. Противоопухолевое действие гликопептидов клеточной стенки *L. bulgaricus* [Текст] / И.Г. Богданов [и др.] // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 1977. – № 84. – С. 709-712.
 18. Бондаренко, В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации [Текст] / В.М. Бондаренко // Тверь, ООО «Издательство «Триада», 2001- 88 с.
 19. Буторова, Л.И. Значение лактулозы в регуляции кишечной микрофлоры [Текст] / Л.И. Буторова, А.В. Калинин // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии – 2002. – № 6. – С. 21-26.
 20. ВОЗ: Информационный бюллетень № 317, «Сердечно-сосудистые заболевания», Женева, Швейцария, сентябрь 2009 г.
 21. Бухарин, О.В. Антагонистическая активность бифидофлоры кишечного биотопа в норме и при дисбиозах [Текст] / О.В. Бухарин [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2009. – № 3. – С. 35-37.
 22. Гаврилова, Н.Б. Кисломолочный продукт с пробиотическими свойствами, обогащенный кальцием [Текст] / Н.Б. Гаврилова, О.А. Гладилова // Молочная промышленность. – 2009. - № 11. – С. 76-77.
 23. Гаврилова, Н.Б. Десертные продукты с иммобилизованными пробиотиками [Текст] / Н.Б. Гаврилова, О.В. Пасько, Т.А. Назаренко // Молочная промышленность. – 2008. - № 7. - С. 68 - 69.

24. Донская, Г.А. Молочная сыворотка в функциональных продуктах [Текст] / Г.А. Донская, Г.В. Фриденберг // Молочная промышленность : научно-технический и производственный журнал. – 2013. – № 6. – С. 52-54.
25. Ганина, В.И. Перспективы применения ЭПС-стартерных культур молочнокислых бактерий [Текст] / В.И. Ганина, Т.В. Рожкова, С.И. Хвыля // Молочная река, 2005. - № 3 (19). – С.19.
26. Ганина, В.И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии: Монография [Текст] / В.И. Ганина. – М.: Изд-во МГУПБ, 2001а.- 169 с.
27. Ганина, В.И. Действие пробиотических продуктов на возбудителей кишечных инфекций [Текст] / В.И. Ганина, Е.В. Большакова // Молочная промышленность. – 2001б. - № 11. – С. 47-48.
28. Ганина, В.И. Бифацид – новый отечественный биологический препарат [Текст] / В.И. Ганина, В.Ф. Семенихина [и др.] // Дисбактериозы и эубиотики. – 1996. - С.12.
29. Громовых, Т.И. Бактериальная целлюлоза на основе штамма *Glucanacetobacter hansenii* GH-1/2008 – потенциальный материал для медицины [Текст] / Т.И. Громовых, Хань Фан Ми, А.Г. Маскаева // Материалы II Международной научно-практической Интернет – конференции "Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы".- 2013.
30. Евдокимов, И.А. Кисломолочный напиток с пребиотиком «Лаэль» / И.А. Евдокимов, В.В. Крючкова, А.В. Серов, Д.В. Харитонов // Молочная промышленность. - 2004 - № 5 - С.33.
31. Евдокимов, И.А. Синбиотические молочные продукты / И.А. Евдокимов // Молочная промышленность. – 2004 – № 4 – С.41-42.
32. Забодалова, Л.А. Техничко-химический и микробиологический контроль на предприятиях молочной промышленности [Текст] : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки дипломированного специалиста 260300

- "Технология сырья и продуктов животного происхождения" по специальности 260303 "Технология молока и молочных продуктов" [Текст] / Л.А. Забодалова; рец.: Т.И. Шингарева, В.В. Шевченко. - Санкт-Петербург : Троицкий мост, 2009. - 224 с.
33. Забодалова, Л.А. Функциональные пищевые продукты - путь к здоровью [Текст] / Л.А. Забодалова // Переработка молока: технология, оборудование, продукция. – 2006. – № 11. – С. 8-11.
34. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования [Текст] / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 384 с.
35. Козлов, А.В., Нефедова Н.В., Моисеева Е.В., Скрабелинская Е.И., Черемных Е.Г. Изучение влияния пищевой добавки хитозоль на биологическую активность инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и проявление признаков хронического дерматита у мышей СБРВ // Успехи // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 4 – С. 50-51.
36. Козлов, А.В. Разработка антимикробной композиции на основе низина и хитозана для применения в технологии натуральных мясных полуфабрикатов, копченостей и ветчины : диссертация ... кандидата техн. наук : 05.18.04 [Текст] / Козлов Антон Викторович; [Место защиты: ГОУ ВПО «Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет прикладной биотехнологии»]. – Москва, 2010. – 206 с.
37. Комплекс метаболитов бифидобактерий и косметическое средство на его основе: пат. 2241441 Рос. Федерация: МПК 7 А61К7/48, А61К35/74, А61К35/78 [Текст] / А.С. Голубков, В.С. Тульский; заявитель и патентообладатель ЗАО "МИРРА-М". – рег. № 2003106383/15 заявл. 07.03.2003; опубл. 10.12.2004.
38. Коршунов, В.М. Коррекция микробиоты кишечника при химиотерапевтических дисбактериозах с помощью аутоштаммов

- бифидобактерий и лактобацилл [Текст] / В.М. Коршунов [и др.] // Микробиология – 1983. – № 9. – С. 20-25.
39. Кольман, Ян Наглядная биохимия [Текст] / Ян Кольман, К. Г. Рем. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 472 с.
40. Красникова, Л.В. Бифидобактерии и использование их в молочной промышленности [Текст] / Л.В. Красникова, И.В. Салахова, В.И. Шаробайко [и др.] // – М.: АгроНИИТЭИмясомолпром (обзорная информация), 1992. – 30 с.
41. Лодыгин, А.Д. Концентраты с пребиотическими свойствами на основе молочной сыворотки [Текст] / А.Д. Лодыгин, И.А. Евдокимов, С.А. Рябцева // Молочная промышленность. – 2006. – № 6. – С. 69-70.
42. Машенцева, Н.Г. Теоретическое обоснование совершенствования промышленно-ценных свойств стартовых культур и их практическое применение в технологии мясных продуктов : диссертация ... доктора технических наук : 05.18.07 [Текст] / Машенцева Наталья Геннадьевна; [Место защиты: ГОУ ВПО «Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет прикладной биотехнологии»]. – Москва, 2008. – 261 с.
43. Нефедова, Н.В. Предотвращение порчи мясных продуктов [Текст] / Н. В. Нефедова [и др.] // Мясная индустрия. – 2008. – N. 12. – С. 18-20.
44. Нефедова, Н.В. Теоретическое и практическое обоснование применения пробиотических культур в биомодификации животного и растительного сырья : диссертация ... доктора технических наук : 05.18.07 [Текст] / Нефедова Нина Васильевна; [Место защиты: ГОУ ВПО «Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.Ю. Ломоносова»]. – Москва, 2005. – 448 с.

45. Остроумов, Л.А. Вклад Кемеровского Технологического Института Пищевой Промышленности в науку о молоке / Л.А. Остроумов // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – Т.3. – С. 68-76.
46. Петухов, В.А. Нарушения функций печени и дисбиоз при липидном дистресс синдроме Савельева: современный взгляд на проблему [Текст] / В.А. Петухов, Л.А. Стернина, А.Е. Травкин // «Consilium Medicum». – 2004. – Т. 6. № 6.
47. Пинегин, Б.В. Совместное использование антибиотиков и антибиотикоустойчивых бифидобактерий при лечении острых кишечных инфекций [Текст] / Пинегин, Б.В. [и др.] // Микробиология – 1983. – № 5. – С. 28-32.
48. Полянская, И.С., Антибиотическая активность молочнокислых бактерий к стафилококкам [Текст] / И.С. Полянская, В.Ф. Семенихина // Молочная промышленность. – 2014. – № 5. – С. 48-49.
49. Пospelова, В.В. Пробиотик «Ацилакт»: патогенетические механизмы, его лекарственные формы и сферы применения / В.В. Пospelова [и др.] // Сб. материалов конф. «Современные технологии в диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней у детей». - Москва, МОНИКИ, 2008. - С. 210 - 213.
50. Пospelова, В.В. Пробиотик Ацилакт и перспективы применения при ротавирусной инфекции / В.В. Пospelова [и др.] // Сб. материалов Всерос. научно-практич. конф. «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств и профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – Москва, 2008. - С. 99.
51. Пospelова, В.В. Биопрепараты, нормализующие микрофлору кишечника: итоги двадцатилетних исследований по проблеме [Текст] / В.В. Пospelова [и др.] // В сб.: Антибиотики и колонизационная резистентность. – М., 1990. – С. 172–181.

52. Постникова, Е.А. Изучение качественного и количественного состава микробиоты кишечника у клинически здоровых детей в раннем возрасте [Текст] / Е.А. Постникова, А.П. Пикина, Л.И. Кафарская [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 1. – С. 62-67.
53. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25 октября 2010 г. № 1873-р. Основы государственной политики в области здорового питания населения на период до 2020. [Текст] // Российская Газета. - 2010. - № 5328. - С. 7.
54. Рогов, И.А. Синбиотики в технологии продуктов питания: Монография [Текст] / И.А.Рогов, Е.И. Титов, В.И. Ганина, Н.В. Нефедова, Г.В. Семенов, С.И. Рогов. – М.: МГУПБ, 2006. – 218 с.
55. Семенихина, В.Ф. Подбор бактериальных культур для производства йогурта с длительным сроком хранения [Текст] / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, А.А. Абрамова // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 40. - № 1. – С. 180-183.
56. Старовойтова, С.А., Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* перспективных для создания пробиотиков [Текст] / С.А. Старовойтова, Л.Н. Лазаренко, Н.А. Тимошок // Наук. вісн. Ужг. ун-ту. Сер. Біол. – 2009. – Вип. 26. – С. 216-219.
57. Стоянова, Л.Г. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: их разнообразие и свойства [Текст] / Л.Г. Стоянова, Е.А. Устюгова, А.И. Нетрусов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. - № 3. - С. 259-275.
58. Стоянова, Л.Г. Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование [Текст] : автореферат диссертации ... доктора биологических наук : 03.00.07, 03.00.23 / Л.Г. Стоянова. – М.: МГУ, 2008. – 47 с.
59. Стоянова, Л.Г. Регуляция синтеза бактериоцина рекомбинантного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116 компонентным составом

- среды [Текст] / Л.Г. Стоянова, Н.В. Левина // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 3. – С. 286-291.
60. Стоянова, Л.Г. Влияние фосфата и углеводов на синтез низина *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм 194 [Текст] / Л.Г. Стоянова, Т.Д. Сульtimiова, А.И. Нетрусов // Вестник Московского Университета, сер. Биология. – 2005. – Т. 16. – № 4. – С. 17-22.
61. Субботина, М.Е. Определение видовой принадлежности штаммов бифидобактерий на основе секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и трансальдолазы [Текст] / М.Е. Субботина, О.Л. Воронина, В.Г. Лунин, О.Г. Жиленкова, А.М. Амерханова // Доклады РАСХН. – 2006. – № 5. – С. 9-12.
62. Титов, Е.И. Стартовые культуры, снижающие содержание холестерина, в мясных продуктах [Текст] / Е.И. Титов [и др.] // Мясная индустрия. - 2012. - № 2. - С. 22-25.
63. Ускова, М.А. Изучение свойств пробиотических молочнокислых бактерий как биологически активных компонентов пищи [Текст] : дис. ...канд. биол. Наук : защищена 03.01.04. / М.А. Ускова. – М., 2010. – 178 с.
64. Устюгова, Е.А. Характеристика и идентификация бактериоцинов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К [Текст] / Е.А. Устюгова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология – 2012. – Т. 48. – № 6. – С. 637-645.
65. Фан Ми, Х. Получение бактериальной целлюлозы микробиологическим синтезом / Х. Фан Ми, Т.И. Громовых // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – № 5 – 2012. – С. 67-68.
66. Федотова, М.А. Разработка технологии мороженого с пробиотическими культурами : диссертация ... кандидата технических наук: 05.18.04 [Текст] / Федотова Марина Александровна; [Место защиты: ГОУ ВПО «Государственное образовательное учреждение высшего

- профессионального образования «Московский государственный университет прикладной биотехнологии»]. – Москва, 2008. – 148 с.
67. Феклисова, Л.В. Новый микробный препарат «Бифацид» при лечении детей больных с острыми кишечными заболеваниями [Текст] / Л.В. Феклисова, В.И. Ганина, В.Ф. Иноземцева, Л.В. Титова, О.Ю. Леонтьева // «Российский вестник перенотологии и педиатрии». - М., 1995. - № 7. - С. 21-26.
68. Фильчакова, С.А. Микробиологический состав кисломолочного мороженого / С.А. Фильчакова // Переработка молока. – 2004. – № 12. – С. 13.
69. Функциональный продукт питания: пат. 2257122 Рос. Федерация: МПК 7 A23L1/03, C12N1/20 [Текст] / Г.В. Семенов, Н.В. Нефедова [и др.] заявитель и патентообладатель Г.В. Семенов, Н.В. Нефедова [и др.] – рег. № 2003137728/13 заявл. 30.12.2003; опубл. 27.07.2005.
70. Хамагаева, И.С. Исследование пробиотических свойств комбинированной закваски [Текст] / И.С. Хамагаева, И.В. Бояринева, Н.Ю. Потапчук // Техника и технологии пищевых производств. – 2013. – Т.28. – № 1. – С.54- 58.
71. Хамагаева, И.С. Исследование холестеринметаболизирующих свойств пробиотических микроорганизмов [Текст] / И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова, Н.А. Замбалова // Молочная промышленность. – 2011. – № 10. – С. 56.
72. Хамагаева, И.С. Влияние условий культивирования на качество бактериальных концентратов с холестеринметаболизирующими свойствами [Текст] / И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова, Н.А. Замбалова, Тиасонг Сан // Вестник ВСГУТУ. – 2011. – № 3. – С.85-88.
73. Харитонов, В.Д. Приоритетные направления развития пищевых технологий [Текст] / В.Д. Харитонов // Молочная промышленность. – 2014. – № 5. – С. 4-5.

74. Храмов, А.Г. Доктрина инновационных технологий молочных продуктов возможности реализации [Текст] / А.Г. Храмов // Молочная промышленность. – 2008. – № 4. – С. 64-67.
75. Храмов, А.Г. Функциональные напитки из молочной сыворотки [Текст] / А.Г. Храмов, И.А. Евдокимов, О.А. Суюнчев // Переработка молока. – 2006. – № 12. – С. 24-25.
76. Цыбикова, А.Х. Разработка технологии биологически активной добавки на основе *Lactobacillus helveticus* 35-1 и *Propionibacterium shermanii* АС 2503 [Текст] / А.Х. Цыбикова, И.С. Хамагаева // Мат-лы XI междунар. конф. молодых ученых «Пищевая технология и биотехнология». Казань, 2010. – С.130-131.
77. Цэнд-Аюуш, Ч. Пробиотические свойства молочнокислых бактерий, выделенных из национальных молочнокислых продуктов Монголии / Ч. Цэнд-Аюуш, В.И. Ганина // Техника и технология пищевых производств, 2013. - № 1. – С. 58-63.
78. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3 т. Т. 3. Пробиотики и функциональное питание [Текст] / Б.А. Шендеров. – М.: Грантъ, 2001. – 288 с.
79. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том 1: Микробиота человека и животных и ее функции [Текст] / Б.А. Шендеров. – М.: Грантъ, 1998. – 290 с.
80. Шкопоров, А.Н. Бифидобактерии: традиционный взгляд и современные генетические исследования [Текст] / А.Н. Шкопоров, Б.А. Ефимов, Н.Н. Володин, Л.И. Кафарская // Вопросы практической педиатрии. – 2007. – Т. 2, № 5. – С. 76-79.
81. Эрвольдер, Т.М. Влияние предварительной активизации лиофилизированной биомассы на развитие бифидобактерий в продуктах «Бифидок» [Текст] / Т.М. Эрвольдер // Молочная промышленность. – 2002. – № 12. – С. 41 - 42.

82. Янковский, Д.С. Роль пробиотиков в охороні здоров'я матері та дитини [Текст] / Д.С. Янковский, Г.С. Дымент // Зб. пр. наук._практ. конф. Пробиотики XXI столетия. Достижения, проблемы, дискуссии. – 2006. – С. 7-18.
83. Янковский, Д.С. Симбионты рода *Bifidobacterium* и стратегия их использования при конструировании мультикомпонентных пробиотиков [Текст] / Д.С. Янковский, Г.С. Дымент // Современная педиатрия. – 2006. – № 1 – С. 10.
84. Янковский, Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления [Текст] / Д.С. Янковский. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.
85. Abedi, D. *In vitro* antibacterial and antiadherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli* / D. Abedi [et al.] // Res. Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. 260-268.
86. Aguilar, C. Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk / C. Aguilar, C. Vanegas, B. Klotz // J. Dairy Res. – 2011. – Vol. 78, № 2. – P.136-143.
87. Aiba, Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic model / Y. Aiba // Am J. Gastroenterol. – 1998. – Vol. 93. – P. 2097-2101.
88. Al-Saleh, A.A. Bile Salts and Acid Tolerance and Cholesterol Removal from Media by some Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria / A.A Al-Saleh; A.A. M. Metwalli, H.M. Abu-Tarboush // J. Saudi Soc. for Food and Nutrition. – 2006. - Vol. 1, №. 1. – 17 p.
89. Annuk, H. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates / H. Annuk [at al.] // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 94. – P. 403–412.
90. Bäckhed, F. Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat? / F. Bäckhed, M. Hornef // Microbas Infect. – 2003 – Vol. 5, № 11. – P. 951-959.

91. Bao, Y. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products / Y. Bao [et al.] // Food. Control. – Vol. 21. – P. 695–701.
92. Benedict, C. Enhancing influence of intranasal interleukin-6 on slow-wave activity and memory consolidation during sleep / C. Benedict [et al.] // FASEB J. – 2009. – Vol. 23, № 10. – P. 3629–3636.
93. Bermudez-Brito, M. Probiotic Mechanisms of Action / M. Bermudez-Brito [et al.] // Ann Nutr Metab. – 2012. – Vol. 61. – P. 160–174.
94. Bhatia, S.J. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori in vitro* / S.J. Bhatia [at al.] // J. Clin. Microbiol. – 1989. – Vol. 27. – P. 2328–2330.
95. Biavati, B. The Family Bifidobacteriaceae / B. Biavati // The Prokaryotes. Third Edition: a handbook on the Biology of Bacteria: Synbiotic Association, Biotechnology, Applied Microbiology / P. Mattarelli, B. Biavati. – Singapore: Springer Science, 2006. – Vol. 3. – P. 322-382.
96. Brown, H.H. Rapid procedure for determination of free serum cholesterol / H. H. Brown [et al.] // Analytical chemistry. – 1954. – Vol. 26, № 2. – P. 397-399.
97. Bordoni, A. Cholesterol-lowering probiotics: *in vitro* selection and *in vivo* testing of bifidobacteria / A. Bordoni [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 97. – P. 8273-8281.
98. Bujňáková, D. Aggregation of lactobacilli and bifidobacteria with *Escherichia coli* O157 / D. Bujňáková [et al.] // Folia Microbiol. – 2004. – Vol. 49. – P. 143-146.
99. Candela. M Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production / M. Candela [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2008. – Vol. 125. – P. 286-292.

100. Canzi, E. Modulation by lactic acid bacteria of the intestinal ecosystem and plasma cholesterol in rabbits fed a casein diet / E. Canzi [et al.] // *Nutr. Res.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1329-1340.
101. Castagliuolo, I. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice / I. Castagliuolo [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 197-204.
102. Challa, A. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats / A. Challa [et al.] // *Carcinogenesis.* – 1997. – Vol. 18. – P. 517–521.
103. Cheikhyoussef, A. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application / A. Cheikhyoussef, N. Pogori, H. Zhang // *International Journal of Food Microbiology.* - 2008. - Vol.125. - P. 215-222.
104. Chenoll, E. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* / E. Chenoll [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 77. – P. 1335-1343.
105. Christensen, J.E. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria / J.E. Christensen [et al.] // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1999. – Vol. 76. – P. 2117-2146.
106. Collado, M.C. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion / M.C. Collado [et al.] // *J. Food Prot.* – 2005. – Vol. 68. – P. 2672-2678.
107. Crowe, J.H. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state / J.H. Crowe [et al.] // *Cryobiol.* – 2001. – Vol. 43. – P. 89-105.
108. Deepika, G. Influence of fermentation conditions on the surface properties and adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG / G. Deepika, E. Karunakaran, C.H. Hurley, C.A. Biggs, D. Charalampopoulos // *Microbial Cell Factories.* – 2012. – Vol. 11. - P. 116.

109. Dunne, C. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings / C. Dunne [et al.] // *Am J Clin Nutr.* - 2001. - Vol. 73. - P. 386-392.
110. Driessen, A.J. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane / A.J. Driessen, N. Nouwen // *Annu Rev. Biochem.* – 2008. – Vol. 77. – P. 643-667.
111. Fellis, G.E. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* / G.E. Fellis, F. Dellagio // *Curr. Issues Intest Microbiol.* – 2007. – Vol.8, № 2. – P. 44-61.
112. Fermentas. Molecular biology : Catalogue & Application Guide, 1998/1999 / Lithuania. – Vilnius.: Fermentas UAB, 1997. – 152 p.
113. FitzGerald, R.J. Bioactive peptides and lactic fermentations / R.J. FitzGerald, B.A. Murray // *Int. J. Dairy Technol.* – 2006. – Vol. 59. – P. 118-125.
114. Fogh, J. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice / J. Fogh, J.M. Fogh, T. Orfeo // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1977. - Vol. 59. - P. 221-226.
115. Fuller, R. Probiotics: their development and use / R. Fuller [et al.] // *Probiotics: prospects of the use in opportunistic infections*, Old Herborn University Seminar Monograph. *Inst. Microbiol. Biochem. Herborn.* – Dill, Germany, 1995. – P.1-8.
116. Gänzle, M.G. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough / M.G. Gänzle, N. Vermeulen, R.F. Vogel // *Food Microbiol.* – 2007. – Vol. 24. – P. 128-138.
117. Gearhart, J. Pluripotency redux-advances in stem-cell research / J. Gearhart, E.E. Pashos, M.K. Prasad // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 357, № 15. – P. 1469-1472.
118. Getz, G.S. Animal Models of Atherosclerosis / Godfrey S. Getz and Catherine A. Reardon // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2012. – Vol. 32, № 5. – P. 1104–1115.

119. Gibson, G.R. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria / G.R. Gibson, X. Wang // J. Appl. Bacteriol. – 1994. – Vol. 77. –P. 412-420.
120. Gillor, O. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials / O. Gillor, L.M. Nigro, M.A. Riley // Curr. Pharm. Des. – 2005. – V.11., № 8. – P. 1067-1075.
121. Gotteland, M. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? / M. Gotteland, O. Brunser, S. Cruchet Aliment // Pharmacol. Ther. – 2006. – Vol. 23, № 10. – P. 1077-1086.
122. Gołek, P. Characteristics of adhesive properties of *Lactobacillus* strains synthesising biosurfactants / P. Gołek, W. Bednarskil, M. Lewandowska // Pol. J. Natur. Sc. - 2007 - Vol. 22. - P. 333-342.
123. Guo, L. -D. Cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* isolated from homemade fermented cream in Inner Mongolia of China / L. -D. Guo, L. -J. Yang, G. -Ch. Huo // Czech. J. Food Sci. – 2011. – Vol. 29, № 3. – P. 219-225.
124. Guo, C. Cholesterol-lowering effects of probiotics / C. Guo, L. Zhang // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2010. – Vol. 50, № 12. – P. 1590-1599.
125. Hashimoto, H. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* TMC 0409 strain observed in the rats fed cholesterol contained diets / H. Hashimoto [et al.] // Anim. Sci. J. – 1999. – Vol. 72. – P. 90-97.
126. Hatakka, K. *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids / K. Hatakka [et al.] // J. Am. Coll. Nutr. – 2008. – Vol. 27, № 4. – P. 441-447.
127. Hestrin, S. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum* / S. Hestrin, D.S. Feingold, G. Avigad // Biochem. J. – 1956. – Vol. 64. – P. 340–351.

128. Hirayama, K. The role of lactic acid in colon cancer prevention: Mechanistic considerations / K. Hirayama, J. Rafter // *Ant. v. Leeuwenhoek.* – 1999. – Vol. 76. – P. 391-394.
129. Horošová, K. Effect of Lactobacilli on *E. coli* adhesion to Caco-2 cells *in vitro* / K. Horošová, D. Bujňáková, V. Kmet // *Folia Microbiol.* – 2006. – Vol. 51, № 4. – P. 281-282.
130. Huber, R.E. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of b-galactosidase (*E. coli*) on lactose / R.E. Huber, G. Kurz, K. Wallenfels // *Biochem.* – 1976. – Vol. 15. – P. 1994-2001.
131. Hütt, P. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens / P. Hütt [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 2006. – V. 100, № 6. – P. 1324-1332.
132. Innis, M.A. Optimization of PCR Protocol. Guide to methods and application / M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.P. Sninsky. – New York: Academic Press, 1990. – P. 14-15.
133. 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 [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2001. – Vol. 73. – P. 386-392.
134. Juillard, V. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis* / V. Juillard [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – P. 1230-1236.
135. Kim, G. -B. Cloning and characterization of the bile salt hydrolase genes (bsh) from *Bifidobacterium bifidum* strains / G. -B. Kim [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2004. – Vol. 70. № 9. – P. 5603-5612.
136. Kim, T.S. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria / T.S. Kim [et al.] // *J. Food Prot.* – 2003. – Vol. 66. – P. 3-12.

137. Kitov, P.L. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands / P.L. Kitov [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – P. 669–672.
138. Klaenhammer, T.R. Genetics of bacteriocins producer by lactic acid bacteria / T.R. Klaenhammer // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1993. – V. 12. – P. 39-85.
139. Kolida, S. The prebiotic effect: review of experimental and human data / S. Kolida // *Handbook of Probiotics* / G.R. Gibson, S. Kolida ; edit. M.B. Roberfroid. – Boca Raton: CRC Press, 2008. – P. 69-92.
140. Korakli, M. Structure-function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans / M. Korakli, R.F. Vogel // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 71 – P. 790-803.
141. Korhonen, H. Food-derived bioactive peptides / H. Korhonen, A. Pihlanto // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Vol. 9. – P. 1297-1308.
142. Korschunov, V.M. Therapeutic use of an antibiotic-resistant *Bifidobacterium* preparation in men exposed to high-dose gamma irradiation / V.M. Korschunov [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 1996. – Vol. 44. – P. 70-74.
143. Kulkarni, N. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase / N. Kulkarni, B.S. Reddy // *Proc. Soc. Exp. Biol.* – 1994. – Med. – Vol. 207. – P. 278-283.
144. Kumar, M. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases / M. Kumar [et al.] // *Experimental Diabetes Research*. – 2012. – T. 2012. – P. 14.
145. Lee, D.K. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content / Lee do K. [et al.] // *Lipids in Health and Disease*. – 2009. – Vol. 8, № 21. – 8 p.
146. Lee, Y. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria / Y. Lee [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 9. – P. 3692-3697.

147. Lim, H. -J. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use / H. -J. Lim, S. -Y. Kim, W. -K. Lee // J. Vet. Sci. – 2004 – Vol. 5, № 4. – P. 391-395.
148. Lorca, G.L. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* *in vitro* / G.L. Lorca // Curr. Microbiol. – 2001. – Vol. 42. – P. 39-44.
149. Lye, H.S. Growth Properties and Cholesterol Removal Ability of Electroporated *Lactobacillus acidophilus* BT 1088 / H.S. Lye, B.Y. Khoo, A.A. Karim, G. Rusul, and M.T. Liong // J. Microbiol. Biotechnol. – 2012 – Vol. 22(7). – P. 981-989.
150. Lye, H.S. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol / H.S. Lye, G. Rusul, M.T. Liong // J. Dairy Sci. – 2010. – Vol. 93, № 4. – P.1383-1392.
151. Macfarland, G.T. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function / G.T. Macfarland [et al.] // The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease – New York: Raven Press, 1991. – P. 51-92.
152. Mahrous, H. Probiotics bacteria from egyptian infants cause cholesterol removal in media and survive in yoghurt / H. Mahrous // Food and Nutrition Sciences. – 2011. – Vol. 2. – P. 150-155.
153. Matijašić, B.B. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion *in vitro* on Caco-2 cells and *ex vivo* on pigs' jejunal tissue / B.B. Matijašić [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2006. – Vol. 107. – P. 92-96.
154. Mego, M. Inramucosal bacteria in colon cancer and their elimination by probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 with organic selenium / M. Mego [et al.] // Folia Microbio. – 2005. – Vol. 50. – P. 443-447.
155. Michetti, P. / Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans / P. Michetti [et al.] // Digestion. – 1999. – Vol. 60. – P. 203-209.

156. Midolo, P.D. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria / P.D. Midolo // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – Vol. 79. – P. 475-479.
157. Minervini, F. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species / F. Minervini [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – P. 5297-5305.
158. Muñoz, J.A. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections / J.A. Muñoz [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77. – P. 8775-8783.
159. Nakamura, S. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice / S. Nakamura [et al.] // Anaerobe. – 2012. – Vol. 18. – P. 19-24.
160. Nakamura, Y. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme / Y. Nakamura [et al.] // J. Dairy Sci. – 1995. – Vol. 78. – P. 1253-1257.
161. Nes, I.F. Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria / I.F. Nes [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 1996. – Vol. 70. – P. 113-128.
162. Nettles, C.G. Biochemical and genetic characteristic of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria / C.G. Nettles, S.F. Barefoost // J. Food Prot. – 1993. – Vol. 56. – P. 338-356.
163. Ouwehand, A.C. Probiotics: an overview of beneficial effects / A.C. Ouwehand, S. Salminen, E. Isolauri // J. Microbiol. - 2003. - Vol. 41, № 2. – P. 63-72.
164. Ouwehand, A.C. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups / A.C. Ouwehand [et al.] // FEMS. Microbiol. Lett. – 1999. – Vol. 172, № 1. – P. 61-64.

165. Orrhage, K. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria / K. Orrhage, E. Sillerstrom, J. A. Gustaffson, C.E. Nord, J. Rafter // *Mutation Res.* – 1994 – Vol. 311 – P. 239-248.
166. Pavlicek, A.S. Free-tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* / A.S. Pavlicek, Hrda and J. Flegr // *Folia Biol. (Praha).* - 1999. - Vol.45. - P. 97-99.
167. Park, Y.H. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats / Y.H. Park [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 655-662.
168. Parvez, S. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health / S. Parvez [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 2006. – Vol. 100. – P. 1171-1185.
169. Pिकासова, O.V. Methods of Molecular Identification as Important Tools for Control and Certification in Microbiology / O.V. Pिकासова, M.A. Kornienko, Yu. D. Tsygankov, A.I. Netrusov // *Electronic Journal of Natural Sciences.* - 2009. - Vol. 1. - P. 35-49.
170. Rodrigues, K.L. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefirian extract. / K. L. Rodrigues [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2005 – Vol. 25, № 5. – P. 404-408.
171. Schleifer, H. *The Prokaryotes. Third Edition* / H. Schleifer, E. Stackenbrand. – Singapore: Springer Science, 2006. – Vol. 3.
172. Tahri, K. Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria / K. Tahri, J.P. Grill, F. Schneider // *Curr. Microbiol.* – 1997. – Vol.34, № 2. – P. 79-84.
173. Reddy, B.S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth / B.S. Reddy // *J. Nutr.* – 1999. – Vol. 129. – P. 1478-1482.

174. Reddy, B. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline, a food mutagen / B.S. Reddy, A. Rivenson // *Cancer Res.* – 1993 – Vol. 53, № 17. – P. 3914-3918.
175. Ribosomal Database Project II (<http://www.cme.msu.edu>).
176. Rolfe, R. Bacterial interference between *Clostridium difficile* and normal microflora / R. Rolfe, S. Helebian, S. Finegold // *J. Infect. Dis.* – 1981 Vol.143. – P. 470-475.
177. Saavendra, J.M. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus / J.M. Saavendra [at al.] // *Lancet.* – 1994. – Vol. 344. – P. 1046-1049.
178. Salof-Coste, C.J. Bifidobacteria / C.J. Salof-Coste // *Danone World Newsletter.* - 1997. - Vol. 16. - P. 1-12.
179. Sánchez, B. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions / B. Sánchez, M.C. Urdaci, A. Margolles // *Microbiology.* – 2010. – Vol. 156. – P. 3232-3242.
180. Sánchez, B. A method for the identification of proteins secreted by lactic acid bacteria grown in complex media / B. Sánchez [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – Vol. 295. P. 226-229.
181. Sánchez, B. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host / B. Sánchez, P. Bressollier, M.C. Urdaci // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 54. – P. 1-17.
182. Schillinger, U. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt like products / U. Schillinger, C. Guigas, W. H. Holzapfel // *International Dairy Journal.* – 2005. – Vol. 15. – P. 1289-1297.

183. Sgouras, D. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota / D. Sgouras [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 518-526.
184. Shen, Q. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians / Q. Shen, N. Shang, P. Li / Curr. Microbiol. – 2011. – Vol. 62, № 4. – P. 1097-1103.
185. Sieladie, D.V. Probiotic properties of lactobacillus strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon / D.V. Sieladie [et al.] // Innovative Romanian Food Biotechnology. – 2011. – Vol. 9 – P. 12-28.
186. Simone, D. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acifophilus* on gut mucosa and peripheral blood B-lymphocytes / D.C. Simone [et al.] // Immunopharmacol. Immunotoxicol. – 1992. – Vol. 14, № 1-2. – P. 331-40.
187. Simons, L.A. / Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol / L.A. Simons, S.G. Amansec, P. Conway // Nutr. Metab. Cardiovascular Dis. – 2006. – Vol. 16, № 8. – P. 531-535.
188. Singh, J.A. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibit colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis / J.A. Sing [et al.] // Carcinogenesis. – 1997. – Vol. 18. – P. 833-841.
189. De Smet, I. Significance of bile-salt hydrolytic activities of lactobacilli / De Smet, I. [et al.] // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – Vol. 79. – P. 292-301.
190. De Smet, I. *In vitro* study of bile-salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity / De Smet, I. [et al.] // Micro Ecol. Health Dis. – 1994. – Vol. 7. – P. 315-329.
191. Starovoitova, S.A. Cholesterol-lowering activity of lactic acid bacteria probiotic strains *in vivo* / S.A. Starovoitova [et al.] // Мікробіологічний журнал. – 2012. – Т. 74, № 3. – С. 78-85.

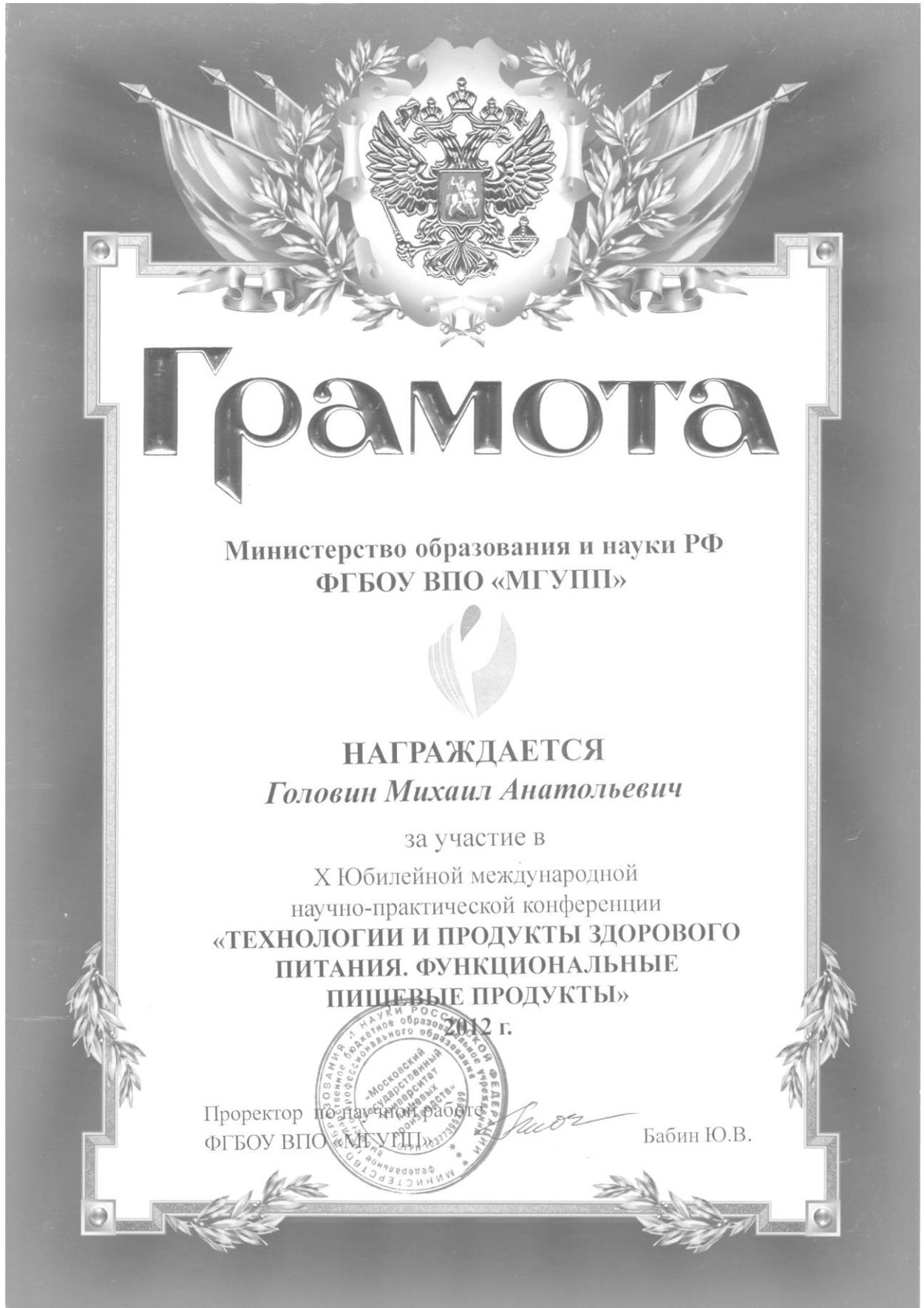
192. Tanaka, H. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization / H. Tanaka [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, № 6. – P. 2502-2512.
193. Tanaka, R. Clinical effects of Bifidobacteria and lactobacilli / R. Tanaka [et al.] // In: Probiotics: prospects of the use in opportunistic infections, Old Herborn University Seminar Monograph. Inst. Microbiol. Biochem. Herborn. – Dill, Germany, 1995. – P. 141-157.
194. Taranto, M.P. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice / M.P. Taranto [et al.] // J. Dairy Sci – 1998. – Vol. 81. – P. 2336-2340.
195. Tieking, M. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli / M. Tieking, M.G. Gänzle // Trends Food Sci. Technol. – 2005. – Vol. 16. – P. 79-84.
196. Tinrat, S. Isolation and characterization of *Lactobacillus salivarius* MTC 1026 as a potential probiotic / S. Tinrat, S. Saraya, M. Traidej Chomnawang // The Journal of general and applied microbiology. - 2011. - Vol. 57(6). - P. 365-378.
197. Du Toit, M. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content // M. Du Toit [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 1998. – Vol. 40, № 3– P. 93-104.
198. Troxel, S.A. Intestinal *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone formers and its relation to urinary oxalate // S.A. Troxel [et al.] // J Endourol. – 2003. – Vol. 17, № 3. – P. 173-176.
199. Turner, M.S. Identification and characterization of the novel LysM domain-containing surface protein Sep from *Lactobacillus fermentum* BR11 and its use as a peptide fusion partner in *Lactobacillus* and *Lactococcus* / M.S. Turner [et al.] // – Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 3673-3680.

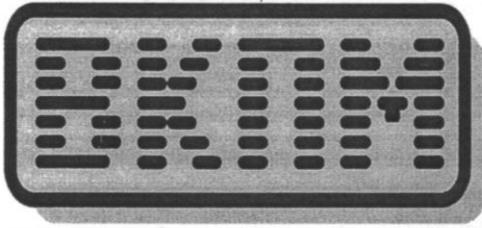
200. Tuomola, E.M. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco 2 cell cultures / E.M. Tuomola, P.S. Salminen // J. Int J Food Microbiol. – 1998 – Vol. 41. – P. 41-45.
201. United States. The United States pharmacopeia. Pharmacopeial Convention. 31st ed., Amended chapters 61, 62, 111. 2007. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
202. Vanderzant, C. Compendium of methods for the microbiological examination of foods / C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser // American Public Health Association. – 1992. – Vol. 3.
203. Van Hijum, S.A.F.T. Structure–function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria / S.A.F.T. Van Hijum [et al.] // Microbiol. Molec. Biol. Rev. – 2006. – Vol. 70. – P. 157-176.
204. De Vuyst, L. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria / L. De Vuyst // Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications / L. De Vuyst, E.J. Vandamme. – London: Blackie Academic and Professional, 1994. – 1994. – P. 91-142.
205. Waldherr, F. Commercial exploitation of homo-exopolysaccharides in non-dairy food systems / F. Waldherr // Bacterial Polysaccharides / F. Waldherr, R.F. Vogel ; edit. M. Ullrich. – Norfolk: Caister Academic Press, 2009. – P. 313-344.
206. Xie, N. Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high cholesterol diet / N. Xie [et al.] // BMC. Complementary and Alternative Medicine. – 2011. – Vol. 53. – P. 11.
207. Xu, R. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH / R. Xu, N. Shang, P. Li // Anaerobe. – 2011. – Vol. 17, № 5. – P. 226-231.
208. Yamamoto, N. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 / N. Yamamoto, A. Akino, T. Takano // J Dairy Sci. – 1994. – Vol. 77, № 4. – P. 917-922.

209. Yildirim, Z. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454 / Z. Yildirim, M. G. Johnson // J. Food Prot. – 1999. – Vol. 61. – P.: 47-51.
210. Yu, Q. Ability of *Lactobacillus* to inhibit enteric pathogenic bacteria adhesion on Caco-2 cells / Q. Yu, Z. Wang, Q. Yang // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2011. - Vol. 27. - P. 881-886.
211. Zhang, J. Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from inner mongolia “Hurood” cheese / J. Zhang [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 24, № 2. – P. 225-235.
212. Zhang, L. Manufacture of cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model / L. Zhang [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. Vol. 29. – P. 127-135.
213. Ziarno, M. Cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures / M. Ziarno, E. Sekul, A. Lafraya Aguado // Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria. – 2007. – V. 1, № 6 – P. 83-94.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1





**Всероссийская Коллекция
Промышленных Микроорганизмов
ФГУП ГосНИИ Генетика**

✉ Россия, Москва, 117545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ФГУП ГосНИИ Генетика - ВКПМ;
☎ (095) 3151210; факс: (095) 3151210; Эл. почта: vkpm@genetika.ru;

СПРАВКА

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов
(ВКПМ), ФГУП ГосНИИ Генетика
приняла на национальное патентное депонирование
20 апреля 2011г.

культуру *Bifidobacterium bifidum* GG-72

Продукт, синтезируемый штаммом: уксусная и молочная кислоты

Депозитор: Ганина В.И.

Зав. ВКПМ
Проф



С.П. Синеокий

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ Ас-1884

ПАСПОРТ
штамма микроорганизма

Номер ВКПМ Ac-1884

Дата депонирования в ВКПМ 20.04.11

1. Родовое и видовое название культуры род *Bifidobacterium bifidum*
2. Номер или наименование штамма GG-72
3. Родословная штамма, номер штамма в другой коллекции (если он существует) коллекция микроорганизмов ГОУ ВПО МГУПБ
4. Способ получения штамма (найден в естественных условиях, где, когда, кем; получен селекционным путем; получен как мутант и т.п.) штамм получен естественным путем
5. Где (наименование организации и ее адрес) идентифицирована культура (данные, на основании которых было сделано заключение о родовой/видовой принадлежности культуры должны прилагаться к паспорту) МГУПБ, Москва, ул. Талалихина, д.33 Идентифицирован по морфологическим, культурально-биохимическим свойствам.
6. Культурально-морфологические особенности штамма грамположительные палочки с бифрукациями и без; располагаются одиночно и в группах
7. Область применения штамма научные исследования с целью применения биологически активных веществ, синтезируемых штаммом, для использования в пищевой и медицинской промышленности.
8. Продукт, синтезируемый штаммом уксусная и молочная кислоты
9. Активность (продуктивность) штамма, другие производственные показатели количества клеток штамма на среде ГМК-2 составляет 4×10^7 до 1×10^9 в 1 см^3
10. Способ определения активности штамма с указанием метода 1 мл свежее приготовленного штамма внести в 9 см^3 стерильной среде ГМК-2, регенерированной на водяной бане, перемешать и термостатировать при температуре $38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 36 ± 2 ч. Должно образоваться равномерное по всему столбику среды помутнение с верхней зоной просветления
11. Способ, условия и состав сред для длительного хранения штамма высушивание сублимационным способом в ампулах под вакуумом свежеприготовленного штамма на стерильной среде ГМК-2 с добавлением защитной среды, содержащей сахарозу, желатозу, лимоннокислый натрий или другие криопротекторы.
12. Способ, условия и состав сред для размножения штамма 1 мл свежее приготовленного штамма внести в пробирки с 9 см^3 стерильной средой ГМК-2 или средой Блаурокка или тиогликолевой средой, регенерированной на водяной бане, перемешать и термостатировать при температуре $38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 36 ± 2 ч. После культивирования в среду вносится 0,5 мл 10%-й стерильный раствор NaHCO_3 при аккуратном перемешивании. После чего штамм храниться при температуре $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Периодичность пассажей - один раз в 14 ± 2 дней
13. Оптимальные условия и состав среды для ферментации стерильная среда ГМК-2, среда Блаурокка, тиогликолевая среда
14. Генетические особенности штамма
 - 1) Мутации, делеции, инверсии _____
 - 2) Устойчивость (чувствительность) к антибиотикам, фагам и т.д. _____
 - 3) Плазмиды (подробное описание) _____
 - 4) Профаги _____

5) Прочие генетические особенности _____

15 Литературные ссылки _____

16 Является ли штамм: зоопатогенным нет (да, нет); фитопатогенным нет (да, нет); представляет ли опасность по каким либо другим причинам нет (да,): если «да», пояснить _____

17. Форма депонирования: хранение, гарантийное хранение, национальное патентное депонирование, международное патентное депонирование.(нужное подчеркнуть)

а) для формы депонирования «хранение»

Депозитор информирован о том, что штамм будет исследован и включен в общую коллекцию ВКПМ. Информация о штамме будет помещена в каталог штаммов ВКПМ, а сам штамм может выдаваться из коллекции по запросу третьих лиц.

б) для формы депонирования «гарантийное хранение»

Срок гарантийного хранения штамма _____ (указать количество лет)

Депозитор информирован о том, что после окончания оговоренного срока, если нет иных указаний, штамм переводится в категорию "хранение".

в) для формы депонирования «патентное депонирование»

Депозитор обязуется

- сообщать в коллекцию информацию о подаче заявки на патент, касающийся депонированного штамма, о получении патента по заявке или об отказе в выдаче патента, а также о прекращении действия патента.
- по просьбе коллекции, в случае необходимости, осуществлять проверку жизнеспособности депонированного штамма;
- возобновлять штамм в коллекции в случае утери им жизнеспособности.

Депозитор ознакомлен с «Правилами депонирования штаммов микроорганизмов в ВКПМ» и согласен с тем, что

- с момента отправки депозитору справки о депонировании штамм не подлежит отзыву;
- до подачи заявки на патент информация о самом факте осуществления депонирования и о депонированном штамме является конфиденциальной и, также как сам штамм, предоставляется третьим лицам только с письменного разрешения депозитора.
- после подачи заявки на патент в патентное ведомство, выдача штамма третьим лицам осуществляется:

а) в соответствии с правилом 11 "Инструкции к Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры" (в случае международного патентного депонирования) и национальным законодательством РФ, если патент испрашен на имя депозитора;

б) только по разрешению депозитора, если патентовладелец не является депозитором штамма;

- ответственность за соответствие реальных свойств депонируемого штамма данным, указанным в паспорте, несет депозитор. Коллекция может осуществить проверку видоспецифических и иных основных свойств (признаков) штамма, указанных в паспорте.
- при необходимости ВКПМ готовит дополнительные образцы культуры путем субклонирования материала, присланного депозитора. Депозитор _____ (желает, не желает) быть информированным о подготовке дополнительных образцов и иметь возможность осуществить проверку идентичности подготовленных в ВКПМ образцов исходной культуре. (*стоимость депонирования для каждого из вариантов приведена в прайс-листе*). Если депозитор не выражает желания проводить проверку идентичности, то подготовленные образцы признаются идентичными первоначальной культуре.
- штамм депонированный по форме национальное патентное депонирование может быть переведен в категорию "хранение" в том случае, если

а) до истечения трех лет с момента национального патентного депонирования в коллекцию не поступила письменная информация о подаче заявки на патент, касающийся депонированного штамма (с указанием номера заявки и объекта патентования), или заявление с просьбой продлить

срок содержания штамма микроорганизма в соответствии с правилами национального патентного депонирования;

- б) по заявке получен отказ в выдаче патента, возможности обжалования которого исчерпаны;
- в) действие патента(ов) закончилось или прекращено и не подлежит восстановлению.

18 Депозитор (полное имя или наименование) ГАНИНА ВЕРА ИВАНОВНА
Паспорт 45 99 845121 выдан 04.11.1999г. ОВД, Рязанский г. Москвы
 Почтовый адрес, телефон, электронная почта депозитора 109428, Москва, Рязанский проспект, д.41/2,
кв.32, тел 277-03-91
 Авторы (фамилия, имя отчество полностью) Ганина Вера Ивановна, Головин Михаил Анатольевич,
Захарченко Анастасия Валерьевна

При международном патентном депонировании, депозитор дополнительно указывает точный адрес и имя депозитора на английском языке.

В.Б. Ганина (зав. кадровой службой *Технологический университет "МГУПБ"*)
 Подпись депозитора (с указанием должности и ФИО подписавшего лица) *В.Б. Ганина*
 Дата: *16.06.2012г.*

УДОСТОВЕРЯЮ:
 НАЧ УПР КАДРОВ МГУПБ
В.Б. Ганина



Раздел заполняется при получении справки о депонировании

Справка о депонировании получена.
 Фамилия, инициалы и должность лица, получившего справку

Подпись, число.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Дом Соусов»

Коновалов А. Е.



2013 г.

АКТ

производственной проверки

Мы, нижеподписавшиеся, сотрудники ООО «Дом Соусов» - биотехнолог Бандоян Акоп Казарович, химик-технолог Гордеев Юрий Юрьевич и сотрудники ФГБОУ ВПО «МГУПП» - доктор технических наук, профессор Ганина В.И., аспирант Головин М.А., составили настоящий акт о том, что на данном предприятии в производственных условиях проведены выработки по получению биомассы штаммов пробиотических культур, способных к ассимиляции холестерина. В работе были использованы пять холестерин-ассимилирующих штаммов: *L. rhamnosus* LC-52 GV, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. fermentum* LFM-2, *L. acidophilus* АСТ-44, *B. bifidum* GG-72.

Получение биомассы осуществляли по технологическим инструкциям. Нарращивание биомассы каждого штамма пробиотических культур осуществляли в ферментёре вертикальном ОКБ ТБМ (г. Кириши) № 70 1991 г. 0,1 м³ при (37±1) °С до наступления стационарной фазы развития в течение 15-18 часов. Биомассу концентрировали на сепараторе УКВ-202К-01 (Уралхиммаш, г. Екатеринбург). Полученную биомассу смешивали с криопротекторной средой и подвергали сублимационному высушиванию на установке LZ-45 (г. Колин, Чехия).

Микробиологические, физико-химические, органолептические и показатели качества готового продукта определяли с использованием стандартных и общепринятых в исследовательской практике методов. Дополнительно определяли, сохранилась ли способность у штаммов к ассимиляции холестерина в условиях *in vitro*.

Сухая биомасса по показателям безопасности отвечала требованиям ФЗ №88 «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» применительно к закваскам.

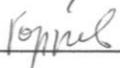
В отношении микробиологических показателей можно сказать следующее. Количества микроорганизмов (КОЕ/см³) каждого из штаммов составляют не менее $1,0 \times 10^{10}$ /грамм биомассы. По массовой доле микроорганизмов в биомассе были установлены следующие показатели: *L. rhamnosus* LC-52 GV-20%, *L. plantarum* ГВИ-1 - 25%, *L. fermentum* LFM-2 - 20%, *L. acidophilus* АСТ-44 - 20%, *B. bifidum* GG-72 - 15%.

По физико-химическим показателям массовая доля влаги составляла не более 4,5%, время растворения порошка в воде не более 3 мин до 98 %.

По органолептическим показателям биомасса представляет собой порошок рассыпчатый беловато-кремовый или желтовато-кремовый с равномерно распределенными мелкими вкраплениями, сухой, обладающий свойством сыпучести. Вкус и запах специфические, свойственные ингредиентам продукта.

Результаты производственной проверки свидетельствуют о возможности получения биомассы с заданными показателями качества, безопасности и с сохранением у штаммов способности ассимилировать холестерин.

От ООО «Дом Соусов»


_____ Бандоян А.К.

_____ Гордеев Ю. Ю.

От ФГБОУ ВПО «МГУПП»


_____ Ганина В. И.

_____ Головин М. А.

Проект технологической инструкции

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ

**«Дом соусов»
(ООО «ДС»)**

ОКП 91 9769

Группа Н 91
(ОКС 67.220.20)

УТВЕРЖДАЮ
ООО «Дом соусов»
Генеральный директор

_____ А. Е. Коновалов

«___» _____ 2013 г.

**Концентрат пробиотической композиции со способностью к снижению
концентрации холестерина**

Технологическая инструкция

Вводится впервые

Ввод в действие с «___» _____ 2015 г.

РАЗРАБОТАНО:

ООО «ДС»

Москва, 2013



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам изучения действия новой пробиотической композиции на
микрофлору кишечника и уровень холестерина у животных

Пробиотическая композиция, снижающая концентрацию холестерина, включающая *Bifidobacterium bifidum* GG-72, *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44, *Lactobacillus fermentum* LFM-2, *Lactobacillus plantarum* ГВИ-1, *Lactobacillus rhamnosus* LC-52GV в дозе 10^9 и 10^8 КОЕ/мл для бифидобактерий и лактобактерий соответственно, на фоне приёма гиперхолестеринового корма (содержание холестерина 2%) по сравнению с контрольной группой, способствовала у животных:

- снижению уровня общего холестерина и холестерина липидов низкой плотности;
- нормализации микробиоты кишечника: лактозонегативная кишечная палочка не высевалась, снизилось количество кокковых форм в общей сумме микроорганизмов до 0,1%;
- повышению суммарной концентрации метаболитов, при этом активность протеолитической микрофлоры находилась в пределах допустимых значений;
- восстановлению баланса концентраций летучих жирных кислот.

Анализ проведенных исследований позволяет сделать заключение об участии пробиотической композиции в метаболизме холестерина у животных на фоне гиперхолестериновой диеты.