

На правах рукописи

ЦЫБИКОВА АРЮНА ХАНДАЖАПОВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ
С ХОЛЕСТЕРИНМЕТАБОЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ**

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Улан-Удэ – 2012

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления» (ВСГУТУ)

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Хамагаева Ирина Сергеевна

Официальные оппоненты: Жамсаранова Сэсэгма Дашиевна,
доктор биологических наук, профессор
кафедры «Биоорганическая и пищевая
химия» ВСГУТУ

Решетник Екатерина Ивановна,
доктор технических наук, и.о. профессора
кафедры «Технологии переработки продукции
животноводства» Дальневосточного
государственного аграрного университета

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Бурятская государственная
сельскохозяйственная академия им. В.Р.
Филиппова» (г. Улан-Удэ)

Защита диссертации состоится «29» мая 2012 г в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д212.039.05 при ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления» по адресу: 670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в, ауд. 8-124.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВСГУТУ.

Автореферат разослан «___» апреля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Столярова А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. На сегодняшний день сердечно - сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности и инвалидности населения, вызывая наибольшее количество социальных и экономических потерь. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 23% случаев преждевременной смерти от ССЗ вызваны избытком холестерина.

В последние годы накоплено значительное количество данных о том, что резидентная и транзиторная микрофлора хозяина, синтезируя, трансформируя или разрушая экзогенные и эндогенные стерины, активно участвует в холестеринном метаболизме. Это позволяет рассматривать микрофлору хозяина как важнейший метаболический и регуляторный орган, участвующий в кооперации с клетками хозяина в поддержании гомеостаза холестерина.

Анализ опубликованных в литературе данных о биологически активных соединениях, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами, показал, что до настоящего времени биотехнологический потенциал анаэробных микроорганизмов бифидобактерий, пропионовокислых и лактобактерий практически не используется. Лактобактерии длительное время привлекают внимание биотехнологов ввиду их потенциального значения для сохранения здоровья, профилактики и лечения многих заболеваний. Увеличивается число публикаций о способности некоторых штаммов лактобактерий проявлять гипохолестеринемический эффект.

Актуальность проведения исследований в области микробной экологии, изучения метаболизма холестерина пробиотическими микроорганизмами определяется необходимостью создания биопродуктов массового потребления для поддержания и сохранения здоровья населения, которые составят достойную конкуренцию лекарственным средствам.

Цель работы. Создание бактериальных концентратов пробиотических микроорганизмов с холестеринметаболизирующими свойствами.

Для достижения указанной цели были определены следующие задачи исследований:

- исследовать холестеринметаболизирующие свойства пробиотических микроорганизмов;
- изучить холестеринметаболизирующую активность пробиотических микроорганизмов при совместном культивировании;
- подобрать условия культивирования микроорганизмов для получения концентратов с холестеринметаболизирующими свойствами;
- разработать технологическую схему получения бактериальных концентратов с холестериндеградирующей активностью;
- исследовать практические аспекты применения замороженных заквасок

для создания кисломолочных продуктов, снижающих уровень холестерина в крови.

Научная новизна. В результате проведенных исследований установлено, что изученные штаммы пробиотических микроорганизмов характеризуются высокой холестеринметаболизирующей активностью, которая зависит от видовой и штаммовой принадлежности. Наиболее высокими холестериндеградирующими свойствами обладает штамм *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁. Среди штаммов пропионовокислых бактерий наибольший холестериндеградирующий эффект наблюдается у *Propionibacterium shermanii* AC 2503, у бифидобактерий – *Bifidobacterium longum* DK 100. Установлено, что степень деградации холестерина зависит от продолжительности культивирования. Наибольшее количество холестерина разрушается в конце экспоненциальной фазы роста. Отмечено увеличение холестеринметаболизирующей активности при сочетании штаммов *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и *Propionibacterium shermanii* AC 2503.

Практическая значимость. Основные результаты работы нашли практическую реализацию в разработке технологии биологически активных добавок, а также замороженных концентратов для производства кисломолочных продуктов. Разработаны проекты ТУ и проведена опытно-промышленная проверка БАД и замороженных бактериальных концентратов в ООО МИП «Бифивит».

Апробация работы. Результаты работы были доложены и обсуждены на научных конференциях ВСГТУ (Улан-Удэ, 2009-2011 гг.), «Современные технологии производства продуктов питания. Состояние, проблемы и перспективы развития» (Омск, 2008 г.), II Всероссийской конференции студентов и аспирантов «Пищевые продукты и здоровье человека» (Кемерово, 2009 г.), XII Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства» (Йошкар-Ола, 2010 г.); XI Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2010 г.), VII Международной научной конференции студентов и аспирантов «Техника и технология пищевых производств» (Могилев, 2010 г.), III Всероссийской научно-практической конференции «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (Бийск, 2010 г.).

Публикации. По результатам выполненных исследований опубликовано 11 работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора, методической части, результатов эксперимента и их анализа, выводов, списка литературы и приложений. Основная часть работы изложена на 151 странице машинописного текста и содержит 52 таблицы и 26 рисунков.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Экспериментальная часть исследований проводилась в лаборатории кафедры «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров» и Малом инновационном предприятии «Бифивит» ВСГУТУ.

Объектами исследований служили чистые культуры пропионовокислых бактерий: *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *shermanii* AC 2503, *P. freundenreichii* subsp. *freudenreichii* AC 2500, *P. cyclohexanicum* Kusano AC 2559, *P. cyclohexanicum* Kusano AC 2560, *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁, полученные из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (г. Москва) и штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium longum* B379M, *B. bifidum* 8, *B. longum* DK 100, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика», активизированные уникальным биотехнологическим методом, разработанным в ВСГУТУ.

Для определения уровня холестерина в питательной среде использовали ферментативный метод. Принцип метода заключается в том, что под действием фермента холестеринэстеразы эфиры холестерина распадаются на холестерин и жирные кислоты. Далее холестерин под воздействием холестеринокси-дисмутазы дает окрашенное соединение и перекись водорода. Интенсивность окраски в реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе. После этого измеряем оптическую плотность опытной пробы (E) и калибровочной пробы (E_k) против рабочего реагента, состоящего из смеси ферментов при длине волны 450 нм. Концентрацию холестерина в пробе определяли расчетным методом по формуле $C = E/E_k * 4,65$, где 4,65 – это концентрация холестерина в калибраторе (ммоль/л). При измерении опытных образцов, дающих интенсивный зеленый цвет, допускается разбавление образцов физиологическим раствором в два раза. Полученные данные в расчете делят на 2.

Для определения холестеринметаболизирующей активности пробиотических микроорганизмов использовали питательную среду на основе молочной сыворотки, разработанную ранее в ВСГУТУ с добавлением очищенной сыворотки крови в качестве источника холестерина.

Активную кислотность определяли потенциометрическим методом по ГОСТ 3624-87; титруемую кислотность – титриметрическим методом по ГОСТ 3624-92; рост биомассы – по оптической плотности фотокolorиметрическим методом на KF - 77 при $\lambda = 550$ нм; концентрацию экзополисахаридов – антроновым методом; антимулагенную активность – по тесту Эймса; адгезивные свойства – по развернутому методу Брилис; среднюю удельную скорость роста бактерий - по приросту биомассы или жизнеспособных клеток; количественный учет пропионовокислых бактерий – методом предельных разведений на среде ГМС или ГМК, а *L. helveticus* – на плотной агаризованной среде MRS по ТУ 10-10-02-789-192-95; морфологию клеток бактерий – путем приготовления препаратов, окрашенных метиленовым синим или по Граму с последую-

щим микроскопированием в иммерсионной системе; определение летучих жирных кислот (ЛЖК) – по дистилляционному числу; количество бактерий групп кишечных палочек – по ГОСТ 9225-84; контаминацию – по ГОСТ 9225-84.

Общая схема проведения эксперимента представлена на рисунке 1.

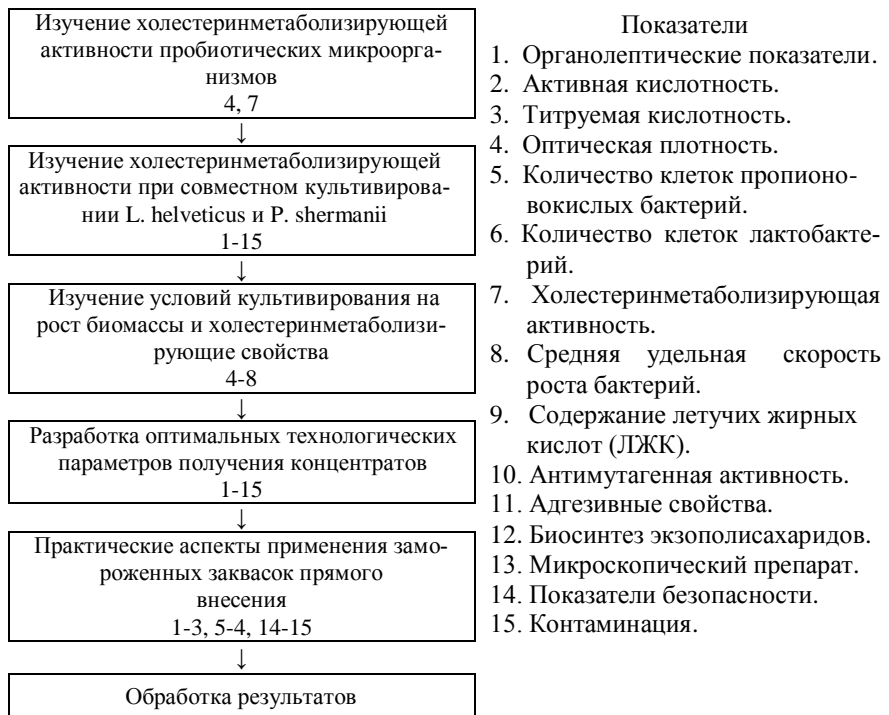


Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование холестеринметаболизирующих свойств пробиотических микроорганизмов

На первом этапе исследований нами была изучена холестеринметаболизирующая активность различных штаммов пробиотических микроорганизмов.

Результаты исследований представлены в таблице 1 и на рисунках 2 и 3.

Таблица 1 – Холестеринметаболизирующая активность микроорганизмов

Наименование штамма микроорганизмов	Содержание холестерина в питательной среде, ммоль/л							Уровень разрушения холестерина, %
	Продолжительность культивирования, ч							
	0	4	8	12	16	20	24	
<i>P. Freudenreichii</i> AC 2500	4,92	4,92	4,81	4,48	3,98	3,32	2,92	40,64
<i>P. Kusano</i> AC 2559	4,92	4,92	4,89	4,68	4,1	3,36	2,89	41,36
<i>P. Kusano</i> AC 2560	4,92	4,92	4,86	4,53	3,91	3,21	2,74	44,22
<i>P. shermanii</i> AC 2503	4,92	4,91	4,68	4,25	3,67	2,93	2,64	46,32
<i>B. longum</i> B379M	4,92	4,92	4,9	4,76	4,19	3,68	3,02	38,68
<i>B. longum</i> DK 100	4,92	4,92	4,88	4,61	4,03	3,28	2,85	42,13
<i>B. bifidum</i> 8	4,92	4,92	4,91	4,81	4,31	3,87	3,1	37,08
<i>L. helveticus</i> 3 ₅₋₁	4,92	4,9	4,54	4,06	3,36	2,54	2,38	51,7

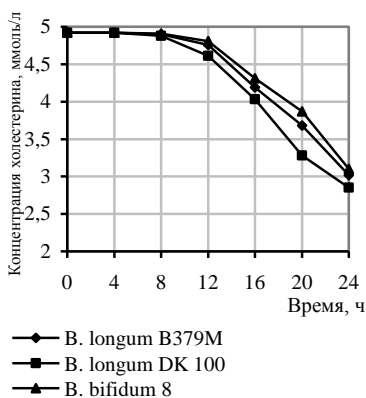


Рисунок 2 – Холестеринметаболизирующая активность бифидобактерий

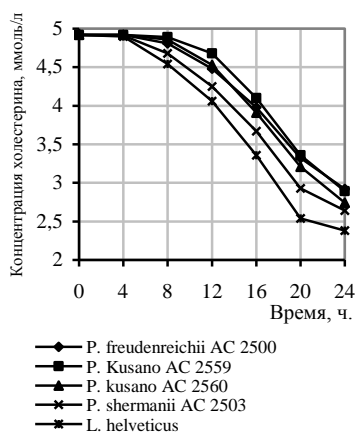


Рисунок 3 – Холестеринметаболизирующая активность пропионово-кислых бактерий и *L. helveticus*

Как видно из данных таблицы 1, все исследуемые штаммы пробиотических микроорганизмов в процессе культивирования в питательной среде с добавлением сыворотки крови в качестве источника холестерина снижают уровень этого стероидного соединения. Наиболее высокой холестериндеградирующей активностью обладает *L. helveticus*. Данная культура связывает до 51,7% холестерина. Степень деградации холестерина у пропионовокислых

бактерий находится в пределах 40-46% от исходного количества, внесенного в среду культивирования холестерина. Наибольшим холестериндеградирующим эффектом обладает штамм пропионовокислых бактерий *P. shermanii* AC 2503, который связывает 46,32% холестерина. Наименьшая холестеринметаболизирующая активность наблюдается у *P. freudenreichii* AC 2500 (40,64%). Следует отметить также достаточно высокую холестеринметаболизирующую активность бифидобактерий, которая достигает 37-42%. Лучше всего связывает холестерин из изученных штаммов бифидобактерий *B. longum* DK 100 (42,13%), менее активен штамм *B. bifidum* 8 (37,08%).

На рисунках 2 и 3 приведены результаты изменения концентрации холестерина в питательной среде в процессе культивирования, которые свидетельствуют о взаимосвязи уровня холестерина и времени инкубации.

Теоретически холестериндеградирующую активность пробиотических микроорганизмов можно объяснить тем, что они регулируют синтез эндогенного холестерина за счет продуцирования биологически активных веществ. Также разными авторами выявлено, что гипохолестеринемия проявляется на фоне нарушения естественной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, т.е. дисбактериоза. Микроорганизмы-пробиотики в первую очередь нормализуют работу желудочно-кишечного тракта, подавляя развитие патогенной микрофлоры и тем самым регулируют липидный обмен.

В результате проведенных исследований установлено, что пробиотические микроорганизмы обладают высокой холестеринметаболизирующей активностью, которая зависит от видовой и штаммовой принадлежности.

Изучение холестеринметаболизирующей активности при совместном культивировании *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и *Propionibacterium shermanii* AC 2503

Для создания ассоциаций культур были выбраны штаммы *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и *Propionibacterium shermanii* AC 2503, обладающие наиболее высокой холестеринметаболизирующей активностью.

Многочисленными исследованиями доказано, что многоштаммовые закваски устойчивы к неблагоприятным факторам среды и обладают более высоким биотехнологическим потенциалом. Поэтому первостепенной задачей при подборе культур является изучение симбиотических взаимоотношений между *L. helveticus* 3₅₋₁ и *Pr. shermanii* AC 2503.

Учитывая высокую кислотообразующую способность *L. helveticus*, совместное культивирование проводили при оптимальной температуре роста пропионовокислых бактерий (30°C). Выбор оптимального соотношения микроорганизмов в комбинированной закваске проводили с учётом биохимических и пробиотических свойств исследуемых культур и их ассоциаций.

Полученные данные отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Выбор соотношения культур в комбинированной закваске

Показатели	Характеристика заквасок				
	L. helveticus 3 ₅₋₁	P. shermanii AC 2503	Варианты комбинированной закваски L. helveticus: P. shermanii		
			20:80	10:90	5:95
Кислотность, °Т	93-95	68-70	90-91	88-89	82-83
Активная кислотность, рН	4,68	4,98	4,69	4,71	4,72
Активность ферментации, ч.	6-8	12-14	6-7	8-9	8-10
Холестеринметаболизирующая активность, %	51,7	46,32	67,0	65,1	63,0
Антимутагенная активность (ингибирование), %	50,2	50,3	52,5	53,6	53,9
Адгезивная активность:					
СПА*	4,5	4,6	4,7	4,9	5,1
КУЭ,** %	85	85	86	87	88
ИАМ***	5,29	5,4	5,51	5,6	5,69
Биосинтез экзополисахаридов, мкг/мл	0,578	1,88	1,9	1,92	2,01
Содержание ЛЖК, мг/100 г	2,8	2,4	3,8	3,9	3,9
Содержание клеток, КОЕ/см ³					
L. helveticus	2*10 ⁹	-	1*10 ⁹	1*10 ⁹	1*10 ⁹
P. shermanii	-	1*10 ⁹	2*10 ⁷	1*10 ⁸	2*10 ⁹

Примечания: СПА* – средний показатель адгезии; КУЭ** – коэффициент участия эритроцитов; ИАМ*** – индекс адгезивности микроорганизмов.

Полученные данные свидетельствуют о повышении холестеринметаболизирующей активности при совместном культивировании. Наибольшая степень деградации холестерина наблюдается при соотношении культур 20:80 (67,0%), но при этом наблюдается увеличение кислотности, что неблагоприятно сказывается на органолептических показателях комбинированной закваски. Наилучшие органолептические характеристики отмечены при соотношении культур 5:95, также при этой ассоциации степень деградации холестерина снижается незначительно и составляет 63,0%.

Результаты, представленные в таблице 2, позволяют рассматривать изученные микроорганизмы как потенциальные продуценты биологически активных веществ, обладающих антимутагенными, адгезивными свойствами, содержание которых увеличивается при совместном культивировании. При этом отмечена высокая плотность популяций L. helveticus 3₅₋₁ и Pr. shermanii AC 2503, что свидетельствует о хорошей сочетаемости микроорганизмов. Это, вероятно, объясняется высокой протеолитической активностью культуры L. helveticus, которая расщепляет белковые компоненты с образованием пептидов и аминокислот и создает благоприятные условия для роста пропионовокислых бактерий.

Следует отметить, что в настоящее время происходит постепенная смена микробиологической парадигмы – переход от представлений одноклеточ-

ности микроорганизмов к представлению о микробных колониях как целостных сверхорганизмах и находит свое отражение в нарастающем интересе к форме, рисунку, макро- и микроструктуре бактериальных колоний. В связи с этим в дальнейших исследованиях изучали морфологию бактерий в комбинированной закваске. Морфология представлена на рисунке 4.



а) морфология закваски *L. helveticus*



б) морфология закваски *P. shermanii* AC 2503



в) морфология комбинированной закваски

Рисунок 4 – Морфология заквасок на молоке

Как видно из рисунка 4, клетки *L. helveticus* представляют собой одинарные палочки, а *P. shermanii* – в форме длинных и коротких цепочек. В комбинированной закваске видна агрегация клеток пропионовокислых и лактобактерий, указывающая на межклеточные взаимодействия – связи (когезию). Из литературных данных известно, что когезия – это не просто образование суммы клеток, а своеобразная надорганизменная система, в определенном отношении аналогичная многоклеточному организму, но не тождественная ему. Свойством такой системы является кооперация отдельных клеток, когда их согласованная деятельность направлена на достижение одного и того же результата. Одним из механизмов кооперации является коммуникация – обмен сигналами и информацией за счет функционирования внеклеточных метаболитов, регулирующих активность бактерий. Образование таких взаимодействий обеспечивает адаптационную, физиологическую устойчивость клеток на воздействие отрицательных условий внешней среды.

Таким образом, в результате экспериментальных исследований установлено, что при совместном культивировании *L. helveticus* и *P. shermanii* повышается холестеринметаболизирующая активность. Также выбрано соотношение культур 5:95, при котором, помимо пробиотических и холестеринметаболизирующих свойств, отмечены хорошие органолептические показатели.

Влияние условий культивирования на рост биомассы и холестеринметаболизирующие свойства пробиотических микроорганизмов

Важную роль при культивировании микроорганизмов играет активность посевного материала. На следующем этапе исследований нами изучено влияние дозы инокулята на рост клеток. В качестве инокулятов были использованы культуры *L. helveticus* и ассоциация *L. helveticus* и *P. shermanii* в соотношении 5:95. Полученные результаты представлены на рисунках 5 и 6.

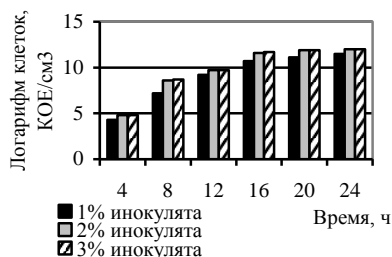


Рисунок 5 – Влияние дозы инокулята *L. helveticus* на рост клеток

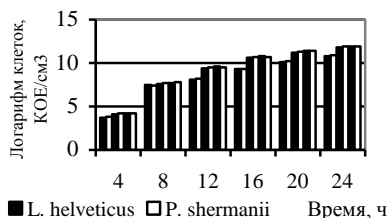


Рисунок 6 – Влияние дозы комбинированного инокулята на рост клеток

Как видно из данных рисунков 5 и 6, с увеличением дозы инокулята от 1 до 2% отмечается увеличение количества жизнеспособных клеток микроорганизмов. Дальнейшее увеличение дозы закваски до 3% не приводит к значительному росту.

Далее изучали рост биомассы пробиотических микроорганизмов и изменение уровня холестерина в процессе культивирования. Результаты исследований представлены на рисунках 7 и 8.



Рисунок 7 – Рост биомассы микроорганизмов в процессе культивирования

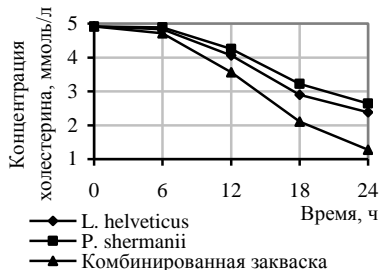


Рисунок 8 – Дегградация холестерина микроорганизмами в процессе культивирования

Из рисунка 7 видно, что наиболее активный рост бактериальной массы наблюдался при культивировании комбинированного инокулята, что свидетельствует о взаимном стимулировании культур. Установлено, что в процессе культивирования идет также активная дегградация холестерина (см. рис. 8). Следует отметить, что наибольшее количество холестерина разрушается в конце экспоненциальной фазы роста через 18 часов культивирования. Это объясняется тем, что в питательной среде накапливается достаточное количество биологически активных соединений, и рост биомассы достигает своего

максимума. Наибольшая холестеринметаболизирующая активность наблюдается при культивировании комбинированного инокулята (63,0%). Показатели холестеринметаболизирующей активности инокулятов на чистых культурах *L. helveticus* и *P. shermanii* составляют соответственно 51,7% и 46,3%. При этом количество жизнеспособных клеток в монокультуре *L. helveticus* и комбинированной закваске достигает 10^{12} см³. Выявлен активный рост пропионовокислых бактерий в комбинированной закваске (рис. 9 и 10).

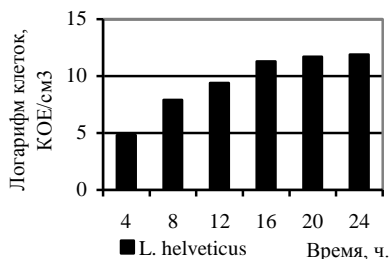


Рисунок 9 – Динамика роста *L. helveticus* на питательной среде

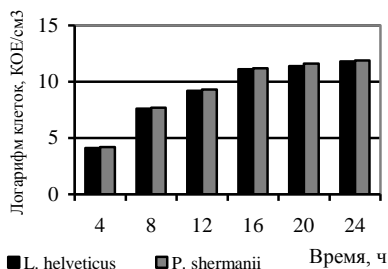


Рисунок 10 – Динамика роста комбинированной закваски на питательной среде

Анализ полученных данных свидетельствует, что при выбранных технологических параметрах культивирования штаммы *L. helveticus* и *P. shermanii* хорошо развиваются в питательной среде на основе молочной сыворотки. На основании проведенных исследований выбраны оптимальные условия культивирования *L. helveticus* и комбинированной закваски – доза инокулята 2%, температура культивирования равна 30°C и продолжительность 18-20 ч.

Разработка технологической схемы получения концентратов с холестеринметаболизирующими свойствами

Полученные нами экспериментальные данные показали, что *L. helveticus* наряду с выраженной холестериндеградирующей активностью характеризуется высокими пробиотическими свойствами, которые послужили методологической основой для разработки концентратов. Кроме того, исследования структурно-функциональных основ взаимодействия *L. helveticus* и *P. shermanii* доказывают перспективность использования комбинированной закваски в производстве бактериальных концентратов.

В результате проведенных исследований выбраны оптимальные технологические параметры получения концентратов. Технологическая схема производства бактериальных концентратов на основе монокультуры *L. helveticus* и комбинированной закваски представлена на рисунке 11.

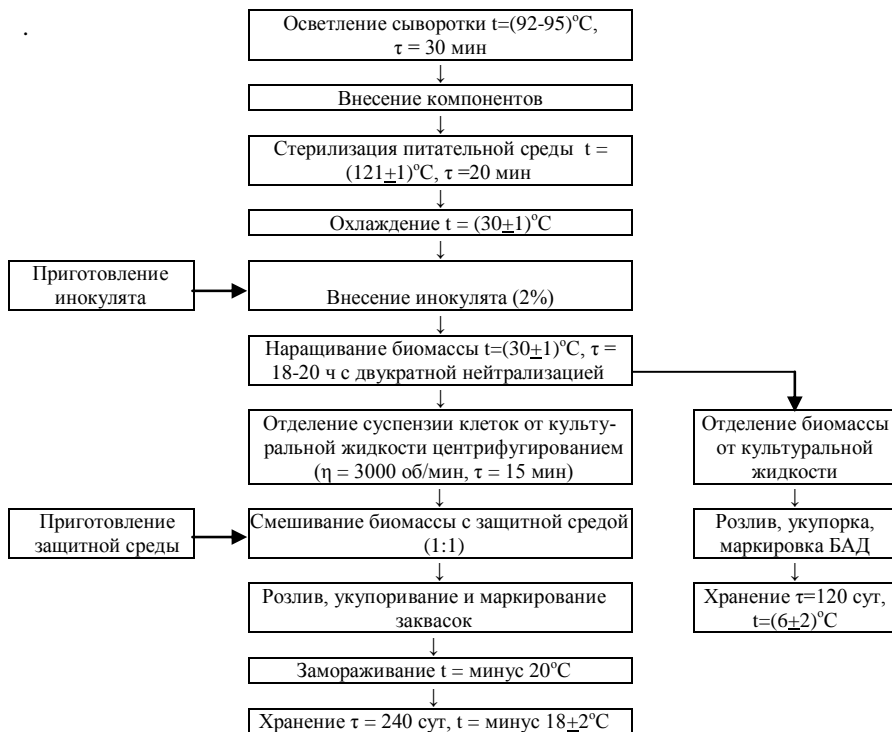


Рисунок 11 – Технологическая схема производства концентратов

Технология производства концентратов включает в себя такие операции, как подготовка питательной среды, внесение инокулята и наращивание биомассы. После окончания процесса культивирования идет отделение культуральной жидкости от биомассы. Полученный жидкий концентрат можно использовать в качестве биологически активных добавок. Для производства замороженных концентрированных заквасок прямого внесения биомассу декантируют для полного отделения культуральной жидкости и смешивают с защитной средой. Защитная среда предназначена для уменьшения повреждения клеток во время замораживания. Она состоит из воды, сахарозы и натрия лимоннокислого трехзамещенного. Защитное действие объясняется способностью сахарозы гидратироваться, понижать точку замораживания воды и замедлять скорость кристаллизации. Серия проведенных нами исследований показывает, что после процесса замораживания количество жизнеспособных клеток пробиотических микроорганизмов уменьшается незначительно и сохраняется биохимическая активность. После смешивания с защитной средой

смесь разливают, замораживают и хранят до реализации. Срок хранения БАД составляет 120 суток, а замороженных заквасок прямого внесения – 240 суток, в течение которых сохраняется высокое количество жизнеспособных клеток и пробиотические свойства. Качественная характеристика разработанных концентратов представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Качественная характеристика бактериальных концентратов

Показатель	Характеристика биологически активных добавок		Характеристика замороженных заквасок прямого внесения	
	БАД на основе <i>L. helveticus</i>	БАД на основе комбинированной закваски	Закваска прямого внесения <i>L. helveticus</i>	Комбинированная закваска
Вкус и запах	Чистый, кисловатый, без посторонних привкусов и запахов			
Консистенция	Однородная, с незначительным отстоем сыворотки		Столбик замороженной суспензии	
Цвет	От белого до светло-желтого			
Предельные значения pH	4,2-4,4	4,6-4,8	5,4-5,6	5,8-6,0
Активность ферментации, ч	-	-	6-8	8-10
Холестеринметаболизирующая активность, %	51,73	63,0	49,45	62,3
Антимутагенная активность (ингибирование), %	50,2	53,9	48,3	51,5
Адгезивные свойства:				
СПА	4,5	4,8	4,1	5,1
КУЭ, %	85	86	83	88
ИАМ	5,29	5,58	5,21	5,69
Биосинтез экзополисахаридов, мкг/мл	0,578	2,01	0,569	2,31
Температура при выпуске с предприятия, °С	4-6		Минус 18±2	
Количество клеток, КОЕ/см ³				
<i>L. helveticus</i>	4*10 ¹²	2*10 ¹²	2*10 ¹²	1*10 ¹²
<i>P. shermanii</i>	-	4*10 ¹²	-	3*10 ¹²
Объем продукта (см ³), в котором не допускаются:				
БГКП (колиформы)	10		2	
<i>S. aureus</i>	10		2	
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	50		10	
Дрожжи, КОЕ/см ³ , не более	10		5	
Плесени, КОЕ/см ³ , не более	10		5	

Анализ данных таблицы 3 показывает, что разработанные БАД и замороженные закваски обладают высокой холестериндеградирующей способностью. БАДы рекомендуются для использования в практическом здравоохранении для лечения. Замороженные закваски могут быть применены в производстве кисломолочных продуктов функционального питания.

Практические аспекты применения заквасок прямого внесения

На следующем этапе работы разработаны технологии пробиотических кисломолочных продуктов на основе разработанных заквасок прямого внесения.

Применение замороженного препарата комбинированной закваски осуществляли из расчета 2 дозы (2 мл) на 200 л молока путем прямого внесения в молоко. Закваска *L. helveticus* характеризуется более высокой биохимической активностью и 2 дозы закваски ферментирования 300 л молока.

Качественная характеристика кисломолочных продуктов функционального питания представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Основные качественные показатели пробиотических продуктов

Показатель	Кисломолочный напиток на основе закваски <i>L. helveticus</i>	Кисломолочный напиток на основе комбинированной закваски
Внешний вид и консистенция	Однородная, плотная. На поверхности допускается незначительное отделение сыворотки	Однородная, плотная, нежная.
Вкус и запах	Освежающий кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов	Чистый, кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Молочно-белый, равномерный по всей массе	
Кислотность, °Т	88-90	80-82
Активность ферментации, ч	6-8	8-10
Количество жизнеспособных клеток на конец срока годности, КОЕ/см ³ : <i>L. helveticus</i> <i>P. shermanii</i>	10 ⁷ -	10 ⁷ 10 ⁷
Объем продукта, в котором не допускаются:		
БГКП (колиформы)	0,1	
<i>S. aureus</i>	1,0	
Патогенные (в т.ч. сальмонеллы)	25	
Дрожжи КОЕ/см ³ , не более	50	
Плесени, КОЕ/см ³ , не более	50	

Разработанные кисломолочные продукты характеризуются хорошими органолептическими показателями и содержат большое количество жизнеспособных клеток пробиотических микроорганизмов, что очень важно при производстве продуктов функционального питания.

Выводы

1. На основании проведенных исследований разработаны технологии биологически активных добавок и замороженных заквасок прямого внесения *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и комбинированной закваски, обладающие выраженной холестеринметаболизирующей активностью.

2. Установлено, что наиболее высокой холестериндеградирующей активностью обладает культура *L. helveticus*, которая разрушает до 51% холестерина за 24 ч культивирования. *P. shermanii* связывает 46,32% холестерина. Среди штаммов бифидобактерий наибольший гипохолестеринемический эффект проявляет *B. longum* DK 100, который разрушает 42,13% животного холестерина.

3. Доказано, что при совместном культивировании штаммов *L. helveticus* и *P. shermanii* наблюдается повышение холестеринметаболизирующих, пробиотических свойств, что свидетельствует о прочных симбиотических связях между культурами в комбинированной закваске.

4. На основании анализа биотехнологического потенциала *L. helveticus* и *P. shermanii* выбрано оптимальное соотношение 5:95, при котором отмечены хорошие органолептические, физико-химические и пробиотические свойства, а также высокая холестеринметаболизирующая активность (63,0%).

5. Подобраны оптимальные условия культивирования для получения биомассы монокультуры *L. helveticus* и комбинированной закваски с высоким титром жизнеспособных клеток и холестеринметаболизирующей активностью.

6. На основе проведенных исследований выбраны оптимальные технологические параметры производства БАД и замороженных заквасок прямого внесения. Установлено, что количество клеток и биохимическая активность после замораживания меняются незначительно.

7. С использованием заквасок прямого внесения разработаны технологии кисломолочных продуктов функционального питания.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Хамагаева И.С. Изучение биотехнологического потенциала *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ / И.С.Хамагаева, А.Х. Цыбикова // Сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. конф. «Современные технологии производства продуктов питания. Состояние, проблемы и перспективы развития». Омск, 2008. С.170-173.

2. Цыбикова А.Х. Подбор условий культивирования комбинированной закваски на основе *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и пропионовокислых бактерий / А.Х. Цыбикова, И.С. Хамагаева // Мат-лы докладов II всероссийской конференции студентов и аспирантов «Пищевые продукты и здоровье человека». Кемерово, 2009. С.61-62.

3. Хамагаева И.С. Исследование биотехнологических свойств *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁/ И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова // Сб. науч. тр. ВСГТУ. Сер.: Биотехнология. Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2009. С.49-52.
4. Хамагаева И.С. Исследование биохимической активности комбинированной закваски на основе *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и *Propionibacterium shermanii* AC 2503 / И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова // Мат-лы XII междунар. науч.- практ. конф. «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства». Йошкар-Ола, 2010. С.307-308.
5. Цыбикова А.Х. Исследование основных биохимических свойств биологически активной добавки на основе *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и *Propionibacterium shermanii* AC 2503 / А.Х. Цыбикова, И.С. Хамагаева // Мат-лы VII междунар. науч. конф. студентов и аспирантов «Техника и технология пищевых производств». Могилев, 2010. С.111-112.
6. Цыбикова А.Х. Разработка технологии биологически активной добавки на основе *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и *Propionibacterium shermanii* AC 2503 / А.Х. Цыбикова, И.С. Хамагаева // Мат-лы XI междунар. конф. молодых ученых «Пищевая технология и биотехнология». Казань, 2010. С.130-131.
7. Хамагаева И.С. Подбор условий культивирования комбинированного бактериального концентрата / И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова // Сб. науч. тр. ВСГТУ. Сер.:Биотехнология. Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2010. С. 204-210.
8. Цыбикова А.Х. Разработка технологии комбинированного бактериального концентрата / А.Х. Цыбикова // Мат-лы III всеросс. науч.- практ. конф. «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности». Бийск, 2010. С.85-90.
9. Цыбикова А.Х. Влияние полиненасыщенных жирных кислот на холестеринметаболизирующие свойства пробиотических микроорганизмов / А.Х. Цыбикова, Г.А. Хангорова, А.М. Хребтовский, И.С. Хамагаева // Сб. науч. трудов ВСГТУ. Сер.:Биотехнология. Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2011. С.37-40.
10. Хамагаева И.С. Влияние условий культивирования на качество бактериальных концентратов с холестеринметаболизирующими свойствами / И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова, Н.А. Замбалова, Тиасонг Сан // Вестник ВСГУТУ. Улан-Удэ, 2011. №3. С.85-88.
11. Хамагаева И.С. Исследование холестеринметаболизирующих свойств пробиотических микроорганизмов / И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова, Н.А. Замбалова // Молочная промышленность. Москва, 2011. № 10. С.56.

Подписано в печать 26.04.2012 г. Формат 60x84 1/16.
Усл.печ.л. 1.16. Тираж 100 экз. Заказ №121.

Издательство ВСГУТУ,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в

© ВСГУТУ, 2012