

На правах рукописи

Ахангаран Махбубех

Разработка биотехнологии напитка молочносодержащего с экстрактом нута сквашенного, содержащего биологически активные пептиды

Специальность 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и биоорганического синтеза Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

Научный руководитель:	Машенцева Наталья Геннадьевна доктор технических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», профессор кафедры биотехнологии и биоорганического синтеза, профессор РАН
Официальные оппоненты:	Волкова Галина Сергеевна , доктор технических наук, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии и безопасности пищи, заведующая лабораторией биотехнологии органических кислот, пищевых и кормовых добавок Агаркова Евгения Юрьевна , доктор технических наук, Федеральное государственное автономное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», заведующая лабораторией биотехнологии молока и молочных продуктов
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 г. в _____ ч на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук 24.2.334.03 на базе ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» по адресу: 125080, г. Москва, Волоколамское ш., д. 11, корп. А

Отзывы (в двух экземплярах) на автореферат, заверенные гербовой печатью учреждения, просим направлять в адрес диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» по адресу: 125080, г. Москва, Волоколамское ш., д. 11, корп. А. Полный текст диссертации размещен в сети Интернет на официальном сайте ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» <http://www.mgupp.ru>.

Автореферат размещен на официальных сайтах ВАК Минобрнауки РФ <http://vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» <http://www.mgupp.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук, доцент

Кусова Ирина Урузмаговна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время возрастает интерес к напиткам на растительной основе (в том числе кокосовым, фундуковым, соевым, миндальным, овсяным, рисовым, кедровым, фисташковым напиткам), что связано с растущей озабоченностью потребителей о своем здоровье, желанием экспериментировать и пробовать новые продукты, а также с постепенными изменениями пищевого поведения. Это стало возможным благодаря развитию технологий переработки растительного сырья, включая бобовые, при производстве напитков на растительной основе, обладающих множеством полезных свойств. Благодаря новым технологиям обработки, например, ферментации молочнокислыми микроорганизмами, улучшаются органолептические характеристики, повышается биологическая ценность и увеличивается срок годности продукта. Кроме того, микробные протеазы усиливают деградацию белков и способствуют образованию биологически активных пептидов, обладающих различными функциональными свойствами. Биоактивные пептиды обычно состоят из 2–20 аминокислот и высвобождаются из исходного белка в ходе его деструкции *in vivo* во время переваривания пищеварительными ферментами, *in vitro* – во время обработки пищевых продуктов или ферментации протеолитическими ферментами или микроорганизмами с протеолитической активностью (Real Hernandez, Gonzalez de Mejia, 2019).

Нут (*Cicer arietinum* L.) – третье по мировой значимости бобовое растение, распространенное и востребованное в Исламской Республике Иран, отличающееся высокой питательной ценностью и содержащее множество биологически активных соединений, включая биоактивные пептиды, которые обладают антиоксидантной, АПФ-ингибирующей, гипохолестеринемической, антигипертензивной, противомикробной, антитромботической, иммуномодулирующей и другими активностями.

Выделение и идентификация микроорганизмов для ферментации нута и изучение их протеолитической активности являются важными этапами при разработке специализированных бактериальных препаратов и производстве готовых продуктов.

Степень разработанности темы исследования. Исследование выполнено на основе научно-теоретических и экспериментальных работ российских и зарубежных ученых: В. И. Ганиной, В. В. Колпаковой, А. Б. Лисицына, Н. Г. Машенцевой, В. Ф. Семенихиной, Н. А. Тихомировой, И. В. Рожковой, В. В. Хорольского, И. М. Чернухи, W. Li, X. Zhang, W. Tian, M. Tanguy, M. Fritz и других. Однако вопрос разработки ферментированного молочнокислыми микроорганизмами нутевого напитка, способствующего расширению ассортимента обогащенных высокобелковых продуктов, в том числе в Иране, до конца не изучен и не описан, вследствие чего данное направление исследований является актуальным и перспективным.

Цель и задачи исследования.

Целью исследования являлась разработка биотехнологии напитка молочносодержащего с экстрактом нута, сквашенного молочнокислыми микроорганизмами, содержащего биологически активные пептиды.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- осуществить теоретические исследования направленной трансформации белков нута молочнокислыми микроорганизмами для получения продуктов питания, содержащих биологически активные пептиды, и сформулировать требования к бактериальному препарату;
- провести выделение молочнокислых микроорганизмов из естественно ферментированных продуктов питания, идентифицировать их по совокупности морфологических, физиолого-биохимических и протеомных признаков, изучить технологические и пробиотические свойства, депонировать в международную коллекцию;
- определить протеолитическую активность молочнокислых микроорганизмов с учетом субстратной специфичности к белкам нута и гены, кодирующие технологически важные протеазы;
- изучить пептидный профиль экстракта нута, ферментированного молочнокислыми микроорганизмами, методом одномерного гель-электрофореза;
- изучить возможность образования биологически активных пептидов из белков нута под действием молочнокислых микроорганизмов, идентифицировать полученные пептиды и определить их потенциальную биологическую активность;
- разработать бактериальный препарат на основе протеолитических молочнокислых микроорганизмов и проект нормативной документации на него;
- разработать технологию напитка молочносодержащего с экстрактом нута сквашенного, содержащего биологически активные пептиды, и оценить ее экономическую эффективность.

Научная новизна исследований. Из продуктов естественной ферментации (простокваша, сыр домашний, йогурт, творог, сыровяленая медвежатица, лосятица, квашеная капуста, огуречный рассол, маринованная спаржа) были выделены, идентифицированы по совокупности морфологических, физиолого-биохимических и протеомных методов молочнокислые микроорганизмы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2, *Lactilactobacillus sakei* SD-8, *Levilactobacillus brevis* VY-1, *Pediococcus pentosaceus* FC-9, *Pediococcus pentosaceus* FC-10, *Leuconostoc mesenteroides* FM-4, *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7, *Leuconostoc mesenteroides* CH-5, *Limosilactobacillus fermentum* AS-3, *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6.

Для отобранных штаммов изучены технологические (активность кислотообразования, антагонистическая активность) и пробиотические свойства (способность выживать в условиях ЖКТ), установлено отношение к антибиотикам, антипитательным факторам нута (фитазная активность, утилизация рафинозы).

Установлено, что штаммы *Leuc. mesenteroides* FM-4 (гены prtB, prtR), *L. sakei* SD-8 (prtB, prtR), *Leuc. mesenteroides* CH-5 (prtB), *P. pentosaceus* FC-9 (prtB, prtH),

L. plantarum PC-7 (prtB, prtP) обладают наибольшей протеолитической активностью в отношении белков молока; штаммы *L. fermentum* SB-2 (prtP/prtM, prtB), *L. sakei* SD-8 (prtB, prtR), *L. brevis* VY-1 (prtP/prtM, prtP, prtB, prtH), *P. pentosaceus* FC-9 (prtP, prtH), *P. pentosaceus* FC-10 (prtB, prtR), *Leuc. mesenteroides* FM-4 (prtB, prtR) – в отношении белков нута; штаммы *P. pentosaceus* FC-10 (prtB, prtP), *L. sakei* SD-8 (prtB, prtR), *P. pentosaceus* FC-9 (prtP, prtH), *Leuc. mesenteroides* FM-4 (prtB, prtR) обладают способностью расщеплять и белки молока, и белки нута. Наличие генов протеаз у всех штаммов подтверждает их протеолитическую активность, а ген prtB играет важную роль в гидролизе белков нута и молока. Протеолитическая активность молочнокислых микроорганизмов является субстратспецифичной.

Выявлены изменения белкового профиля нута под действием молочнокислых микроорганизмов: пептиды имели молекулярную массу в основном ниже 20 кДа. Большинство штаммов активно расщепляли белки вицилина. Изучен пептидный состав, проведена идентификация и исследованы потенциальные биологические активности пептидов, образующихся под действием протеаз идентифицированных микроорганизмов на белки нута – ингибирующая активность ангиотензинпревращающего фермента, антигипертензивная, противоопухолевая, противогрибковая, антибактериальная, противотуберкулезная активности.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Проведено депонирование 10 штаммов молочнокислых микроорганизмов в Биоресурсный центр ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт».

Разработан бактериальный препарат «ЛактоЛек» для производства ферментированного молочно-нutowого напитка с биопептидами, подана заявка на патент «Препарат бактериальный протеолитический для производства ферментированного нutowого напитка», № 2024116892 от 19.06.2024; на препарат разработана нормативная документация (ТУ, ТИ). Опытная партия бактериального препарата была выработана на базе ООО «ПромБиоТехнологии», Тульская область, г. Ефремов.

С учетом органолептических характеристик и пищевой ценности разработана технология напитка молкосодержащего с экстрактом нута сквашенного бактериальным препаратом «ЛактоЛек», содержащего биоактивные пептиды. Полученный продукт соответствует нормам, установленным ТР ТС 033/2013. Апробация технологии осуществлена в производственных условиях ООО «ЖУКОВОМОЛОКО», Калужская область, г. Жуков.

Готовый продукт содержит пептиды с различными биологическими активностями: противоопухолевой, антигипертензивной, противотуберкулезной, антиоксидантной, противогрибковой, антибактериальной и ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ).

Результаты работы внедрены в учебный процесс на кафедре Биотехнологии и биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» и использованы при подготовке бакалавров и магистров по направлениям подготовки 19.03.01 и 19.04.01 «Биотехнология».

Методология и методы исследования. В основе организации и проведения исследований лежат работы ученых России, Ирана и других стран. Методологическую основу диссертации составляют законы классического научного познания, современные методы прикладных исследований. Математическая обработка результатов проводилась с применением программного пакета Microsoft Excel 2019 и программного обеспечения «Statistica 10.0».

Основные положения, выносимые на защиту:

- выделение, идентификация и скрининг молочнокислых микроорганизмов с протеолитической активностью;
- протеомное исследование пептидов, образующихся в результате протеолиза белков нута молочнокислыми микроорганизмами;
- анализ биологических активностей пептидов с использованием баз данных биоинформати.
- разработка бактериального препарата и биотехнологии напитка молкосодержащего с экстрактом нута сквашенного, содержащего биологически активные пептиды.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует пунктам 7, 8, 12, 25 паспорта специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ».

Степень достоверности полученных результатов. При проведении исследования применяли современные методы определения; выводы, сделанные в результате работы, базировались на достижениях фундаментальных и прикладных научных дисциплин, относящихся к теме диссертационной работы.

Личный вклад автора состоит в анализе технической и научной литературы, выборе и обосновании методов исследования, проведении экспериментов, анализе и обобщении результатов и формулировании выводов по работе, подготовке публикаций и докладов на конференциях, разработке технической документации.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были предметом докладов на научных конференциях, конгрессах: Национальной научно-практической конференции «Инновации в биотехнологии» (Москва, 2021); Международной научно-практической конференции «Новые информационные технологии и системы в решении задач инновационного развития» (Ижевск, 2022); Международной научно-практической конференции молодых ученых «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов» (Лосино-Петровский, 2022); III Национальной научно-практической конференции «Инновации в биотехнологии» (Москва, 2023); XIII Международной научной конференции (Минск, 2023); Международной научно-практической конференции «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение» (Воронеж, 2023), XVII Международном биотехнологическом форуме «РосБиоТех» (Москва, 2024); Международной научно-практической конференции «Пищевая индустрия: инновационные процессы, продукты и технологии» (Москва, 2024).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ. Из них 2 публикации в изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, 6 публикаций в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 патент.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Основное содержание работы изложено на 150 страницах, включает 22 таблицы и 31 рисунок. Список литературы включает 173 источников, из них – 149 на английском языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность работы, определены цель и задачи исследования, указана научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертации, а также положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Исследование включает аналитический обзор научной литературы, информацию о нуте и его свойствах, биологической активности пептидов нута, современных методах идентификации молочнокислых микроорганизмов, их протеолитической активности и генах, кодирующих протеазы, методах выявления и идентификации биологически активных пептидов и определения их функциональности.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе представлены методы и объекты исследования, указаны исследуемые показатели и описаны способы их определения. Исследования были проведены по схеме, представленной на рисунке 1.

Объектами исследования являлись:

- молочнокислые микроорганизмы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (B-14054), *Latilactobacillus sakei* SD-8 (B-14053), *Levilactobacillus brevis* VY-1 (B-14052), *Pediococcus pentosaceus* FC-9 (B-14055), *Pediococcus pentosaceus* FC-10 (B-14056), *Leuconostoc mesenteroides* FM-4 (B-14057), *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 (B-14058), *Leuconostoc mesenteroides* CH-5 (B-14059), *Limosilactobacillus fermentum* AS-3 (B-14060), *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 (B-14061), выделенные из естественно ферментированных пищевых продуктов;
- семена нута типа кабули, произрастающего в Иране;
- тест-культуры *Salmonella typhimurium* 5715, *Proteus vulgaris* 14 и *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 209P из ГКПМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича;
- образцы пищевого продукта – ферментированного молочнокислыми микроорганизмами экстракта нута и напитка молочносодержащего с экстрактом нута сквашенного.

В работе использовали стандартные и общепринятые микробиологические, химические, физико-химические, биохимические, органолептические и протеомные методы исследований, проведен биоинформационный анализ результатов. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам осуществлялось диско-диффузионным методом; антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и между молочнокислыми микроорганизмами – методом перпендикулярных штрихов (Лысак, 2002); определение фитазной активности штаммов – на питательной среде, содержащей фитат натрия и фотоколориметрическим методом. Для протеомной идентификации бактерий была использована система Bruker Biotyper MALDI-TOF-масс-спектрометрия (Bruker, США). Определение протеолитической активности микроорганизмов проводилось на молочном агаре (Pailin et al., 2001) и количественно с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС, «Sigma-Aldrich», США), которая используется для измерения количества высвобождаемых аминокрупп в супернатантах (Adler-Nissen, 1979). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) генов протеиназ проводилась на амплификаторе Eppendorf Mastercycler Gradient («Eppendorf», США) с использованием праймеров в концентрации 1 мкМ; ДНК-электрофорез образцов – в камере для горизонтального электрофореза SE-2 («Helicon», США) в 1 %-ном агарозном геле с окраской электрофореграмм бромистым этидием. Одномерный электрофорез белкового матрикса нута проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле в камере для вертикального электрофореза («Helicon», США) с последующим окрашиванием электрофореграмм Кумасси R-250 («PanReac», Испания); двумерный электрофорез белкового матрикса нута и готового продукта – по О'Фарреллу с использованием камеры («Bio-Rad», США) с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в стеклянных трубках в первом направлении, электрофорезом в полиакриламидном геле во втором направлении и окрашиванием Кумасси R-250 («PanReac», Испания) или азотнокислым серебром; компьютерную денситометрию двумерных электрофореграмм во влажном состоянии полных/отдельных фрагментов осуществляли сканированием (Expression 1680, «Epson», США), разрешение 300 ppi, анализ изображений с помощью ПО ImageMaster™ 2D Platinum на базе Melanie 7.0 («GE Healthcare», Швейцария); биоинформационный анализ 1-ДЭ и 2-ДЭ электрофореграмм – интерпретация белковых фрагментов в соответствии с БД Swiss-Prot и БД протеомики растений; масс-спектрометрический анализ – с использованием оборудования ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН: полученные трипсинолизом пептиды идентифицировали методами MALDI-TOF и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex («Bruker», Германия) с УФ-лазером ($\lambda = 336$ нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да. Для расшифровки масс-спектров применяли традиционные методы биоинформатики с использованием базы данных Protein NCBI; биоинформационный анализ пептидов – с помощью баз данных NCBI, BLOPER, AntiCP, AntiBP, ANTpin, ToxinPred, AntiFP, AntiTb.



Рисунок 1 – Схема выполнения исследований

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы были выделены из продуктов естественной ферментации (табл. 1) и идентифицированы по совокупности физиолого-биохимического и протеомного MALDI-TOF MS методов. Идентификация с помощью MALDI-TOF MS (рис. 2) для 3 штаммов из 10 не позволила точно идентифицировать штаммы и показала, что:

- для штамма *L. fermentum* AS-3 значение коэффициента совпадения score 2,124 со штаммом *L. fermentum* 21_PG_1 ZZMK и score 1,846 со штаммом *L. paracasei* ssp. *paracasei* DSM 20006 DSM;

- для штамма *L. paracasei* значение коэффициента совпадения score 2,187 со штаммом *L. paracasei* ssp. *paracasei* DSM 2649 DSM и score 2,043 со штаммом *L. fermentum* DSM 20391 DSM_2.

- для штамма *Leuc. mesenteroides* значение коэффициента совпадения score 2,117 со штаммом *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* DSM 20343T DSM и score 1,761 со штаммом *L. plantarum* DSM 20246 DSM.

В связи с этим был проведен дополнительный биохимический тест на ферментацию углеводов. Так, например, штаммы *L. fermentum* 21_PG_1 ZZMK и *L. fermentum* DSM 20391 DSM_2 можно различить со штаммами *L. paracasei* ssp. *paracasei* DSM 20006 DSM и *L. paracasei* ssp. *paracasei* DSM 2649 DSM по способности последних ферментировать арабинозу. А штамм *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* DSM 20343T DSM будет ферментировать D-ксилозу в отличие от *L. plantarum* DSM 20246 DSM.

Штаммы, депонированные в Биоресурсный центр ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» (табл. 1).

Таблица 1 – Микроорганизмы, депонированные в коллекцию ВКПМ

№	Источник выделения	Вид	Штамм	Номер ВКПМ
1	Сыровяленая медвежатина	<i>L. fermentum</i>	SB-2	B-14054
2	Сыровяленая лосятина	<i>L. sakei</i>	SD-8	B-14053
3	Домашний йогурт	<i>L. brevis</i>	VY-1	B-14052
4	Квашеная капуста	<i>P. pentosaceus</i>	FC-9	B-14055
5	Сыр домашний	<i>P. pentosaceus</i>	FC-10	B-14056
6	Простокваша	<i>Leuc. mesenteroides</i>	FM-4	B-14057
7	Огуречный рассол	<i>L. plantarum</i>	PC-7	B-14058
8	Творог	<i>Leuc. mesenteroides</i>	CH-5	B-14059
9	Спаржа маринованная 1	<i>L. fermentum</i>	AS-3	B-14060
10	Спаржа маринованная 2	<i>L. paracasei</i>	CA-6	B-14061

При определении пробиотических свойств выявлено, что наиболее жизнеспособными штаммами в условиях ЖКТ являются *L. sakei* SD-8, *L. brevis* VY-1, *L. plantarum* PC-7, *Leuc. mesenteroides* CH-5 и *L. paracasei* CA-6 (рис. 3).

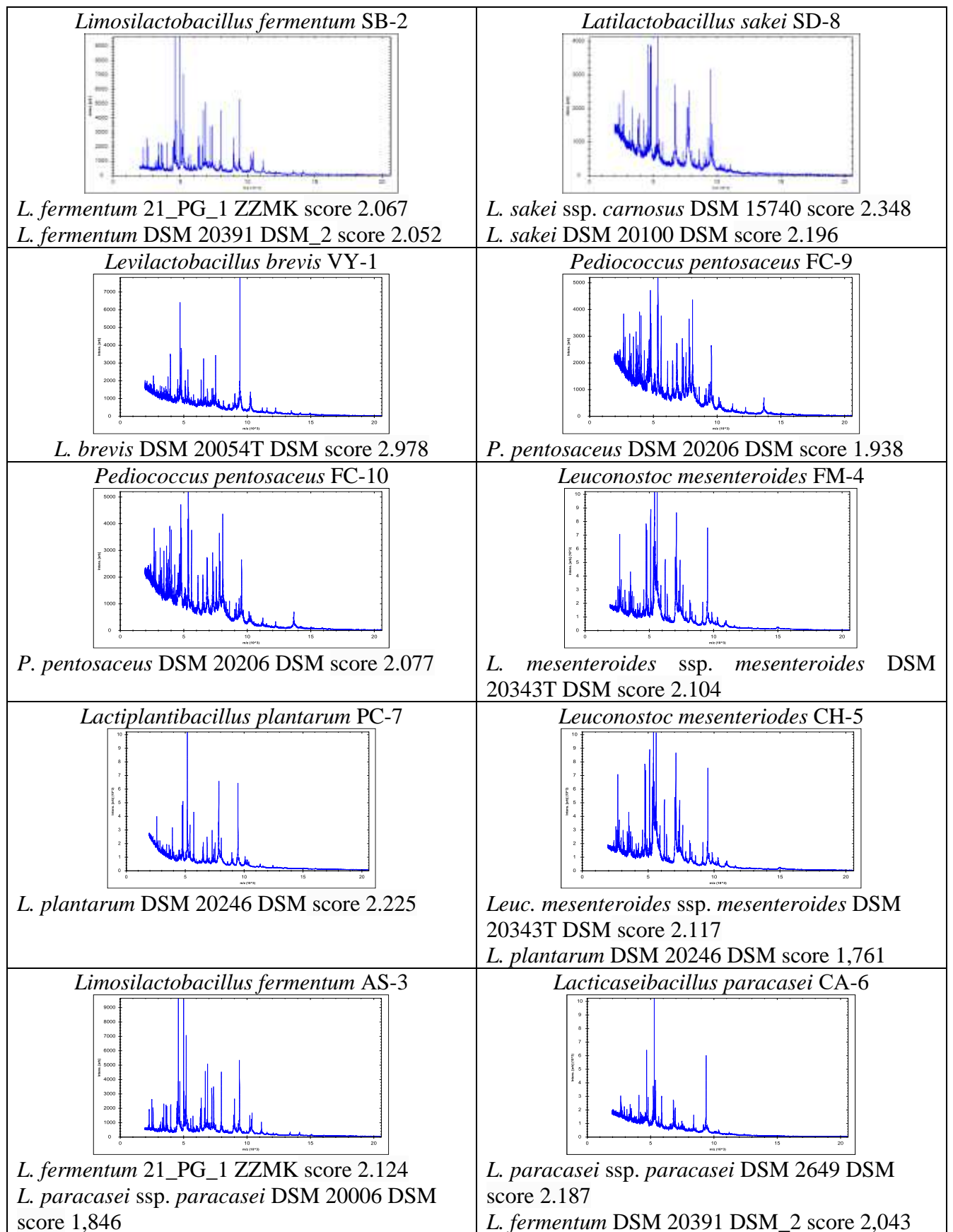


Рисунок 2 – Масс-спектры MALDI-TOF идентифицируемых микроорганизмов

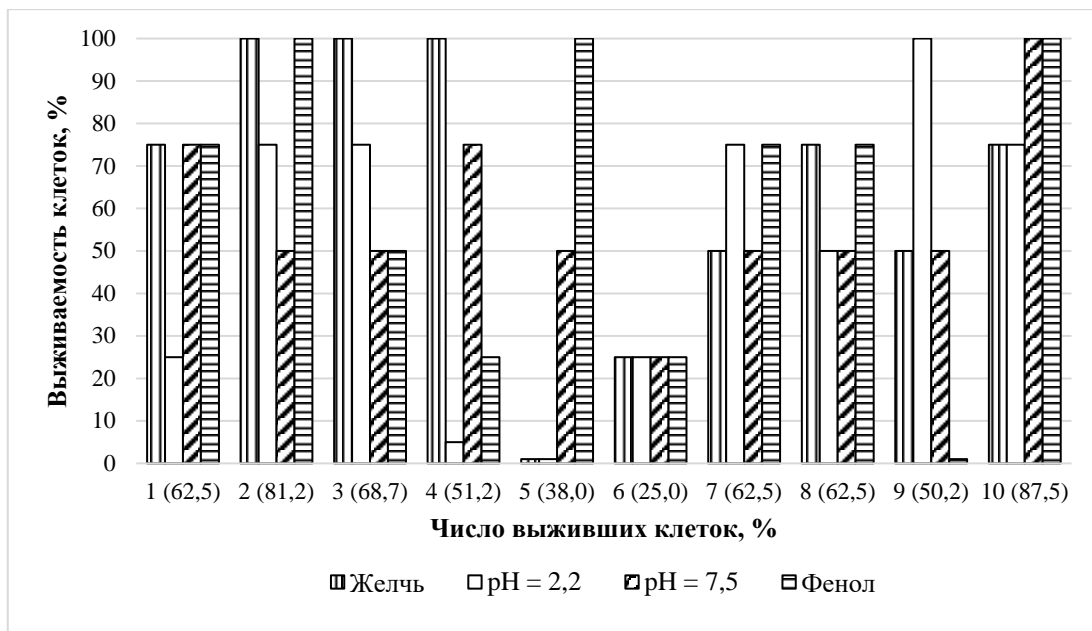


Рисунок 3 – Устойчивость штаммов к условиям ЖКТ

Исследование антагонистической активности проводилось в отношении тест-культур *Salmonella typhimurium* 5715, *Proteus vulgaris* 14 и *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 209P. Наибольшую антагонистическую активность проявили штаммы *L. fermentum* SB-2, *Leuc. mesenteroides* FM-4 и *L. paracasei* CA-6, за ними следовали штаммы *L. sakei* SD-8, *P. pentosaceus* FC-9, *L. plantarum* PC-7 и *L. fermentum* AS-3.

При определении отношения микроорганизмов к антибиотикам было показано, что штаммы чувствительны к макролидам, линкозамидам, хинолонам, пенициллиновым и аминогликозидным антибиотикам. Резистентность к ванкомицину характерна для всех штаммов и является природной (Charteris, 1998). Устойчивость к ципрофлоксацину объясняется узкой направленностью действия данного антибиотика, в основном, в отношении грамотрицательных микроорганизмов. Ряд штаммов были устойчивы к азтреонаму, к клоксациллину устойчивость зависила от концентрации антибиотика.

Наиболее активными кислотообразователями были штаммы *Lactilactobacillus sakei* SD-8, *Pediococcus pentosaceus* FC-9, *Leuconostoc mesenteroides* FM-4, *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 и *Limosilactobacillus fermentum* AS-3, а самые низкие показатели кислотообразования были у *Pediococcus pentosaceus* FC-10 и *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6. Титруемая кислотность была в пределах 85–117 °Т, предельная кислотность (через 7 сут.) – 122–210 °Т. Значения активной кислотности были в пределах от 4,4 до 5,7. Вкус сгустка, образованного разными штаммами, чистый, кисломолочный, а консистенция однородная.

При оценке способности микроорганизмов снижать содержание антипитательных факторов установлено, что все штаммы, кроме *L. plantarum* PC-7, утилизировали рафинозу в разной степени, самыми активными были *L. sakei* SD-8, *L. brevis* VY-1 и *Leuc. mesenteroides* CH-5. Фитазной активности у исследуемых штаммов не обнаружено.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ГЕНОВ ПРОТЕАЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

При определении протеолитической активности микроорганизмов на молочном агаре штаммы были распределены по убыванию размера зон просветления вокруг колоний в следующем порядке: *L. sakei* SD-8, *Leuc. mesenteroides* FM-4, *Leuc. mesenteroides* CH-5, *P. pentosaceus* FC-9, *P. pentosaceus* FC-10, *L. plantarum* PC-7. Штаммы *L. fermentum* SB-2, *L. brevis* VY-1, *L. fermentum* AS-3 и *L. paracasei* CA-6 не проявили активности.

Для подтверждения выводов, сделанных на основании качественной оценки протеолитической активности был использован количественный метод ТНБС, который чаще всего применяется для определения степени протеолиза и среди спектрофотометрических методов считается стандартным. Результаты измерения протеолитической активности накопления аминного азота (эквивалент L-лейцина, мМ), определенного методом ТНБС, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика параметров ферментации и уровня протеолитической активности молочнокислых бактерий белков нута

№	Образец через 72 ч ферментации	pH	Эквиваленты L-лейцина, мМ	Δ эквиваленты L-лейцина, мМ
1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2	4,13	27,91	17,35
2	<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8	3,47	25,72	16,13
3	<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1	3,7	25,38	14,74
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9	3,63	25,92	12,58
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10	3,85	26,88	14,2
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4	3,87	22,84	10,53
7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7	3,47	15,89	3,38
8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5	3,48	19,57	8,04
9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3	3,23	14,74	3,75
10	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CA-6	3,3	14,83	3,72
11	Контроль	5,31– 5,34	41,78	29,63

Самый высокий показатель накопления аминного азота был у штамма *L. fermentum* SB-2 (17,35), затем по убыванию у штаммов *L. sakei* SD-8 (16,13), *L. brevis* VY-1 (14,74) и *P. pentosaceus* FC-10 (14,2). Наименьшее количество накопления аминного азота характерно для штаммов *L. plantarum* PC-7 (3,38), *L. fermentum* AS-3 (3,75) и *L. paracasei* CA-6 (3,72).

По результатам ПЦР выявлено, что в геноме всех штаммов присутствуют гены протеаз: межгенной области prtP, каталитического домена prtM и протеаз клеточной стенки prtB, prtH и prtR (рис. 5), что подтверждает их протеолитическую активность, а ген prtB играет важную роль в гидролизе белков нута и молока.

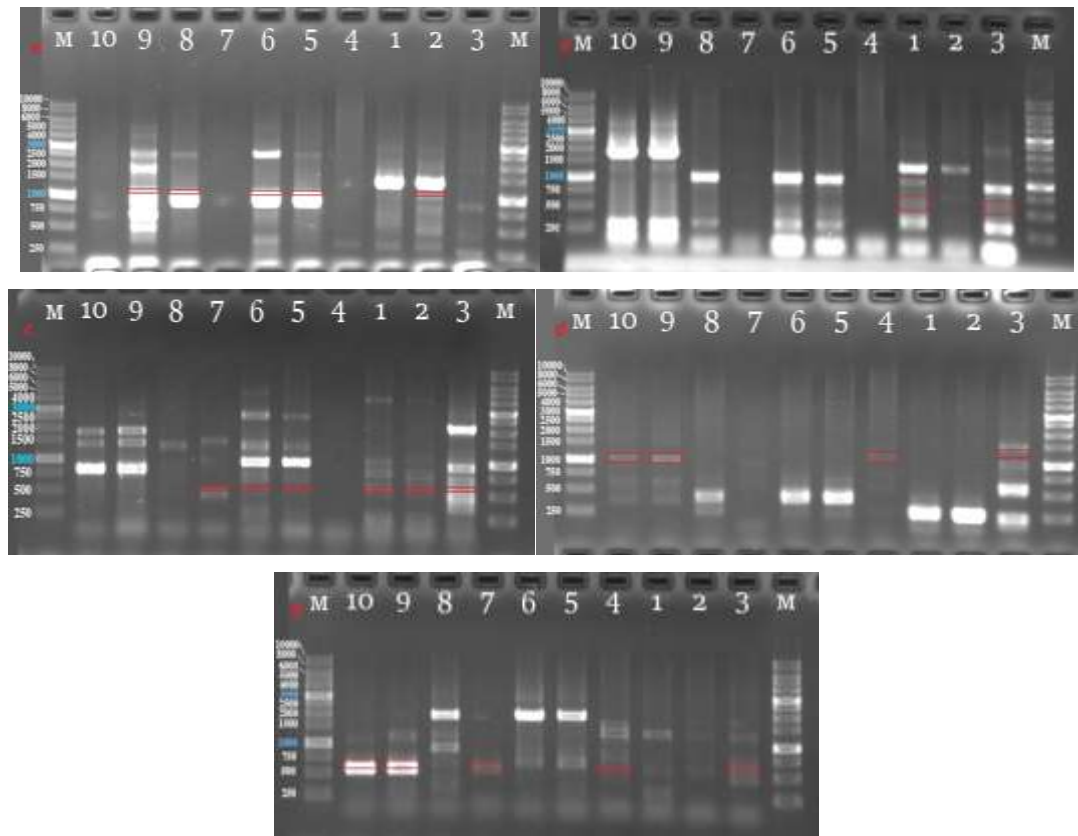


Рисунок 5 – Картина гель-электрофореза генов протеаз: а – prtP/prtM (685 п.н.), б – prtP (560 п.н.), в – prtB (597 п.н.), д – prtH (1034 п.н.), е – prtR (1052 п.н.), М – маркер 1 Kb DNA Ladder (DL006), (Geneaid Biotech Ltd, Тайвань), 1 – *L. paracasei* CA-6, 2 – *L. fermentum* AS-3, 3 – *Leuc. mesenteroides* CH-5, 4 – *L. plantarum* PC-7, 5 – *Leuc. mesenteroides* FM-4, 6 – *P. pentosaceus* FC-10, 7 – *P. pentosaceus* FC-9, 8 – *L. fermentum* SB-2, 9 – *L. sakei* SD-8, 10 – *L. brevis* VY-1

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ФЕРМЕНТАЦИИ ЭКСТРАКТА НУТА

На рис. 6 представлена технологическая схема получения экстракта нута и условия его ферментации. Органолептическая оценка показала, что экстракт нута, ферментированный штаммами 5, 6, 9 и 10, имеет неприятный запах, поэтому данные штаммы не подходят для получения продукта (табл. 3).

Таблица 3 – Органолептическая оценка ферментированного экстракта нута

№	Штамм	Запах
1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2	нормальный, слегка кислый, свежий
2	<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8	нормальный, слегка кислый
3	<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1	кислый, кефирный
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9	свежий
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10	неприятный, резкий
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4	резкий кислый
7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7	приятный свежий
8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5	слегка кисловатый
9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3	неприятный, тухловатый
10	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CA-6	неприятный и резкий

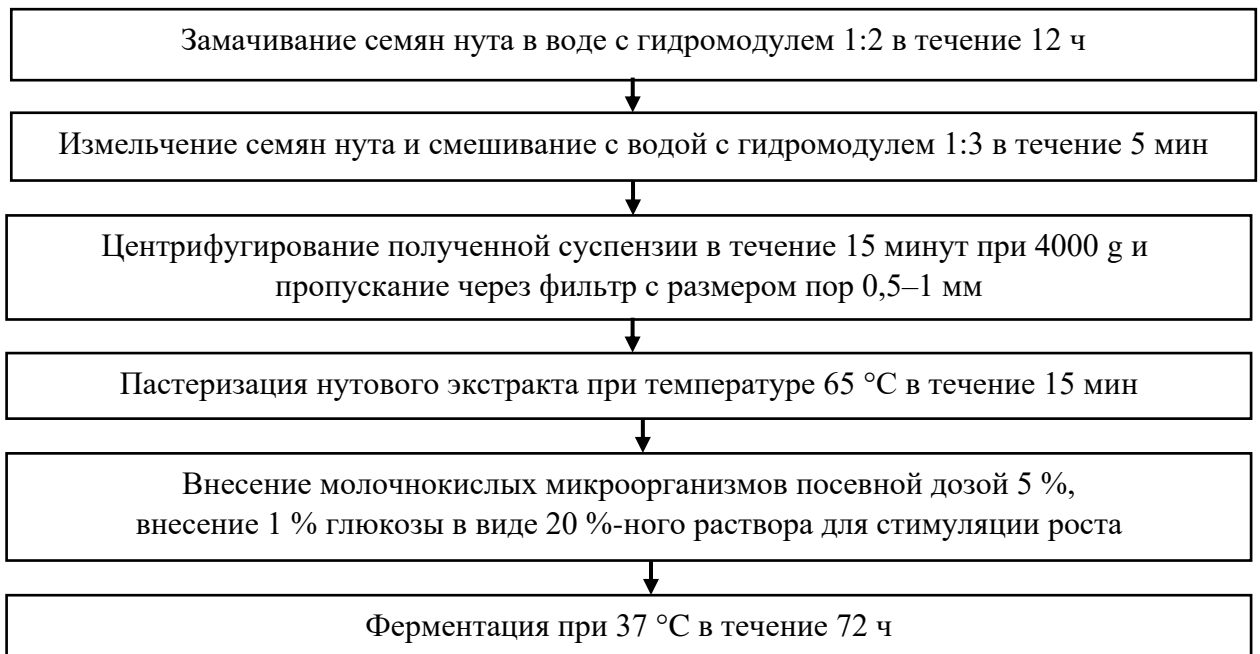


Рисунок 6 – Технологическая схема получения экстракта нута

Влияние микроорганизмов на белковый профиль экстракта нута исследовали с помощью одномерного гель-электрофореза. В основном образовывались полосы с молекулярной массой примерно от 97 до 10 кДа. Полоса 97 кДа была отнесена к липоксигеназе (фрагмент 1). Предполагаемые молекулярные массы 49, 35, 33, 19 и 15 кДа были идентифицированы как субъединицы вицилина нута (7S) (фрагмент 3 и 4), о которых сообщили Chang и др. (2011), а линии фракции легумина показали сильную полосу в 60 кДа (фрагмент 2). Количественные изменения произошли в ферментном комплексе нута, а именно в нутовой липоксигеназе. Молекулярная масса пептидов, полученных после ферментации, в основном ниже 20 кДа, большинство штаммов смогли разрушить вицилин.

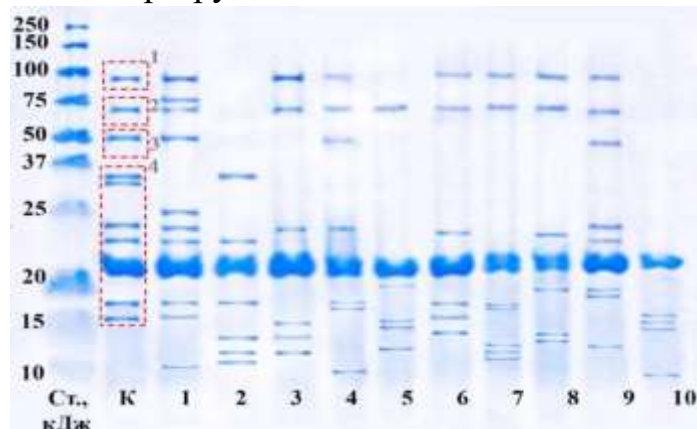


Рисунок 7 – Электрофореграмма белкового профиля экстракта нута, ферментированного микроорганизмами. Ст., кДа – стандартный маркер Page Ruler; К – контроль, 1 – *L. fermentum* SB-2; 2 – *L. sakei* SD-8; 3 – *L. brevis* VY-1; 4 – *P. pentosaceus* FC-9; 5 – *P. pentosaceus* FC-10; 6 – *Leuc. mesenteroides* FM-4; 7 – *L. plantarum* PC-7; 8 – *Leuc. mesenteroides* CH-5; 9 – *L. fermentum* AS-3; 10 – *L. paracasei* CA-6. Окрашивание Кумасси R-250

На основании выполненных исследований были отобраны как протеолитические следующие штаммы: *L. fermentum* SB-2 (1), *L. sakei* SD-8 (2), *L. plantarum* PC-7 (7) и *Leuc. mesenteriodes* CH-5 (8). По результатам протеомного исследования образцов белков нута после протеолиза штаммами 1–10 были идентифицированы пептиды, потенциальная биологическая активность которых представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Определение потенциальной биологической активности пептидов нута

Белок – предшественник пептида	№ позиций в а.п.*	Последовательность, подтвержденная MS/MS	m/z	Активность**
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2, 24 ч				
NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic-like XP_004494625.2	33–53	ASGEQKFPPQKQETQPGKEHA	2364,2	ACE inhibitor, AntiCP, АНТpin
dehydrin DHN3 XP_004512937.1	22–47	IVQVDQYGNPINQSGVGMTGEAGRTF	2738,3	ACE inhibitor, AntiCP,
late embryogenesis abundant protein D-34-like XP_004496718.1	1–23	MNQEQRPRRHQADQDPIKYGDVLP	2777,4	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AntiFP
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2, 36 ч				
vicilin-like XP_004493035.1	144–156	LAIPVNRPGQFQS	1426,8	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8, 24 ч				
2S albumin-like XP_004487601.1	30–51	EIPESCHKQLKSLNLKHCEKFL	2622,3	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, АНТpin
	30–52	EIPESCHKQLKSLNLKHCEKFLM	2753,4	Antioxidative, AntiBP, ACE inhibitor, AntiCP
	24–55	SKDEKEEIPESCHKQLKSLNLKHC EKFLMKRM	3884,9	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AntiFP
<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8, 36 ч				
2S albumin-like XP_004487601.1	24–51	SKDEKEEIPESCHKQLKSLNLKHC EKFL	3338,6	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, АНТpin, AntiFP
<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1, 24 ч				
vicilin-like XP_004493035.1	377–388	GFGINAQNNQRN	1332,6	ACE inhibitor
	376–388	LGFGINAQNNQRN	1445,7	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP
2S albumin-like XP_004487601.1	131–143	LRCGITPPLGCDL	1355,7	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9, 24 ч				
2S albumin-like XP_004487601.1	131–147	LRCGITPPLGCDLSFDN	1490,7	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9, 36 ч				
vicilin-like XP_004493035.1	420–428	LLKNQRQSH	1123,6	Antioxidative, AntiCP, AntiBP, AntiFP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10, 24 ч				
vicilin-like XP_004493035.1	400–419	IQRPVKEVAFPGSAEEVDR	2127,1	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP

<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10, 36 ч				
vicilin-like XP_004492829.1	328–346	KKEDEEEEEDRNVQVQRFQ	2435,2	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP, AHTpin
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4, 24 ч				
vicilin-like XP_004492829.1	395–420	VISQIQRPVKEVAFPGSAEEVDRL LK	2908,6	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AntiBP
	387–405	FLAGEEDNVISQIQRPVKE	2172,1	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP
	328–358	KKEDEEEEEDRNVQVQRFQSKLS SGDVVVIP	3616,8	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP
	328–359	KKEDEEEEEDRNVQVQRFQSKLS SGDVVVIPA	3687,8	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4, 36 ч				
2S albumin-like XP_004487601.1	77–90	REEGLKENCCAQL	1490,7	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7, 36 ч				
2S albumin-like XP_004487601.1 P24 oleosin XP_004489219.1	24–52	SKDEKEEIPESCHKQLKSLNLKHC EKFLM	3469,7	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin, AntiFP
	155–189	GSVADVAGYVGQKTKDVGQKTK EVGQDIQAKAHET	3642,8	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3, 24 ч				
dehydrin DHN3 XP_004512937.1	2–20	SYNQGQYVDQTRRTDEYGN	2336,0	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3, 36 ч				
vicilin-like XP_004493035.1 P24 oleosin XP_004489219.1	331–348	KEDEEEEEEDRNVQVQRFQ	2307,1	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP, AHTpin
	155–193	GSVADVAGYVGQKTKDVGQKTK EVGQDIQAKAHETKRST	4115,0	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP
<i>Lactiseibacillus paracasei</i> CA-6, 24 ч				
vicilin-like XP_004493035.1 oleosin 16.4 kDa-like XP_004515879.1 late embryogenesis abundant protein 2 NP_001296579.1 NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplast-like XP_004494625.2	384–391	NNQRNFLA	976,5	ACE inhibitor, AntiCP
	2–17	AQPQRGDYDNYQQHP	2022,0	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin
	138–155	FGMTNDDQDKDHFPTNRH	2175,0	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP
	33–52	ASGEQKFPQKQETQPGKEN	2293,2	ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin
<i>Lactiseibacillus paracasei</i> CA-6, 36 ч				
seed linoleate 9S- lipoxygenase-3 XP_004486857.1	190–201	LRGDGTGERKEW	1403,7	ACE inhibitor, AntiCP, AntiBP, AntiTb

*а.п. – аминокислотная последовательность

** AntiCP – противораковый, AntiBP – антибактериальный, AHTpin – антигипертензивные ингибиторы, AntiFP – противогрибковый, AntiTb – противотуберкулезный, ACE inhibitor – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ)

Во всех исследуемых образцах идентифицированы пептиды, обладающие преимущественно противоопухолевой и потенциальной ингибирующей активностью ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), за исключением образца *Leuc. mesenteroides* CH-5, для которого такие пептиды не обнаружены. Для

всех пептидов, кроме GFGINAQNNQRN *L. brevis* VY-1, показана противоопухолевая активность. Антигипертензивными свойствами обладают пептиды, образуемые штаммами *L. fermentum* SB-2, *L. sakei* SD-8, *P. pentosaceus* FC-10, *L. plantarum* PC-7, *L. fermentum* AS-3 и 10 *L. paracasei* CA-6. Противогрибковые свойства установлены для штаммов 1, 4 и 7. Среди исследуемых пептидов только REEGLKENCCAQL, образуемый штаммом 6, оказался потенциально токсичным (аллергенным), поэтому данный штамм не рассматривался для дальнейших исследований. Штаммы 2, 4, 6 и 10 способствуют образованию пептидов с антибактериальными свойствами. Антиоксидантные свойства обнаружены у образцов со штаммами 1, 3, 4, 6, 7 и 10 (табл. 4).

Авторы работы считают, что использование композиций штаммов намного перспективнее использования их поодиночке, поэтому были составлены и использованы в дальнейшем следующие композиции штаммов: *L. fermentum* SB-2 (1) + *L. sakei* SD-8 (2) и *L. plantarum* PC-7 (7) + *Leuc. mesenteriodes* CH-5 (8).

Поскольку планировалось использование композиций штаммов, необходимо было установить их антагонистическую активность по отношению друг к другу, чтобы избежать ингибирования одного штамма другим. Было установлено отсутствие антагонизма между штаммами *L. fermentum* SB-2 и *L. sakei* SD-8, а также штаммами *L. plantarum* PC-7 и *Leuc. mesenteriodes* CH-5, поэтому их можно использовать в совместной композиции.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ НАПИТКА МОЛОКОСОДЕРЖАЩЕГО С ЭКСТРАКТОМ НУТА СКВАШЕННОГО

Несмотря на ряд преимуществ использования растительных белков в питании человека, их выраженный вкус и плохая растворимость ограничивают их применение в пищевой промышленности. Для преодоления этого недостатка комбинация с молочными белками может стать интересной стратегией увеличения использования растительных белков.

Был выработан напиток молокосодержащий с экстрактом нута, сквашенный композициями 1 (*L. fermentum* SB-2 + *L. sakei* SD-8) и 2 (*L. plantarum* PC-7 + *L. mesenteriodes* CH-5). Рецепт продукта содержала 55 % коровьего молока жирностью 0,5 % и 45 % нутового экстракта. Композиция микроорганизмов вносилась в количестве 10^7 КОЕ/см³. Напиток сквашивали в течение 72 ч.

В ходе определения активности кислотообразования во всех образцах было отмечено активное повышение кислотности (табл. 5).

Оба напитка соответствовали микробиологическим требованиям ТР ТС 033/2013 для жидких кисломолочных продуктов и содержали молочнокислых микроорганизмов не менее 1×10^8 КОЕ/мл. БГКП, в т.ч. *E. coli*, сальмонеллы, *L. monocytogenes* и *S. aureus* обнаружены не были. Также не были обнаружены дрожжи и плесневые грибы.

Таблица 5 – Активность кислотообразования композиций в напитке

Образец	Длительность ферментации, ч	Кислотность	
		активная, рН	титруемая, °Т
Напиток, сквашенный композицией 1	0	6,69	27
	24	3,5	107
	72	3,5	164
Напиток, сквашенный композицией 2	0	6,69	27
	24	3,88	98
	72	3,57	180
Молоко коровье, сквашенное композицией 1 (контроль)	0	5,56	25
	24	5,18	88
	72	3,8	135
Молоко коровье, сквашенное композицией 2 (контроль)	0	5,56	25
	24	4,98	79
	72	4,03	120

Более высокими органолептическими характеристиками обладал напиток, сквашенный композицией 1 в течение 24 ч: по консистенции, цвету и аромату он был максимально близок к установленным в ТР ТС нормам. Напиток, сквашенный композицией 2, проигрывал по органолептическим показателям, поскольку имел неприятное бобовое послевкусие и обладал легким бобовым запахом (табл. 6). К 72 ч ферментации вкус обоих продуктов становился кислым, их органолептика ухудшалась.

Таблица 6 – Органолептические показатели продуктов через 24 ч сквашивания

Образец	Внешний вид	Консистенция	Вкус	Запах	Цвет
Напиток, сквашенный композицией 1	Непрозрачная жидкость	Жидкая, однородная	Кисломолочный с легкими цветочными нотками	Кисломолочный	Светло-кремовый
Напиток, сквашенный композицией 2	Непрозрачная жидкость	Жидкая, однородная	Кисломолочный с бобовым послевкусием	Кисломолочный с бобовыми нотками	Светло-кремовый

Напиток, сквашенный композицией 1, имел более высокое содержание сухих веществ и белка по сравнению с образцом, сквашенным композицией 2 (табл. 7).

Таблица 7 – Химический состав напитков

Образец	Сухих веществ, %	Сырой протеин (N×6,25), %	Жир, %	Углеводы, %	Зола, %
Напиток, сквашенный композицией 1	14,3	10,60	0,82	1,84	1,04
Напиток, сквашенный композицией 2	12,7	9,78	0,79	1,15	0,98

Установлено, что в результате протеолиза белков нута *L. fermentum* SB-2 и *L. sakei* SD-8 образовывались пептиды с различными потенциальными биологическими активностями: противоопухолевой, антигипертензивной, противотуберкулезной, антиоксидантной, противогрибковой, антибактериальной и ингибиторы АПФ. Образцы также содержали типичные белки молока, обнаруживаемые на электрофореграммах в виде дополнительных пятен-фракций. Результаты идентификации показали, что это: α -S1 казеин, фосфорилированный по остатку серина 130S, смесь β -казеина, фосфорилированного по 50S, и фрагмент α -S1 казеина, а также смесь трех белков – β -лактоглобулина, фрагмента прогестаген-ассоциированного эндометриального белка и фрагмента β -казеина.

Оценка экономической эффективности показала, что при замене коровьего молока на экстракт нута и использовании отечественного бактериального препарата «ЛактоЛек» себестоимость продукта снижается на 35 %.

ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ научно-технической литературы, посвященной влиянию микроорганизмов на трансформацию белков нута для получения продуктов питания, содержащих биологически активные пептиды, и сформулировано требование к бактериальному препарату на основе молочнокислых микроорганизмов – наличие субстратспецифичной протеолитической активности, подтвержденной наличием генов протеиназ, обоснована актуальность разработки бактериального препарата и технологии напитка молкосодержащего с экстрактом нута сквашенного, содержащего биологически активные пептиды.

2. Выделены и идентифицированы 10 промышленно-ценных молочнокислых микроорганизмов: *L. fermentum* SB-2, *L. sakei* SD-8, *L. brevis* VY-1, *P. pentosaceus* FC-9, *P. pentosaceus* FC-10, *L. mesenteroides* FM-4, *L. plantarum* PC-7, *L. mesenteroides* CH-5, *L. fermentum* AC-3, *L. paracasei* CA-6. Определены пробиотические свойства микроорганизмов: наиболее жизнеспособными штаммами в условиях ЖКТ являются *L. sakei* SD-8, *L. brevis* VY-1, *L. plantarum* PC-7, *Leuc. mesenteroides* CH-5 и *L. paracasei* CA-6. При определении отношения микроорганизмов к антибиотикам было показано, что штаммы чувствительны к макролидам, линкозамидам, хинолонам, пенициллиновым и аминогликозидным антибиотикам. Резистентность к ванкомицину характерна для всех штаммов и

является природной. Наивысшую антагонистическую активность к санитарно-показательной микрофлоре показали *L. fermentum* SB-2, *Leuc. mesenteroides* FM-4 и *L. paracasei* CA-6. Наиболее активными кислотообразователями были штаммы *L. sakei* SD-8, *P. pentosaceus* FC-9, *Leuc. mesenteroides* FM-4, *L. plantarum* PC-7 и *L. fermentum* AS-3. При оценке возможности снижать содержание антипитательных факторов установлено, что все штаммы, за исключением *L. plantarum* PC-7, утилизируют рафинозу в разной степени, фитазной активности обнаружено не было. Штаммы депонированы в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт».

3. Установлено, что штаммы *Leuc. mesenteroides* FM-4, *L. sakei* SD-8, *Leuc. mesenteroides* CH-5, *P. pentosaceus* FC-9, *L. plantarum* PC-7 проявили наибольшую протеолитическую активность в отношении белков молока; штаммы *L. fermentum* SB-2, *L. sakei* SD-8, *L. brevis* VY-1, *P. pentosaceus* FC-9, *P. pentosaceus* FC-10, *Leuc. mesenteroides* FM-4 – в отношении белков нута; штаммы *P. pentosaceus* FC-10, *L. sakei* SD-8, *P. pentosaceus* FC-9, *Leuc. mesenteroides* FM-4 показали способность расщеплять и белки молока, и белки нута. Выявление генов протеаз у всех штаммов подтвердило их протеолитическую активность, установлено, что ген *prtV* кодирует фермент, играющий важную роль в гидролизе белков нута и молока.

4. В результате одномерного гель-электрофореза ферментированного экстракта нута идентифицированы белковые фрагменты липоксигеназы, вицилина и легумина. Молекулярная масса пептидов, полученных после ферментации молочнокислыми микроорганизмами, была в основном ниже 20 кДа; большинство идентифицированных штаммов способны разлагать вицилин.

5. В результате протеомных исследований пептидов нута, образующихся под действием молочнокислых микроорганизмов, были идентифицированы 30 пептидов. Из них 29 обладали потенциальной ингибирующей активностью по отношению к ангиотензинпревращающему ферменту (BIOPEP), 29 – противоопухолевой активностью (AntiCP), 8 – антигипертензивными свойствами (АНTrin), 7 – противотуберкулезными свойствами (AntiTb), 5 – противогрибковыми свойствами (AntiFP), 4 – антибактериальной активностью (AntiBP).

6. Разработаны бактериальный препарат «ЛактоЛек» из перспективных в отношении протеолиза штаммов *L. fermentum* SB-2 и *L. sakei* SD-8 и проекты ТУ и ТИ на него. Опытная партия бактериального препарата была выработана на базе ООО «ПромБиоТехнологии».

7. С учетом органолептических показателей разработана технология напитка молочносодержащего с экстрактом нута, сквашенного бакпрепаратом «ЛактоЛек», содержащего биоактивные пептиды. Полученный продукт соответствует нормам, установленным ТР ТС 033/2013. Оценка экономической эффективности показала, что при замене коровьего молока на экстракт нута и использовании бакпрепарата «ЛактоЛек» себестоимость продукта снижается на 35 %.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ

Статьи, индексируемые в международных базах данных Web of Science и Scopus

1. Ахангаран, М. Биоактивные пептиды и антипитательные вещества нута: характеристика и свойства (обзор) / М. Ахангаран, Д. А. Афанасьев, И. М. Чернуха, Н. Г. Машенцева, М. Гаравири // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2022. – Т. 183. – №. 1. – С. 214–223. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1-214-223> (Scopus)

2. Афанасьев, Д. А. Влияние микрокапсулированных стартовых культур на образование биологически активных пептидов в готовых мясных продуктах. Д. А. Афанасьев, И. М. Чернуха, В. И., Ганина, Н. Г. Машенцева, Л. И. Ковалев, А. В. Коврижных, М. Ахангаран, М. Гаравири // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2022. – №. 59. – С. 42–63. <https://doi.org/10.17223/19988591/59/2> (Web of Science, Scopus)

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Коврижных, А. В. Определение протеолитической активности молочнокислых бактерий и выявление генов протеиназ / А. В. Коврижных, Д. А. Афанасьев, М. Ахангаран, М. Гаравири, Н. Г. Машенцева, Н. В. Василичев // Хранение и переработка сельхозсырья, – 2022. – Т. 4. – С. 113–127. <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.341>

2. Афанасьев, Д. А. Оценка функциональности пептидов с применением методов биоинформатики / Д. А. Афанасьев, Н. Г. Машенцева, И. М. Чернуха, М. Ахангаран, М. Гаравири // Все о мясе. – 2021. – № 6. – С. 48–53. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2021-6-48-53>

3. Масумиан, М. Генетический анализ разнообразия линий нута методом случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD) / М. Масумиан, М. Гаравири, З. Годжаванд, М. Ахангаран, Н. Г. Машенцева, Д. Синаки // Хранение и переработка сельхозсырья, – 2024. – 32(1). – С.95–107. <https://doi.org/10.36107/spfp.2024.1.458>

4. Ахангаран, М. Разработка напитка молкосодержащего сквашенного с экстрактом нута / М. Ахангаран, Г. А. Мариненкова, И. И. Ионова, Я. М. Савинов, Н. Г. Машенцева // Новые технологии / New technologies. 2024. – 20(3). – С. 11–27. <https://doi.org/10.47370/2072-0920-2024-20-3-11-27>

Патенты на изобретения

1. Патент № 2803851 С1 Российская Федерация, МПК А23J 1/14. Способ получения белкового изолята из бобов нута типа Дези или Кабули / М. Гаравири, **М. Ахангаран**, Д. А. Афанасьев, И. А. Фоменко, Н.Г. Машенцева // патентообладатель ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет». – № 2023119096/10(041180); заявл. 19.07.2023; опубл. 21.09.2023.

Статьи и материалы конференций, индексируемые в РИНЦ

1. **Ахангаран, М.** Сравнительная характеристика современных методов идентификации микроорганизмов: преимущества и недостатки / Н. Г. Машенцева, **М. Ахангаран**, М. Гаравири, С. К. Венкант, Д. А. Афанасьев // Новые информационные технологии и системы в решении задач инновационного развития : сборник статей Международной научно-практической конференции, Ижевск, 7 мая 2022 года. – Уфа: Общество с ограниченной ответственностью «ОМЕГА САЙНС», 2022. – С. 9–15.

2. **Ахангаран, М.** Способы биотрансформации белков нута / **Ахангаран М.**, Гаравири М., Афанасьев Д. А., Машенцева Н. Г // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых, Лосино-Петровский, 27–28 октября 2022 года. – Лосино-Петровский: Б. и., 2022. – С. 211–216.

3. **Ахангаран, М.** Влияние молочнокислых микроорганизмов на повышение качества нуттового напитка на молочной основе / **М. Ахангаран**, Г. А. Мариненкова, Н. Г. Машенцева // Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение: сборник научных статей и докладов, Воронеж, 19–20 ноября 2023 года. – ВГУИТ, 2023. – С. 116–117.

4. **Ахангаран, М.** Ферментативное производство биологически активных пептидов в растительном сырье / М. Гаравири, **М. Ахангаран**, И.А. Фоменко, Н.Г. Машенцева // Микробные биотехнологии : фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XIII Междунар. науч. конф. (Минск, 6–9 июня 2023 г.) / орг. ком. конф.: А. А. Шепшелев (пред.) и [др.]. – Минск : Беларуская наука, 2023. – С. 142–143.

5. **Ахангаран, М.** Биотехнологическая переработка семян нута кабули различными методами для использования в пищевой промышленности / **Ахангаран М.**, Гаравири М., Машенцева Н. Г // «Пищевая индустрия: инновационные процессы, продукты и технологии»: материалы Международной научно-практической конференции, Москва, 16 мая 2024 года. – М.: ООО «Сам Полиграфист», 2024. – С. 389–393.

SUMMARY

The possibility of directed transformation of chickpea proteins by lactic acid microorganisms to obtain food enriched with biologically active peptides is shown. 10 microorganisms have been isolated from natural sources, which have been identified by phenotypic, physiological, biochemical and proteomic methods, and their technological and probiotic properties have been studied. To determine their proteolytic activity, the TNBS method was used, as well as cultivation on milk agar. Peptides formed from chickpea proteins have been identified by MALDI-TOF MS and mass spectrometry methods and their potential bioactivity has been determined. A bacterial preparation based on *Limosilactobacillus fermentum* SB2 and *Latilactobacillus sakei* SD-8 strains has been developed. The technology of a milk-containing drink with an extract of fermented chickpeas has been developed.

РЕЗЮМЕ

Показана возможность направленной трансформации белков нута молочнокислыми микроорганизмами для получения продуктов питания, содержащих биологически активные пептиды. Из природных источников выделены 10 микроорганизмов, которые были идентифицированы фенотипическими, физиолого-биохимическими и протеомными методами, изучены их технологические и пробиотические свойства. Для определения их протеолитической активности использовали ТНБС метод, а также культивирование на молочном агаре. Методами MALDI-TOF MS и масс-спектрометрией идентифицированы биопептиды, образующиеся из белков нута, и определена их потенциальная биоактивность. Разработан бактериальный препарат на основе штаммов *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 и *Latilactobacillus sakei* SD-8. Разработана технология напитка молочносодержащего с экстрактом нута сквашенного.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.п. – аминокислотная последовательность

АПФ – ангиотензинпревращающий фермента

БГКП – бактерии группы кишечных палочек

БД – база данных

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ТНБС (TNBS) – 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТР ТС – Технический регламент Таможенного союза

ТД – техническая документация

ТУ – технические условия

ТИ – технологическая инструкция

MALDI-TOF MS – времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией и ионизацией с использованием матрицы

1-ДЭ – одномерный электрофорез, 2-ДЭ – двумерный электрофорез