

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

АХАНГАРАН МАХБУБЕХ

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

Специальность 4.3.5 – Биотехнология пищевых продуктов и биологически
активных веществ

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
профессор РАН
Машенцева Наталья Геннадьевна

Москва – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Нут и его свойства.....	13
1.2 Антипитательные факторы.....	15
1.3 Биологическая активность пептидов бобов нута	16
1.4 Высвобождение пептидов.....	18
1.5 Микробная ферментация нута	19
1.6 Протеолитическая система молочнокислых микроорганизмов	21
1.7 Методы идентификации бактерий.....	25
1.7.1 Полимеразная цепная реакция.....	26
1.7.2 Метод MALDI-TOF MS	26
1.8 Ферментированные продукты на основе нута	27
ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1 Организация работы.....	31
2.2 Методы исследования.....	33
2.2.1 Определение культуральных свойств микроорганизмов	33
2.2.2 Определение КОЕ микроорганизмов	33
2.2.3 Определение тинкториальных свойств микроорганизмов	34
2.2.4 Определение физиолого-биохимических, пробиотических и технологических свойств микроорганизмов	34
2.2.5 Молекулярно-генетические методы исследования.....	41
2.2.6 Определение химического состава продукта.....	44
2.2.7 Определение органолептических свойств продукта.....	45
2.2.8 Микробиологические методы исследования	46
2.2.9 Протеомные методы исследования	46
2.2.10 Биоинформационный анализ электрофореграмм	48
2.2.11 Статистическая обработка результатов исследований	48
ГЛАВА 3 ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ	50
3.1 Выделение микроорганизмов из природных источников	50
3.2 Идентификация микроорганизмов	51
3.2.1 Определение фенотипических свойств исследуемых штаммов.....	51
3.2.2 Изучение физиолого-биохимических свойств микроорганизмов	53
3.2.3 Ферментация лакмусового молока	55

3.2.4 Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS	56
3.3 Технологические и пробиотические свойства	59
выделенных микроорганизмов	59
3.3.1 Активность кислотообразования штаммов	59
3.3.2 Устойчивость к NaCl.....	60
3.3.3 Определение устойчивости штаммов к воздействию желчи.....	61
3.3.4 Определение устойчивости штаммов к фенолу	62
3.3.5 Определение устойчивости штаммов к повышенной	64
кислотности среды.....	64
3.3.6 Определение устойчивости штаммов к повышенной	65
щелочности среды.....	65
3.3.7 Скрининг штаммов на антагонистическую активность	66
3.3.8 Определение устойчивости штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам.....	68
3.3.9 Определение активности ферментации рафинозы микроорганизмами	71
3.3.10 Определение активности фитазы.....	71
Заключение по главе 3	74
ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ГЕНОВ ПРОТЕАЗ	
МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	76
4.1 Результаты культивирования микроорганизмов на агаре с обезжиренным молоком.....	76
4.2 Определение протеолитической активности методом TNBS.....	77
4.3 Определение генов протеаз методом ПЦР.....	79
Заключение по главе 4.....	81
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ФЕРМЕНТАЦИИ	
ЭКСТРАКТА НУТА.....	82
5.1 Технология получения экстракта нута	82
5.2 Органолептическая оценка ферментированного экстракта нута	83
5.3 Определение белкового профиля ферментированного экстракта нута	83
5.4 Идентификация пептидов с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии	84
5.5 Исследование антагонистической активности выбранных штаммов по отношению друг к	
другу	96
Заключение по главе 5	97
ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ НАПИТКА МОЛОКОСОДЕРЖАЩЕГО С	
ЭКСТРАКТОМ НУТА СКВАШЕННОГО	98
6.1 Разработка технологии напитка молочносодержащего с экстрактом.....	98
нута сквашенного.....	98

6.2	Определение кислотообразующей активности штаммов в напитках	99
6.3	Определение органолептических показателей напитков	101
6.4	Определение микробиологических показателей напитков	102
6.5	Определение химического состава напитков.....	103
6.6	Протеомные исследования ферментированных напитков	104
6.7	Оценка экономической эффективности технологии напитка молочносодержащего с экстрактом нута сквашенного	105
	Заключение по главе 6	108
	ВЫВОДЫ.....	110
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	112
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1 УДОСТОВЕРЕНИЕ О ДЕПОНИРОВАНИИ ШТАММОВ	136
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2	137
	СПРАВКА О НАЦИОНАЛЬНОМ ПАТЕНТНОМ ДЕПОНИРОВАНИИ <i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8.....	137
	ПРИЛОЖЕНИЕ 3	138
	СПРАВКА О НАЦИОНАЛЬНОМ ПАТЕНТНОМ ДЕПОНИРОВАНИИ <i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2.....	138
	ПРИЛОЖЕНИЕ 4	139
	ПРОЕКТ ТУ ПРОИЗВОДСТВА «ПРЕПАРАТ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ «ЛАКТОЛЕК» (ТУ 9229-014-.....-2024).....	139
	ПРИЛОЖЕНИЕ 5	140
	ПРОЕКТ ТИ ПРОИЗВОДСТВА «ПРЕПАРАТ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ «ЛАКТОЛЕК».....	140
	ПРИЛОЖЕНИЕ 6	142
	УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ НА ПАТЕНТ	142
	ПРИЛОЖЕНИЕ 7	143
	АКТ ПРОМЫШЛЕННОЙ ВЫРАБОТКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА.....	143
	ПРИЛОЖЕНИЕ 8	145
	АКТ ОПЫТНОЙ ВЫРАБОТКИ НАПИТКОВ МОЛОКОСОДЕРЖАЩИХ СКВАШЕННЫХ С ЭКСТРАКТОМ НУТА.....	145
	ПРИЛОЖЕНИЕ 9	146
	ПАТЕНТ «СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОГО ИЗОЛЯТА ИЗ БОБОВ НУТА ТИПА ДЕЗИ ИЛИ КАБУЛ»	146
	ПРИЛОЖЕНИЕ 10	147
	ДИПЛОМ УЧАСТНИКА МЕЖДУНАРОДНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ФОРУМА	147

ПРИЛОЖЕНИЕ 11.....	148
ДИПЛОМ УЧАСТНИКА МЕЖДУНАРОДНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ФОРУМА	148
ПРИЛОЖЕНИЕ 12	149
ДИПЛОМ УЧАСТНИКА НАЦИОНАЛЬНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ	149
ПРИЛОЖЕНИЕ 13	150
ДИПЛОМ УЧАСТНИКА НАЦИОНАЛЬНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ	150

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

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 [82, 141]. 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 [45, 137].

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 [31].

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. Tangyu, M. Fritz и др. 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 молокосодержащего 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 молокосодержащего 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 медвежатина, лосятина, квашеная капуста, огуречный рассол, маринованная спаржа) были выделены, идентифицированы по совокупности морфологических, физиолого-биохимических и протеомных методов молочнокислые микроорганизмы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2, *Latilactobacillus 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 желудочно-кишечного тракта, 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 и 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 молочносодержащего 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 биоинформатики;
- разработка бактериального препарата и биотехнологии напитка молокосодержащего с экстрактом нута сквашенного, содержащего биологически активные пептиды.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует пп. 7, 8, 12 и 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.

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 две публикации в изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, шесть публикаций в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и один 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 источника, из них 149 – на английском языке.

ГЛАВА 1 ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нут и его свойства

Бобовые принадлежат к семейству *Leguminosae* (или *Fabaceae*) и после зерновых считаются наиболее важной сельскохозяйственной культурой. Известно, что в рацион человека бобовые растения вошли примерно за VII тыс. до н. э., сейчас это один из основных продуктов, преимущественно в развивающихся странах [102]. В наше время бобовые выращивают на площади около 180 млн га, что составляет приблизительно 12–15 % пахотных земель планеты. Наиболее потребляемыми бобовыми культурами являются фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris*), нут (*Cicer arietinum*), горох (*Pisum sativum*), чечевица (*Lens culinaris*), бобы (*Vicia faba*), арахис (*Arachys hypogea*) и соевые бобы (*Glycine max*), последние являются наиболее востребованными в промышленности во всем мире [135].

Семена бобовых востребованы из-за своей пищевой ценности, в них содержится значительное количество углеводов (от 30 до 40 %), белков (от 17 до 40 %), пищевых волокон (от 8 до 27,5 %), жиров (от менее 5 до 47 %) и достаточное количество незаменимых аминокислот, таких как лизин, лейцин и аргинин [69, 128]. Они являются хорошим источником биологически активных соединений, витаминов и минералов [74, 87]. В частности, нут привлекает к себе большое внимание благодаря большому количеству биологически активных соединений, белка и пищевых волокон.

Нут (*C. arietinum* L.) – одно из старейших и наиболее широко потребляемых бобовых растений в мире. Это основная продовольственная культура, особенно в тропических и субтропических регионах [36, 160].

Обычно нут возделывают в Северной Америке, Австралии, Азии и Европе как озимую культуру. На Юго-Восточную Азию приходится около 80 % мирового производства, крупнейшей страной-производителем также является Индия [124, 145]. На территории бывшего СССР выращивание нута весьма распространено на Кавказе, в Молдове, Казахстане и Средней Азии. В России основными регионами

– производителями нута стали Волгоградская, Саратовская, Самарская, Оренбургская и Ростовская области. По данным за 2019 г., здесь сосредоточено свыше 85 % всех нутовых плантаций страны, что, в свою очередь, составляет более 80 % всего нута, произведенного в России.

Продукты переработки нута применяются в различных отраслях пищевой промышленности: при производстве мясных, молочных, хлебобулочных, кондитерских изделий, что позволяет повысить их качественные характеристики и пищевую ценность.

Известно множество способов употребления нута в пищу. Как правило, семена данного растения употребляют в свежем виде или после термической обработки, в последнее время набирают популярность пророщенные семена в рационе, используют также цветы. Продукты переработки нута широко применяются в мясной, молочной, кондитерской, хлебобулочной и других отраслях пищевой промышленности, где используются для формирования текстуры и консистенции готовых продуктов, в том числе ферментированных.

Семена нута имеют свою эндогенную микрофлору, представленную молочнокислыми микроорганизмами, энтерококками, дрожжами, которая используется для получения ферментированных продуктов питания – теста для хлебобулочных изделий (микроорганизмы позволяют увеличить выход продукта, улучшить его текстуру), кисломолочных продуктов [27].

Есть два основных типа семян нута: дези и кабули. Семена дези более мелкие, угловатые, с темной и грубой зерновой оболочкой, а семена кабули крупнее по размеру, с гладкой и кремовой семенной оболочкой. Тип дези представляет собой предковую форму, в то время как тип кабули возник в результате мутации и отбора. Чаще всего в промышленности используется тип кабули, его семена весом 100–750 мг с энергетической ценностью около 365 ккал/100 г [75, 164].

Семена нута богаты белком, имеют низкое содержание жира. Основными компонентами семян нута являются углеводы (70–68 %), которые представлены олигосахаридами: рафинозой, стахиозой, вербаскозой, галактозиллом и цицеритолом. Полисахариды представлены крахмалом в двух формах – доступным

и неперевариваемым, и пищевыми волокнами – растворимыми и нерастворимыми [124, 172]. В большом количестве семена нута содержат биологически активные вещества, такие как биоактивные пептиды, фенолы, ингибиторы трипсина и сапонины [59, 86].

1.2 Антипитательные факторы

Защитные метаболиты растений часто называют антипитательными веществами или природными токсикантами. В рационе человека бобовые представляют собой неизбежный источник антинутриентов. Имеются данные, свидетельствующие о том, что в бобовых содержатся определенные четко идентифицированные агенты, затрудняющие пищеварение [104].

Биологическая ценность и диетическое использование нута ограничиваются присутствующими в нем антипитательными веществами. Антипитательные вещества придают семенам горечь и препятствуют работе пищеварительных ферментов [104]. Примерами таких веществ у различных бобовых могут служить рафиноза, фитиновая кислота, конденсированные дубильные вещества, алкалоиды, лектины, пиримидиновые гликозиды (такие, как вицин и конвицин), а также сапонины и ингибиторы протеазы [133].

В нуте в различных частях растения содержатся рафиноз, фитиновая кислота, сапонины и конденсированные таниновые мономеры, являющиеся флаван-3-олами [44, 148, 163]. Для повышения потенциала нута в целях использования его в рационе человека необходимо исключить эти антипитательные компоненты и, соответственно, повысить питательную ценность семян нута [130]. В этой связи для сокращения содержания антипитательных веществ в семенах нута достаточно обработать их физическим или химическим способом, например путем замачивания, нагревания, проращивания, выборочной экстракции, облучения и ферментативной обработки. Одним из наиболее простых и в то же время эффективных способов удаления антипитательных факторов считается замачивание. Например, благодаря замачиванию количество дубильных веществ в

семенах нута снижается на 53 % [126]. Как правило, используют комбинации методов, поскольку одного способа для эффективного удаления антинутриентов бывает недостаточно [79, 81].

Результаты ряда последних исследований показывают, что некоторые из перечисленных выше соединений при употреблении в небольших количествах могут оказывать положительный эффект на пациентов с онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями [110, 117].

1.3 Биологическая активность пептидов бобов нута

Без сомнения, белки являются универсальными молекулами. Количество функций, в которые они вовлечены во время метаболизма, подтверждает это утверждение. Белки выполняют защитную функцию, являясь частью ферментативной системы, интегрируемой в иммунологическую систему, необходимой во время метаболизма, как питательные вещества, как запасующие, сократительные, структурные и подвижные молекулы, как переносчики, а также как сигнальные и регуляторные медиаторы. Помимо этих свойств, белковые молекулы могут выступать в роли антифризов, подсластителей и антиоксидантов. Относительно недавно открытая роль связана с их способностью взаимодействовать с клеточными мембранами по типу связывания нерецептор-лиганд [37].

С точки зрения питания белки являются источником аминокислот и энергии, которые необходимы для роста и развития организма. За счет своих функционально-технологических свойств белки вносят вклад в физико-химические и органолептические свойства различных продуктов. Кроме того, многие пищевые белки обладают биологическими свойствами, которые делают эти компоненты потенциальными функциональными или полезными для здоровья пищевыми ингредиентами. Многие из этих свойств приписываются биологически активным пептидам, входящим в состав белковых молекул, которые могут высвобождаться во время пищеварения в желудочно-кишечном тракте или в

контролируемых гидролитических процессах с использованием экзогенных протеаз [119].

Биоактивные пептиды, полученные в составе ферментированных пищевых продуктов во время технологического процесса, стали предметом интенсивных исследований из-за своей пользы для здоровья. Многие пептиды животного и растительного происхождения с потенциально важными физиологическими функциями у человека были описаны в ферментированных пищевых продуктах. Биоактивные пептиды обнаружены, по большей части, в ферментированных молочных продуктах, за которыми следуют бобовые, зерновые, мясные и рыбные продукты. Биоактивные пептиды обычно содержат от 2 до 20 аминокислотных остатков, они входят в состав полипептидной цепи животных и растительных белков и требуют протеолиза для высвобождения из белка-предшественника. Основные белки, содержащиеся в молоке, мясе, рыбе, злаках, полузерновых и бобовых, способны высвобождать до 20000 биоактивных пептидов. Высвобождение пептидов при производстве ферментированных пищевых продуктов может происходить двумя путями: под действием микробной протеолитической системы и за счет активности собственных протеолитических ферментов сырья [38, 88, 95, 107, 108, 129, 131].

В последнее время интерес к биопептидам возрос в связи с их потенциальными активностями, способными влиять как на качественные характеристики готового продукта, так и на физиологическое состояние потребителя [134].

Например, пептиды с антиоксидантной активностью позволяют бороться с окислительным стрессом и снизить вероятность развития ряда дегенеративных и онкологических заболеваний, а также болезни сердца и различные воспаления [59, 91, 122, 169]. Биоактивные пептиды с антигипертензивным эффектом могут быть получены в составе белкового гидролизата нута с помощью различных ферментных препаратов, например пепсина [28, 63, 136]. Пептиды нута обладают гипохолестеринемической активностью [71]. Из бобов нута был выделен пептид Val-Phe-Val-Arg-Asp, и в ходе испытаний *in vivo* было показано, что он обладает

значительным уровнем гипохолестеринемического действия [144]. Также у биопептидов нута есть ряд других активностей, о которых мы будем говорить в следующих главах работы.

1.4 Высвобождение пептидов

Аминокислотная структура более крупного белка может заключать в себе биологически активные пептиды. Для их высвобождения из белка существует три различных способа (рис. 1.1):

- 1) расщепление ферментами желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, хемотрипсин);
- 2) во время ферментативной обработки ферментами препаратами;
- 3) во время ферментации со стартовыми и заквасочными культурами, у которых есть протеиназы [106].



Рисунок 1.1 – Способы высвобождения био пептидов из белков нута [106]

1.5 Микробная ферментация нута

Одним из самых ранних процессов производства продуктов питания стала ферментация, которая в том числе продлевает срок годности продуктов и улучшает их органолептические качества. Ферментированные продукты представлены на рынке в большом разнообразии, причем многие из них, помимо домашнего изготовления, производятся также в промышленных масштабах, их можно купить во всем мире [149]. Однако некоторые национальные ферментированные продукты производятся исключительно в определенном месте или в ряде различных регионов с различными культурными обычаями. Для запуска процессов контролируемой трансформации заквасочными культурами решающее значение имеет ферментация. Для поддержания промышленных производств важны штаммы, адаптированные к условиям технологического процесса, при котором происходит ферментация нута [34].

Совокупность грамположительных, не образующих спор, каталазоотрицательных, кокковых или палочковидных организмов с высокой толерантностью к низкому рН известна как молочнокислые бактерии (МКБ) [73]. МКБ являются одними из наиболее важных микроорганизмов, применяющихся в пищевой промышленности в качестве стартовых, заквасочных, защитных культур. Основным продуктом их метаболизма – молочная кислота, положительно влияющая на органолептические, микробиологические, текстурные характеристики готовых пищевых продуктов [65]. За счет молочной кислоты и сопутствующих antimicrobial соединений, в том числе других органических кислот, бактериоцинов, перекиси водорода, они подавляют рост санитарно-показательной микрофлоры [159].

МКБ относятся к ветви *Clostridium*, которая связана с бациллами. Низкая концентрация GC-пар может быть обнаружена в ДНК МКБ, что является их генетической характеристикой [85]. Группа МКБ в настоящее время относится к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli* и порядку *Lactobacillales*. Клеточная морфология, способ ферментации глюкозы, диапазон температур роста и модели использования

сахара используются для классификации МКБ [123]. *Lactobacillus* является самым крупным родом, включающим более 100 видов [161].

МКБ имеют сложные питательные потребности, включая аминокислоты, пептиды, нуклеотидные основания, витамины, минералы, жирные кислоты и углеводы. Диапазон рН, в котором они лучше всего растут, составляет от 5,5 до 5,8 [33, 78]. По продуктам брожения углеводов МКБ различают на гомоферментативные и гетероферментативные микроорганизмы. [101, 105]. Большинство МКБ продуцируют антимикробные пептиды – бактериоцины, которые проявляют консервирующее действие [115]. Многими авторами описаны пробиотические свойства МКБ, их способность расщеплять микотоксины, предотвращать рост патогенных микроорганизмов и антимикробную активность бесклеточных экстрактов МКБ из различных источников [111, 155].

Ниша жизнедеятельности МКБ очень обширная, они обнаруживаются на растениях и плодах по всей планете, ферментированных мясных, молочных и рыбных продуктах, в соленых, квашеных, маринованных овощах и фруктах силосе, а также в ротовой полости и желудочно-кишечном тракте человека и животных [48, 94].

Некоторые МКБ используются в качестве пробиотиков из-за их пользы для здоровья. Пробиотики – это живые микроорганизмы, такие как бактерии или дрожжи, которые приносят пользу здоровью человека или животных. Их можно найти в пищевых добавках, ферментированных продуктах, таких как йогурт, и ферментированных продуктах в целом [65]. Микроорганизм должен быть принципиально непатогенным, общепризнанным безопасным (может иметь статус GRAS), выдерживать низкие значения рН, высокие концентрации конъюгированных и деконъюгированных солей желчных кислот, быть толерантным для иммунной системы и не должен приводить к выработке антител для того, чтобы квалифицироваться как пробиотик. Такие организмы также не должны нести трансмиссивных генов антибиотикоустойчивости, которые могут переходить к потенциальным патогенам [32].

Чтобы поддерживать жизнеспособность и, возможно, колонизировать человека-хозяина, пробиотический кандидат также должен быть в состоянии выживать при прохождении через желудочно-кишечный тракт [114]. Однако для работы этих микроорганизмов может не потребоваться колонизация, особенно когда речь идет о модулировании микробиоты кишечника [62]. Безопасность МКБ, используемых в качестве пробиотиков, должна быть тщательно оценена, и должны соблюдаться строгие критерии отбора. Поэтому, несмотря на статус GRAS у многих из пробиотических штаммов, для этих микроорганизмов FDA учредило орган, регулирующий производство, маркировку, а также контролирующий безопасность продукции. Предполагаемое использование продукта регламентируется четырьмя нормативными категориями FDA, каждая из которых имеет свой собственный набор правил. Первая категория – это фармацевтические или биологические продукты, за которыми следуют пищевые добавки, продукты питания или пищевые ингредиенты, фармацевтические продукты питания и пищевые добавки [47, 67].

1.6 Протеолитическая система молочнокислых микроорганизмов

Одной из уникальных физиологических особенностей молочнокислых бактерий является способность к протеолизу. Казеин-утилизирующий протеолитический механизм молочнокислых бактерий обеспечивает клетки жизненно важными аминокислотами на протяжении всего их развития в молоке. Молочнокислые бактерии и их протеолитическая система чрезвычайно важны, когда речь идет об органолептических качествах ферментированных пищевых продуктов. Помимо получения питательных веществ, клеточный протеолиз отвечает за регулирование качества полипептидов, поддержание надлежащего уровня регуляторных белков в организме и их удаление при необходимости [138].

Протеиназы и пептидазы составляют протеолитическую систему молочнокислых бактерий. Казеин протеиназами расщепляется на пептиды, которые впоследствии расщепляются пептидазами (внутриклеточно) на более

мелкие пептиды и аминокислоты. Аминокислоты и пептиды транспортируются через цитоплазматическую мембрану с помощью транспортных механизмов [77].

Потребность в поиске новых микроорганизмов, которые могут быть продуцентами этих ферментов, а также в проведении углубленного анализа уже имеющегося генетического материала была мотивирована растущим спросом на протеолитические ферменты. В настоящее время рекомбинантные микробные штаммы продуцируют подавляющее большинство ферментов, что делает биокатализаторы значительно более доступными, чем белки, выделенные из природных продуцентов [127, 142]. Понимание активности, контроля и физиологической роли участников протеолитической системы молочнокислых бактерий привлекло внимание многих исследователей [57, 99, 152, 153].

МКБ могут продуцировать как внеклеточные, так и внутриклеточные протеолитические ферменты. Диапазон рН 7–7,5 идеально подходит для выращивания протеолитических бактерий в молоке. Низкие температуры препятствуют росту и развитию этих бактерий и снижают их ферментативную активность. Протеолитические ферменты быстро становятся неактивными при температурах, которые необходимы для развития бактерий. После длительного хранения при низких температурах в ряде случаев отмечена необратимая потеря активности протеолитических ферментов [93, 166].

Белки могут быть разрушены ферментами МКБ. Аминокислоты, которые МКБ использует в качестве источника азота, часто являются конечными продуктами этого распада. Термофильные виды лактобацилл более способны расщеплять белки, чем палочки или стрептококки, однако каждый вид имеет штаммы с широким спектром активности. Различные виды, подвиды и даже штаммы МКБ проявляют широкий спектр протеолитической активности. К коккам с самым высоким уровнем активности относятся *Lactococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, тогда как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* показывает наиболее низкий уровень активности. Самыми активными протеолитическими видами МКБ, используемых в молочной промышленности, считаются *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,

Lactobacillus helveticus и *Lactobacillus acidophilus*, а *Lactiplantibacillus plantarum* наименее активны. В целом палочки обладают более высокой активностью, чем молочные стрептококки [92, 93, 132, 156, 165].

Экзопептидазы и эндопептидазы представляют собой два разных типа протеолитических ферментов (протеиназ). Пептидная связь вблизи амино- или карбокси-концов субстрата разрывается первой группой. Эндопептидазы разрывают пептидные связи, находящиеся далеко от концов субстрата. Протеолитические ферменты подразделяются на следующие группы в зависимости от их химических механизмов катализа гидролиза амидных связей в пептидных субстратах: сериновые протеиназы (ЕС 3.4.21), цистеиновые протеиназы (ЕС 3.4.22), аспарспартилпротеиназы (ЕС 3.4.23), металлопротеиназы (ЕС 3.4.24) и треонинпептидазы (ЕС 3.4.25) [64, 97, 125].

Поскольку МКБ растут в богатой белком среде, очевидно, что для их выживания необходима эффективность протеолитической системы. В питательных средах, на которых растут МКБ, решающая роль в гидролизе олигопептидов принадлежит обнаруженным в клеточной стенке протеиназам. Перенос этих веществ в бактериальную клетку осуществляет особая транспортная система, затем благодаря ряду пептидаз происходит расщепление их на свободные аминокислоты [41, 89].

Транспортирование продуцируемых СЕР пептидов через систему Opp (олигопептидную пермиазу) после гидролиза казеина представлено на . рис. 1.2 [138].

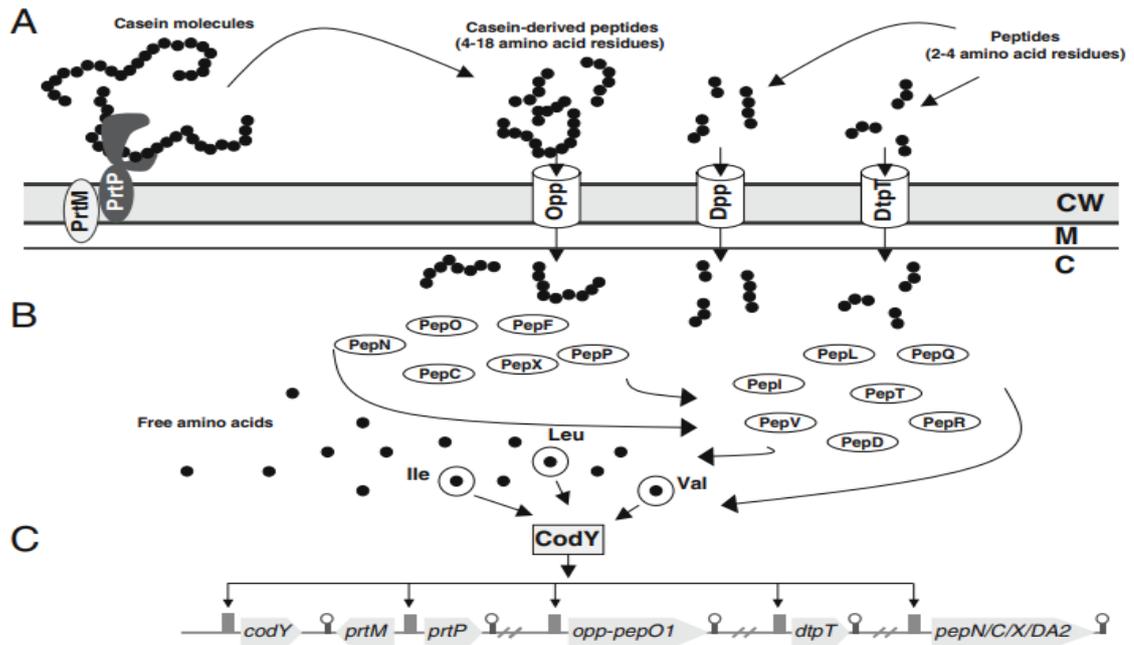


Рисунок 1.2 – Функционирование и регулирование протеолитической системы МКБ при гидролизе казеина [138]

Условные обозначения: *CW* – клеточная стенка; *M* – мембрана; *C* – цитоплазма; *A* – *PrtP*, протеиназа клеточной стенки (СЕР); *Opp* – пермеаза олигопептидов; *Dpp* – транспортер пептидов, содержит от 2 до 9 а.о.; *B* – внутриклеточные пептидазы (*PepO*, *PepF*, *PepN*, *PepP* – эндопептидазы широкой специфичности); *PepC* – цистеинпептидаза; *PepX* – X-пролилдипептидилами-нопептидаза; *PepT* – трипептидаза; *PepQ* – пролидаза; *PepR* – пролиназа; *Pep* – пролиниминопептидаза; *PepD* и *PepV* – дипептидазы *D* и *V*; *C* – репрессор транскрипции *CodY* (при повышении внутреннего пуля аминокислот лейцина, валина и изолейцина использует их в качестве кофакторов для репрессии экспрессии генов протеолитической системы)

Существует множество подходов к определению протеолитической активности бактерий. Из-за специфичности действия ферментов протеолитическая активность в пределах одного штамма может различаться и неодинаково проявляться на разных питательных средах. Для обнаружения протеолитической активности штаммы культивируют на средах, содержащих сухое молоко или желатин. В случае когда колонии развиваются на молочном агаре, гидролиз белка наблюдается в виде зон просветления вокруг них. При этом чем больше диаметр зон просветления вокруг колоний, тем выше казеинолитическая активность микроорганизмов [113].

1.7 Методы идентификации бактерий

Бактерии часто идентифицируют с помощью морфологических и физиолого-биохимических тестов. Среди традиционных методов идентификации бактерий можно назвать микроскопическое исследование (например, с окрашиванием по Граму), фенотипическое исследование свойств бактерий на основе посева на селективные среды, обнаружение бактериальных антител серологическими методами и оценку чувствительности к противомикробным препаратам. Некоторые из этих методов (например, окрашивание по Граму для микроскопического исследования бактерий) можно выполнить за считанные минуты, однако им не хватает точности и диагностических возможностей, необходимых для идентификации [35].

Раньше для идентификации бактерий использовались физиолого-биохимические характеристики, но более поздние разработки привели к появлению многочисленных молекулярных методов, коммерческих зондов на основе гибридизации и методов времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией на матрице [157]. В связи с тем, что бактерии рода, вида, подвида и даже штамма имеют в своем геноме специфические и уникальные последовательности, полимеразная цепная реакция при репликации определенной последовательности бактериальной нуклеиновой кислоты быстро получила широкое распространение, и появилась возможность быстрого обнаружения и идентификации микроорганизмов [53].

Гибридизации с использованием зондов, нацеленных на рибосомную РНК (рРНК), предложили особый взгляд на структуру и пространственно-временную динамику сложных микробных сообществ за последние десять лет. Благодаря различной эволюционной консервативности молекул рРНК могут быть созданы зонды нуклеиновых кислот для выборочного нацеливания на таксономические группы с разной степенью специфичности (от вида к домену). В последнее время для идентификации прокариотов используется метод анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК [150].

1.7.1 Полимеразная цепная реакция

Фрагмент ДНК может быть реплицирован и амплифицирован в лаборатории с помощью полимеразной цепной реакции до размера, в миллионы раз превышающего его первоначальный размер. Ввиду быстроты, доступности и простоты в использовании традиционный ПЦР-анализ широко используется для видовой идентификации микроорганизмов в пищевой и медицинской промышленности. В последнее время для идентификации бактерий стали популярны многие методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), включая RAPD-PCR, PCR-DGGE, PCR-RFLP, AFLP и multiple PCR [54, 146] (рис. 1.3).

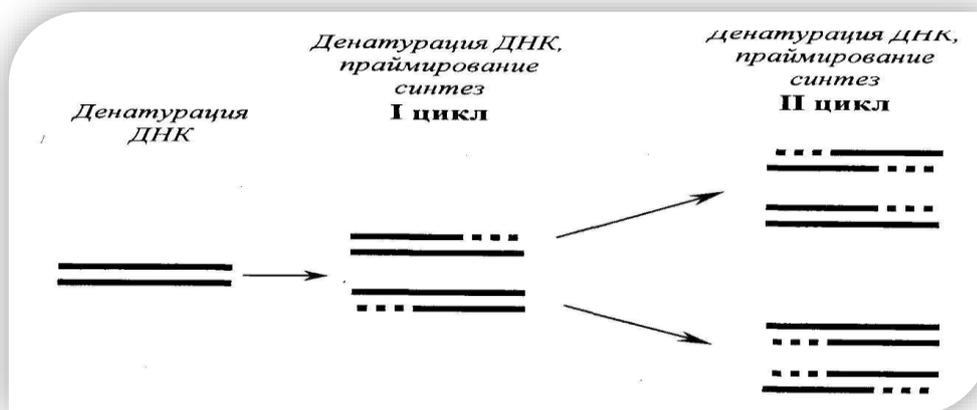


Рисунок 1.3 – Полимеразная цепная реакция [54, 146]

1.7.2 Метод MALDI-TOF MS

Современная технология масс-спектрометрии, которая используется в области наук о жизни, улучшает знания обо всей биологической системе за счет прямого исследования биологических молекул, таких как белки, липиды, углеводы и аминокислоты [98, 120]. Самыми распространенными методами для идентификации микроорганизмов и оценки микробного биоразнообразия являются технология времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) и ионизация

электрораспылением [52, 103]. MALDI-TOF MS играет значительную роль в микробиологии и в области безопасности пищевых продуктов в связи с высокой разрешающей способностью метода различать микроорганизмы на уровне рода, вида и даже подвида (рис. 1.4).

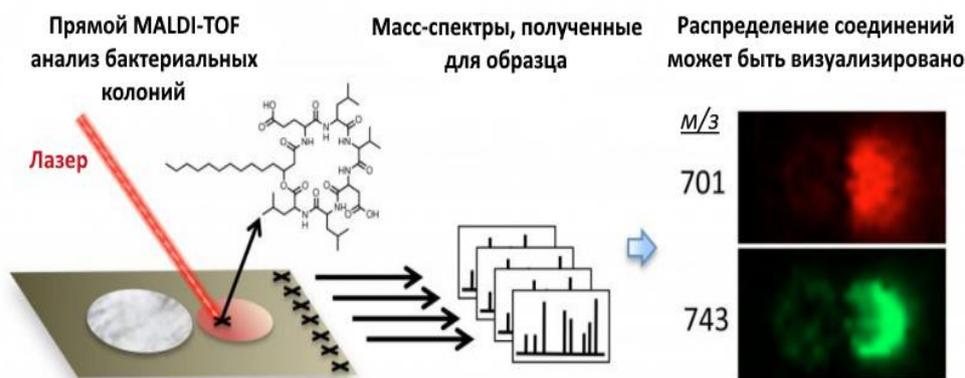


Рисунок 1.4 – Метод MALDI-TOF MS [58]

1.8 Ферментированные продукты на основе нута

В 2021 г. Tanguy и его коллеги [154] изучали влияние молочнокислых микроорганизмов при ферментации нутевого экстракта на увеличение содержания L-лизина, устранение неперевариваемых сахаров и улучшение вкуса продукта. Для ферментации экстракта нута были использованы природные изоляты. Более 30 штаммов были отобраны в качестве кандидатов для достижения низких уровней L-лизина на основе состава их генома, связанного с метаболизмом L-лизина. Исследования изотопов углерода ^{13}C показали, что два штамма *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* Nestlé Culture Collection (NCC) 2511 и *Bacillus amyloliquefaciens* NCC 156 имели лучшие результаты. Оба штамма улучшили аминокислотный и белковый профили, утилизировали неперевариваемые углеводы и сформировали желаемый вкусоароматический букет. Устранение неперевариваемых сахаров, таких как стахиоза и рафиноза, а также превращение неприятных альдегидов в соответствующие спирты и кислоты с фруктовыми и сладкими нотками являются дополнительными преимуществами этих бактерий.

Следующее исследование [170] было проведено для изучения влияния молочнокислых бактерий на физико-химические и антиоксидантные свойства напитков из нута. Было показано, что при выработке напитков путем ферментации экстракта нута молочнокислыми бактериями содержание полисахаридов в образцах снизилось. Их инфракрасные спектры были схожими с небольшой разницей в пропускании некоторых характерных полос. Профили фрагментов электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) образцов после 24 ч ферментации выявили накопление ряда низкомолекулярных пептидов и исчезновение полосы в диапазоне 94,3 кДа, что указывает на расщепление белков. После 12 ч ферментации наблюдалось значительное повышение DPPH, скорости удаления радикалов ABTS и значения FRAP. Полученные данные позволяют предположить, что ферментацию молочнокислыми бактериями можно использовать для повышения антиоксидантной активности образцов и улучшения их физико-химических характеристик.

В 2022 г. Zhang и его коллеги [171] исследовали влияние штамма *Lactocaseibacillus rhamnosus* CICC 20257, ферментного препарата папаина и использования в рецептуре сладкого картофеля (ямса) на вкус нутового напитка. Было исследовано влияние ферментации на уровень свободных аминокислот и содержание летучих соединений. Данные газовой хроматографии-масс-спектрометрии (GC-MS) и «электронного носа» были сопоставимы между собой. Путем ферментативной обработки нутового экстракта папаином и добавлением сладкого картофеля можно нивелировать нежелательные органолептические характеристики. После ферментации МКБ были обнаружены ароматические соединения, играющие важную роль в формировании вкуса, такие как 2,3-пентандион, 2,3-бутандион, гептилформиат, в то же время содержание свободных аминокислот в образцах снизилось в разной степени. Эти результаты показали, что ферментация молочнокислыми бактериями в сочетании с обработкой папаином и добавлением ямса может быть использована для улучшения вкуса напитка.

Xuemei Ma и его коллеги [96] работали над получением пептидов нута и оценкой их влияния на снижение уровня глюкозы в крови за счет ингибиторов

альфа-глюкозидазы, которые применяются в комплексной терапии сахарного диабета 2 типа. Выявлено, что наибольший выход пептидов был получен при использовании микроорганизмов рода *Bifidobacterium* – $52,99 \pm 0,88$ %, наименьший выход пептидов был у *Lactobacillus thermophilus* – $43,22 \pm 0,47$ %. Данные микроорганизмы позволили получить пептиды с молекулярной массой существенно ниже 20 кДа.

Klongklaew и его коллеги [84] исследовали влияние молочнокислых бактерий на улучшение функциональных свойств продуктов на основе нута. *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 использовали для ферментации водных экстрактов муки 4 сортов нута в течение 72 ч. Эти сорта нута для ферментации были выбраны из-за высокого содержания в них фенолов и связанных с ними антиоксидантных и антигипертензивных свойств, соответствующих ингибирующей способности АПФ. После ферментации нута было определено содержание фенолов, а также антиоксидантные, антигипергликемические и антигипертензивные свойства. Общее количество растворимых фенолов в образцах течением времени существенно не менялось, хотя общая антиоксидантная активность увеличивалась в процессе ферментации, особенно через 24 ч, что связано с высвобождением пептидов, обладающих антиоксидантной активностью. В ферментированных образцах значение pH которых было ниже неферментированного контроля за счет накопления молочной кислоты, была отмечена более высокая ингибирующая активность в отношении α -амилазы и α -глюкозидазы, что может быть использовано при снижении постпрандиальной гликемии у пациентов с диабетом 2-го типа и с преддиабетом.

Li W. и Wang T. изучали влияние ферментации нута культурой *Bacillus subtilis* Iwo и антиоксидантные свойства полученного продукта. В процессе ферментации анализировали концентрации растворимого белка, пептидов и свободного аминного азота, активность протеиназ, расщепление белка и профиль пептидов [90]. Кроме того, было исследовано влияние ферментации на антиоксидантную активность, в частности, на активность DPPH и гидроксильных радикалов. Результаты показали, что во время ферментации увеличивается

высвобождение растворимых белков, пептидов и свободного аминокислотного азота, которые достигают своих максимальных количеств (15,4 мг/г, 25,8 мг/г и 1,03 г/100 г соответственно) в течение 48 ч ферментации. Электрофоретические профили показали, что после 24 ч ферментации большая часть белков нута была расщеплена. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), концентрация гидрофобных/высокомолекулярных пептидов уменьшалась, или они не были обнаружены, в то время как концентрации гидрофильных/низкомолекулярных пептидов росли. Кроме того, по сравнению с неферментированным, ферментированный нут продемонстрировал большую способность поглощать DPPH и гидроксильные радикалы. В результате данный подход может быть предложен как новый способ повышения биологической ценности нута, а нут, ферментированный *B. subtilis*, можно использовать в пищевой промышленности, так как этот вид микроорганизмов в целом признан безопасным (GRAS).

Заключение по главе 1

По сравнению с использованием ферментных препаратов получение биологически активных пептидов (БАП) в составе ферментированных молочнокислыми микроорганизмами пищевых продуктов – более доступный и естественный способ. Кроме того, он имеет более высокий потенциал для получения новых пептидных последовательностей и, таким образом, новых БАП с определенными биологическими характеристиками. Недостаточная характеристика протеаз молочнокислых микроорганизмов различных видов и низкая скорость накопления пептидов во время ферментации остаются двумя препятствиями для дальнейшего промышленного использования лактобацилл. Эти трудности могут быть решены путем метаболической инженерии протеолитической системы молочнокислых микроорганизмов.

ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Организация работы

В данной главе изложены методы и объекты исследования, указаны исследуемые показатели и описаны способы их определения. Исследования проводились по схеме, представленной на рисунке 2.1.

Объектами исследования являлись:

- молочнокислые микроорганизмы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (B-14054), *Lactilactobacillus 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 молокосодержащего с экстрактом нута сквашенного.

В ходе исследования были использованы стандартные и общепринятые микробиологические, химические, физико-химические, биохимические, органолептические и протеомные методы исследований, проведен биоинформационный анализ результатов.

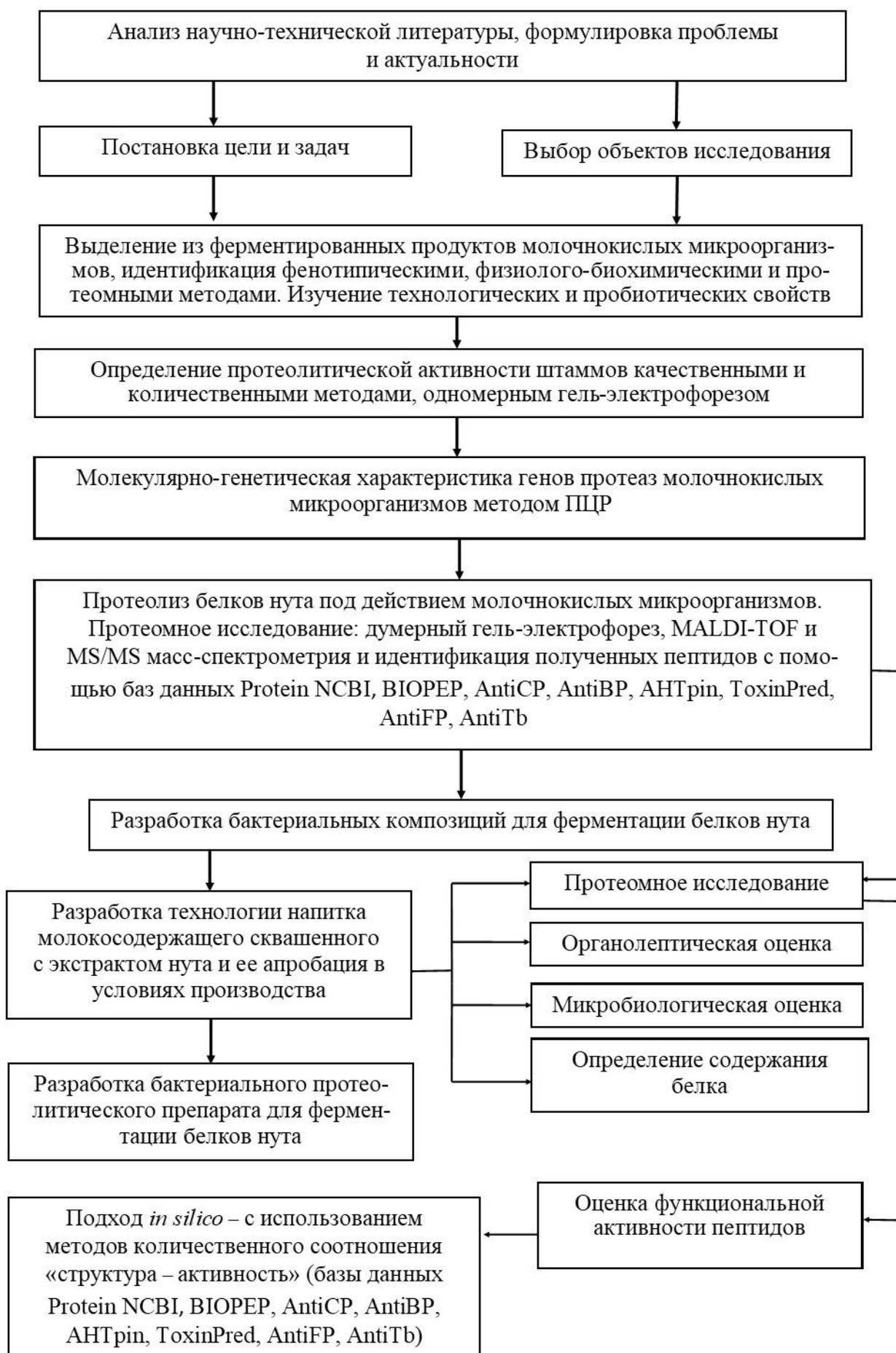


Рисунок 2.1 – Схема выполнения исследований

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение культуральных свойств микроорганизмов

Штаммы молочнокислых микроорганизмов выделяли и культивировали на жидкой и твердой питательной среде де Мана, Рогозы, Шарпа (MRS) при температуре 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч в соответствии с ГОСТ ISO 7218-2015 [20] (рис. 2.2).



Рисунок 2.2 – Культивирование бактерий на плотной среде MRS

2.2.2 Определение КОЕ микроорганизмов

КОЕ (колониеобразующие единицы) – количество жизнеспособных клеток в исследуемом образце. В исследуемых образцах данную величину определяли путем визуального сравнения со стандартами мутности по МакФарланду. Стандарты мутности МакФарланда представляют собой набор, содержащий 5 пробирок (по одной пробирке каждого стандарта МакФарланда – 0,5, 1, 2, 3 и 4 ед.) Мутность бактериальной суспензии измеряют в международных единицах мутности (МЕ). Международная единица мутности (1 МЕ) соответствует мутности суспензии бактерий с концентрацией 1,1 млрд клеток в 1 см³ [29].

2.2.3 Определение тинкториальных свойств микроорганизмов

Тинкториальными свойствами микроорганизмов называют способность их вступать в реакцию с красителями и окрашиваться. Окраску мазка производили фуксином или по Граму [116]. Клетки затем микроскопировали ($\times 1000$) с использованием светового микроскопа, на микроскопический препарат наносили иммерсионное масло.

2.2.4 Определение физиолого-биохимических, пробиотических и технологических свойств микроорганизмов

Определение активности кислотообразования штаммов

Для определения активности кислотообразования исследуемых штаммов использовался метод титрования культуральной жидкости 0,1 Н NaOH. Штаммы бактерий культивировали в стерильном обезжиренном молоке. В конические колбы вносили по 10 см³ полученного продукта, 20 см³ дистиллированной воды и 3 капли 1 % фенолфталеина. Полученная смесь тщательно перемешивалась и титровалась щелочью до образования стойкого слабо-розового окрашивания. После чего фиксировалось количество пошедшей на титрование щелочи, а затем кислотность рассчитывалась по ГОСТ 3624-92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности» [15].

Определение устойчивости штаммов к NaCl

Тестируемые культуры МКБ инокулировали в 10 см³ стерильной MRS с концентрацией NaCl 2, 4, 6,5, 8, 10, 12 % и инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Рост контролировали путем визуального осмотра пробирок, а переносимость NaCl оценивали после того, как 1 см³ культуральной жидкости помещали на чашки с агаром MRS и инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Эксперименты с

положительным контролем проводились с пробирками, содержащими культуры молочнокислых бактерий без дополнительного NaCl, в то время как эксперименты с отрицательным контролем представляли собой пробирки с добавленным NaCl, но без культур молочнокислых бактерий [68].

Определение устойчивости штаммов к повышенной кислотности и щелочности среды

В конической колбе готовили жидкую питательную среду *Lactobacillus* MRS Broth и доводили ее до pH = 2,2 (нормальная кислотность желудка) с помощью 10 % раствора HCl. После этого колбу со средой укупоривали ватно-марлевой пробкой, заворачивали в бумагу и стерилизовали при давлении 0,15 МПа в течение 15 мин. Стерильную питательную среду после остывания при комнатной температуре в стерильном боксе и в условиях асептики разливали по пробиркам. Затем в пробирки засеивали исследуемые штаммы в количестве 1 см³ на 15 см³ среды. Посевы выдерживались в термостате при 37 °С в течение 48 ч. Количество жизнеспособных клеток определялось визуальным методом с использованием стандартов Мак-Фарланда. Тестирование устойчивости штаммов к щелочной реакции среды осуществляли аналогичным способом, но с доведением питательной среды с помощью NaOH до pH = 7,5 (нормальная кислотность в пищеварительном тракте) [121].

Определение устойчивости штаммов к фенолу

Кишечные бактерии могут дезаминировать ароматические аминокислоты, которые образуются из пищевых белков, что приводит к образованию фенолов. Эти фенольные соединения могут ингибировать рост молочнокислых бактерий. Следовательно, устойчивость пробиотиков к фенолу важна для их выживания в желудочно-кишечном тракте [100].

В качалочных колбах готовили жидкую питательную среду *Lactobacillus* MRS Broth с добавлением фенола в концентрации 0,4 %. После этого колбу со средой укупоривали ватно-марлевой пробкой, заворачивали в бумагу и стерилизовали при давлении 0,15 МПа в течение 15 мин. Стерильную питательную среду после остывания при комнатной температуре в стерильном боксе и в условиях асептики разливали по пробиркам. Затем в пробирки засеивали исследуемыми штаммами в количестве 1 см³ на 15 см³ среды. Посевы выдерживали в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Количество жизнеспособных клеток определяли визуальным методом [168].

Определение устойчивости штаммов к желчи

Использовали клеточные суспензии штаммов с концентрацией клеток примерно 10⁹ КОЕ/ см³. В пробирку вносили клеточную суспензию в количестве 1 см³ и желчь медицинскую консервированную («Самсон-Мед», Россия) в количестве 9 см³. В контрольные образцы вместо желчи вносили физраствор. Культивирование вели при 37° С течение 2 ч. Количество жизнеспособных клеток определяли по стандарту МакФарланда [147, 1].

Скрининг штаммов на антагонистическую активность

Для определения антагонистической активности исследуемых штаммов использовали метод перпендикулярных прямых. На поверхность агаризованной среды *Lactobacillus* MRS Broth в чашке Петри вертикальным штрихом микробиологической петлей засеивали исследуемые штаммы бактерий и помещали их в термостат при 37 °С на 24 ч. По истечении этого времени на поверхности среды образовывался видимый слой бактерий в виде прямого штриха по диаметру чашки. После чего на агаризованную среду перпендикулярно к выросшим бактериям подсеивали тест-культуры *Salmonella*, *Esherichia coli*, *Proteus vulgaris* и *Staphylococcus aureus*, начиная с краев чашки. Чашки Петри помещали в термостат

при 37° С на 48 ч (рис. 2.3). Результаты антагонистической активности определяли визуально. Антагонистическая активность исследуемых штаммов по отношению друг к другу также оценивалась с использованием метода перпендикулярных прямых [158].

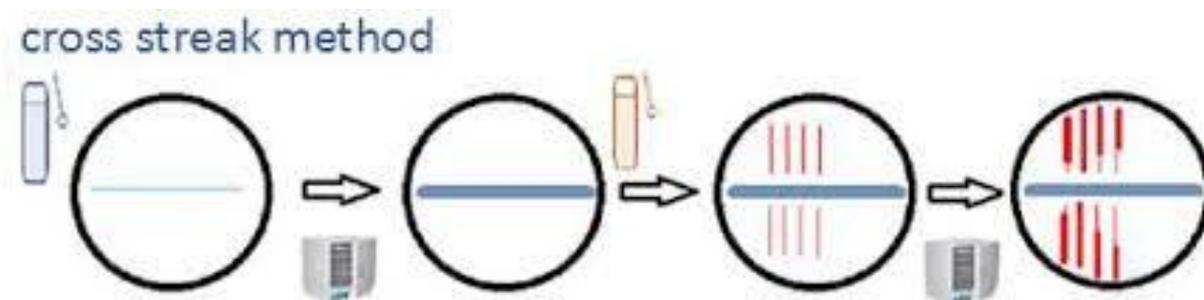


Рисунок 2.3 – Схема скрининг на антагонистическую активность

Определение устойчивости штаммов к антибиотикам

Для определения устойчивости к антибиотикам молочнокислых микроорганизмов был использован диско-диффузионный метод. Работа проходила в соответствии с инструкцией к октодискам и МУ 2.3.2.2789-10 [1].

Интерпретация результатов осуществлялась с помощью различных источников в зависимости от вида микроорганизмов. В качестве среды культивирования применяли MRS-агар – оптимальную питательную среду для выращивания молочнокислых микроорганизмов. Для тестирования использовали суточные культуры, содержащие $(1-2) \times 10^8$ КОЕ/см³. В целях высокой воспроизводимости результатов согласно инструкции в чашки Петри заливали определенное количество агара (толщина агарового слоя составляла $4 \pm 0,5$ мм), бактериальную культуру для чашек диаметром 90 мм брали в объеме 0,1 см³, для чашек диаметром 200 мм – 1,2 см³. Октодиски (HiMedia, Индия) с различными антибиотиками помещали на поверхность засеянного культурой агара. Чашки Петри инкубировали в аэробных условиях в течение 24 ч при 37 °С. Диаметр зон задержки роста штаммов вокруг дисков определяли с помощью линейки-лекала HiAntibiotic ZoneScale™-С фирмы Hi-media (Индия) [70, 162].

Тест на ферментацию рафинозы

Нут содержит значительное количество углеводов, примерно 61 % (в весовом отношении), включая рафинозу, содержание которой колеблется от 0,46 до 0,92 % в зависимости от вида, сорта и условий выращивания [109, 167]. Для исследования способности штаммов к утилизации рафинозы использовали бульонную среду с феноловым красным с добавлением рафинозы. В стерильные пробирки с питательной средой инокулировали исследуемые штаммы при концентрации клеток 10^9 КОЕ/ см³ в количестве 1 см³ на 15 см³ среды. Посевы выдерживали в термостате при 37 °С в течение 48 ч. Образование кислоты из рафинозы определяли по изменению окраски с красной на желтую [72].

Определение фитазной активности штаммов

Фитазную активность штаммов определяли качественным и количественным методами.

Определение фитазной активности качественным методом: на поверхность агаризованной среды, содержащей фитат натрия, D-глюкозу и микробиологический агар, короткими штрихами засеивали исследуемые штаммы бактерий. В качестве контроля на поверхность среды засеивали аналогичным образом *Candida tropicalis* RCAM 00331 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-100. После чего чашки культивировали при 37° С в течение 24 ч. Фитазную активность штаммов определяли по образованию зон просветления вокруг линии роста бактерий [60].

Определение фитазной активности количественным методом: активность фитаз определяли по накоплению в реакционной смеси свободного фосфат-иона с помощью модифицированного метода Фиске-Су-барроу [42]. В экстракт нута вносили культуры бактерий и инкубировали 24 ч при 37 °С. После этого, клетки отделяли центрифугированием, а супернатант анализировали на наличие фитазной активности. За единицу фитазной активности принимали количество фермента,

способного высвободить 1 мкмоль неорганического фосфата из фитата натрия за 1 мин.

Определение протеолитической активности штаммов на агаре с обезжиренным молоком

Для определения протеолитической активности микроорганизмов использовали молочный агар. Скрининговую среду готовили следующим образом: 25 г обезжиренного сухого молока восстанавливали в 250 см³ дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивали и автоклавировали при температуре 121 °С в течение 15 мин. Аналогичным способом стерилизовали 500 см³ в 2,5 % раствора агара. Обезжиренное молоко и агаровую среду непосредственно перед посевом микроорганизмов выдерживали на водяной бане при температуре 50 °С, после чего обезжиренное молоко вносили в колбу с агаровой средой и тщательно перемешивали. Затем агар с обезжиренным молоком быстро разливали по чашкам Петри. На застывшую среду штаммы засеивали отдельными бляшками с помощью бактериальной петли и культивировали при температуре 37 °С в течение 48 ч с последующим содержанием в холодильнике при температуре 4 °С в течение 36 ч.

В качестве контроля в исследовании выступала незасеянная микроорганизмами чашка Петри. В конце культивирования микроорганизмы формировали на данной среде колонии, окруженные белой или беловатой зоной преципитации, размер которой определялся с помощью линейки [113].

Определение протеолитической активности методом TNBS

Протеолитическую активность в ходе работы определяли количественно с помощью метода TNBS (*2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота*) [25]. Для получения образцов белково-пептидных фракций ферментированных экстрактов нута аликвоту (5 см³) каждого варианта центрифугировали при температуре +4 °С в течение 20 мин при 4400 мин⁻¹ на центрифуге 5702R (Eppendorf, Германия). После

этого доводили рН надосадочной жидкости до значения 4,60 добавлением 0,1 М раствора либо NaOH, либо HCl с последующей фильтрацией надосадочной жидкости через шприцевые фильтры с гидрофильной мембраной с диаметром пор 0,20 мкм (Sartorius, Германия). Полученные в результате белково-пептидные фракции замораживали и хранили при температуре минус 70° С в холодильнике-морозильнике Sanyo (Япония) до начала анализа. Перед проведением анализа образцы размораживали и дополнительно фильтровали с помощью шприцевых фильтров с гидрофильной PVDF-мембраной с диаметром пор 0,45 мкм (Carl Roth, Германия).

Реакцию с TNBS проводили в центрифужных пробирках объемом 15 см³. Для этого в пробирки вносили последовательно по 2 см³ 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, с рН 8,20, 200 мкл 1 % р-ра SDS (Додецилсульфат натрия), 50 мкл приготовленной пробы и 2 см³ свежеприготовленного 0,1 % водного раствора TNBS. В холостую пробу вносили 2 см³ 0,2125 М натрий-фосфатного буфера с рН 8,20, 250 мкл 1 % раствора SDS и 2 см³ свежеприготовленного 0,1 % раствора TNBS.

В центрифужные пробирки со стандартными растворами различных концентраций вносили по 2 см³ 0,2125 М натрий-фосфатного буфера с рН 8,20, 250 мкл раствора стандарта и 2 см³ свежеприготовленного 0,1 % раствора TNBS. В качестве стандарта использовался L-лейцин. Из базового раствора лейцина с концентрацией 3,0 ммоль/дм³ в 1 %-м растворе SDS приготавливали серию разведений в 1 %-м водном растворе SDS с концентрациями L-лейцина в диапазоне значений 0,15–3,0 ммоль/дм³.

Все центрифужные пробирки с пробами плотно закрывали крышками и встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 10 с, затем инкубировали на водяной бане GFL (Германия) с непрозрачной крышкой в течение 1 ч при 50 °С. Для прекращения реакции в каждую центрифужную пробирку внесли по 4 см³ раствора 0,1 Н соляной кислоты. Центрифужные пробирки снова встряхивали на вортексе в течение 10 с и инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

В целях определения оптической плотности по 200 мкл раствора из каждой центрифужные пробирки (в трех повторностях) переносили в лунки 96-луночных несорбирующих УФ-прозрачных планшетов с плоским профилем дна UV-Star (Greiner BioOne, Германия). Оптическую плотность растворов при длине волны, равной 340 нм определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy 2 (Bio Tek, США) [22, 25].

Определение отношения штаммов к лакмусовому молоку

Лакмусовое молоко – это среда на основе молока с лакмусом (индикатором pH), используемая для дифференциации различных видов бактерий. Лактоза (молочный сахар) и казеин (молочный белок), содержащиеся в среде, могут метаболизироваться различными видами бактерий. Тест дифференцирует микроорганизмы на основе различных метаболических реакций в лакмусовом молоке, включая восстановление, ферментацию, образование сгустка, и образование газа [118].

В каждую пробирку с 10 см³ лакмусового молока вносили 1 см³ клеточной суспензии. Образцы культивировали при температуре 37° С в течение 48 ч.

2.2.5 Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение ДНК

Экстракцию ДНК из микроорганизмов осуществляли с использованием стеклянных шариков. Для этого предварительно стеклянные шарики промывали концентрированной серной кислотой, затем дважды отмывали дистиллированной водой и высушивали при 60 °С. Полученную культуру из чашки Петри отбирали в эппендорф микробиологической петлей и растворяли для лизиса в 500 мкл буфера следующего состава: 100 mM Tris HCl (pH = 8); 50 mM EDTA; 1 % SDS. Затем к полученной смеси добавляли около 400 мкл (0,3 г) стеклянных шариков,

интенсивно перемешивали в течение 3 мин и отстаивали в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в новый эппендорф с добавлением 275 мкл 7М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (рН 7,0) и выдерживали 5 мин при температуре 65 °С, а затем еще 5 мин при температуре 4 °С. После этого добавляли 500 мкл хлороформа и интенсивно перемешивали в течение 1–3 мин. Центрифугировали 2 мин при 13 000 мин^{-1} . После центрифугирования верхний слой отбирали в новый эппендорф с добавлением 1 см^3 99,8 %-ного этилового спирта и выдерживали 30 мин при температуре -20 °С. Центрифугировали 10 мин при 13000 мин^{-1} при 4 °С. После этого осадок промывали 70 %-м ледяным этиловым спиртом. Осадок высушивали в течение 5 мин при температуре 65 °С. Затем его растворяли в 30–50 мкл ТЕ (Трис-НСl, ЭДТА) буфера [22].

ПЦР (полимеразная цепная реакция) генов протеиназ

ПЦР осуществлялась на амплификаторе Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, США). Реакционная смесь содержала следующие компоненты:

- 1) ДНК-матрицу;
- 2) праймеры (концентрация – 1 мкМ).

Если длина не превышает 25 пар нуклеотидов, то для расчета температуры отжига применяют следующую формулой:

$$T_a = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 5, \text{ } ^\circ\text{C},$$

где T_a – температура отжига; G, C, A, T – число соответствующих нуклеотидов в праймере (табл. 2.1);

- 3) смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (в концентрации каждого 0,2 мкМ);
- 4) буфер для полимеразы. В реакционную смесь добавляли 5 или 10-кратный буфер для используемой полимеразы (10× Taq buffer), содержащий соли магния (сульфат или хлорид) в количестве, необходимом для получения конечной концентрации Mg^{2+} ионов 1–4 мМ;
- 5) полимеразу (использовали полимеразу Taq);
- 6) бидистиллированную воду.

Таблица 2.1 – Праймеры, использованные в работе [151]

№ п/п	Название	Температура отжига, °С	Последовательность
1	PrtP700	56	GCTTGAATTCGTTGTCGCTGCGGTTGT
2	PrtM700	56	GCAATGAATTCGAATGCACGATAAATGAG
3	P15C	55	AACCAAATCTGATGTTG
4	P06C	55	TTTCAGCGGAAGCAACT
5	PRTB10	56	GGTGTGCTCCTGATGCCAGC
6	PRTB20	56	CCCCGTTTAACAACCTGCAAGTT
7	Jp23	56	GCTTGGATAGTAGCGTTAGC
8	Jp25	56	GGTGAACAAACTGAAGACG
9	prti2	53	CAACACCGGGACCACGGTG
10	IP6Xba	53	CTGATCGTGGACGGTGTTC

Программа ПЦР: суммарное время длительности программы составляло 1 ч 30 мин – 2 ч 20 мин. Условия амплификации ПЦР: начальная денатурация при 94 °С в течение 4 мин; 30 циклов денатурации при 94° С в течение 1 мин; отжиг при 53–56 °С в зависимости от mT праймеров (1 мин); удлинение при 72 °С (1,5 мин) и окончательное удлинение при 72 °С в течение 7 мин [22].

Электрофорез продуктов ПЦР

Электрофорез образцов проводили в камере для горизонтального электрофореза SE-2 фирмы Helicon в 1%-ном агарозном геле. Камеру подключали к источнику тока и проводили разделение при силе тока 100–150 мА, напряжении 150 В. В качестве маркера использовали GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва) Аналитические гели документировали и визуализировали с использованием гель-документирующей системы BioRad Gel-Doc (США) [22].

2.2.6 Определение химического состава продукта

Определение содержания сухих веществ

Определение содержания сухих веществ выполняли в соответствии с ГОСТ Р 54668-2011 [17]. Метод основан на высушивании анализируемого образца до постоянной массы.

После фиксирования постоянной массы содержание сухих веществ рассчитывали по следующей формуле:

$$СВ = \frac{m_c - m_{п}}{m_b - m_{п}} \cdot 100\% ,$$

где m_c – масса чашки с высушенной навеской, г;

$m_{п}$ – масса пустой чашки, г; m_b – масса чашки с влажной навеской, г.

Определение содержания жира в молочных продуктах

Для определения содержания жира в молочных продуктах использовали метод Гербера в соответствии с ГОСТ 5867-90 [18].

Определение содержания жира в растительном сырье

Количественное определение содержание жира в растительном сырье осуществляли по ГОСТ 13496.15-2016 [4].

Определение содержания сырого протеина

Определение содержание сырого протеина осуществлялось по ГОСТ 34454-2018 [13].

Определение содержания золы

Для определения золы использовали метод в соответствии с ГОСТ 32933-2014 [11].

Определение содержания массовой доли белка в молочных продуктах

Определение содержания массовой доли белка в молочных продуктах выполнялось по ГОСТ 25179-2014 [5].

Метод определения содержания редуцирующих веществ

Определение содержания РВ проводили по ГОСТ Р 54667-2011 [16].

Количественное определение содержания углеводов

Содержание углеводов определяли по разности из сухого остатка продукта и количества белка, жира и золы в пересчете на сухие вещества по ГОСТ 34567-2019 [14].

2.2.7 Определение органолептических свойств продукта

Определение органолептических показателей полученных образцов проводилось согласно ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [24] и ГОСТ 31450-2013 «Молоко питьевое. Технические условия» [6].

2.2.8 Микробиологические методы исследования

Определение микробиологических показателей полученных образцов проводилось согласно ТР ТС 033/2013 [24]. Определение количества молочнокислых микроорганизмов в продукте производилось методом культивирования на питательной среде Бликфельдта, ГОСТ 10444.11-2013 [2], ГОСТ 10444.15-94 [3]. Общее количество микроорганизмов и бактерий группы кишечных палочек осуществляли согласно ГОСТ 32901-2014 [10] методом культивирования с использованием среды КМАФАнМ и среды Кесслера. Дрожжи и плесени определялись по ГОСТ 33566-2015 [12], *Listeria monocytogenes* – по ГОСТ 32031-2012 [9], *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 31746-2012 [8], *Salmonella* – по ГОСТ 31659-2012 [7].

2.2.9 Протеомные методы исследования

Идентификация штаммов методом MALDI-TOF MS

Для идентификации микроорганизмов использовали метод MALDI-TOF MS [140]. Исследования выполняли на приборе Bruker Bioityper MALDI-TOF (США).

Масс-спектрометрическое исследование белковых фракций

Для идентификации белков отдельные фракции вырезали из геля двумерного электрофореза (ДЭ), затем вырезанные фрагменты измельчали и осуществляли их трипсинолиз. Для масс-спектрометрического анализа белковых фракций применяли оборудование 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. Расшифровку спектров осуществляли с помощью стандартных методом биоинформатики. Анализ масс-спектров выполняли с помощью

программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США) с точностью определения массы MH^+ 0,01 % с использованием базы данных Protein NCBI.

При пробоподготовке для протеомного анализа 100 мкл взвеси образца гомогенизировали в 2 см³ в системе «тефлон – стекло» в лизирующем растворе имеющем следующий состав: 9М мочевины, 5 % меркаптоэтанола, 2 % тритона X-100, 2 % амфолинов pH 3,5–10. Полученный гомогенат осветляли центрифугированием при 800 g в течение 5 мин и надосадочную фракцию, содержащую солюбилизированные белки (экстракт – 100 мкл), использовали для фракционирования. Для идентификации коротких пептидов взвесь образцов центрифугировали при 800 g 5 мин, после чего разведенную в пять раз надосадочную фракцию использовали для масс-спектрометрической идентификации [173].

Одномерный электрофорез в полиакриламидном геле (1-ДЭ)

Одномерный электрофорез [56] проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) с концентрацией 10 и 12 % в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в вертикальной камере для электрофореза (Helicon, США) при постоянной силе тока и напряжении 70 В и 100 В в течение 2 ч. В качестве раствора стандартов использовали маркер, состоящий из белковых препаратов с молекулярной массой 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20 кДа (Thermo, Латвия).

Для обнаружения белка гель окрашивали красителем Кумасси бриллиантовым синим R-250 (PanReac, Испания). Затем гель переносили в гелевую систему документирования BioRad Gel-Doc и анализировали.

Двумерный электрофорез (2-ДЭ)

Для двумерного электрофореза [21] экстракта белков нута по методу О'Фаррелла применяли камеру для двумерного электрофореза (Bio-Rad, США) с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в стеклянных трубках в первом направлении, электрофорезом в ПААГ во втором направлении и последующим

окрашиванием полученных электрофореграмм Кумасси R-250 (PanReac, Испания) или азотнокислым серебром.

Компьютерная денситометрия

Компьютерную денситометрию [21] двумерных электрофореграмм проводили при использовании электрофореграмм во влажном состоянии, а денситометрию полных/отдельных фрагментов осуществляли сканированием (Expression 1680, Epson, США) при разрешении 300 ppi. Анализ изображений проводили с помощью ПО ImageMaster™ 2D Platinum на базе Melanie 7.0 (GE Healthcare, Швейцария). При определении количества белка использовалось по три электрофореграммы с равным нанесением. Разброс значений оптической плотности составлял не более $\pm 1,5\%$.

2.2.10 Биоинформационный анализ электрофореграмм

В ходе биоинформатического анализа электрофореграмм 1-DE и 2-DE применяли интерпретацию белковых фрагментов из базы данных Swiss-Prot, NCBI, BIOPEP, AntiCP, AntiBP, ANTPin, ToxinPred, AntiFP и AntiTb.

2.2.11 Статистическая обработка результатов исследований

Математическая обработка результатов проводилась с применением программного пакета Microsoft Excel 2019 и программного обеспечения Statistica 10.0.

Заключение по главе 2

Во второй главе представлены объекты исследования. Кратко описаны культуральные, морфологические, в т.ч. тинкториальные, физиолого-биохимические, пробиотические и технологические методы изучения микроорганизмов. Идентификация вновь выделенных штаммов проводилась протеомным методом. Молекулярно-генетические исследования заключались в изучении генов, кодирующих протеолитическую активность молочнокислых микроорганизмов. Биоактивные пептиды были определены протеомными методами, их прогнозируемая функциональность – с привлечением инструментов биоинформатики. Качественные показатели готовых продуктов

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

3.1 Выделение микроорганизмов из природных источников

На данном этапе исследований выделение новых штаммов молочнокислых микроорганизмов осуществляли из естественно ферментированных пищевых продуктов (табл. 3.5). Микроорганизмы были идентифицированы по совокупности физиолого-биохимического и протеомного MALDI-TOF MS методов.

Для выделения бактерий была приготовлена серия десятикратных разведений в физиологическом растворе. После приготовления разведений из каждой пробирки делали посев на поверхность плотной питательной среды MRS, растирая посевной материал шпателем. Затем чашки помещали в термостат и культивировали при температуре 37° С в течение семи суток. Параметры инкубации были выбраны исходя из физиологических свойств молочнокислой микрофлоры. Так, температура 37° С является оптимальной для ее роста, а продолжительное время культивирования дает возможность выявить различные виды бактерий, так как скорость роста микроорганизмов неодинакова.

Параллельно с этим для каждого продукта проводилось бактериологическое исследование. Для этого определяли общее количество микроорганизмов в 1 г продукта и присутствие основных представителей санитарно-показательной микрофлоры: бактерий группы кишечных палочек (БГКП), бактерий рода *Salmonella*, протей, коагулазоположительных стафилококков, *Clostridium perfringens* и *Listeria monocytogenes*. В результате исследования колонии, характерные для данных видов бактерий, не обнаружены.

Для получения чистой культуры был выбран метод истощающего штриха, который применяют для получения изолированных колоний. Контроль однородности выделенной культуры осуществлялся визуальным способом и методом микроскопирования. После микроскопирования были отобраны бактерии – клетки чистых культур микроорганизмов, однородные по форме и размеру

(палочки, кокки или коккобациллы) и окраске по Граму (грамположительные). Остальные культуры отбраковали.

3.2 Идентификация микроорганизмов

3.2.1 Определение фенотипических свойств исследуемых штаммов

Культуральные или морфологические свойства отобранных штаммов молочнокислых микроорганизмов изучали на плотной питательной среде MRS. Определяли диаметр в миллиметрах, описывали форму, характер контура края, поверхность, рельеф, цвет, структуру и консистенцию колоний (табл. 3.1).

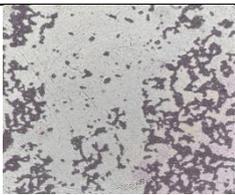
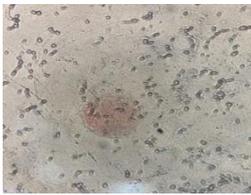
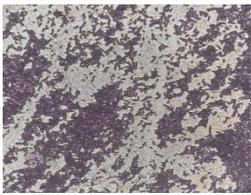
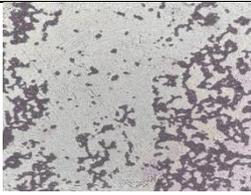
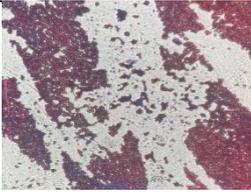
Таблица 3.1 – Характеристика колоний штаммов молочнокислых микроорганизмов

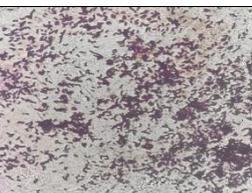
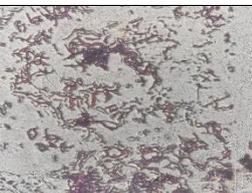
Название микроорганизма	Характеристика колоний							
	Размер	Форма	Характер контура края	Рельеф	Поверхность	Цвет	Структура	Консистенция
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	выпуклый	гладкая, блестящая	кремово-белый	однородная	пастообразная
<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8	До 1 мм (точечные)	круглая	Ровный	выпуклый	гладкая, блестящая	кремово-белый	однородная	пастообразная
<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	выпуклый	гладкая, блестящая	белый	однородная	мазеобразная
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	выпуклый	гладкая, блестящая	белый	однородная	пастообразная
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	выпуклый	гладкая, блестящая	белый	однородная	пастообразная
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	выпуклый с приподнятым центром	гладкая, блестящая	белый	однородная	мазеобразная
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	плоско-выпуклый	гладкая, блестящая	белый	однородная	мазеобразная
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	выпуклый	гладкая, блестящая	белый	однородная	крошкообразная

<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	плоский	гладкая, блестящая	белый	однородная	мазеобразная
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CA-6	1–2 мм (мелкие)	круглая	ровный	плоский	гладкая, блестящая	белый	однородная	Пастообразная

Была проведена микроскопия десяти фиксированных и окрашенных по Граму мазков исследуемых штаммов. Тинкториальные свойства штаммов описаны и представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Фенотипические свойства исследуемых штаммов бактерий

№	Микроскопический препарат	Видовое название микроорганизма
1		<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2. Грамположительные короткие палочки с закругленными концами, находящиеся преимущественно в группах.
2		<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8. Короткие грамположительные палочки с закругленными концами, расположенные поодиночке, цепочками или группами.
3		<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1. Грамположительные палочковидные бактерии с закругленными концами. Чаще всего находятся в группах или цепочках.
4		<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9. Клетки шаровидной формы, грамположительные, чаще всего находятся в группах.
5		<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10. Грамположительные кокки, находящиеся в цепочках или группах.

6		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> FM-4. Грамположительные клетки шаровидной формы, соединенные попарно или в короткие цепочки.
7		<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7. Грамположительные прямые палочки с прямоугольными концами.
8		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5. Короткие грамположительные палочки с закругленными концами, соединенные в длинные цепочки.
9		<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3. Длинные грамположительные палочки, соединенные в группы.
10		<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CA-6. Грамположительные короткие палочки с закругленными концами, находящиеся поодиночке, в коротких цепочках или группах.

Далее штаммы были идентифицированы по совокупности физиолого-биохимического и протеомного MALDI-TOF MS методов.

3.2.2 Изучение физиолого-биохимических свойств микроорганизмов

Молочнокислые бактерии известны своей способностью ферментировать углеводы. Каждый штамм молочнокислых бактерий ферментирует сахара по-разному, что лежит в основе их физиолого-биохимической идентификации, в том числе при разделении близкородственных видов. Чтобы выяснить способность утилизации углеродсодержащих соединений, молочнокислые бактерии высевали на среды, содержащие их в качестве единственного источника углерода. При образовании кислот снижалось значение рН среды и изменялась окраска индикатора, в этом случае реакция считалась положительной.

Как следует из таблицы результатов (табл. 3.3), все штаммы ферментируют глюкозу, галактозу и фруктозу. Все штаммы, кроме штамма № 3, ферментируют маннозу. Только штамм № 4 ферментирует рамнозу, а штамм № 9 – рибозу. Штаммы № 5, 6, 8 и 10 ферментируют инозитол. Все штаммы, кроме штаммов № 1, 2, 3 и 5, ферментируют маннит. Штаммы № 3 и 4 были не способны ферментировать лактозу, штаммы 1 и 2 – мальтозу, а штаммы № 3, 4 и 9 – сахарозу. Штаммы № 2, 6, 8 и 10 ферментировали мелибиозу, а штаммы № 1, 2, 4, 7 и 9 ферментировали целлобиозу. В ряде случаев можно говорить о штаммоспецифической характеристике утилизации углеводов, поэтому для более точной идентификации физиолого-биохимическими методами необходимо расширять спектр используемых углеводов, например как в стрипах API 50 CH (bioMerieux, Франция), где используется 49 углеводных субстратов.

Таблица 3.3 – Способность ферментировать микроорганизмами углеводы

Название микроорганизма	Манноза	Глюкоза	Инозит	Маннит	Лактоза	Мелибиоза	Мальтоза	Галактоза	Сахароза	Фруктоза	Целлобиоза	Рибоза	Рамноза
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2 (1)	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8 (2)	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1 (3)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9 (4)	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10 (5)	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4 (6)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7 (7)	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5 (8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3 (9)	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CA-6 (10)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

3.2.3 Ферментация лакмусового молока

Ферментация лактозы проявляется, когда лакмус становится розовым в результате продукции кислоты. По результатам исследований все штаммы сбраживали лактозу, за счет достаточной продукции кислоты казеин в молоке свертывался и затвердевал, а у штаммов *Leuconostoc mesenteroides* FM-4 и *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 образовывалась сыворотка на поверхности (табл. 3.4; рис. 3.1).

Таблица 3.4 – Ферментация лакмусового молока

Реакция	Причина
Защелачивание	
1. Розовый или красный цвет молока	Ферментация лактозы и/или глюкозы в молоке
2. Кислотная коагуляция	Образование молочной кислоты, ведущее к створаживанию казеина и появлению прозрачной водянистой жидкости
3. Губчатый сгусток	Образование газа в сгустке казеина
Защелачивание	
1. Синий цвет молока	Протеолиз с образованием основных аминов или аммиака
2. Щелочная коагуляция с бледно-голубым сгустком	Переход казеина в параказеин под действием фермента ренина
3. Пептонизация	Переваривание казеина, сопровождаемое просветлением среды и растворением сгустка
Восстановление	
Обесцвечивание среды (напоминает свежее автоклавированную среду)	Реакция лакмуса в глубине пробирки: под действием микробных редуказ количество растворенного кислорода сокращается, а бесцветной (восстановленной) формы лакмуса – повышается



Рисунок 3.1 – Изменения лакмусового молока

3.2.4 Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS

Метод MALDI-TOF предназначен для идентификации чистых бактериальных культур.

Идентификация с помощью MALDI-TOF MS (рис. 3.2) показала следующее:

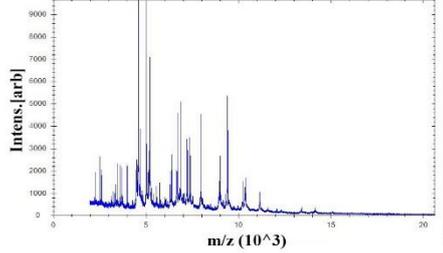
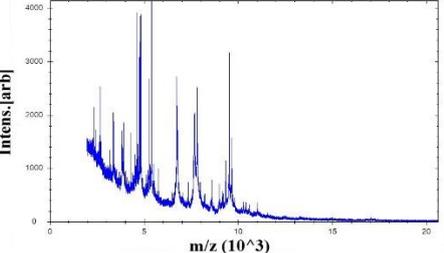
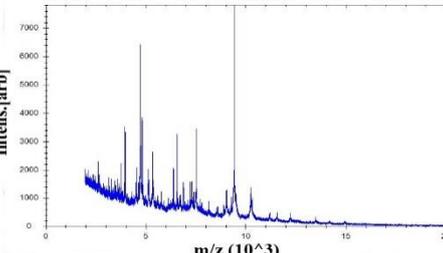
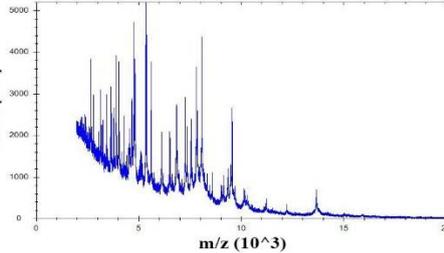
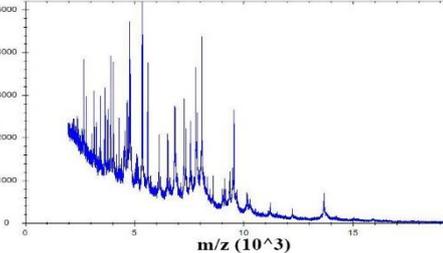
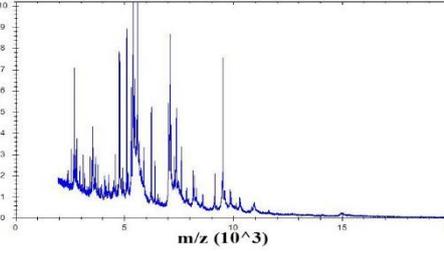
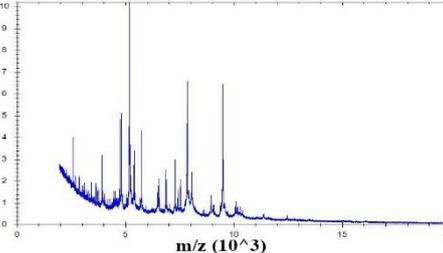
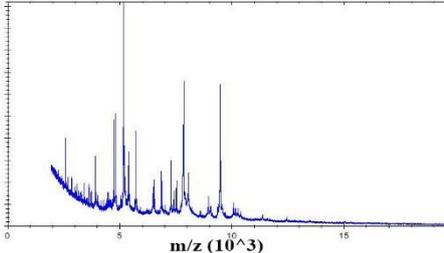
- для штамма *Limosilactobacillus fermentum* AS-3, выделенного из сыровяленной медвежатины, значение коэффициента совпадения score 2,124 со штаммом *Limosilactobacillus fermentum* 21_PG_1 ZZMK и score 1,846 со штаммом *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* DSM 20006 DSM;

- для штамма *Lacticaseibacillus paracasei*, выделенного из маринованной спаржи, значение коэффициента совпадения score 2,187 со штаммом *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* DSM 2649 DSM и score 2,043 со штаммом *Limosilactobacillus fermentum* DSM 20391 DSM_2;

- для штамма *Leuconostoc mesenteroides*, выделенного из огуречного рассола, значение коэффициента совпадения score 2,117 со штаммом *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* DSM 20343T DSM и score 1,761 со штаммом *Lactoplantibacillus 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 отличить от штаммов *L. paracasei* ssp. *paracasei* DSM 20006 DSM и *L. paracasei* ssp. *paracasei* DSM 2649 DSM благодаря способности последних ферментировать арабинозу. А штамм *Leuc. mesenteroides*

ssp. *mesenteroides* DSM 20343T DSM способен ферментировать D-ксилозу, в отличие от *L. plantarum* DSM 20246 DSM (табл. 3.5).

<p><i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2</p>  <p><i>Lactobacillus fermentum</i> 21_PG_1 ZZMK score 2.067 <i>Lactobacillus fermentum</i> DSM 20391 DSM_2 score 2.052</p>	<p><i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8</p>  <p><i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>carneus</i> DSM 15740 DSM score 2.348 <i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20100 DSM score 2.196</p>
<p><i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1</p>  <p><i>Lactobacillus brevis</i> DSM 20054T DSM score 2.978</p>	<p><i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9</p>  <p><i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20206 DSM score 1.938</p>
<p><i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10</p>  <p><i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20206 DSM score 2.077</p>	<p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4</p>  <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> DSM 20343T DSM score 2.104</p>
<p><i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7</p>  <p><i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 DSM score 2.225</p>	<p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5</p>  <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> DSM 20343T DSM score 2.117 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSM 20246 DSM score 1,761</p>

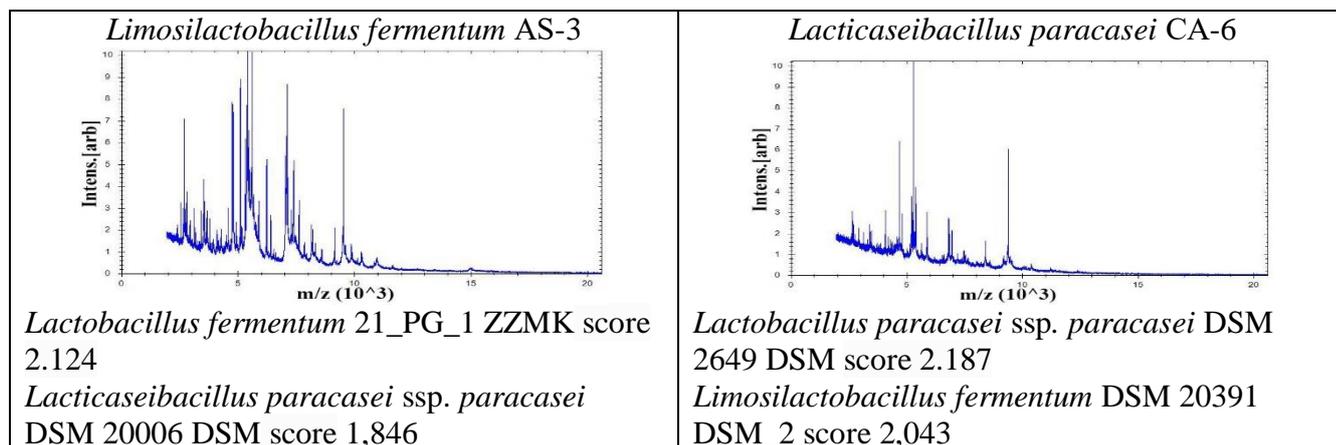


Рисунок 3.2 – Спектры при идентификации штаммов методом MALDI-TOF и score с типовыми штаммами

Штаммы депонированы в Биоресурсный центр ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» (табл. 3.5), что подтверждается справками о депонировании (ПРИЛОЖЕНИЯ 1–3).

Таблица 3.5 – Микроорганизмы, депонированные в коллекцию ВКПМ

№ п/п	Источник выделения	Вид	Штамм	Номер ВКПМ
1	Сыровяленая медвежатина	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	SB-2	В-14054
2	Сыровяленая лосятина	<i>Latilactobacillus sakei</i>	SD-8	В-14053
3	Домашний йогурт	<i>Levilactobacillus brevis</i>	VY-1	В-14052
4	Квашеная капуста	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FC-9	В-14055
5	Домашний сыр	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FC-10	В-14056
6	Простокваша	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FM-4	В-14057
7	Огуречный рассол	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	PC-7	В-14058
8	Творог	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CH-5	В-14059
9	Маринованная спаржа 1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	AS-3	В-14060
10	Маринованная спаржа 2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CA-6	В-14061

3.3 Технологические и пробиотические свойства выделенных микроорганизмов

Любую активность микроорганизма можно рассматривать в аспекте его биотехнологического использования: все зависит от того, какая технология разрабатывается, какое будет использоваться сырье, его исходных параметров, а также желаемых характеристик готового продукта.

К основным технологическим свойствам заквасочных культур микроорганизмов можно отнести способность сбраживать углеводы с образованием молочной кислоты, способность активно «работать» в сырье с различным содержанием соли, антагонистическую активность по отношению к санитарно-показательной микрофлоре.

Эффективность пробиотических микроорганизмов зависит от их устойчивости к фенолу (0,4–0,5 %) и к желчи (способны расти в присутствии до 40 % солей желчи) в условиях желудочно-кишечного тракта.

3.3.1 Активность кислотообразования штаммов

Активность кислотообразования штаммов представлена в таблице (табл. 3.6). Все изучаемые штаммы хорошо сквашивали молоко и образовывали плотный сгусток. Наиболее активными кислотообразователями были штаммы *Latilactobacillus 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 штаммов *Pediococcus pentosaceus* FC-10 и *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6. Значения активной кислотности (рН) были в пределах от 4,43 до 5,65. Сгусток, образованный разными штаммами, имеет чистый кисломолочный вкус и однородную консистенцию.

Таблица 3.6 – Активность кислотообразования штаммов

№	Штамм	Активность ферментации, ч	Кислотность		
			Активная, рН	Титруемая, °Т	Пределная, °Т
1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2	24	5,37	105	153
2	<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8	20	5,25	110	162
3	<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1	22	4,58	108	154
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9	24	4,64	100	170
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10	48	5,33	85	122
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4	22	5,24	112	148
7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7	24	4,43	113	210
8	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> CH-5	22	4,57	102	174
9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3	20	5,65	117	173
10	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CA-6	21	5,35	94	123

3.3.2 Устойчивость к NaCl

Полученные результаты показывают, что у большинства штаммов наблюдалось достоверное снижение роста при концентрации соли 6,5 %, а у штамма *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 рост не наблюдался при концентрациях 8, 10 и 12 %, у штамма *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 при концентрации 12 % NaCl роста не наблюдалось (табл. 3.7).

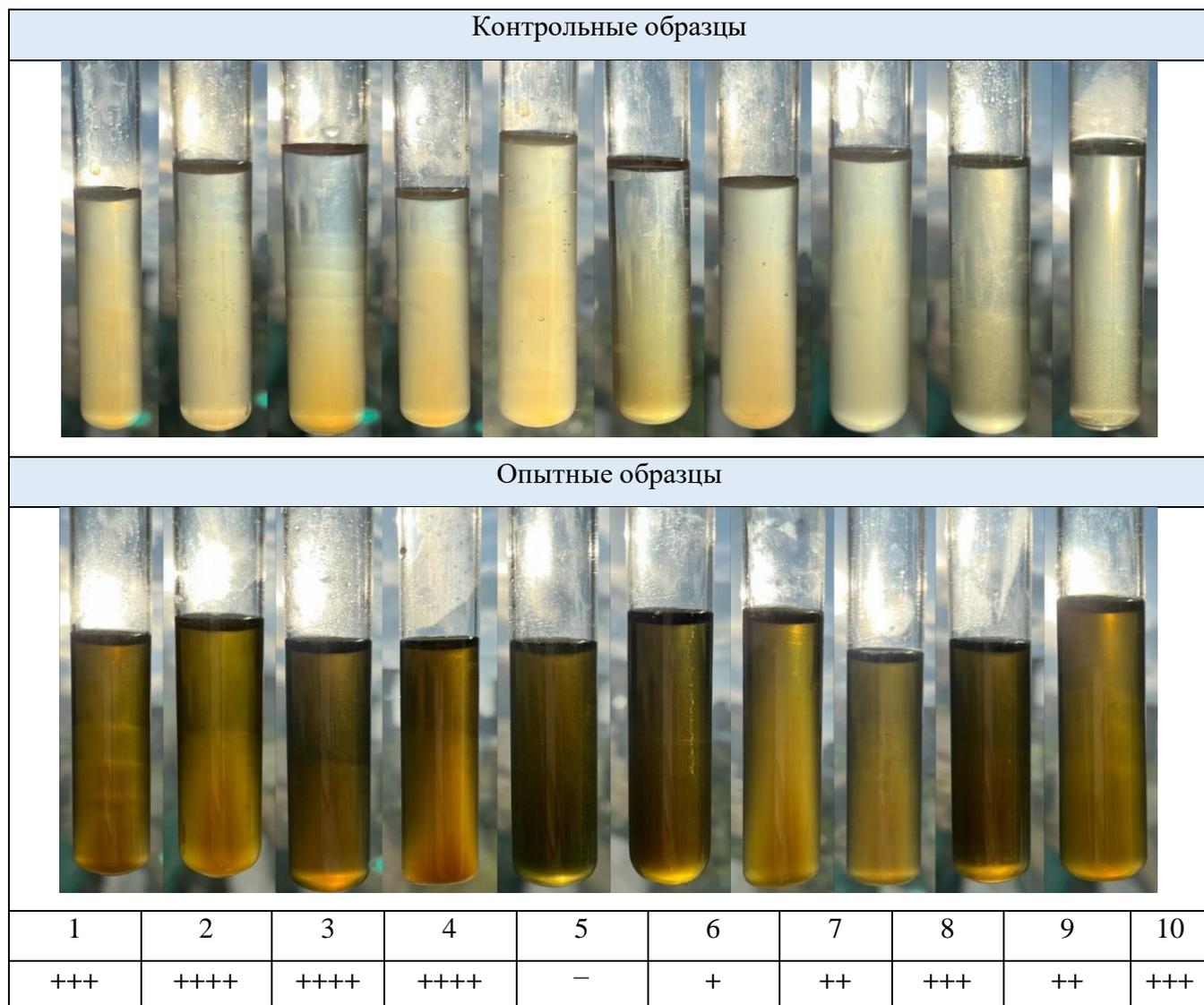
Таблица 3.7 – Устойчивость штаммов к поваренной соли

Концентрация соли, %	Микроорганизмы									
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2	<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8	<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CA-6
2	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++
4	+++	++++	++++	++++	++	++++	++++	+++	++++	++++
6,5	++	+++	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
8	+	++	+	+	+	++	++	++	++	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

«++++» – обильный рост (как в контроле), «+++» – рост несколько хуже, чем в контроле, «++» – удовлетворительный рост, «+» – плохой рост, «-» – нет роста

3.3.3 Определение устойчивости штаммов к воздействию желчи

Результаты экспериментальных исследований показали, что среди десяти изучаемых штаммов наиболее устойчивыми по отношению к желчи являются *Latilactobacillus sakei* SD-8, *Levilactobacillus brevis* VY-1, *Pediococcus pentosaceus* FC-9 и *Leuconostoc mesenteroides* CH-5, тогда как *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 и *Pediococcus pentosaceus* FC-10 показали полное отсутствие устойчивости, а *Limosilactobacillus fermentum* AS-3 – едва заметную устойчивость (рис. 3.3).

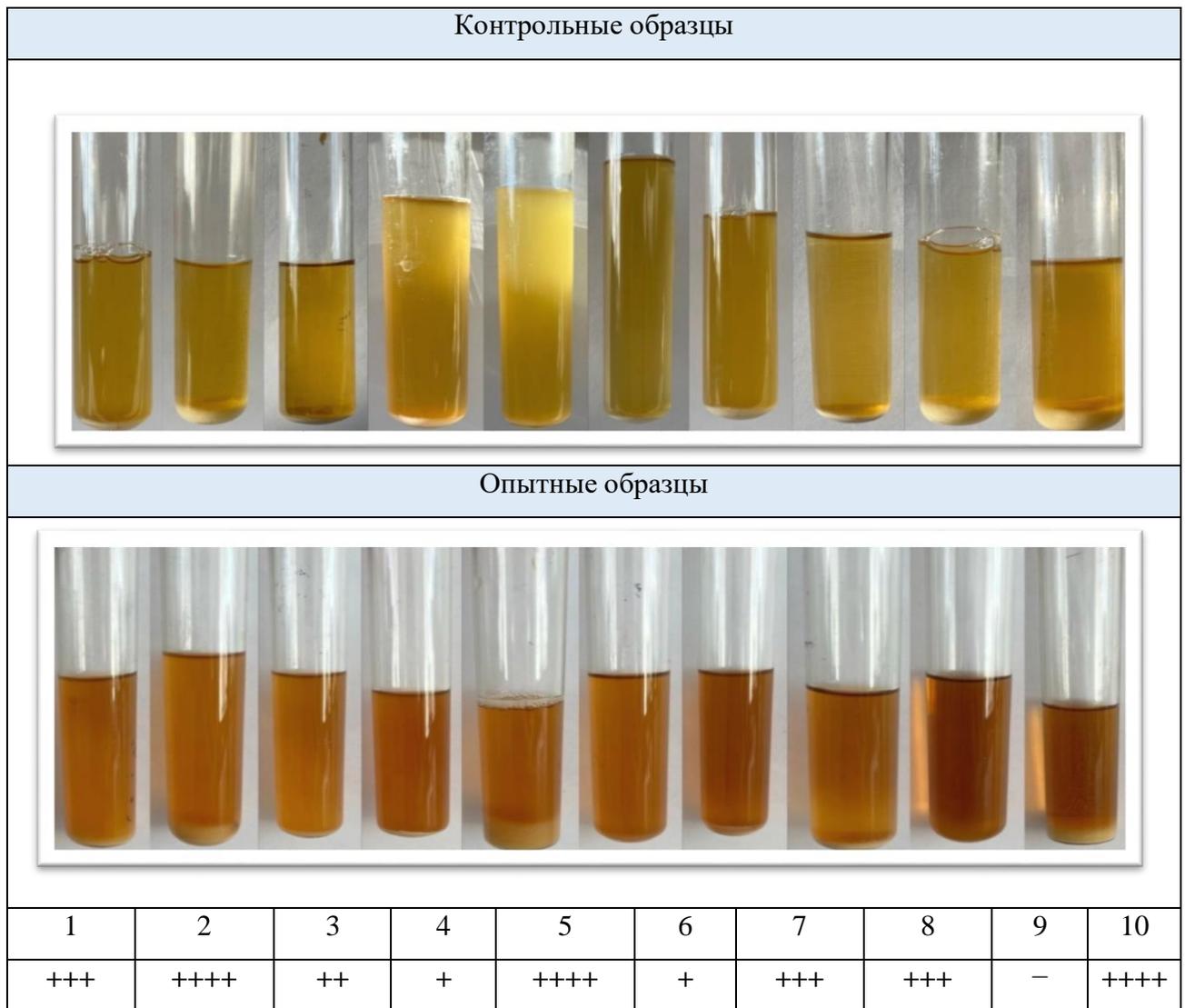


«++++» – обильный рост (как в контроле), «+++» – рост несколько хуже, чем в контроле, «++» – рост удовлетворительный, «+» – плохой рост, «-» – нет роста

Рисунок 3.3 – Устойчивость штаммов к действию желчи

3.3.4 Определение устойчивости штаммов к фенолу

По результатам исследования штаммы *Latilactobacillus sakei* SD-8, *Pediococcus pentosaceus* FC-10 и *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 демонстрировали наибольший рост, а штамм № *Limosilactobacillus fermentum* AS-3 не показал роста (рис. 3.4).



«++++» – обильный рост (как в контроле), «+++» – рост несколько хуже, чем в контроле, «++» – рост удовлетворительный, «+» – плохой рост, «-» – нет роста

Рисунок 3.4 – Устойчивость штаммов к фенолу

Анализируя полученные в ходе исследований результаты, можно сказать, что степень выживаемости в условиях ЖКТ различается от штамма к штамму. Перспективными в этом плане являются *Latilactobacillus sakei* SD-8, *Levilactobacillus brevis* VY-1, *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7, *Leuconostoc mesenteroides* CH-5 и *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 общий процент выживаемости которых составляет 87,5 %, 68,7 %, 62,5 %, 62,5 % и 81,25 % соответственно (рис. 3.5).

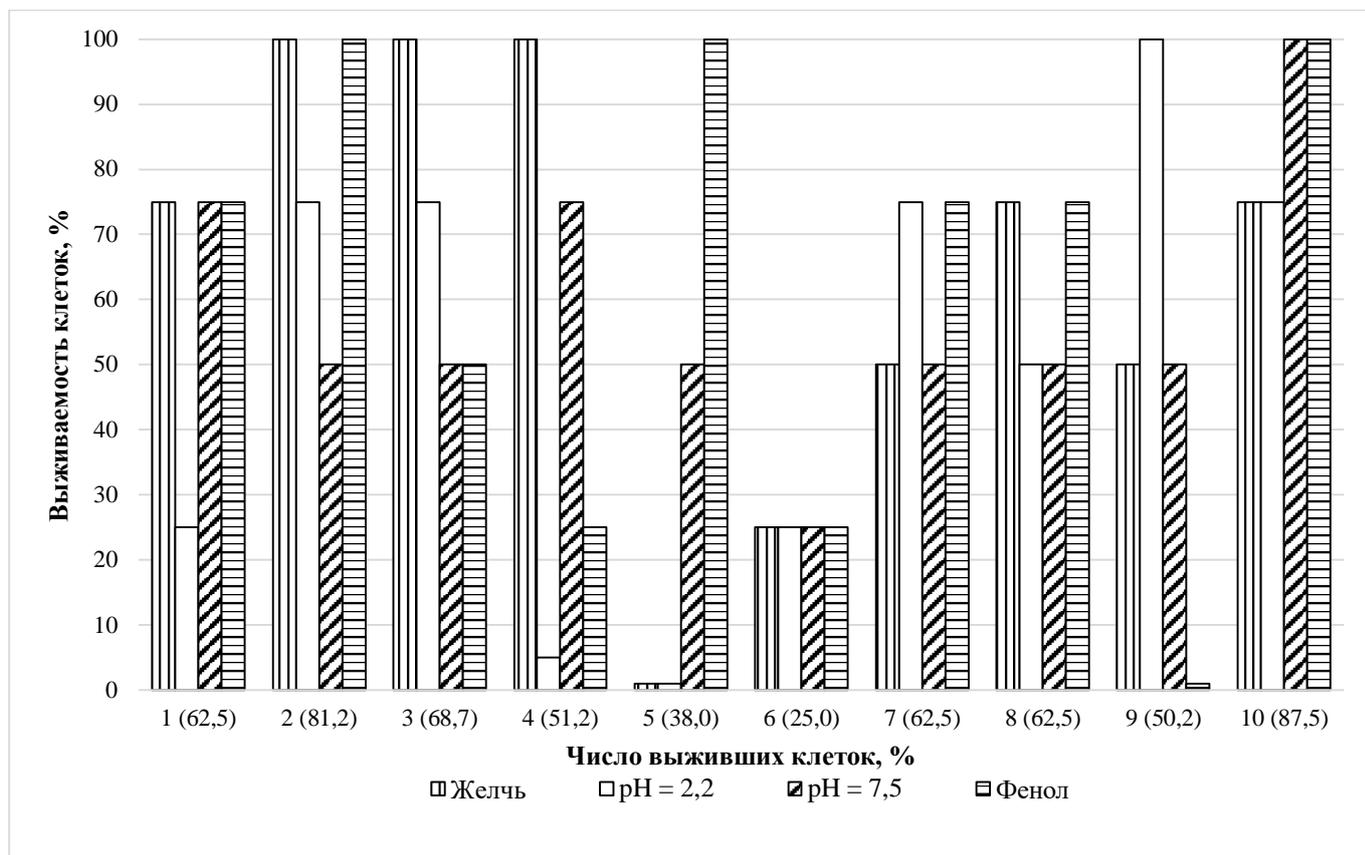
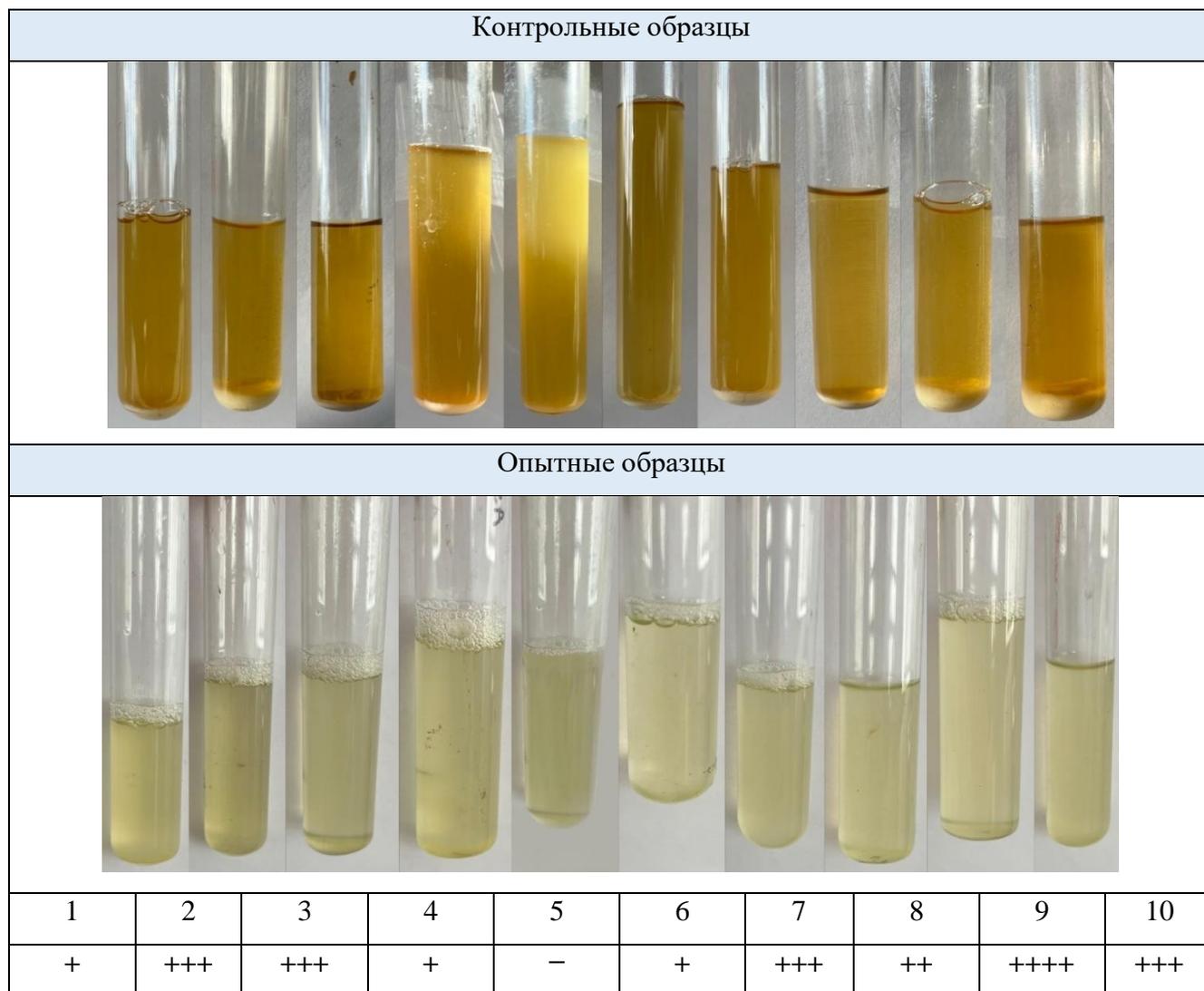


Рисунок 3.5 – Устойчивость штаммов к условиям ЖКТ

3.3.5 Определение устойчивости штаммов к повышенной кислотности среды

При тестировании штаммов выявлено, что наиболее устойчивыми к pH среды равной 2,2, что является нормальной кислотностью желудка, оказались следующие бактерии: *Lactilactobacillus sakei* SD-8 (2), *Levilactobacillus brevis* VY-1 (3), *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 (7), *Limosilactobacillus fermentum* AS-3 (9), *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 (10). Среди остальных бактерий *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (1), *Pediococcus pentosaceus* FC-9 (4), *Leuconostoc mesenteroides* FM-4 (6) и *Leuconostoc mesenteroides* CH-5 (8) обладали едва заметной устойчивостью, тогда как штамм *Pediococcus pentosaceus* FC-10 (5) полностью ингибировался кислотной средой (рис. 3.6).

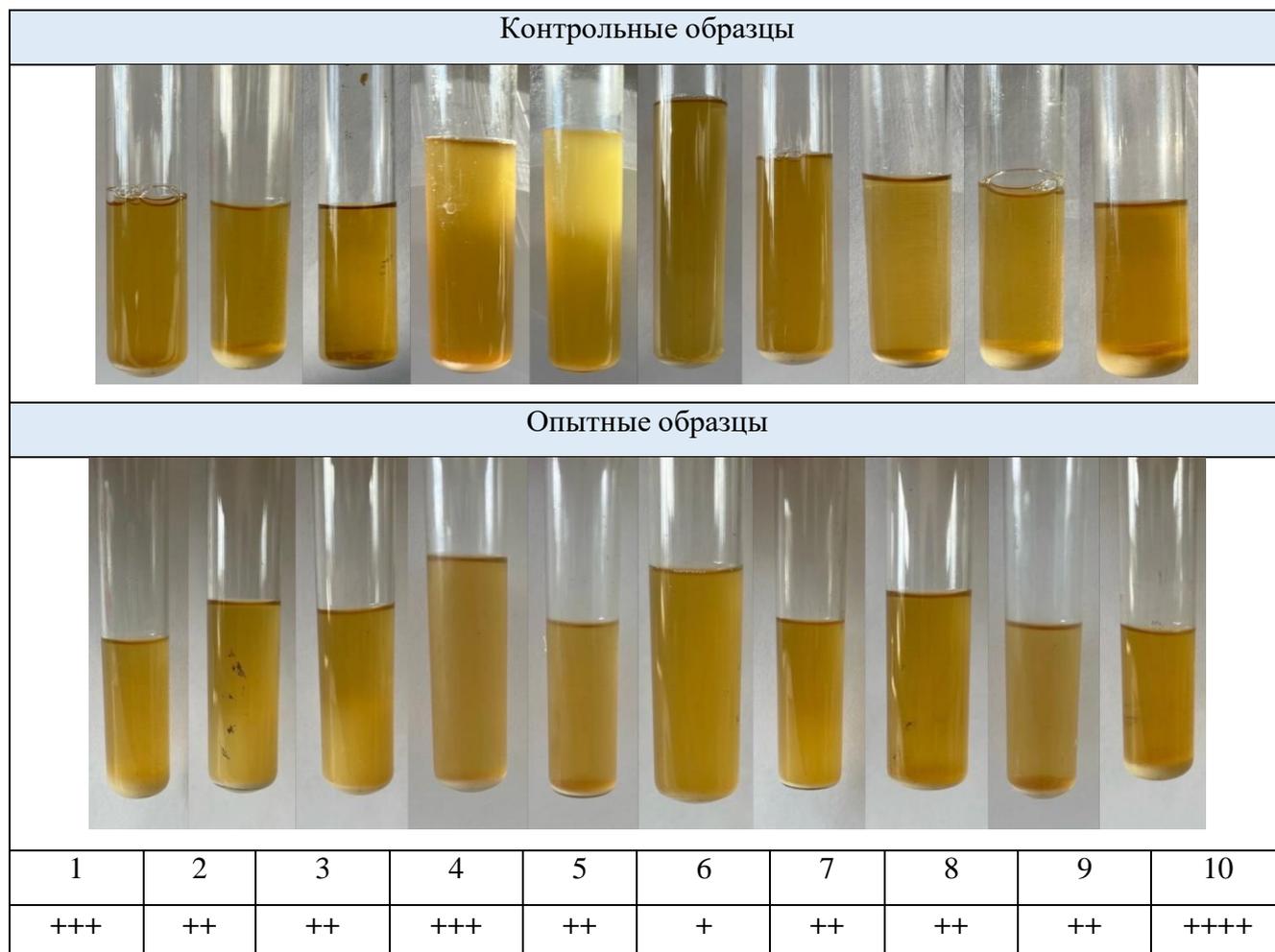


«++++» – обильный рост (как в контроле), «+++» – рост несколько хуже, чем в контроле, «++» – рост удовлетворительный, «+» – плохой рост, «-» – нет роста

Рисунок 3.6 – Устойчивость штаммов к значению рН среды, равному 2,2

3.3.6 Определение устойчивости штаммов к повышенной щелочности среды

Выявлено, что рН среды 7,5 не является ингибирующим для большинства изученных штаммов МКБ. Так, наибольшую устойчивость к щелочной среде проявляют штаммы *Lactilactobacillus sakei* SD-8 (2) и *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 (10) (рис. 3.7).



«++++» – обильный рост (как в контроле), «+++» – рост немного хуже, чем в контроле, «++» – рост удовлетворительный, «+» – слабый рост, «-» – нет роста

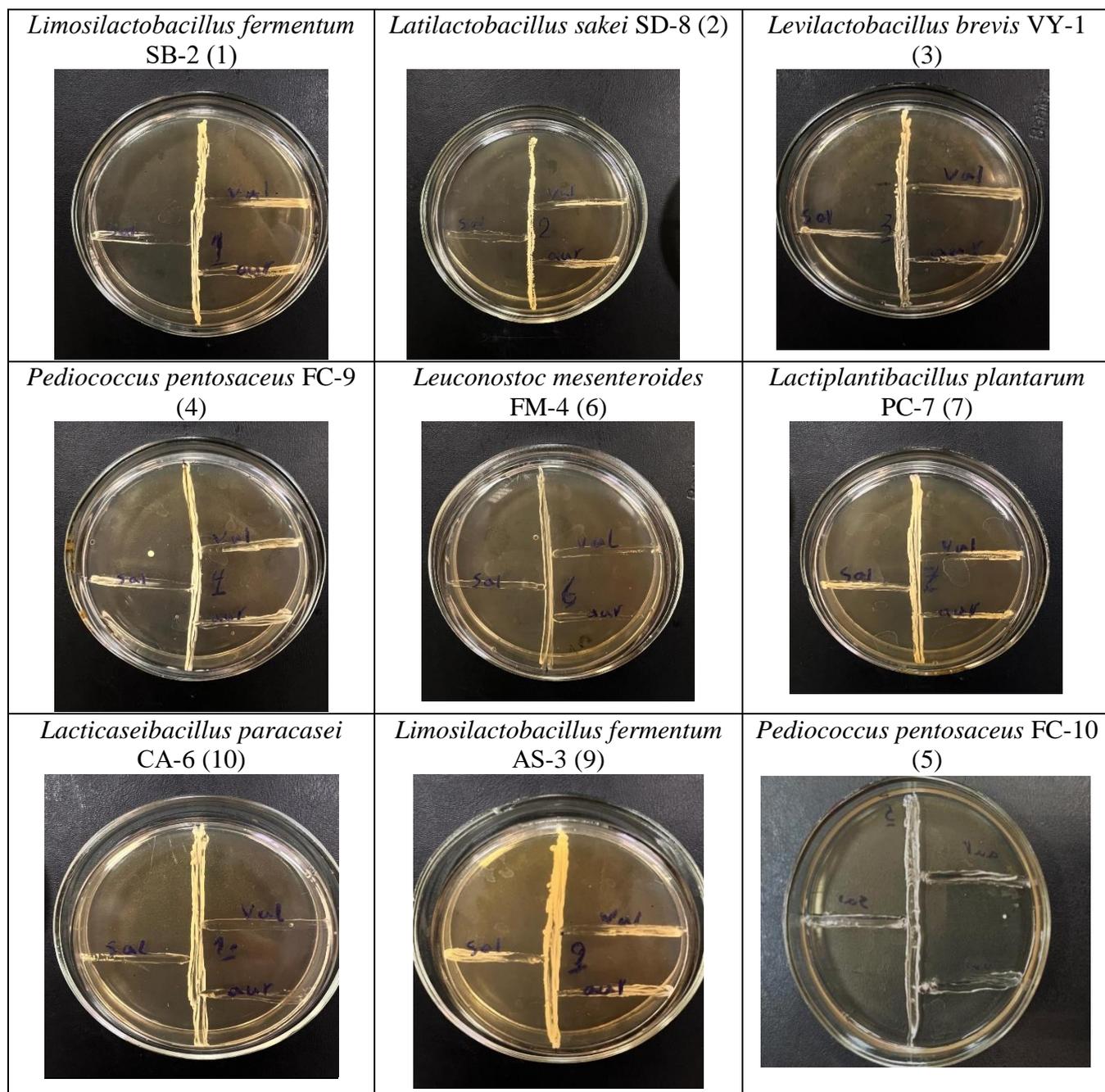
Рисунок 3.7 – Устойчивость штаммов к рН среды 7,5

3.3.7 Скрининг штаммов на антагонистическую активность

Важной особенностью пробиотических бактерий является их способность ингибировать патогенные и условно-патогенные микроорганизмы в ЖКТ человека. Именно поэтому важно было провести исследование антагонистической активности выбранных штаммов в отношении следующих тест-культур: *Salmonella typhimurium* 5715, *Proteus vulgaris* 14 и *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 209P.

Производство противомикробных соединений МКБ является одной из ключевых характеристик конкурентного исключения патогенных бактерий. Многочисленные антимикробные вещества, вырабатываемые МКБ, включая

органические кислоты, перекись водорода, бактериоцины, липиды и метаболиты аминокислот, имеют хорошо изученную историю [30]. В условиях эксперимента наибольшую антагонистическую активность проявили штаммы 1, 6 и 10, за ними следовали штаммы 2, 4, 7 и 9. Штаммы 5 и 8 проявили наименьшую антагонистическую активность (рис. 3.8).



Leuconostoc mesenteriodes CH-5 (8)

Рисунок 3.8 – Антагонистическая активность штаммов МКБ

3.3.8 Определение устойчивости штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам

Результаты определения антибиотикорезистентности представлены в таблице 3.8 и на рисунке 3.9.

Таблица 3.8 – Устойчивость штаммов к антибиотикам

Антибиотики	Микроорганизмы									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ингибиторы синтеза клеточной стенки										
БЕТА-ЛАКТАМЫ										
Азтреонам АТ30	R<10	R 11	I 16	R<10	R<10	R<10	R<10	S36	R<10	R<10
Цефазолин CZ30	S18	R12	S30	I 16	S18	I 15	S 26	S 31	S 27	S 22
Бензилпенициллин p10	S >34	S >34	S >26	S >27	S 27	S <26	S >31	S>36	S>37	S>26
Клоксациллин СОХ30	I 22	I 22	R12	R16	R15	S28	I>24	R11	R20	S>26
Клоксациллин СОХ5	R<10	R10	R<10	S20	R<10	R<10	R<10	R10	S19	R10
Бензилпенициллин p2	S34	S>32	S32	S>27	S>26	S>26	S>32	S>34	S>34	S>26
Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот										
ХИНОЛОНЫ										
Гатифлоксацин GAT5	S22	S18	S22	S20	I 17	S22	S24	S27	S24	S28
Спарфлоксацин SPX5	–	S24	–	–	S20	–	S26	–	S27	–
Ципрофлоксацин СІР5	I 18	R<10	R<10	R<10	R<10	R<10	S21	R<10	S25	R<10
Офлоксацин OF5	S 22	I 20	S 20	S 16	I 18	S27	I 20	S>34	S27	S22
Норфлоксацин NX10	S24	–	S22	S17	–	S28	–	S>30	–	S27
Левифлоксацин LE5	S 20	–	S 26	I 16	–	S22	–	S >30	–	S 22
Ингибиторы синтеза белка										
МАКРОЛИДЫ										
Азитромицин AZM15	S 28	S 31	S 26	S 22	S >25	S 25	S 22	S 32	S 27	S >28
Эритромицин E15	S 34	S >33	S >26	S 27	S 30	S 31	S >33	S 36	S 33	S >26
Эритромицин E10	S30	S>35	S34	S26	S>31	S>26	S>38	S33	S30	S>26

ЛИНКОЗАМИДЫ										
Клиндамицин CD2	S >31	S >33	I 18	S >24	S 22	S <26	S 21	S 25	S 27	S >26
Линкомицин L2	S>30	R10	R11	S>36	R<10	R12	S17	S30	S30	S>26
Ингибиторы синтеза клеточной стенки										
ГЛИКОПЕПТИДЫ										
Тейкопланин TEI30	S22	S16	S17	S18	I>13	R10	S>22	S22	S24	R>10
Ванкомицин VA30	R10	R<10	R<10	R<10	R<10	R<10	R<10	R<10	R<10	R<10
Ингибиторы синтеза белка										
ТЕТРАЦИКЛИНЫ										
Доксициклина гидрохлорид DO30	–	S25	–	–	S 23	–	S >31	–	S 35	–
АМИНОГЛИКОЗИДЫ										
Гентамицин GEN10	S 20	I 13	S 34	S 18	R<10	S 28	S 19	S 16	S 26	S 24
Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот										
ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ										
Нитрофурантоин NIT 300	S19	–	R<10	I15	–	R<10	–	R<10	–	R<10
Котримоксазол COT25	R <10	–	R <10	R <10	–	R <10	–	R <10	–	–

R – устойчивый; S – чувствительный; I – промежуточная чувствительность

В нашем исследовании использовались разные группы антибиотиков: ингибиторы клеточной стенки (пенициллин, диклоксациллин и ампициллин); ингибиторы синтеза белка (тетрациклин, гентамицин, эритромицин, цефалотин, цефотаксим, цефтазидим, цефуроксим) и ингибиторы синтеза ДНК и РНК (пемфлоксацин и триметоприм).

Резистентность к ванкомицину является природной и характерна для всех штаммов педиококков. Аналогичные результаты получены в работе [40] при исследовании лактобактерий, выделенных из кисломолочных продуктов, а также из ЖКТ человека. К пенициллиновым антибиотикам (цефазолину, бензилпенициллину) все штаммы были чувствительные. Ряд штаммов был устойчив к азтреонаму, к клоксациллину устойчивость зависела от концентрации антибиотика, при концентрации антибиотика 5 мкг в диске большинство штаммов было устойчивыми, при повышении концентрации до 30 мкг в диске штаммы становились чувствительными к нему. Большинство штаммов были чувствительны к хинолиновым антибиотикам, таким как левофлоксацин LE5, норфлоксацин NX10, спарфлоксацин SPX5, гатифлоксацин GAT5. Но они продемонстрировали устойчивость к антибиотик ципрофлоксацину CIP5, о чем также сообщили Duche [51] и Obioha [112] в своих исследованиях. В отличие от изученных нами штаммов,

в отчете об этом исследовании большинство их штаммов оказались устойчивыми к хинолиновым антибиотикам. Чувствительность к хинолоновым антибиотикам наблюдалась только в том случае, если изолят был получен из ферментированного пищевого источника, в то время как большинство изолятов-представителей микрофлоры ЖКТ человека были устойчивы к этому антибиотику [46]. Все штаммы были чувствительны к макролидам (азитромицин, эритромицин). Отчет об исследовании подтверждается результатами нашей работы. Устойчивость к клиндамицину наблюдалась у всех штаммов, и результат соответствует исследованию Gad с соавторами [55].

Хотя согласно ряду исследований [66] большинство видов молочнокислых бактерий были устойчивы к гликопептидным антибиотикам, значительное количество штаммов чувствительны к тейкопланину. Чувствительность к гентамицину наблюдалась у всех штаммов, кроме штамма 5. Штаммы проявили устойчивость к нитрофурантоину и котримоксазолу, что согласуется с результатами исследований Sharma и его коллег [143].

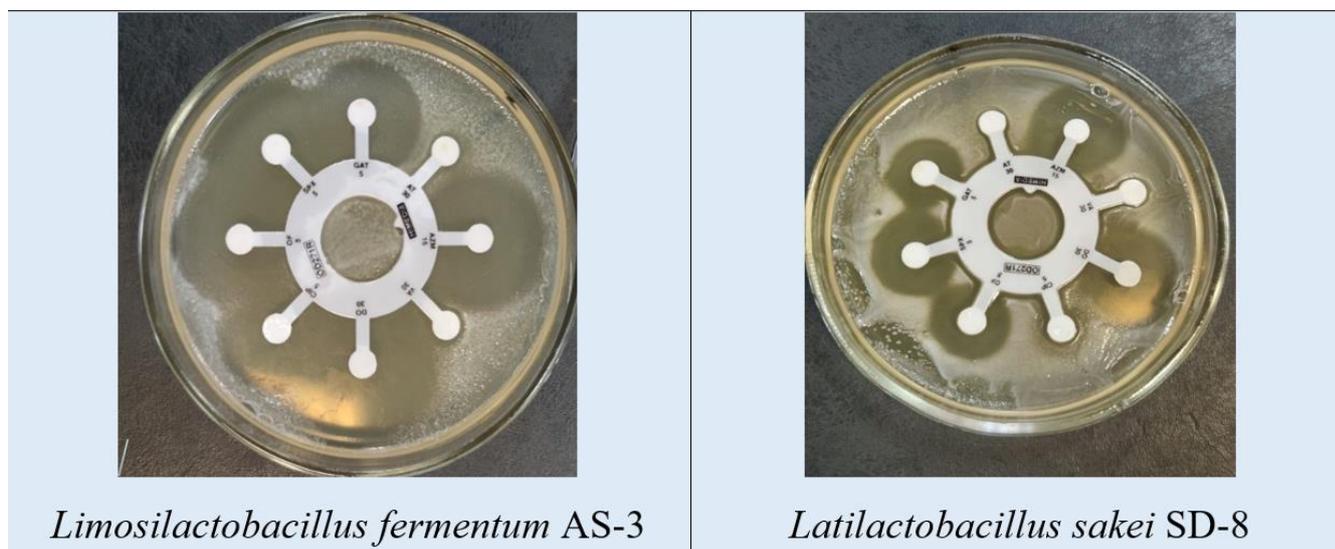


Рисунок 3.9 – Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, определенная с помощью октодисков, на примере штамма *Limosilactobacillus fermentum* AS-3, *Latilactobacillus sakei* SD-8

3.3.9 Определение активности ферментации рафинозы микроорганизмами

Как уже сказано выше, нут имеет в своем составе различные антипитательные соединения, в том числе сапонины, фитиновую кислоту, рафинозу и конденсированный танин [163].

В нашей работе были идентифицированы бактериальные штаммы, способные ферментировать рафинозу. Штаммы *Leuconostoc mesenteroides* CH-5 и *Lactilactobacillus sakei* SD-8 имели самую высокую активность при ферментации рафинозы, следующим был штамм *Levilactobacillus brevis* VY-1. Штаммы *Leuconostoc mesenteroides* FM-4, *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 и *Pediococcus pentosaceus* FC-9 не проявили активности. Остальные штаммы показали очень низкую активность (рис. 3.10).

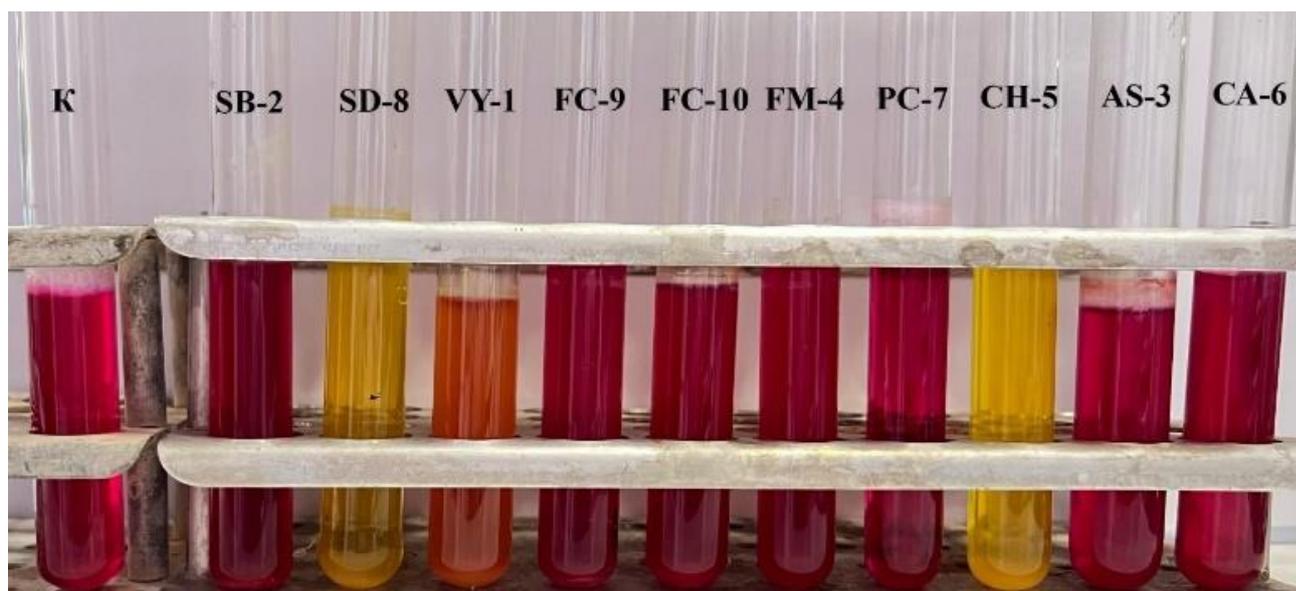


Рисунок 3.10 – Способность штаммов к утилизации рафинозы

3.3.10 Определение активности фитазы

Исследование фитазной активности чашечным тестом показало наличие зон просветления у контрольных образцов, однако зон просветления не было обнаружено у тестируемых штаммов (рис. 3.11). Из этого следует, что фитазная активность у исследуемых штаммов отсутствует.

Контрольные штаммы	
<i>Candida tropicalis</i> RCAM 00331	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-100
	
Тестируемые штаммы	
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2	<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8
	
<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9
	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4
	
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5

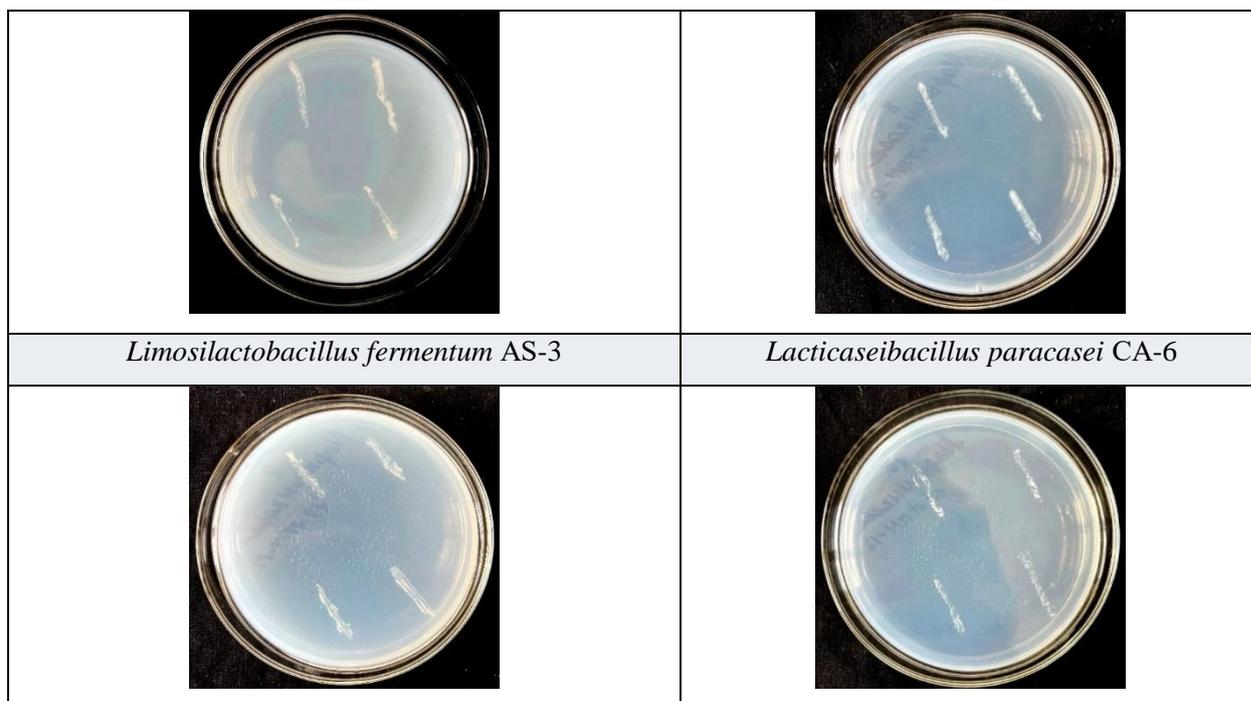


Рисунок 3.11 – Чашечный тест на фитазную активность штаммов бактерий

При определении фитазной активности количественным методом количество ионов фосфата в контрольном образце было больше или равно, чем в опытном образце, из чего сделан вывод, что фитазная активность у молочнокислых микроорганизмов отсутствует (табл. 3.9).

Таблица 3.9 – Фитазная активность штаммов

Номер образца											
Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	К
Исследование без разведения опытных проб											
Значение OD	0,985	1,043	1,046	0,977	0,973	1,101	0,952	0,975	1,042	1,033	1,078
Концентрация PO ₄ , мкМ	0,159	0,171	0,171	0,158	0,158	0,181	0,154	0,158	0,170	0,169	0,177
Фитазная активность, ед/см ³	0,639	0,683	0,685	0,633	0,631	0,725	0,615	0,632	0,682	0,674	0,708
Исследование с разведением опытных проб в два раза											
Значение OD	0,537	0,575	0,579	0,505	0,519	0,576	0,487	0,547	0,544	0,551	0,586

Концентрация PO ₄ , мкМ	0,076	0,084	0,084	0,070	0,073	0,084	0,067	0,078	0,078	0,079	0,085
Концентрация PO ₄ , мкМ с учетом разведения	0,153	0,167	0,169	0,141	0,146	0,168	0,135	0,157	0,156	0,158	0,171
Фитазная активность, ед/см ³	0,511	0,558	0,563	0,470	0,487	0,559	0,449	0,523	0,519	0,528	0,571

Фитазной активности у исследуемых штаммов не обнаружено. Относительно фитатов как антипитательных факторов мнение неоднозначно. Фитаты были отнесены к антипитательным факторам еще в 1920-х гг., поскольку фитиновая кислота образует нерастворимые комплексы с важными двухвалентными катионами (например, Fe, Zn, Ca и Mg), делая их биологически недоступными для всасывания и утилизации в тонком кишечнике. Более поздние исследования показали, что фитаты не оказывают негативного влияния на биодоступность металлов при соблюдении сбалансированной диеты. Более того, некоторые исследования доказывают пользу комплексообразования с фитиновой кислотой, поскольку сами по себе ионы металлов при определенных обстоятельствах вредны и при неблагоприятных условиях могут привести к ряду серьезных заболеваний. Фитаты также обладают антиоксидантной активностью и противоопухолевым эффектом, а также оказывают терапевтическое воздействие при болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и других заболеваниях [163]. Таким образом, в свете данных исследований нельзя однозначно считать фитаты антипитательными факторами и нежелательными компонентами в растительной пище.

Заключение по главе 3

В результате исследований, проведенных с помощью фенотипических методов и MALDI-TOF MS, были идентифицированы десять штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников, а их

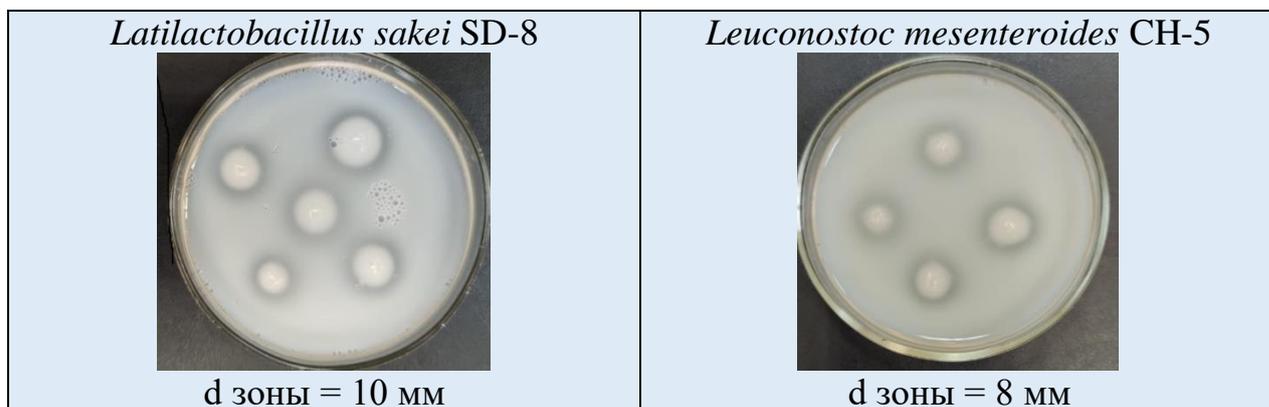
технологические и пробиотические характеристики были изучены с помощью физиологических и биохимических методов. Среди этих микроорганизмов 4 штамма *Limosilactobacillus fermentum* SB-2, *Lactilactobacillus sakei* SD-8, *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 и *Leuconostoc mesenteroides* CH-5 обладали хорошими технологическими и пробиотическими свойствами, а остальные штаммы бактерий проявляли слабые пробиотические свойства и имели низкую выживаемость в пищеварительной системе человека. В результате указанные выше штаммы оказались весьма перспективными для продолжения исследований и использования их для производства напитков с экстрактом нута, содержащих биологически активные пептиды.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ГЕНОВ ПРОТЕАЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Жизнеспособность МКБ прямо зависит от эффективности их протеолитической системы. В состав клеточной стенки входят протеиназы, выполняющие важную роль в гидролизе олигопептидов в той питательной среде, в которой растут МКБ. Продукты гидролиза транспортируются в бактериальную клетку с помощью специфической транспортной системы и разрушаются до свободных аминокислот под действием ряда пептидаз [138].

4.1 Результаты культивирования микроорганизмов на агаре с обезжиренным молоком

Визуальный осмотр чашек Петри с молочным агаром показал, что штаммы *Latilactobacillus sakei* SD-8, *Leuconostoc mesenteroides* FM-4 и *Leuconostoc mesenteroides* CH-5 образовали на чашках Петри более крупные зоны просветления, что свидетельствует о большей протеолитической активности, а штаммы *Pediococcus pentosaceus* FC-9, *Pediococcus pentosaceus* FC-10 и *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 показали меньшую активность. Среди исследованных штаммы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2, *Levilactobacillus brevis* VY-1, *Limosilactobacillus fermentum* AC-3 и *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 не проявили активности (рис. 4.1).



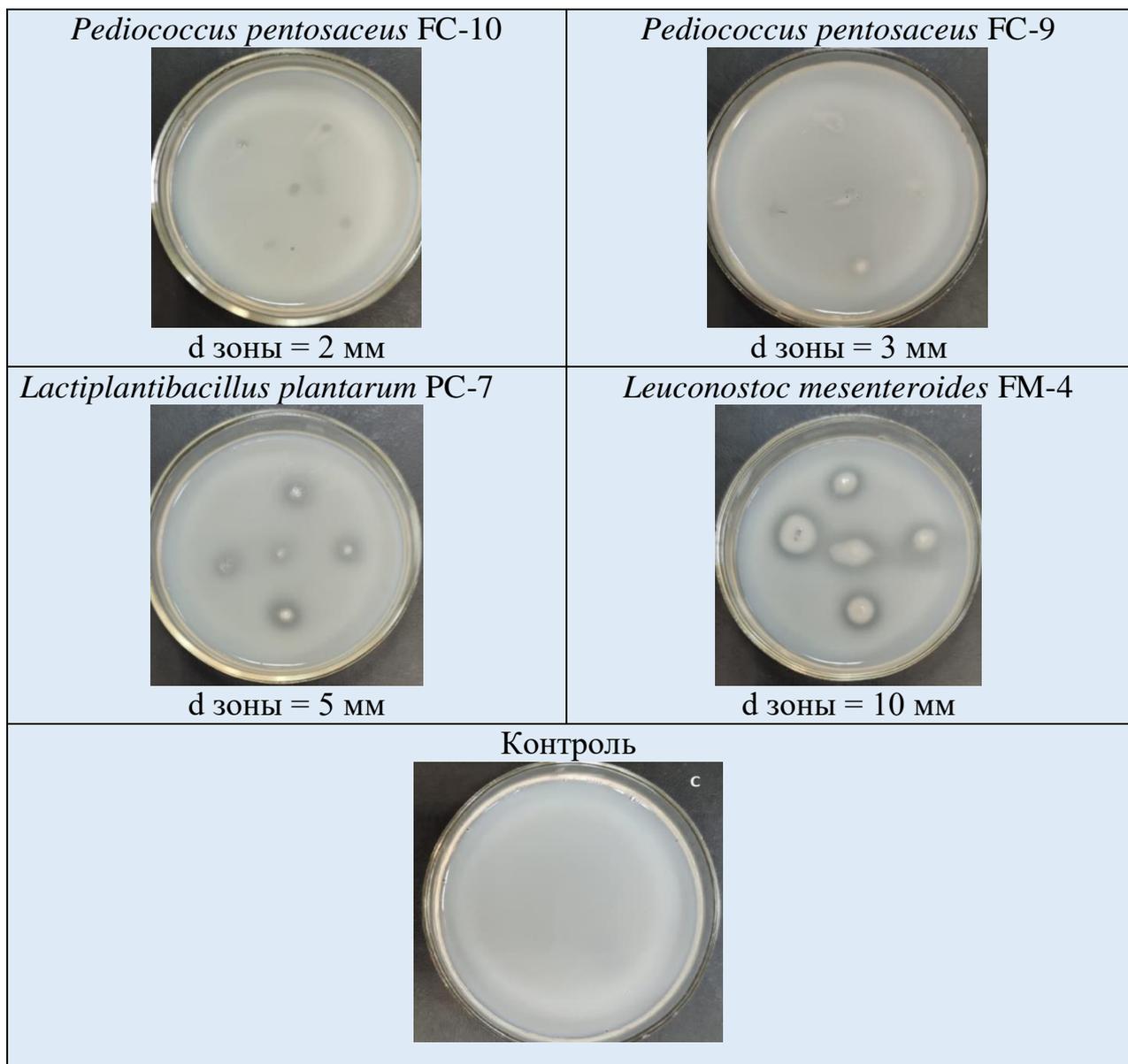


Рисунок 4.1 – Зоны просветления на молочном агаре вокруг колоний молочнокислых микроорганизмов

4.2 Определение протеолитической активности методом TNBS

Результаты измерения протеолитической активности (эквиваленты L-лейцина, мМ) образцов ферментированного нутового экстракта представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – рН и протеолитическая активность в исследуемых образцах

№ п/п	Образец	Время, ч	рН	Эквиваленты L-лейцина, мМ	Δ эквивалентов L-лейцина, мМ*
1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2	0	6,14	10,56	0
		72	4,13	27,91	17,35
2	<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8	0	6,19	9,59	0
		72	3,47	25,72	16,13
3	<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1	0	6,15	10,64	0
		72	3,7	25,38	14,74
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9	0	6,13	13,34	0
		72	3,63	25,92	12,58
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10	0	6,2	12,68	0
		72	3,85	26,88	14,2
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4	0	6,14	12,31	0
		72	3,87	22,84	10,53
7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7	0	6,2	12,51	0
		72	3,47	15,89	3,38
8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CH-5	0	6,13	11,53	0
		72	3,48	19,57	8,04
9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3	0	6,1	10,99	0
		72	3,23	14,74	3,75
10	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CA-6	0	6,12	11,11	0
		72	3,3	14,83	3,72
11	Контроль	0	6,2	12,15	0
		72	5,31– 5,34	41,78	29,63

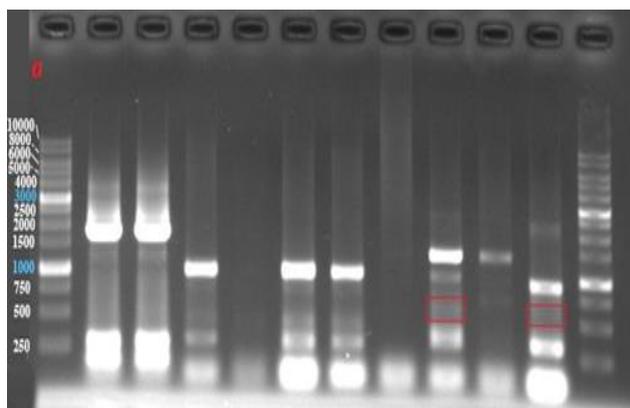
*Δ эквивалентов L-лейцина – разница в количестве L-лейцина в 0 и 72 ч

Метод TNBS позволил определить протеолитическую активность изучаемых микроорганизмов и выбрать из них наиболее активные. Как видно из таблицы 4.1, наименьшее количество накопления азота характерно для штаммов *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 (3,38), *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6 (3,72) и *Limosilactobacillus fermentum* AC-3 (3,72), *Limosilactobacillus fermentum* AS-3 (3,75).

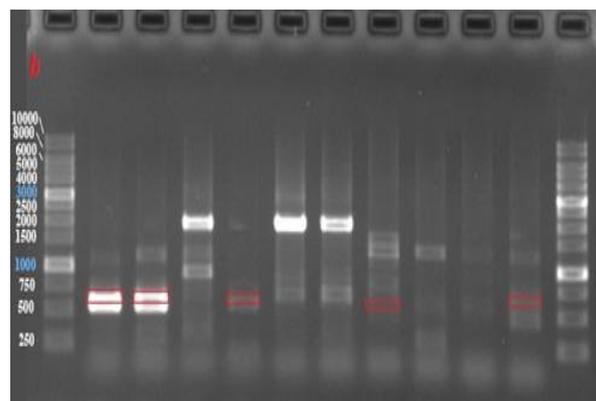
Более высокий показатель у штамма *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (17,35). Наибольшее накопление L-лейцина показали штаммы *Lactilactobacillus sakei* SD-8 (16,13), *Levilactobacillus brevis* VY-1 (14,74) и *Pediococcus pentosaceus* FC-10 (14,2).

4.3 Определение генов протеаз методом ПЦР

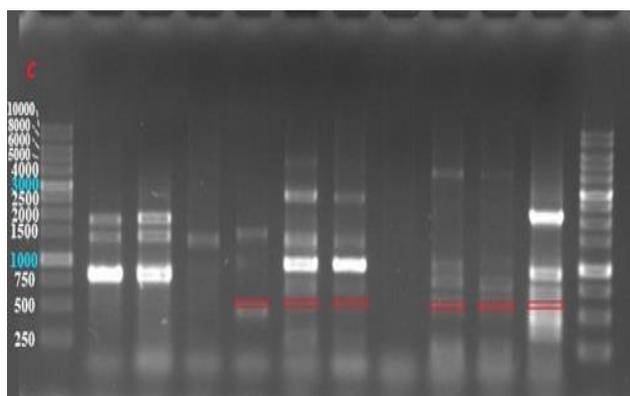
По результатам ПЦР выявлено, что в геноме всех изученных штаммов присутствуют гены протеаз: межгенной области prtP, каталитического домена prtM и протеаз клеточной стенки prtB, prtH и prtR, что подтверждает их протеолитическую активность, а ген prtB играет важную роль в гидролизе белков нута и казеина (рис. 4.2, табл. 4.2).



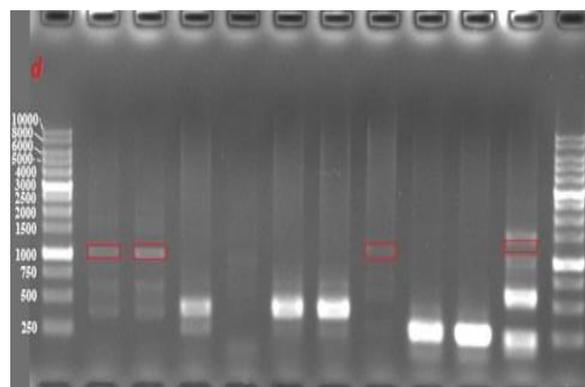
a



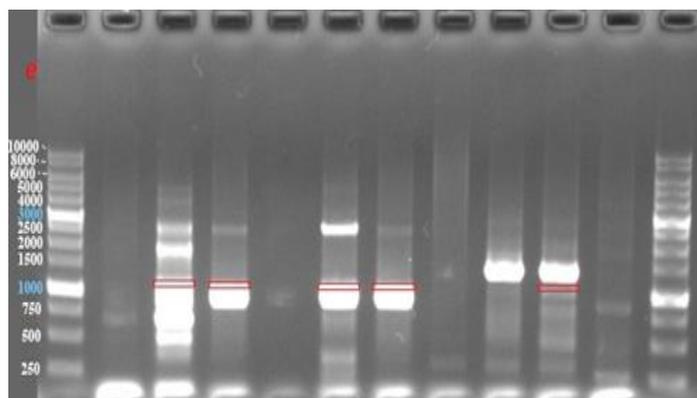
b



c



d



e

Рисунок 4.2 – 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

Таблица 4.2 – Наличие генов протеиназ клеточной стенки у МКБ, обнаруженных методом ПЦР

Гены	<i>L. paracasei</i> CA-6	<i>L. fermentum</i> AS-3	<i>Leuc.</i> <i>mesenteroides</i> CH-5	<i>L. plantarum</i> PC-7	<i>Leuc.</i> <i>mesenteroides</i> FM-4	<i>P. pentosaceus</i> FC-10	<i>P. pentosaceus</i> FC-9	<i>L. fermentum</i> SB-2	<i>L. sakei</i> SD-8	<i>L. brevis</i> VY-1
prtP/prtM (685 bp)								+		+
prtP (560 bp)	+	+		+			+			+
prtB (597 bp)				+	+	+		+	+	+
prtH (1034 bp)	+	+					+			+
prtR (1052 bp)		+	+		+	+			+	

Штаммы *Leuconostoc mesenteroides* FM-4 (гены prtB, prtR), *Latilactobacillus sakei* SD-8 (prtB, prtR), *Leuconostoc mesenteroides* CH-5 (prtB), *Pediococcus pentosaceus* FC-9 (prtB, prtH), *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 (prtB, prtP) обладали наибольшей протеолитической активностью в отношении казеина; штаммы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (prtP/prtM, prtB), *Latilactobacillus sakei* SD-8 (prtB, prtR), *Levilactobacillus brevis* VY-1 (prtP/prtM, prtP, prtB, prtH), *Pediococcus pentosaceus* FC-9 (prtP, prtH), *Pediococcus pentosaceus* FC-10 (prtB,

prtR), *Leuconostoc mesenteroides* FM-4 (prtB, prtR) – в отношении белков нута; штаммы *Pediococcus pentosaceus* FC-10 (prtB, prtP), *Lactobacillus sakei* SD-8 (prtB, prtR), *Pediococcus pentosaceus* FC-9 (prtP, prtH), *Leuconostoc mesenteroides* FM-4 (prtB, prtR) проявили способность расщеплять и казеин, и белки нута. Наличие генов протеиназ у всех штаммов коррелирует с их протеолитической активностью, а ген prtB кодирует протеазу, которая играет важную роль в гидролизе белка нута и казеина. Протеолитическая активность молочнокислых микроорганизмов субстратспецифична, поэтому выбор протеолитических микроорганизмов должен осуществляться с учетом субстрата, который планируется ферментировать.

Заключение по главе 4

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. Было установлено, что протеолитическая активность микроорганизмов субстратспецифична: есть микроорганизмы, которые гидролизуют белки молока, есть микроорганизмы, которые гидролизуют белки нута, а есть те, которые гидролизуют и белки молока, и белки нута. Поэтому выбор протеолитических микроорганизмов должен осуществляться с учетом субстрата, который потом планируется ферментировать.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ФЕРМЕНТАЦИИ ЭКСТРАКТА НУТА

5.1 Технология получения экстракта нута

Так называемое растительное молоко, или молочный напиток, – древний, традиционный и привычный диетический пищевой продукт в странах Востока, Азии, в том числе в Иране, приготавливаемый из вымоченных зерен (семян), культивируемых человеком и используемых в пищу растений, перетертых в ступке или разрушенных (взбитых) в блендере с большим количеством воды, с дальнейшим отделением полученной для питья молочноподобной жидкости от пульпы, толокна и жмыха процеживанием.

Для производства растительных напитков утвержден новый национальный стандарт ГОСТ Р 70650-2023 [19]. На рис. 5.1 представлена схема получения нутового экстракта.

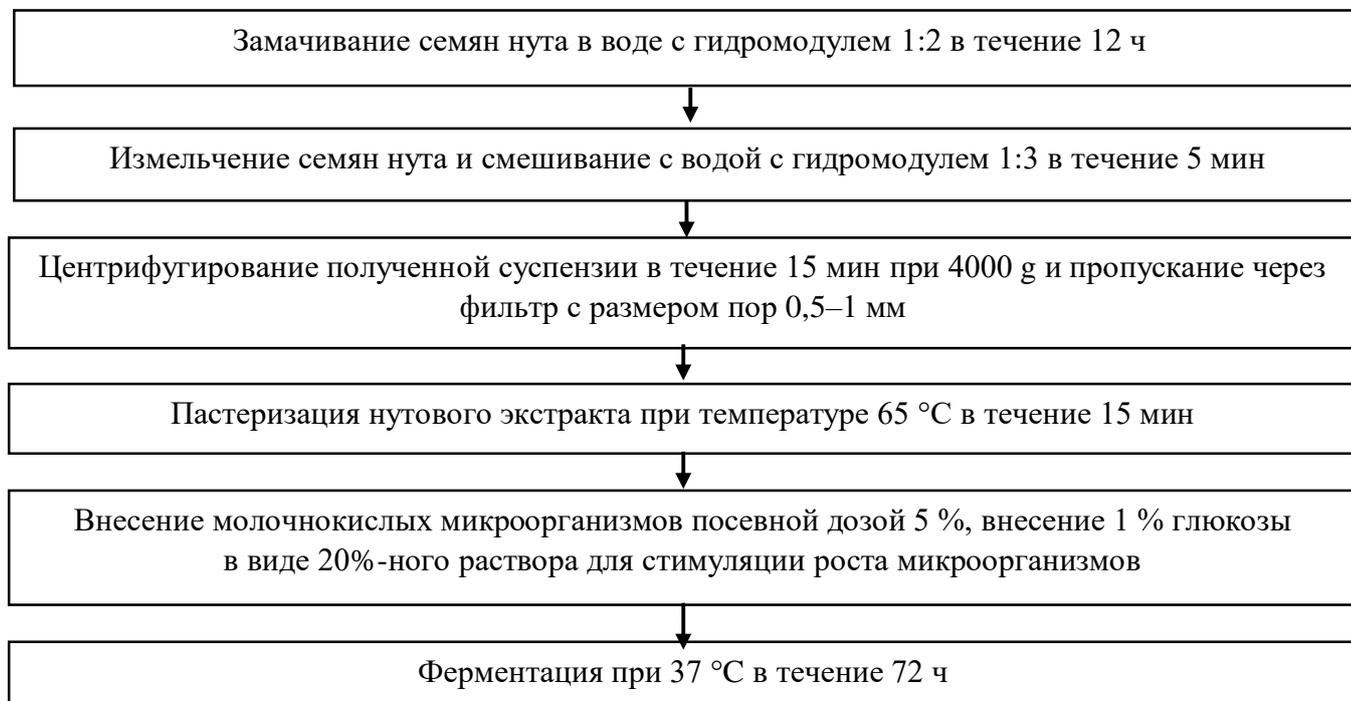


Рисунок 5.1 – Схема получения экстракта нута

5.2 Органолептическая оценка ферментированного экстракта нута

Экстракт нута, ферментированный разными штаммами, имели разный аромат. Штаммы 1–4 и 7 образовывали мягкий и приятный запах, а штаммы 5, 6, 9 и 10 – резкий и специфический. Эта характеристика учитывалась далее при создании бактериальных композиций для выработки напитка с экстрактом нута (табл. 5.1).

Таблица 5.1 – Ароматическая 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, резкий

5.3 Определение белкового профиля ферментированного экстракта нута

Влияние микроорганизмов на белковый профиль ферментированного экстракта нута исследовали с помощью одномерного гель-электрофореза (рис. 5.2). 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 [39], а линии фракции легумина показали сильную полосу в диапазоне 60–65 кДа (фрагм. 2). Для всех штаммов была видна очень сильная полоса 23 кДа. По сообщению Di

Francesco A. с соавт. [49] эта полоса принадлежит вицилину. Изменения произошли в полосе, соответствующей в нутовой липоксигеназе, она стала менее четкой. По результатам электрофореза экстрактов, ферментированных каждым из десяти штаммов, установлено, что молекулярная масса пептидов, полученных после ферментации, в основном ниже 20 кДа.

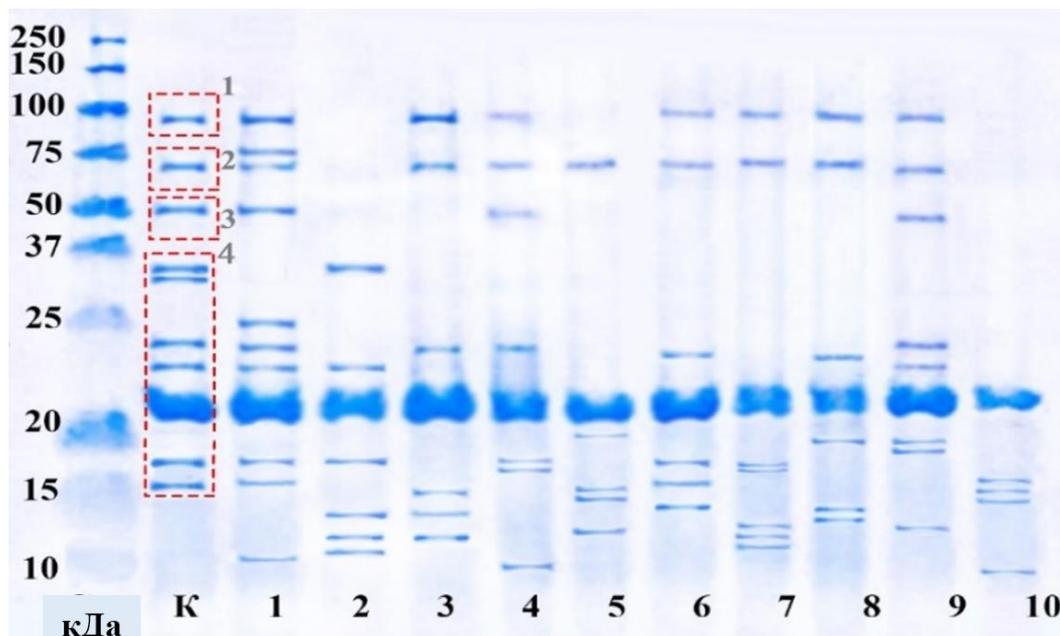


Рисунок 5.2 – Электрофореграмма белкового профиля экстракта нута, ферментированного микроорганизмами

Ст., кДа – стандартный маркер Page Ruler; K – 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

5.4 Идентификация пептидов с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии

По результатам протеомного исследования образцов белков нута после протеолиза штаммами 1–10 были идентифицированы пептиды с потенциальной биологической активностью с помощью комплекса протеомных методов исследования. На первом этапе белковые фракции идентифицировали через 24 ч ферментации каждым штаммом экстракта нута с помощью двумерного

электрофореза (ДЭ) (рис. 5.4). Белковые фракции находились в диапазоне масс 10–80 кДа и рI 4,8–10,0. В экстракте нута без добавления молочнокислых бактерий было идентифицировано 15 белковых фракций (рис. 5.3).

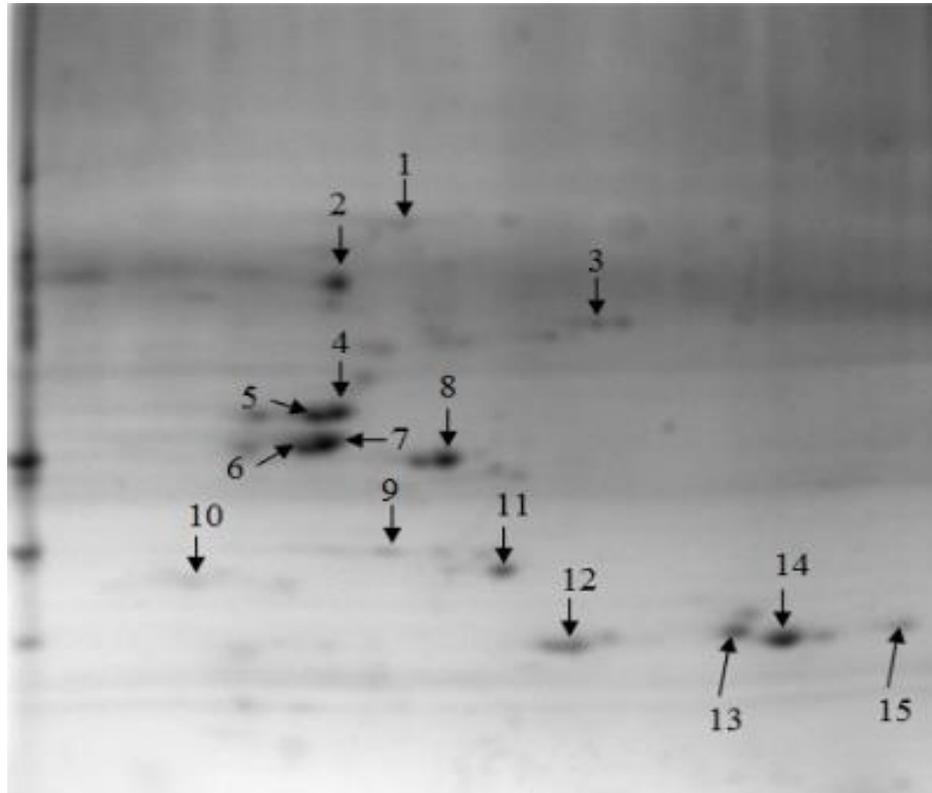


Рисунок 5.3 – Двумерная электрофореграмма белков экстракта нута (контроль). Окраска Кумасси R-250. Стрелки с цифрами указывают идентифицированные фракции в соответствии с табл. 5.2.

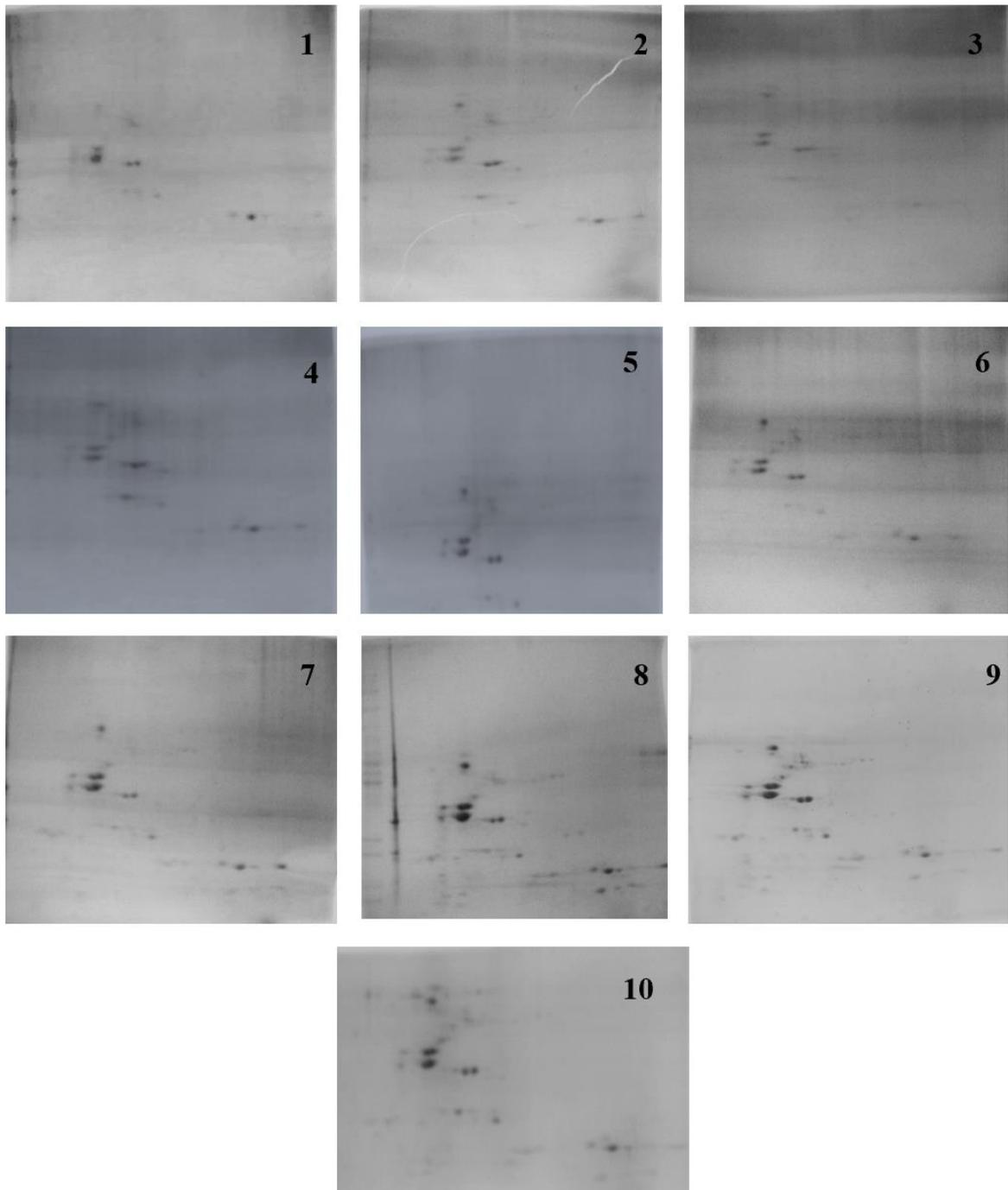


Рисунок 5.4 – ДЭ белков экстракта нута

1 – *Limosilactobacillus fermentum* SB-2; 2 – *Latilactobacillus sakei* SD-8;
 3 – *Levilactobacillus brevis* VY-1; 4 – *Pediococcus pentosaceus* FC-9; 5 – *Pediococcus pentosaceus* FC-10; 6 – *Leuconostoc mesenteroides* FM-4; 7 – *Lactiplantibacillus planatum* PC-7; 8 – *Leuconostoc mesenteroides* CH-5; 9 – *Limosilactobacillus fermentum* AS-3; 10 – *Lacticaseibacillus paracasei* CA-6.
 Окрашивание кумасси G-250

На рисунке 5.4 показаны белки экстракта нута, которые являются идентифицированными по результатам анализа фракций, приведенных в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Результаты масс-спектрометрической идентификации белковых фракций экстракта нута (контроль)

№	Наименование белка (символ гена)	Номера в Protein NCBI	S / M/ C *	Мм/pI (эксп.)	Мм/pI (расчет.)
1 5991	Seed biotin-containing protein SBP65 (<i>LOC101504303</i>)	XP_004487170.1	290/29/59	71,0/5,40	71,3/5,97
2 5992	Смесь фрагмента без N- конца vicilin-like и seed storage protein At2g18540 (<i>LOC101506263</i>)	XP_004503582.1	321/48/42	70,0/4,90	82,5/5,78
3 5993	Фрагмент без N-конца provicilin-like (<i>LOC101510367</i>)+ гексозы	XP_004496703.1	91/32/56	43,0/9,10	64,6/6,61
4 5994	Фрагмент N-конца legumin A-like (<i>LOC101489278</i>)	XP_004493780.1	276/25/48	36,0/5,20	59,8/5,87
5 5995	Фрагмент без C-конца legumin A-like (<i>LOC101489278</i>) (1)	XP_004493780.1	249/25/42	36,0/5,00	59,8/5,87
6 5996	Фрагмент без C-конца legumin-like (<i>leg</i>) (1)	XP_027188788.1	211/21/32	28,0/5,00	56,7/5,97
7 5997	Фрагмент без C-конца legumin-like (<i>leg</i>) (1)	XP_027188788.1	173/20/33	29,0/5,10	56,7/5,97
8 5998	Фрагмент vicilin-like (<i>LOC101515515</i>) (1)	XP_004493035.1	393/39/71	28,0/7,80	51,9/5,73
9 5999	albumin-2-like (<i>LOC101512722</i>)+ Acetyl (Protein N-term)	NP_001351664.1	487/32/96	25,0/5,10	26,1/5,67
10 6000	Фрагмент legumin J-like (<i>LOC101501269</i>) (1)	XP_004495100.1	144/25/52	23,5/4,90	60,3/5,50
11 6001	Фрагмент N – конца vicilin-like (<i>LOC101505411</i>) (1)	XP_004492829.1	110/21/34	24,0/7,70	51,1/6,10
12 6002	Смесь фрагмента N- конца vicilin-like (<i>LOC101515515</i>) и P24 oleosin (<i>LOC101509783</i>)	XP_004493035.1 XP_004489219.1	106/9/30 78/6/43	20,0/8,00	51,9/5,73 20,7/7,85
13 6003	Фрагмент C-конца legumin A-like (<i>LOC101489278</i>)) (1)	XP_004493780.1	120/13/24	20,0/ 9,20	59,3/5,87

14 6004	Фрагмент С-конца legumin-like (<i>LEG</i>) (1)	XP_027188788.1	360/23/32	20,0/9,40	56,2/5,97
15 6005	Фрагмент С-конца legumin J-like (<i>LOC101501269</i>)	XP_004495100.1	152/16/24	20,0/10,0	60,3/5,50

Примечание. S/M/C – показатели идентификации: score – показатель соответствия; matched peptides – число совпавших пептидов; coverage – процент покрытия полной аминокислотной последовательности (а.п.) белка выявленными пептидами.

*Мм/pI (эксп.) – полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ (двумерная электрофореграмма); Мм/pI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные на основании данных об аминокислотной последовательности с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других посттрансляционных модификаций в программе ExPASy Compute pI/Mw tool; * – указание на подтверждающую идентификацию с помощью тандемной масс-спектрометрии (в скобках указано число секвенированных триптических пептидов). В первом столбце указан порядковый номер, обозначающий положение фракции на рис. 5.4.*

Эффективность действия штаммов на белки экстракта нута различалась (табл. 5.3, рис. 5.5). Результаты компьютерной денситометрии обзорных ДЭ позволили оценить эффект действия разных штаммов на количество суммарного белка по сравнению с контролем. Следует отметить, что за счет протеаз нута и в контроле шла деградация белков (до 50 %) на короткие пептиды и аминокислоты. Контроль – экстракт нута без ферментации микроорганизмами.

Таблица 5.3 – Суммарная интенсивность количества белков на ДЭ по срокам ферментации

Суммарная интенсивность количества белка в экстракте нута, в %, через		
0 ч	24 ч	36 ч
Контроль		
100	75,5	50,0
Штамм 1		
100	64,5	45,3
Штамм 2		
100	85,0	37,0
Штамм 3		
100	91,0	74,1
Штамм 4		
100	62,4	32,0

Штамм 5		
100	74,0	46,0
Штамм 6		
100	84,0	74,2
Штамм 7		
100	92,5	87,5
Штамм 8		
100	80,5	49,7
Штамм 9		
100	63,0	59,1
Штамм 10		
100	54,5	42,3
Штаммы 1/2		
100	50,5	40,5

Также отмечается и определенное конкурентное торможение протеолиза у некоторых штаммов, в частности, у штаммов 3, 6, 7 и 9, где он идет медленнее, чем в контроле, очевидно, за счет выработки ингибиторов протеаз и, возможно, изменения рН экстракта нута.

На рисунке 5.5 приведены результаты фракционирования белков на ДЭ в контроле с минимальным и максимальным эффектом действия промышленных микроорганизмов. Промежуточные фрагменты в экстракте нута практически не детектировались. Процесс утилизации в этом случае идет медленнее, более мягко и не всегда линейно.

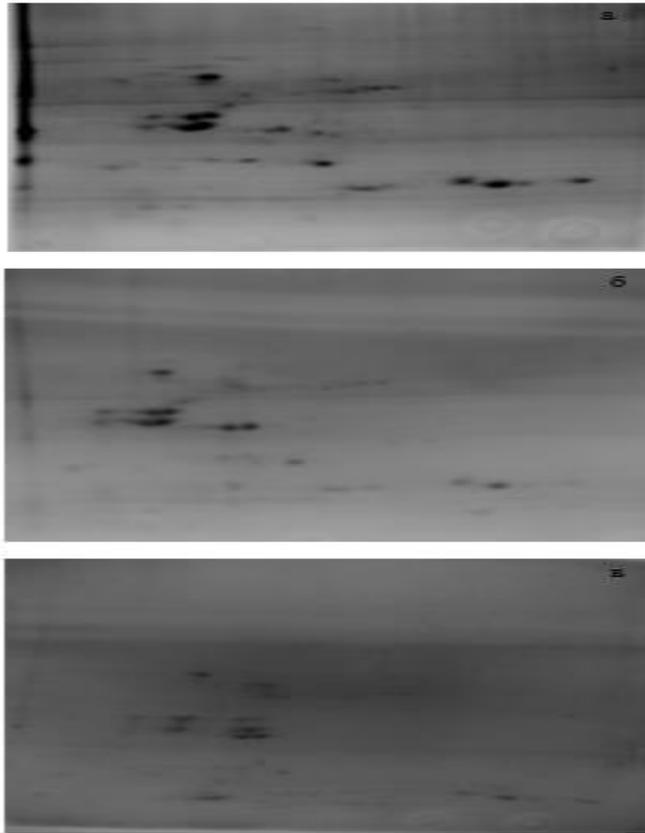


Рисунок 5.5 – ДЭ белки экстракта нута с максимальным разбросом в значениях суммарного белка: а – контроль (100 %); б – штамм 3 (74,1 %); в – штамм 4 (32 %) через 36 ч инкубирования

На рисунке 5.6 представлены масс-спектры коротких пептидов, полученных в результате воздействия штамма 1 на белки экстракта нута по сравнению с контролем. В контроле в 0 ч инкубации количество коротких пептидов очень мало.

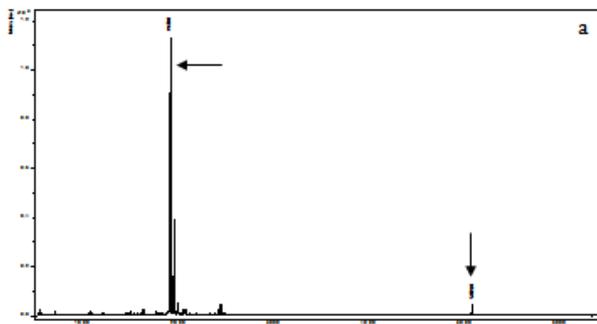


Рисунок 5.6 – Масс-спектры коротких пептидов экстракта нута в контроле: а – 0 ч

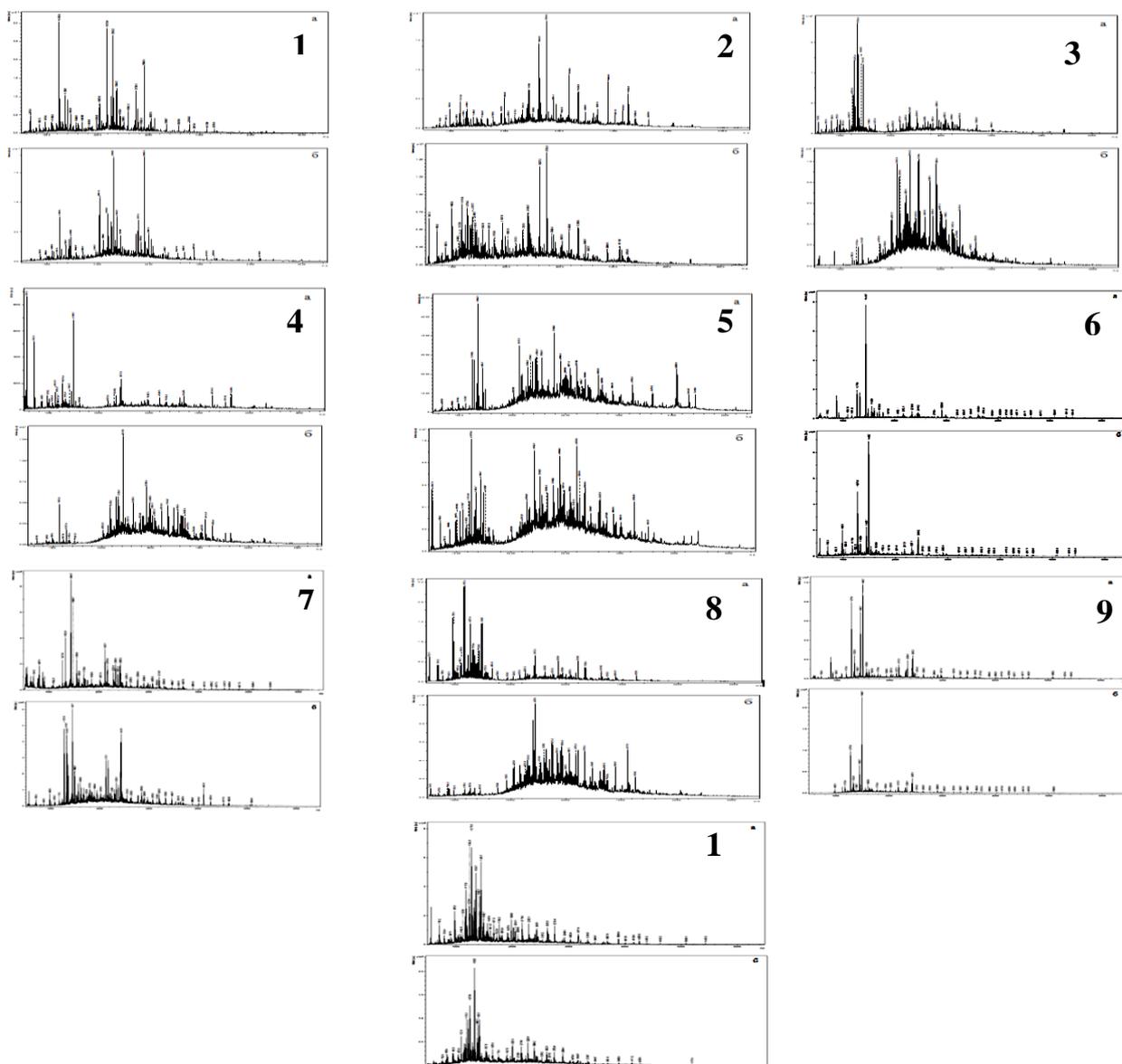


Рисунок 5.7 – Масс-спектры коротких пептидов экстракта нута после действия штамма: 1 – *L. fermentum*; 2 – *L. sakei*; 3 – *L. brevis*; 4 – *P. pentosaceus*; 5 – *P. pentosaceus*; 6 – *Leuc. mesenteroides*; 7 – *L. plantarum*; 8 – *Leuc. mesenteroides*; 9 – *L. fermentum*; 10 – *L. paracasei*: а – 24 ч; б – 36 ч

Результаты тандемной масс-спектрометрии коротких пептидов, образующихся при использовании молочнокислых бактерий для протеолиза белков экстракта нута, показали идентификацию 30 пептидов (табл. 5.4). Производительность использованных штаммов в генерировании коротких пептидов по времени инкубации явно различалась. Через 24 ч образовывалось много пептидов штаммами 1, 5 и 10, к 36 ч штаммами – 2–4 и 8. Штаммы 6, 7, 9

были менее активны. Они накапливали меньшее количество пептидов и сигнал (количество) формировался с меньшей интенсивностью. Очевидно, их использование является менее эффективным. Наблюдался и сдвиг масс генерируемых пептидов. На 24 ч большее разнообразие и интенсивность сигнала отмечались для более коротких пептидов у штаммов 1, 3 и 8, а у штамма 2 на 36 ч. Пики масс средних значений на 36 ч выросли у штаммов 3,4 и 8.

Биоинформационный анализ пептидов – идентификация и прогнозирование биологической активности пептидов проводился с помощью баз данных NCBI, BIOPEP, AntiCP, AntiBP, AHTpin, ToxinPred, AntiFP, AntiTb.

Таблица 5.4 – Определение потенциальной биологической активности пептидов нута

№ пептида	Белок источник	№ позиций в а.п.	Последовательность подтвержденная MS/MS	m/z	Активность
1	2	3	4	5	6
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2, 24 ч					
1	NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic-like XP_004494625.2	33–53	ASGEQKFPPQKQETQPGKEHA	2364,2	ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin
2	dehydrin DHN3 XP_004512937.1	22–47	IVQVDQYGNPINQSGVGMTGEAGR TF	2738,3	ACE inhibitor, AntiCP
3	late embryogenesis abundant protein D-34-like XP_004496718.1	1–23	MNQEQPRRHQADQDPIKYGDVLP	2777,4	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AntiFP
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SB-2, 36 ч					
4	vicilin-like XP_004493035.1	144–156	LAIPVNRPGQFQS	1426,8	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8, 24 ч					
5	2S albumin-like XP_004487601.1	30–51	EIPESCHKQLKSLNLKHCEKFL	2622,3	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin
6		30–52	EIPESCHKQLKSLNLKHCEKFLM	2753,4	Antioxidative, AntiBP, ACE inhibitor, AntiCP
7		24–55	SKDEKEEIPESCHKQLKSLNLKHCEKFLMKRM	3884,9	Antioxidative, ACE inhibitor,

					AntiCP, AntiFP
<i>Latilactobacillus sakei</i> SD-8, 36 ч					
8	2S albumin-like XP_004487601.1	24–51	SKDEKEEIPESCHKQLKSLNLKHCE KFL	3338,6	Antioxidativ e, ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin, AntiFP
<i>Levilactobacillus brevis</i> VY-1, 24 ч					
9	vicilin-like XP_004493035.1	377–388	GFGINAQNNQRN	1332,6	ACE inhibitor
10		376–388	LGFGINAQNNQRN	1445,7	Antioxidativ e, ACE inhibitor, AntiCP
11	2S albumin-like XP_004487601.1	131–143	LRCGITPPLGCDL	1355,7	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9, 24 ч					
12	2S albumin-like XP_004487601.1	131–147	LRCGITPPLGCDLSFDN	1490,7	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-9, 36 ч					
13	vicilin-like XP_004493035.1	420–428	LLKNQRQSH	1123,6	Antioxidativ e, AntiCP, AntiBP, AntiFP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10, 24 ч					
14	vicilin-like XP_004493035.1	400–419	IQRPVKEVAFPGSAEEVDNR	2127,1	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FC-10, 36 ч					
15	vicilin-like XP_004492829.1	328–346	KKEDEEEEEEDRNVQVQRFQ	2435,2	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP, AHTpin
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4, 24 ч					
16	vicilin-like XP_004492829.1	395–420	VISQIQRPVKEVAFPGSAEEVDRL LK	2908,6	Antioxidativ e, ACE inhibitor, AntiCP, AntiBP
17		387–405	FLAGEEDNVISQIQRPVKE	2172,1	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP
1	2	3	4	5	6
18		328–358	KKEDEEEEEEDRNVQVQRFQSKLSS GDVVVIP	3616,8	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP
19		328–359	KKEDEEEEEEDRNVQVQRFQSKLSS GDVVVIPA	3687,8	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FM-4, 36 ч					
20	2S albumin-like XP_004487601.1	77–90	REEGLKENCCAQL	1490,7	Antioxidativ e, ACE inhibitor,

					AntiCP
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7, 24 ч					
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PC-7, 36 ч					
21	2S albumin-like XP_004487601.1 P24 oleosin XP_004489219.1	24–52	SKDEKEEIPESCHKQLKSLNLKHCE KFLM	3469,7	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin, AntiFP,
22		155–189	GSVADVAGYVGQKTKDVGQKTKE VGQDIQAKAHET	3642,8	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP,
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3, 24 ч					
23	dehydrin DHN3 XP_004512937.1	2–20	SYNQGQYVDQTRRTDEYGN	2336.0	ACE inhibitor, AntiCP
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AS-3, 36 ч					
24	vicilin-like XP_004493035.1 P24 oleosin XP_004489219.1	331–348	KEDEEEEEEDRNVQVQRFQ	2307.1	ACE inhibitor, AntiTb, AntiCP, AHTpin
25		155–193	GSVADVAGYVGQKTKDVGQKTKE VGQDIQAKAHETKRST	4115.0	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CA-6, 24 ч					
26	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, chloroplastic-like XP_004494625.2	384–391	NNQRNFLA	976.5	ACE inhibitor, AntiCP
27		2–17	AQPQRGDYDNYQQHP	2022.0	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin
28		138–155	FGMTNDDQDKDHFPTNRH	2175.0	Antioxidative, ACE inhibitor, AntiCP
29		33–52	ASGEQKFPPQKQETQPGKEH	2293,2	ACE inhibitor, AntiCP, AHTpin
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CA-6, 36 ч					
30	seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 XP_004486857.1	190–201	LRGDGTGERKEW	1403,7	ACE inhibitor, AntiCP, AntiBP, AntiTb

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 активностью и потенциальной ингибирующей активностью ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), за исключением образца *Leuc. mesenteriodes* 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 *Limosilactobacillus fermentum* SB-2; *Pediococcus pentosaceus* FC-9; *Lactiplantibacillus planatum* PC-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 образуют пептиды с антибактериальными свойствами. Антиоксидантные свойства обнаружены у образцов со штаммами 1, 3, 4, 6, 7 и 10 (табл. 5.4).

На основании определения самой высокой протеолитической активности штаммов в отношении и белков нута, и белков молока, ароматической оценки ферментированного нутового экстракта, а также ранее определенных пробиотических и технологических свойств, в т.ч., способности утилизировать рафинозу, которая является одним из антипитательных соединений нута, образующих биологически активные пептиды были отобраны для биотехнологии разрабатываемого напитка следующие штаммы: *L. fermentum* SB-2 (1), *L. sakei* SD-8 (2), *L. plantarum* PC-7 (7) и *Leuc. mesenteriodes* CH-5 (8). Также по нашему мнению, использование композиций штаммов намного перспективнее использования их поодиночке, поэтому были составлены и использованы в дальнейшем следующие композиции штаммов, взаимно дополняющих друг друга по промышленно-важным свойствам: *L. fermentum* SB-2 (1) + *L. sakei* SD-8 (2) и *L. plantarum* PC-7 (7) + *Leuc. mesenteriodes* CH-5 (8).

5.5 Исследование антагонистической активности выбранных штаммов по отношению друг к другу

В ходе работы планировалось использование композиций штаммов, в связи с этим необходимо было установить их антагонистическую активность по отношению друг к другу для предотвращения ингибирования одного штамма другим.

Тест проводился на чашках Петри с использованием метода перпендикулярных прямых. По данным теста было установлено, что *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (1) и *Latilactobacillus sakei* SD-8 (2) не ингибируют друг друга. *Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 (7) и *Leuconostoc mesenteriodes* CH-5 (8) показали такой же результат (рис. 5.8).

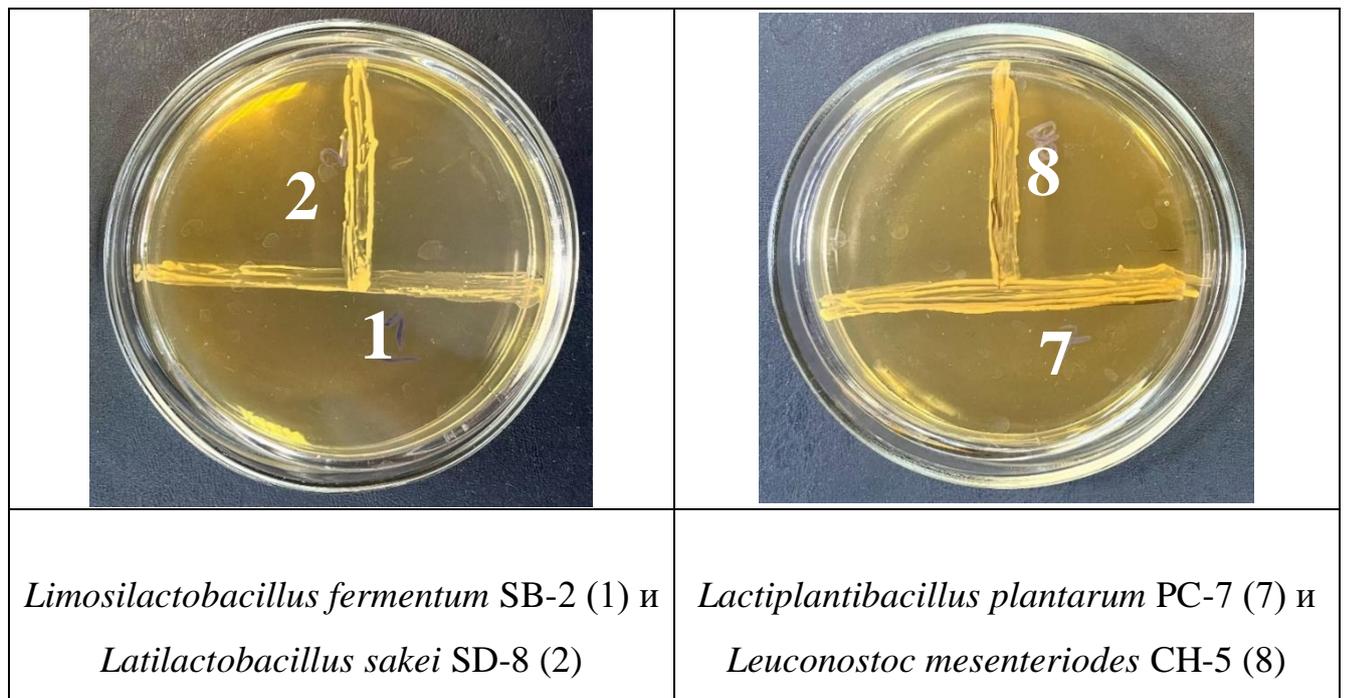


Рисунок 5.8 – Антагонистическая активность выбранных композиций штаммов

По результатам проведенных исследований для разработки бактериального препарата были выбраны штаммы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 и *Latilactobacillus sakei* SD-8, которые депонированы в Биоресурсный центр ВКПМ

НИЦ «Курчатовский институт» под номерами В-14054 и В-14053 соответственно, статус – национальное патентное депонирование (приложения 1–3). На основе этих штаммов создан препарат бактериальный сухой «ЛактоЛек» для производства ферментированного нутевого напитка «ЛатоЛек», разработана нормативная документация на него (проект ТУ 9229 014- 2024, ТИ) (приложения 4, 5). Подана заявка на патент «Препарат бактериальный протеолитический для производства ферментированного нутевого напитка» (приложение 6). Также осуществлена промышленная выработка бактериального препарата «ЛактоЛек» на базе ООО «ПромБиоТехнологии», Тульская область, г. Ефремов (приложение 7).

Заключение по главе 5

На основании результатов, полученных при изучении ферментации экстракта нута штаммами молочнокислых бактерий, были идентифицированы белковые фрагменты липоксигеназы, вицилина и легума. Молекулярная масса пептидов, полученных после ферментации молочнокислыми микроорганизмами, в основном была ниже 20 кДа. В гидролизатах экстракта нута микроорганизмами при проведении протомных исследований было идентифицировано 30 пептидов, обладающих различными биологическими характеристиками (в том числе противоопухолевой, антибактериальной, антигипертензивной и потенциальной ингибирующей активностью в отношении ангиотензинпревращающего фермента) и противотуберкулезными свойствами.

ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ НАПИТКА МОЛОКОСОДЕРЖАЩЕГО С ЭКСТРАКТОМ НУТА СКВАШЕННОГО

6.1 Разработка технологии напитка молокосодержащего с экстрактом нута сквашенного

В последнее время все чаще для создания более здорового образа жизни разрабатываются инновационные продукты, в рецептуру которых входит как животное, так и растительное сырье. Несмотря на преимущества использования растительных белков в питании человека, их выраженный вкус и плохая растворимость ограничивают их применение в пищевой промышленности. Чтобы преодолеть этот технико-функциональный недостаток, комбинация с молочными белками может стать интересной стратегией увеличения использования растительных белков с минимальным ущербом для органолептических характеристик продукта, улучшения пищевой ценности и снижения затрат на ингредиенты [61, 139].

Ранее проводились исследования подобных продуктов с разным соотношением нутового экстракта и коровьего молока (90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90), соответственно. Наиболее успешными, по мнению авторов, были рецептуры с соотношением нутового экстракта и коровьего молока 30:70 и 50:50, соответственно [26].

Для оценки качества и безопасности продукции на территории России действующие технические регламенты Таможенного союза – ТР ТС 021/2011 [23], а также ТР ТС 033/2013 [24]. Так как растительных ферментированных напитков на рынке в настоящее время совсем немного, а молочно-растительные напитки в мире набирают популярность, то было принято решение разработать продукт, соответствующий требованиям ТР ТС 033/2013 для молокосодержащих продуктов, у которых массовая доля сухих веществ молока в сухих веществах готового продукта должна составлять 20 % и более. В связи с этим была выбрана рецептура продукта, которая содержала 55 % коровьего молока жирностью 0,5 % и 45 %

нутового экстракта. Далее был выработан напиток молокосодержащий с экстрактом нута, сквашенный композицией 1 (*L. fermentum* SB-2 + *L. sakei* SD-8) или композицией 2 (*L. plantarum* PC-7 + *L. mesenteriodes* CH-5). Композицию микроорганизмов вносили в количестве 10^7 КОЕ/см³ напитка. Напиток сквашивали в течение 72 ч (рис. 6.1).

6.2 Определение кислотообразующей активности штаммов в напитках

Известно [43], что молочнокислые бактерии в течение своего жизненного цикла метаболизируют углеводы, такие как лактоза, в молочную кислоту, что снижает pH окружающей среды. В результате продукт обладает не только нужной консистенцией, органолептическими и микробиологическими показателями, но и полезными свойствами для человеческого организма благодаря своей кислой среде. Он помогает предотвратить появление патогенных микроорганизмов в толстой кишке, что повышает иммунитет и уменьшает метеоризм. Эти данные подчеркивают необходимость выяснения способности штаммов вырабатывать кислоты.

Скорость подкисления и pH, полученные различными штаммами после инкубации в течение 0, 24 и 72 ч, представлены в таблице 6.1. Обе бактериальных композиции показали значительную скорость образования молочной кислоты при 37 °C за 72 ч.

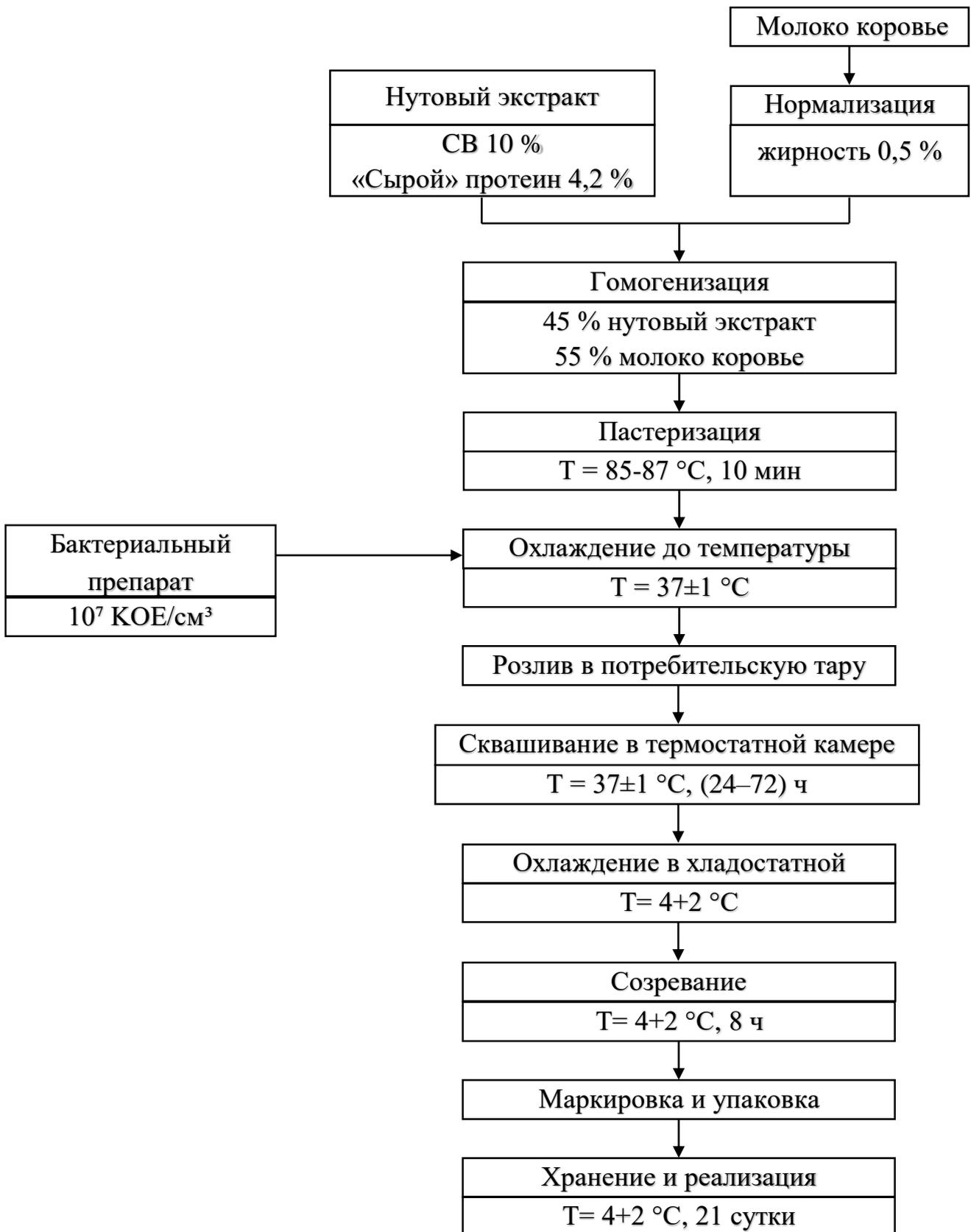


Рисунок 6.1– Технологическая схема получения продукта

Таблица 6.1 – 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

6.3 Определение органолептических показателей напитков

Органолептические показатели продукта – один из важнейших критериев, повышающих его привлекательность и конкурентоспособность.

Анализируя органолептические показатели напитков, можно сделать вывод, что полученные образцы соответствуют нормам, установленным ТР ТС 033/2013 [24] и ГОСТ 31450-2013 [6]. 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. К 72 ч ферментации вкус обоих продуктов становился кислым, их органолептика ухудшалась. Поэтому было выбрано время ферментации продукта 24 ч (табл. 6.2).

Таблица 6.2 – 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

6.4 Определение микробиологических показателей напитков

Оба напитка, сквашенные композициями штаммов 1 и 2, соответствовали микробиологическим требованиям ТР ТС 033/2013 для жидких кисломолочных продуктов и содержали молочнокислых микроорганизмов не менее 1×10^8 КОЕ/см³. БГКП (в том числе *E. coli*, сальмонеллы, *L. monocytogenes* и *S. aureus*) обнаружены не были. Также не были обнаружены плесневые грибы и дрожжи (табл. 6.3).

Таблица 6.3 – Микробиологические показатели продукта

Наименование показателя	Требования ТР ТС 033/2013	Период хранения, сутки									
		1		3		5		7		9	
КОЕ/см ³ (г)	МКМ не менее 1×10^7	$1,2 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$6,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$
Масса продукта, в которой не допускаются, г:											
БГКП (колиформы)	0,01	Не обнаружены									

Дрожжи, КОЕ/ см ³ (г), не более	50	Не обнаружены
Плесени, КОЕ/ см ³ (г), не более	50	Не обнаружены
Патогенные, в том числе <i>Salmonella</i> , КОЕ/см ³ (г), не более	25,0	Не обнаружены
<i>S. aureus</i> , КОЕ/ см ³ (г), не более	1,0	Не обнаружены
<i>L. monocytogenes</i> , КОЕ/см ³ (г), не более	25,0	Не обнаружены

6.5 Определение химического состава напитков

Далее исследовали содержание сухих веществ, белка, жира, углеводов и золы в ферментированных напитках. Напиток, сквашенный комбинацией 1, в целом имел незначительно большее содержание жира, углеводов и золы по сравнению с образцом, сквашенным комбинацией 2 (табл. 6.4).

Таблица 6.4 – 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

6.6 Протеомные исследования ферментированных напитков

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 ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). Образцы также содержали типичные белки молока, обнаруживаемые на электрофореграммах (рис. 6.2). 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.

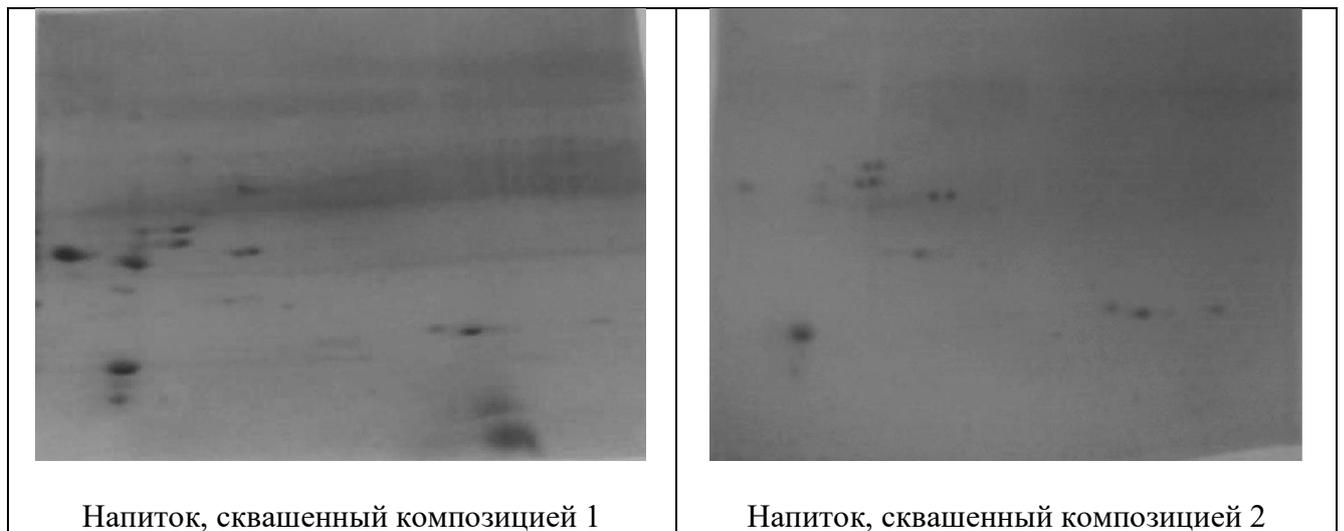


Рисунок 6.2 – Двумерный электрофорез белков напитков

Промышленная апробация технологии напитка молкосодержащего с экстрактом нута, сквашенного молочнокислыми микроорганизмами, была осуществлена на базе ООО «ПромБиоТехнологии», Тульская область, г. Ефремов (приложение 7).

6.7 Оценка экономической эффективности технологии напитка молокосодержащего с экстрактом нута сквашенного

Для оценки эффективности предлагаемого изменения технологии напитка необходимо оценить и сопоставить затраты на внедрение новой технологии с ожидаемым производственным и финансовым результатом, а также с учетом возможного временного бюджета технического перевооружения производства.

Расчет приведен для партии готового напитка объемом 1000 м³. Техническое перевооружение производства готового продукта потребует дополнительного помещения для размещения оборудования, предназначенного для получения вновь вводимых компонентов готового продукта: экстракта нута и бактериального препарата «ЛактоЛек».

Предполагаемый комплекс по переработке бобов нута, который можно использовать при производстве напитка молкосодержащего с экстрактом нута сквашенного, представлен на видео, которое можно увидеть по ссылке <https://yandex.ru/video/preview/12780577473716460422>

Минимальный комплект оборудования для переработки нута, возможного к дальнейшему масштабированию в условиях увеличения доли готовой продукции, изготавливаемой по новой технологии, обойдется предприятию в 17 400 000 руб. (турецкое оборудование, так как актуальные российские аналоги, сопоставимые по критерию «стоимость-производительность» не найдены»), площадь для размещения комплекса составит 120 кв. м. Технический срок службы оборудования – 10 лет.

Работа оборудования будет организована по схеме календарного месяца «дни работы оборудования в месяц/день профилактического осмотра; количество смен в сутки; продолжительность непрерывной смены работы оборудования, час.»: 29/1;2;8, то есть в течение каждого календарного месяца один день выделяется для профилактического осмотра и доналадки оборудования комплекса, в течение рабочих суток комплекс будет использоваться в 2 смены по 8 ч, то есть с максимальной загрузкой 16 ч в сутки.

Производительность планируемого комплекса переработки нута с целью получения экстракта ключевого компонента изготовления готового продукта равна 2,4 т/сут, или $2,4 \times 29 = 69,6$ т/мес. Для производства 1000 м³ нутового экстракта необходимо 250 кг бобов нута. Выход сухого нутового экстракта из бобов нута составляет 80 %. Доля сухого экстракта в жидкой фракции равна 1 %. Таким образом, месячная потребность в бобах нута для полной загрузки оборудования составит $69\,600 / 0,8 \times 0,01 = 870$ кг. Текущая стоимость нута в сфере оптовой торговли в ценах сентября 2024 г. находится в диапазоне от 18–25 до 50–80 руб/кг. Для целей расчета примем цену максимального качественного, но не слишком дорогого сырья – 25 руб/кг.

Месячный объем затрат на закупку бобов нута для полной загрузки оборудования составит $870 \times 25 = 21\,750$ руб. Стоимость аренды дополнительного производственного помещения площадью 400 м² для размещения и обслуживания комплекса оборудования не учитывается, так как для работы комплекта будет использоваться помещение предприятия. Работу комплекса будет обеспечивать бригада в составе двух человек, включая бригадира-оператора и оператора. Общая сумма затрат по производству экстракта нута в месяц представлена в таблице 6.5.

Таблица 6.5 – Калькуляция затрат на изготовление экстракта нута на минимальном комплекте оборудования в месяц

№ п/п	Затраты	Сумма, руб.
1	Амортизация комплекса	145 000
2	Заработная плата оператора (1 чел.)	80 000
3	Заработная плата бригадира-оператора (1 чел.)	120 000
4	Отчисления по обязательное социальное и медицинское страхование, а также страхование производственных рисков (31,2 %)	62 400
5	Стоимость сырья нута (870 кг)	21 750
6	Стоимость химических материалов и компонентов для получения экстракта нута	5850
	Итого	435 000

С учетом максимального месячного объема производства экстракта нута, соответствующего режиму полной загрузки оборудования, стоимость 1 л экстракта составит: $435\,000 / 69\,600 = 6,25$ руб.

Себестоимость 450 л экстракта нута, таким образом, составит: $6,25 \times 450 = 2815,5$ руб.

Стоимость второго вводимого компонента – бактериального препарата «ЛактоЛек» – оценивали по цене приобретения у оптового поставщика, так как в самостоятельной организации его производства потребуются дополнительные расходы и временные затраты на установку и запуск технологической платформы, на что в среднем потребуется не менее 6 мес. В случае выхода на массовое производство нового продукта предприятие может принять решение об организации производства бактериального препарата на собственной материально-технической базе.

Оптовая стоимость бактопрепарата «ЛактоЛек» составит 6 руб. на 1 л готового продукта. Для технической перестройки производственного процесса на технологию изготовления ферментированного напитка с добавлением экстракта нута потребуется 1,5 мес. (рис. 6.3).

Вид работ	Дни				
	1-10	11-17	18-32	33-41	42-45
Поиск поставщиков и заключение договоров					
Закупка и доставка оборудования					
Монтаж оборудования и технологической линии					
Пуско-наладочные работы					
Запуск технологической линии					

Рисунок 6.3 – Диаграмма Ганта технического перепрофилирования технологической линии для изготовления ферментированного продукта

Оценка экономической эффективности показала, что при замене коровьего молока на экстракт нута (для производства 1000 л нутевого экстракта необходимо 250 кг бобов нута) и использовании российского бактериального препарата «ЛактоЛек» себестоимость продукта снижается на 35 % по сравнению с образцом без нутевого экстракта (технология продукта, подобного йогурту) (табл. 6.5).

Оптовая цена 1 л молока 0,5%-ной жирности принята 45 руб/л, оптовая цена 1 кг бобов нута – 25 руб.

Как видно из таблицы 6.6, в результате внедрения предлагаемой технологии предприятие не только позволит осуществить выпуск более полезного напитка, но и более чем в 1,5 раза снизит себестоимость его производства.

Таблица 6.6 – Оценка экономической эффективности ферментированного напитка

Рецептурные ингредиенты	Себестоимость 1000 л, руб.	
	Традиционная технология	Разработанная технология
Молоко коровье 0,5%-ной жирности – 550 л	45 000	24 750
Бактериальный препарат для йогурта «Хр. Хансен»	6646	–
Экстракт нута (в пересчете на бобы нута) – 450 л	–	2812,50
Бактериальный препарат «ЛактоЛек»	–	6000
Итоговая цена	51 646	33 562,5

Заключение по главе 6

Выработан напиток из 55% коровьего молока жирностью 0,5 % и 45 % экстракта нута с двумя комбинациями молочнокислых микроорганизмов для сквашивания. После изучения органолептических показателей напитков с комбинацией штаммов 1 имел более высокие оценки. Также по органолептическим показателям было определена рациональная продолжительность сквашивания – 24 ч. Напиток, сквашенный комбинацией штаммов 1, имел более высокое общее содержание белка и углеводов по сравнению с напитком, сквашенным комбинацией 2. В составе напитка, сквашенного композицией 1 (*L. fermentum* SB-2 и *L. sakei* SD-8), были получены пептиды с потенциальной биологической активностью: антигипертензивной, противоопухолевой, противотуберкулезной, противогрибковой, антибактериальной и антиоксидантной. Себестоимость производства напитка молокосодержащего с экстрактом нута, сквашенного

разработанным бактериальным препаратом «Лактолек», на 35 % ниже, чем себестоимость йогуртового напитка, произведенного по классической технологии, с использованием только коровьего молока.

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 молокосодержащего 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, утилизировали 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 *prtB* 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 (АНТpin), 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 молкосодержащего 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 %.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПФ – ангиотензинпревращающий фермент

БГКП – бактерии группы кишечных палочек

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

TNBS – 2,4,6-тринитробензолсульфоная кислота

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

ПЦР – полимеразная цепная реакция

MS/MS – тандемная масс-спектрометрия

M/Z – коэффициент отношения массы к заряду (mass-to-charge ratio)

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации США (National Centre for Biotechnology Information)

БД – база данных

ДЭ – двумерная электрофореграмма / двумерный электрофорез

ПААГ – полиакриламидный гель

SDS-PAGE – электрофорез в ПААГ (в полиакриламидном геле) в присутствии SDS

SDS – додецилсульфат натрия

БАП – биологически активные пептиды

DRPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

GC-MS – газовая хроматография-масс-спектрометрия

FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная сила

ABTS – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) диаммониевая соль

МКБ – молочнокислые бактерии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авторский коллектив: Научно-исследовательский институт питания РАМН МУ 2.3.2.2789-10. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: методическое пособие / Научно-исследовательский институт питания РАМН. Авторский коллектив. – Издание официальное. – Москва : Роспотребнадзор, 2011. – 105 с.
2. ГОСТ 10444.11-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 14 с.
3. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. – Москва : Стандартинформ, 2010. – 4 с.
4. ГОСТ 13496.15-2016. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения массовой доли сырого жира. – Москва : Стандартинформ, 2020. – 9 с.
5. ГОСТ 25179-2014 Молоко и молочные продукты. Методы определения массовой доли белка. – Москва : Стандартинформ, 2019. – 9 с.
6. ГОСТ 31450-2013. Молоко питьевое. Технические условия. – Москва : Стандартинформ, 2019. – 8 с.
7. ГОСТ 31659-2012. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 19 с.
8. ГОСТ 31746-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. – Москва : Стандартинформ, 2013. – 22 с.
9. ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria Monocytogenes*. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 25 с.
10. ГОСТ 32901-2014. Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа. – Москва : Стандартинформ, 2015. – 24 с.

11. ГОСТ 32933-2014. Корма, комбикорма. Метод определения содержания сырой золы. – Москва : Стандартиформ, 2020. – 7 с.
12. ГОСТ 33566-2015. Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов. – Москва : Стандартиформ, 2019. – 13 с.
13. ГОСТ 34454-2018. Продукция молочная. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля. – Москва : Стандартиформ, 2018. – 11 с.
14. ГОСТ 34567-2019. Мясо и мясные продукты. Метод определения влаги, жира, белка, хлористого натрия и золы с применением спектроскопии в ближней инфракрасной области. – Москва : Стандартиформ, 2019. – 9 с.
15. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – Москва : Стандартиформ, 2009. – 7 с.
16. ГОСТ Р 54667-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров. – Москва : Стандартиформ, 2012. – 23 с.
17. ГОСТ Р 54668-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли влаги и сухого вещества. – Москва : Стандартиформ, 2019. – 9 с.
18. ГОСТ 5867-90. Молоко и молочные продукты. Методы определения жира. – Москва : Стандартиформ, 2009. – 13 с.
19. ГОСТ Р 70650-2023. Напитки на растительной основе (из зерна, орехов, кокоса). Общие технические условия. – Москва : Стандартиформ, 2023. – 11 с.
20. ГОСТ ISO 7218-2015. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям. – Москва : Стандартиформ, 2016. – 69 с.
21. Ковалёв, Л. И. Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах / Л. И. Ковалёв, С. С. Шишкин, М. А. Ковалёва, А.В. Иванов, Н.Л. Вострикова, И.М. Чернуха // Всё о мясе. – 2013. – № 3. – С. 32–34. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/proteomnoe-izuchenie-belkov-v-obraztsah-svininy-i-vyrobotannyh-iz-nee-myasnyh-produktah> (дата обращения: 13.11.2024).

22. 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. Василиевич // *Хранение и переработка сельхозсырья*, – 2022. – Т. 4. – С. 113–127. <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.341>

23. ТР ТС 021/2011. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции»: сайт Техэксперт Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации. – 2011 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902320560> (дата обращения: 15.06.2023).

24. ТР ТС 033/2013. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции»: сайт Техэксперт Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации. – 2013 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/499050562> (дата обращения: 20.06.2023).

25. Adler-Nissen, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid / J. Adler-Nissen // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1979. – Vol. 27. № 6. – P. 1256–1262. DOI: 10.1021/jf60226a042.

26. Aguilar-Raymundo, V. G. Yoghurt-type Beverage with Partial Substitution of Milk by a Chickpea Extract: Effect on Physicochemical and Flow Properties / V. G. Aguilar-Raymundo, J. F. Vélez-Ruiz // *International Journal of Dairy Technology*. – 2019. – Vol. 72(2). – P. 266–274. DOI: 10.1111/1471-0307.12581.

27. Ahangaran, M. Bioactive peptides and antinutrients in chickpea: description and properties (a review) / M. Ahangaran, D.A. Afanasev, I. M. Chernukha, N. G. Mashentseva, M. Gharaviri // *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. – 2022. – Vol. 183. – № 1. – P. 214–223. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-214-223.

28. Aluko, R. E. Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates / R. E. Aluko // *Journal of AOAC International*. – 2008. – Vol. 91. – № 4. – P. 947–956. DOI: 10.1093/jaoac/91.4.947.

29. Amy, L. L. Preparation of routine Media and Reagents Used in Antimicrobial Susceptibility Testing / L. L. Amy // Book: Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition. – 2016. – Vol. 1–3. – Chap. 5.20. DOI: 10.1128/9781555818814.ch5.20.1.

30. Ayo-Omogie, H. N. In vitro Probiotic Potential of Autochthonous Lactic Acid Bacteria and Microbiology of Kunu Made from Mixed Grains / H. N. Ayo-Omogie, E. I. J. Okorie // British Microbiology Research Journal. – 2016. – Vol. 14. – № 4. – P. 1–10. DOI: 10.9734/BMRJ/2016/25403.

31. Begum, N. Nutritional composition, health benefits and bio-active compounds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) / N. Begum, Q. U. Khan, L. G. Liu, W. Li, D. Liu, I. U. Haq // Frontiers in Nutrition – 2023. – Vol. 10. DOI: 10.3389/fnut.2023.1218468

32. Belicova, A. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak bryndza cheese / A. Belicova, M. Mikulasova // BioMed research international. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-8. doi: 10.1155/2013/760298.

33. Bintsis, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics / T. Bintsis // AIMS microbiology. – 2018. – Vol. 4. – P. 665–684. DOI: 10.3934/microbiol.2018.4.665.

34. Boyaci Gunduz, C. P. Molecular analysis of the dominant lactic acid bacteria of chickpea liquid starters and doughs and propagation of chickpea sourdoughs with selected *Weissella confuse*. / C. P. Boyaci Gunduz, R. Gaglio, E. Franciosi, L. Settanni, H. Erten // Food Microbiology. – 2020. – Vol. 91. – №103490. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103490

35. Boyd, M. A. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus species* / M. A. Boyd, M. A. Antonio, S.L. Hillier // Journal of clinical microbiology. – 2005. – Vol. 43. – № 10. – P. 5309-5311. DOI: 10.1128/JCM.43.10.5309-5311.2005.

36. Bulbula, D. D. Study on the effect of traditional processing methods on nutritional composition and antinutritional factors in chickpea (*Cicer arietinum*) / D. D. Bulbula, K. Uрга // Cogent Food & Agriculture. – 2018. – Vol. 4(1) – P. 1–12. DOI: 10.1080/23311932.2017.1422370.

37. Carlos, E. Biologically active and antimicrobial peptides from plants / E. Carlos, A. Salas, A. Jesus [et al.] // *BioMed research international*. – 2015. – Vol. 2015. – № 102129. DOI: 10.1155/2015/102129.

38. Cavazos, A. Identification of bioactive peptides from cereal storage proteins and their potential role in prevention of chronic diseases / A. Cavazos, E. Gonzalez de Mejia // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2013. – Vol. 12. – № 4. – P. 364-380. DOI: 10.1111/1541-4337.12017

39. Chang, Y. Characterization of protein fractions from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques / Y. Chang, I. Alli, Y. Konishi, E. Ziomek // *Food Research International*. – 2011. – Vol. 44. – №. 9. – P. 3094-3104. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.08.001.

40. Charteris, W. P. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species / W. P. Charteris, P. M. Kelly, L. Morelli, J. K. Collins // *Journal of Food Protection*. – 1998. – Vol. 61. – № 12. – P. 1636–43. DOI: 10.4315/0362-028x-61.12.1636.

41. Chen, C. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review / C. Chen, S. Zhao, G. Hao, H. Yu, H. Tian, G. Zhao // *International journal of food properties*. – 2017. – Vol. 20. – № 1. – P. 316–330. DOI: 10.1080/10942912.2017.1295988.

42. Chen, C. C. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase / C. C. Chen, P. H. Wu, C. T. Huang [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – Vol. 35. – № 4. – P. 315-320. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.05.007.

43. Cui, Y. The Carbohydrate Metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum* / Y. Cui, M. Wang, Y. Zheng, K. Miao, X. Qu // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 24. <https://doi.org/10.3390/ijms222413452>.

44. Curiel, J. A. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: the potential. / J. A. Curiel, R. Coda, Centomani, I. C. Summo, M. Gobetti, C. G. Rizzello // *International Journal of Food Microbiology*. – 2015. – Vol. 196. – P. 51-61. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.032.

45. Daliri, E. Bioactive peptides / E. Daliri, D. Oh, and B. Lee // *Foods*. – 2017. – Vol. 6. – № 5. – P. 32. DOI: 10.3390/foods6050032.
46. Danielsen, M. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents / M. Danielsen, A. Wind // *International journal of food microbiology*. – 2003. – Vol. 82. – № 1. – P. 1–11. DOI: 10.1016/s0168-1605(02)00254-4.
47. Degnan, F. H. The US food and drug administration and probiotics: regulatory categorization / F. H. Degnan // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 46. – P. S133–6. doi: 10.1086/523324.
48. Devi, M. Bactericidal activity of the lactic acid bacteria *Lactobacillus delbreukii* / M. Devi, L. Jeyanthi Rebecca. S. Sumathy // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. – 2013. – Vol. 5. – № 2. – P. 176–180. https://www.researchgate.net/publication/276320731_Bactericidal_activity_of_the_lactic_acid_bacteria_Lactobacillus_delbreukii.
49. Di Francesco, A. Mass Spectrometry Characterization of the SDS-PAGE Protein Profile of Legumins and Vicilins from Chickpea Seed / A. Di Francesco, M. A. De Santis, A. Lanzoni, M. G. G. Pittalà, R. Saletti, Z. Flagella, V. Cunsolo // *Foods*. – 2024. – Vol. 13. – № 6. – P. 887. <https://doi.org/10.3390/foods13060887>.
50. Domoney, C. Inhibitors of Legume Seeds / C. Domoney // *Seed Proteins*. – 1999. – P. 635–655. DOI: 10.1007/978-94-011-4431-5_27.
51. Duche, R. T. Antibiotic Resistance in Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria of Fermented Foods and Human Origin from Nigeria / R. T. Duche, A. Singh, A. G. Wandhare [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 142. DOI: 10.1186/s12866-023-02883-0.
52. Dušková, M. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS / M. Dušková, O. Šedo, K. Kšicová, Z. Zdráhal, and R. Karpíšková // *International journal of food microbiology*. – 2012. – Vol. 159. – № 2. – P. 107–114. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029.
53. Emmadi, R. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing: a review of FDA-approved and cleared assays / R. Emmadi, J. B. Boonyaratanakornkit, R.

Selvarangan, V. Shyamala [et.al] // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2011. – Vol. 13. – № 6. – P. 583–604. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.05.011.

54. Gabło, N. Polymerase chain reaction: a powerful analytical tool in the field of food safety / N. Gabło // Maso international – Journal of food science and technology. – Vol. 13. – № 1. – P. 15–23. DOI: 10.2478/mjfst-2023-0002.

55. Gad, G. F. M. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products / G. F. M. Gad, A. M. Abdel-Hamid, Z. S. H. Farag // Brazilian journal of Microbiology. – 2014. – Vol. 45. – P. 25–33. DOI: 10.1590/s1517-83822014000100005

56. Gallagher, S. R. One-dimensional SDS gel Electrophoresis of Proteins. / S. R. Gallagher // Current Protocols in Molecular Biology. Unit 10.2A. – 2012. – Vol. 97. DOI: 10.1002/0471142727.mb1002as97.

57. García-Cano, I. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins / I. García-Cano, D. Rocha-Mendoza, J. Ortega-Anaya, K. Wang, E. Kosmerl, R. Jiménez-Flores // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 103. – P. 5243-5257. DOI: 10.1007/s00253-019-09844-6.

58. Garcia, EF. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected Lactobacillus Strains / Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, da Costa WC, de Sousa Oliveira K, Franco OL, de Moraes Júnior MA, Lucena BT, Picão RC, Magnani M, Saarela M, de Souza EL // Front Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1371. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01371.

59. Ghribi, A. M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate / A. M. Ghribi, A. Sila, R. Przybylski, N. Nedjar-Arroume, I. Makhlouf, C. Blecker [et al.] // Journal of functional foods. – 2015. – Vol. 12. – P. 516-525. DOI: 10.1016/j.jff.2014.12.011.

60. Gordeeva, T. L. Comparative analysis in Plate Test of Expression Efficiency of Genes for Bacterial Phytases in *Pichia pastoris* yeast / T. L. Gordeeva, L. N.

Borshchevskaya, A. N. Kalinina // *Biotechnology*. – 2017. – Vol. 33. – № 6. – P. 83–88. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-83-88.

61. Goulding, D. A. Milk proteins: an overview / D. A. Goulding, P. F. Fox, J. A. O'Mahony // *Book: Milk Proteins: From Expression to Food*. – 2020. – P. 21–98. DOI: 10.1016/B978-0-12-815251-5.00002-5.

62. Grazul, H. Impact of probiotic supplements on microbiome diversity following antibiotic treatment of mice / H. Grazul, L. L. Kanda, D. Gondek // *Gut microbes*. – 2016. – Vol. 7. – № 2. – P. 101–114. DOI: 10.1080/19490976.2016.1138197.

63. Gupta, N. Enzymatic treatment improves ACE-I inhibition and antiproliferative potential of chickpea / N. Gupta, S. S. Bhagyawant // *Vegetos*. – 2019. – Vol. 32. – P. 363–369. DOI: 10.1007/s42535-019-00031-6.

64. Gurumalles, P. systematic reconsideration on proteases / P. Gurumalles, K. Alagu, B. Ramakrishnan, S. A. Muthusamy // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 128. – P. 254–267. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081.

65. Hati, S. Novel starters for value added fermented dairy products / S. Hati, S. Mandal, J.B. Prajapati // *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*. – 2013. – Vol. 1. – № 1. – P. 83–91. DOI: 10.12944/CRNFSJ.1.1.09.

66. Herreros, M. A. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese) / M. A. Herreros, H. Sandoval, L. González, J. M. Castro, J. M. Fresno, M. E. Tornadijo // *Food Microbiology*. – 2005. – Vol. 22. – № 5. – P. 455–459. DOI: 10.1016/j.fm.2004.11.007.

67. Hoffman, F. A. Executive summary: scientific and regulatory challenges of development of probiotics as foods and drugs / F. A. Hoffman, J. T. Heimbach, M. E. Sanders, P. L. Hibberd // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2008. – Vol. 46. – P. 53–57. DOI: 10.1086/523342.

68. Hu, G. Characterization of lactic acid-producing bacteria isolated from rumen: growth, acid and bile salt tolerance, and antimicrobial function / G. Hu, H. Jiang, Y. Zong, O. Datsomor, L. Kou, Y. An, J. Zhao, L. Miao // *Fermentation*. – 2022. – Vol. 8. – № 385. DOI: 10.3390/fermentation8080385.

69. Iqbal, A. Nutritional quality of important food legumes / A. Iqbal, I. A. Khalil, N. Ateeq, M. Sayyar Khan // Food chemistry. – 2006. – Vol. 97. – № 2. – P. 331–335. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.
70. Issaoui, E. K. Molecular identification and antibiotic resistance of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from table olives / E. K. Issaoui, E. I. O. Khay, J. Abrini, S. Zinebi, N. Amajoud, N. S. Senhaji, H. Abriouel // Archives of Microbiology. – 2020. – Vol. 203(2). – P. 597–607. DOI: 10.1007/s00203-020-02053-0.
71. Jukanti, A. K. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.) : a review / A. K. Jukanti, P. M. Gaur, C. L. L.Gowda, R. N. Chibbar // British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – № S1. – P. 11–26. DOI: 10.1017/S0007114512000797.
72. Jyoti Das, A. Growth and metabolic characterization of four lactic acid bacteria species isolated from rice beer prepared in Assam / A. Jyoti Das, M. Jyoti Das, T. Miyaji, S. Chandra Deka // Access Microbiology. – 2019. – Vol. 1. – № 4. DOI: 10.1099/acmi.0.000028.
73. Kaban, G. Identification of lactic acid bacteria and gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk) / G. Kaban, M. Kaya // Journal of Food Science. – 2008. – Vol. 73. – № 8. – P. M385-M388. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00906.x.
74. Kan, L. Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes / L. Kan, S. Nie, J. Hu, S. Wang, Z. Bai, J. Wang, Y. Zhou, J. Jiang, Q. Zeng, K. Song // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 260. – P. 317-326. DOI: 10.1016/j.foodchem.
75. Kaur, R. Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer arietinum*) – A review / R. Kaur, K. Prasad // Trends in Food Science & Technology. – 2021. – Vol. 109. – P. 448-463. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.01.044.
76. Kaya, M. Phytase activity, phytic acid, zinc, phosphorus and protein contents in different chickpea genotypes in relation to nitrogen and zinc fertilization / M. Kaya, Z. Küçükyumuk, I. Erdal // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – № 18. – P. 4508-4513.

77. Kenny, O. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus* / O. Kenny, R.J. FitzGerald, G. O’Cuinn, T. Beresford, K. Jordan // International Dairy Journal. – 2003. – Vol. 13. – № 7. – P. 509–516. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00073-6.

78. Khalid, K. An overview of lactic acid bacteria / K. Khalid // Int. J. Bioscience. – 2011. – Vol. 1. – P. 1–13.

79. Khandelwal, S. Polyphenols and tannins in Indian pulses: effect of soaking, germination and pressure cooking / S. Khandelwal, S.A. Udipi, P. Ghugre // Food Research International. – 2010. – Vol. 43. – № 2. – P. 526–530. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.09.036.

80. Khattab, R. Y. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments. 2. Antinutritional factors / R. Y. Khattab, S. D. Arntfield // LWT-Food Science and Technology. – 2009. – Vol. 42. – № 6. – P. 1113–1118. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.02.004.

81. Khokhar, S. Antinutritional factors in food legumes and effects of processing / S. Khokhar, R. K. O. Apenten // The role of food, agriculture, forestry and fisheries in human nutrition. – 2003. – Vol. 4. – P. 82–116.

82. Kanyama, C. A. Differences in Environmental Impact between Plant-Based Alternatives to Dairy and Dairy Products: A Systematic Literature Review / C.A. Kanyama, B. Hedin, C. Katzeff // Sustainability. – 2021. – Vol. 13(22). – № 12599. DOI: 10.3390/su132212599.

83. Kishor, K. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum*) milk / K. Kishor, J. David, S. Tiwari, A. Singh, B. S. Rai // International Journal of Chemical Studies. – 2017. – Vol. 5. – № 4. – P. 1941–1944.

84. Klongklaew, A. Lactic acid bacteria based fermentation strategy to improve phenolic bioactive-linked functional qualities of select chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties / A. Klongklaew, K. Banwo, P. Soodsawaeng, A. Christopher, CH. Khanongnuch, D. Sarkar, K. Shetty // NFS Journal. – 2022. – Vol. 27. – P. 36–46. DOI: 10.1016/j.nfs.2022.03.004.

85. König, H. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine / H. König, G. Uden, J. Fröhlich // Biology, Wine, Microorganism, Springer Ebooks. – 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-60021-5.

86. Kou X. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates / X. Kou, J. Gao, Z. Xue, Z. Zhang, H. Wang, X. Wang // LWT-Food Science and Technology. – 2013. – Vol. 50. – № 2. – P. 591-598. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.08.002.

87. Kumar, M. R. Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes / M. R. Kumar, M. V. Kumar // Lwt. – 2017. – Vol. 75. – P. 51–58. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.08.036

88. Lafarga, T. Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis / T. Lafarga, P. O'Connor, M. Hayes // Peptides. – 2014. – Vol. 59. – P. 53–62. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.07.005.

89. Leroy, F. Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry / F. Leroy, L. D. Vuyst // Trends in Food Science & Technology. – 2004. – Vol. 15. – № 2. – P. 67–78. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.004.

90. Li, W. Effect of solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* lwo on the proteolysis and the antioxidative properties of chickpeas / W. Li, T. Wang // International Journal of Food Microbiology. – 2021. – Vol. 338. – № 108988. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108988.

91. Li, Y. H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) / Y. H. Li, B. Jiang, T. Zhang, W. Mu, J. Liu // Food Chemistry. – 2008. – Vol. 106. – № 2. – P. 444–450. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.067.

92. Lim Y. H. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements / Y. H. Lim, H. L. Foo, T. C. Loh, R. Mohamad, N. Abdullah // Journal of Animal Science and Biotechnology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–13. DOI: 10.1186/s40104-019-0323-z.

93. Linares-Morales, J. R. Selection of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables based on their antimicrobial and enzymatic activities / J. R. Linares-Morales, G. E. Cuellar-Nevárez, B. E. Rivera-Chavira, N. Gutiérrez-Méndez, S. B. Pérez-Vega, G.V. Nevárez-Moorillón // *Foods*. – 2020. – Vol. 9. – № 10. – P. 1399. DOI: 10.3390/foods9101399.
94. Liu, W. Biodiversity of lactic acid bacteria / W. Liu, H. Pang, H. Zhang, Y. Cai // In book: *Lactic Acid Bacteria*, Chapter 2. – 2014. – P. 103-203. DOI: 10.1007/978-94-017-8841-0_2.
95. López-Barrios, L. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients / L. López-Barrios, J. A. Gutiérrez-Urbe, S.O. Serna-Saldívar // *Journal of Food Science*. – 2014. – Vol. 79. – № 3. – P. R273–R283. DOI: 10.1111/1750-3841.12365.
96. Ma, X. Study on preparation of chickpea peptide and its effect on blood glucose / X. Ma, X. Fan, D. Wang, X. Li, X. Wang, J. Yang, C. Qiu, X. Liu, G. Pang, R. Abra, L. Wang // *Frontiers in Nutrition*. – 2022. – Vol. 9. – № 988628. DOI: 10.3389/fnut.2022.988628.
97. Mamo, J. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries / J. Mamo, F. Assefa // *Journal of Food Quality*. – 2018. DOI: 10.1155/2018/7957269.
98. Matsuo, T. Introduction to modern biological mass spectrometry / T. Matsuo, Y. Seyama // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2000. – Vol. 35. – № 2. – P. 114–130. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9888(200002)35:2<114::AID JMS949>3.0.CO;2-1.
99. Matti, A. Isolation, Screening, and identification of proteolytic lactic acid bacteria from indigenous *Chao* product / A. Matti, T. Utami, C.S. Hidayat, E. Rahayu // *Journal of Aquatic Food Product Technology*. – 2019. – Vol. 28. – № 7. – P. 781–793. DOI: 10.1080/10498850.2019.1639872.
100. Mayer Labba, I. C. Isolation, identification, and selection of strains as candidate probiotics and starters for fermentation of Swedish legumes / I. C. Mayer Labba, T. Andlid, A. Lindgren, A. S. Sandberg, F. Sjöberg // *Food & Nutrition Research*. – 2020. – Vol. 64. – № 4410. DOI: 10.29219/fnr.v64.4410.

101. McDonald, L. C. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria / L. C. McDonald, R. F. McFeeters, M. A. Daeschel, H. P. Fleming // Applied and Environmental Microbiology. – 1987. – Vol. 53. – № 6. – P. 1382–1384. DOI: 10.1128/aem.53.6.1382-1384.1987.

102. Meena, R. S. Towards the current need to enhance legume productivity and soil sustainability worldwide: a book review / R. S. Meena, R. S. Yadav, H. Meena, S. Kumar, Y. K. Meena, A. Singh // Journal of Cleaner Production. – 2015. – Vol. 104. – P. 513–515. DOI: 10.1016/j.jclepro.2015.05.002.

103. Michalak, M. Composition of lactic acid bacteria during spontaneous curly kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) fermentation / M. Michalak, K. Gustaw, A. Wasko, M. Polak-Berecka // Microbiological Research. – 2018. – Vol. 206. – P. 121–130. DOI: 10.1016/j.micres.2017.09.011.

104. Mohan, V. R. Antinutritional factors in legume seeds: characteristics and determination / V. R. Mohan, P. S. Tresina, E. D. Daffodil // Agricultural and Food Sciences. – 2016. – P. 211–220. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00036-2.

105. Mokoena, M. P. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages / M. P. Mokoena, T. Mutanda, A. O. Olaniran // Food & Nutrition Research. – 2016. – Vol. 8. – № 60. DOI: 10.3402/fnr.v60.29630.

106. Möller, N. P. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects / N. P. Möller, K. E. Scholz-Ahrens, N. Roos, J. Schrezenmeir // European Journal of Nutrition. – 2008. – Vol. 47. – № 4. – P. 171–182. DOI: 10.1007/s00394-008-0710-2.

107. Montoya-Rodríguez, A. Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases / A. Montoya-Rodríguez, M. A. Gómez-Favela, C. Reyes-Moreno, J. Milán-Carrillo, E. Gonzálezde Mejía // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2015. – Vol. 14. – № 2. – P. 139–158. DOI: 10.1111/1541-4337.12125.

108. Mora, L. Cardioprotective cryptides derived from fish and other food sources: generation, application, and future markets / L. Mora, M. Hayes // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2015. – Vol. 63. – № 5. – P. 1319–1331. DOI: 10.1021/jf505019z.

109. Mulimani, V. H. Communication: Enzymatic degradation of raffinose family sugars in chickpea flour / V. H. Mulimani, Ramalingam // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 1997. – Vol. 13. – P. 583–585. DOI: 10.1023/a:1018529812482.

110. Muzquiz, M. Antinutritional factors / M. Muzquiz, J. A. Wood // In book: *Chickpea Breeding and Management*. Wallingford: CAB International. – 2007. – P. 143–166. DOI: 10.1079/9781845932138.006.

111. Naidu, A. S. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) / A. S. Naidu, W. R. Bidlack, R. A. Clemens // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 1999. – Vol. 39. – № 1. – P. 13–126. DOI: 10.1080/10408699991279187.

112. Obioha, P. I. Antimicrobial Resistance of Lactic Acid Bacteria from Nono, a Naturally Fermented Milk Product / P. I. Obioha, A. Anyogu, B. Awamaria, H. B. Ghodduji, L. I. I. Ouoba // *Antibiotics*. – 2023. – Vol. 12. – № 5. DOI: 10.3390/antibiotics12050843.

113. Pailin, T. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar / T. Pailin, D. H. Kang, K. Schmidt, D. Y. C. Fung // *Letters in Applied Microbiology*. – 2001. – Vol. 33. – № 1. – P. 45–49. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2001.00954.x.

114. Papadimitriou, K. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches / K. Papadimitriou, G. Zoumpopoulou, B. Folligné, V. Alexandraki, M. Kazou, B. Pot, [et al] // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 58. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00058.

115. Parada, J. L. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives / J. L. Parada, C. R. Caron, A. B. P. Medeiros, C. R. Soccol // *Brazilian archives of Biology and Technology*. – 2007. – Vol. 50. – P. 512–542. DOI: 10.1590/S1516-89132007000300018.

116. Paray, A. A. Gram staining: A brief review / A. A. Paray, M. Singh, M. A. Mir, A. Kaur // *International Journal of Research and Review*. – 2023. – Vol. 10. – P. 336–341. DOI: 10.52403/ijrr.20230934.

117. Pasquale, I. De. Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours / De. I. Pasquale, E. Pontonio, M. Gobbetti, C. Rizzello // *International Journal of Food Microbiology*. – 2020. – Vol. 316. – P. 108426. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108426

118. Patil, P. Isolation of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria from dairy products / P. Patil, A. Wadehra, K. Munjal, P. Behare // *Asian Journal of Dairy and Food Research*. – 2015. – Vol. 34. – № 4. – P. 280–284. DOI: 10.18805/ajdfr.v34i4.6878.

119. Pedroche, J. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases / J. Pedroche, M. M. Yust, H. Lqari, C. Megías, J. Giron-Calle, M. Alaiz, [et al] // *Food Research International*. – 2007. – Vol. 40. – № 7. – P. 931–938. DOI: 10.1016/j.foodres.2007.04.001.

120. Petrotchenko, E. V. Modern mass spectrometry-based structural proteomics / E. V. Petrotchenko, C. H. Borchers // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. – 2014. – Vol. 95. – P. 193–213. DOI: 10.1016/B978-0-12-800453-1.00006-3.

121. Pundir, R. K. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: An in vitro study / R. K. Pundir, S. Rana, N. Kashyap, A. Kaur // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2013. – Vol. 3(3). – P. 85–93. DOI: 10.7324/JAPS.2013.30317.

122. Pihlanto-Leppälä, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides / A. Pihlanto-Leppälä // *Trends in Food Science & Technology*. – 2000. – Vol. 11. – № 9–10. – P. 347–356. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00003-6.

123. Quinto, E. J. Probiotic lactic acid bacteria: A review / E. J. Quinto, P. Jiménez, I. Caro, J. Tejero, J. Mateo, T. Girbés // *Food and Nutrition Sciences*. – 2014. – Vol. 5. – № 18. – P. 1765–1775. DOI: 10.4236/fns.2014.518190.

124. Rachwat, R. D. Chickpeas composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review / R. D. Rachwat, E. Nebesny, G. Budryn // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2015. – Vol. 55. – № 8. – P. 1137–1145. DOI: 10.1080/10408398.2012.687418.

125. Ramachandran, R. Proteinases, their extracellular targets, and inflammatory signaling / R. Ramachandran, C. Altier, K. Oikonomopoulou, M.D. Hollenberg // *Pharmacological Reviews*. – 2016. – Vol. 68. – P. 1110–1142. DOI: 10.1124/pr.115.010991.

126. Rao, P. U. Tannin content of pulses: varietal differences and effects of germination and cooking / P. U. Rao, Y. G. Deosthale // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1982. – Vol. 33. – № 10. – P. 1013–1016. DOI: 10.1002/jsfa.2740331012.

127. Razzaq, A. Microbial proteases applications / A. Razzaq, S. Shamsi, A. Ali, Q. Ali, M. Sajjad, A. Malik, M. Ashraf // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 7. – № 110. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110.

128. Rebello, C. J. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities / C. J. Rebello, F. L. Greenway, J. W. Finley // *Obesity Reviews*. – 2014. – Vol. 15. – № 5. – P. 392–407. DOI: 10.1111/obr.12144.

129. Ricci, I. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity / I. Ricci, R. Artacho, M. Olalla // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2010. – Vol. 50. – № 5. – P. 390–402. DOI: 10.1080/10408390802304198.

130. Roy, A. Food processing methods towards reduction of antinutritional factors in chickpea / A. Roy, S. Ghosh, S. Kundagrami // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 8. – № 1. – P. 424–432. DOI: 10.20546/ijcmas.2019.801.044.

131. Sah, B. N. P. Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: a critical review / B. N. P. Sah, T. Vasiljevic, S. McKechnie, O. N. Donkor // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2015. – Vol. 14. – № 2. – P. 123–138. DOI: 10.1111/1541-4337.12126.

132. Saidi, Y. Polyphasic characterisation of non-starter lactic acid bacteria from Algerian raw Camel's milk and their technological aptitudes / Y. Saidi, B. del Rio, D. E. Senouci, B. Redruello, B. Martinez, V. Ladero, M. Kihal, M.A. Alvarez // *Food technology and biotechnology*. – 2020. – Vol. 58. – № 3. – P. 260. DOI: 10.17113/ftb.58.03.20.6598.
133. Samtiya, M. Plant food Anti-Nutritional Factors and Their Reduction Strategies: an Overview / M. Samtiya, R. E. Aluko, T. Dhewa // *Food Production, Processing and Nutrition*. – 2020. – Vol. 2. – P. 1–14. DOI:10.1186/s43014-020-0020-5.
134. Sánchez, A. Bioactive peptides: a review / A. Sánchez, A. Vázquez // *Food Quality and Safety*. – 2017. – Vol. 1. – № 1. – P. 29–46. DOI: 10.1093/fqsafe/fyx006.
135. Sánchez-Chino, X. Nutrient and nonnutrient components of legumes, and its chemopreventive activity: a review / X. Sánchez-Chino, C. Jiménez-Martínez, G. Dávila-Ortiz, I. Álvarez-González, E. Madrigal-Bujaidar // *Nutrition and Cancer*. – 2015. – Vol. 67. – № 3. – P. 401–410. DOI: 10.1080/01635581.2015.1004729.
136. Sánchez-Chino, X. M. Protective effect of chickpea protein hydrolysates on colon carcinogenesis associated with a hypercaloric diet / X. M. Sánchez-Chino, C. J. Martínez, E. B. León-Espinosa, L. Garduño- Siciliano, I. Álvarez-González, [et al.] // *Journal of the American College of Nutrition*. – 2019. – Vol. 38. – № 2. – P. 162–170. DOI: 10.1080/07315724.2018.1487809.
137. Sanjukta, S. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits / S. Sanjukta, A. K. Rai // *Trends in Food Science & Technology*. – 2016. – Vol. 50. – P. 1–10. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.01.010.
138. Savijoki, K. Proteolytic systems of lactic acid bacteria / K. Savijoki, H. Ingmer, P. Varmanen // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2006. – Vol. 71. – P. 394–406. DOI: 10.1007/s00253-006-0427-1.
139. Schmitt, C. Plant Proteins and Their Colloidal State / C. Schmitt, L. Bovetto, J. Buczkowski, G. De Oliveira Reis, P. Pibarot, L. Amagliani, J. Dombrowski // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. – 2021. – Vol. 56. – P. 101510. DOI: 10.1016/j.cocis.2021.101510.

140. Seibold, E. Identification of *francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels / E. Seibold, T. Maier, M. Kostrzewa, E. Zeman, W. Splettstoesser // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol. 48. – № 4. – P. 1061–1069. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.

141. Sethi, S. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review / S. Sethi, S. K. Tyagi, and R. K. Anurag // *Journal of Food Science and Technology*. – 2016. – Vol. 53. – P. 3408-3423. DOI: 10.1007/s13197-016-2328-3.

142. Sharma, M. A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches / M. Sharma, Y. Gat, S. Arya, V. Kumar, A. Panghal, A. Kumar // *Industrial Biotechnology*. – 2019. – Vol. 15. – № 2. – P. 69–78. DOI: 10.1089/ind.2018.0032.

143. Sharma, P. Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* sp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations / P. Sharma, S. K. Tomar, V. Sangwan, P. Goswami, R. Singh // *Journal of Food Safety*. – 2016. – Vol. 36. – № 1. – P. 38–51. DOI:10.1111/jfs.12211.

144. Shi, W. Evaluation of hypolipidemic peptide (Val-Phe-Val-Arg-Asn) virtual screened from chickpea peptides by pharmacophore model in high-fat diet-induced obese rat / W. Shi, T. Hou, D. Guo, H. He // *Journal of Functional Foods*. – 2019. – Vol. 54. – P. 136-145. DOI: 10.1016/j.jff.2019.01.001.

145. Shukla, R. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds / R. Shukla, P. Singh, B. Prakash, N.K. Dubey // *Food Control*. – 2012. – Vol. 25. – № 1. – P. 27–33. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.010.

146. Singh, J. A critical review on PCR, its types and applications / J. Singh, N. Birbian, Sh. Sinha, A. Goswami. J // *International Journal of Current Research in Biological Sciences*. – 2014. – Vol. 1. – № 7. – P. 65–80. ISSN: 2348-8069.

147. Singhal, K. Bile and acid tolerance ability of probiotic *Lactobacillus* strains / K. Singhal, H. Joshi, B.L. Chaudhary // Journal of Global Pharma Technology. – 2010. – Vol. 2. – № 12. – P. 17–25.

148. Sinha, S. K. Condensed tannin: a major anti-nutritional constituent of faba bean (*Vicia faba* L.) / S. K. Sinha, K. Amresh // Horticulture International Journal. – 2018. – Vol. 2. – № 2. – P. 32–33. DOI: 10.15406/hij.2018.02.00022.

149. Smid, E. J. Functional Genomics for Food Fermentation Processes / E. J. Smid, J. Hugenholtz // Annual Review of Food Science and Technology. – 2010. – Vol. 1. – № 1. – P. 497–519. DOI: 10.1146/annurev.food.102308.124143.

150. Sipos, R. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis / R. Sipos, M. Palatinszky, S. Revesz, K. Marialigeti, M. Nikolausz // FEMS Microbiology Ecology. – 2007. – Vol. 60. – P. 341–350. DOI:10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x.

151. Strahinic, I. The presence of *prtP* proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3-18 / I. Strahinic, M. Kojic, M. Tolinacki, D. Fira, L. Topisirovic // Letters in Applied Microbiology. – 2010. – Vol. 50. – № 1. – P. 43–49. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2009.02748.x.

152. Sun, F. Production, purification and biochemical characterization of the microbial protease produced by *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages / F. Sun, Y. Hu, X. Yin, B. Kong, L. Qin // Process Biochemistry. – 2020. – Vol. 89. – P. 37–45. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.10.029.

153. Sun, F. Purification and biochemical characteristics of the microbial extracellular protease from *Lactobacillus curvatus* isolated from Harbin dry sausages / F. Sun, Q. Sun, H. Zhang, B. Kong, X. Xia // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 133. – P. 987–997. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.169.

154. Tangyu, M. Genome-based selection and application of food-grade microbes for chickpea milk fermentation towards increased l-lysine content, elimination of indigestible sugars, and improved flavor / M. Tangyu, M. Fritz, R. Aragao-Börner, L. Ye,

B. Bogicevic, J. Christoph // *Microbial Cell Factories*. – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 109. DOI: 10.1186/s12934-021-01595-2.

155. Todorov, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action / S. D. Todorov // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2009. – Vol. 40. – P. 209–221. DOI: 10.1590/S1517-83822009000200001.

156. Toe, C. J. Extracellular proteolytic activity and amino acid production by lactic acid bacteria isolated from Malaysian foods / C. J. Toe, H. L. Foo, T. C. Loh, R. Mohamad, R. Abdul Rahim, Z. Idrus // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 7. – P. 1777. DOI: 10.3390/ijms20071777.

157. Tortoli, E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium* / E. Tortoli // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2014. – Vol. 27. – № 4. – P. 727–752. DOI: 10.1128/CMR.00035-14.

158. Uhlig, E. Use of bacterial strains antagonistic to *Escherichia coli* for biocontrol of spinach: A field trial / E. Uhlig, A. Kjellstrom, N. Nurminen, C. Olsson, E. Oscarsson, P. Canaviri-Paz, L. Mogren, [et al] // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. – 2021. – Vol. 74. – № 102862. DOI: 10.1016/j.ifset.2021.102862.

159. Vuyst, L. De. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications / L. De Vuyst, Leroy F // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – Vol. 13. – № 4. – P. 194–199. DOI: 10.1159/000104752.

160. Wallace, T. C. The nutritional value and health benefits of chickpeas and hummus / T. C. Wallace, R. Murray, K. M. Zelman // *Nutrients*. – 2016. – Vol. 8. – № 766. DOI: 10.3390/nu8120766.

161. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research / J. Walter // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74. – № 16. – P. 4985–4996. DOI: 10.1128/AEM.00753-08.

162. Wang, K. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China / K. Wang, H. Zhang, J. Feng, L. Ma, C. de la. Fuente-Núñez,

S. Wang, X. Lu // Journal of Agriculture and Food Research. – 2019. – Vol. 1. – № 100006. DOI:10.1016/j.jafr.2019.100006.

163. Wang, N. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.) / N. Wang, D.W. Hatcher, R. T. Tyler, R. Toews, E. Gawalko // Food Research International. – 2010. – Vol. 43. – № 2. – P. 589–594. DOI: 10.1016/j. foodres.2009.07.012.

164. Wang, X. Subunit, amino acid composition and *in vitro* digestibility of proteins isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars / X. Wang, W. Gao, J. Zhang [et al.] // Food Research International. – 2010. – Vol. 43. – № 2. – P. 567–572. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.07.018.

165. Waśko, A. Purification and characterization of a proteinase from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* OXY / A. Waśko, M. Kieliszek, Z. Targoński // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2012. – Vol. 42. – № 5. – P. 476–488. DOI: 10.1080/10826068.2012.656869.

166. Worsztynowicz, P. Integrated approach for obtaining bioactive peptides from whey proteins hydrolysed using a new proteolytic lactic acid bacteria / P. Worsztynowicz, W. Białas, W. Grajek // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 312. – № 126035. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.126035.

167. Xiaoli, X. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography / X. Xiaoli, Y. Liyi, H. Shuang, L. Wei, S. Yi, M. Hao, Z. Xiaoxiong // Food Chemistry. – 2008. – Vol. 111. – № 1. – P. 215–219. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.039.

168. Yadav, R. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage raabadi / R. Yadav, A. K. Puniya, P. Shukla // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – № 1683. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01683.

169. Zhang, J. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide / J. Zhang, H. Zhang, L. Wang, X. Guo, X. Wang, H. Yao // European Food Research and Technology. – 2009. – Vol. 229. – P. 709–719. DOI: 10.1007/s00217-009-1103-3.

170. Zhang, X. Influence of lactic acid bacteria fermentation on physicochemical properties and antioxidant activity of chickpea Yam Milk / X. Zhang, S. Zhang, B. Xie, Z. Sun // *Journal of Food Quality*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1–9. – № 5523356. DOI: 10.1155/2021/5523356.

171. Zhang, X. Insight into the influence of lactic acid bacteria fermentation on the variations in flavor of chickpea milk / X. Zhang, W. Tian, B. Xie, Z. Sun // *Foods*. – 2022. – Vol. 11. – № 16. DOI: 10.3390/foods11162445.

172. Zhang, Y. Effects of ciceritol from chickpea on human colonic microflora and the production of short chain fatty acids by in vitro fermentation / Y. Zhang, D. Su, J. He, Z. Dai, A. Riaz, S. Ou [et al] // *LWT-Food Science and Technology*. – 2017. – Vol. 79. – P. 294–299. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.01.040.

173. Zvereva, E.A. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products / E.V. Zvereva, L.I. Kovalev, A.V. Ivanov, M.A. Kovaleva, A.V. Zherdev, S.S. Shishkin, A.B. Lisitsyn, I.M. Chernukha, B.B. Dzantiev // *Meat Science*. – 2015. – V. 105. – P. 46–52. DOI: 10.1016/j.meatsci.2015.0.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Удостоверение о депонировании штаммов



Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

23.04.2024 г

Кому: ФГБОУ ВО "Российский
Биотехнологический Университет"

УДОСТОВЕРЕНИЕ

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) удостоверяет, что следующие штаммы:

<i>Levilactobacillus brevis</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14052
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14055
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14056
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14057
<i>Lactobacillus plantarum</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14058
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14059
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14060
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	регистрационный номер ВКПМ В-14061

действительно депонированы в БРЦ ВКПМ (категория «хранение») и могут быть выданы по запросу.

Руководитель БРЦ ВКПМ
Проф.



Синеокий С.П.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2**Справка о национальном патентном депонировании*****Latilactobacillus sakei* SD-8**

Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

14053

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ**СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ**

Биоресурсный центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатowski институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Latilactobacillus sakei SD-8

Дата депонирования: 10 июня 2024 года

Депозитор: ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ

Продукт, продуцируемый штаммом (область применения штамма): молочная кислота, протеазы

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14053

Руководитель БРЦ ВКПМ
Проф.



Синеокий С.П.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Справка о национальном патентном депонировании

Limosilactobacillus fermentum SB-2

Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

14054

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатowski институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Limosilactobacillus fermentum SB-2

Дата депонирования: 10 июня 2024 года

Депозитор: ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ

Продукт, продуцируемый штаммом (область применения штамма): молочная кислота, протеазы

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14054

Руководитель БРЦ ВКПМ
Проф.



Синеокий С.П.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Проект ТУ производства «Препарат бактериальный «ЛактоЛек» (ТУ 9229-014-.....-2024)

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»**

ОКП 92 2900

Группа Н18
(ОКС 07.100.30)

СОГЛАСОВАНО
Федеральная служба по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
Санитарно-эпидемиологическое

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «Российский
биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)»

№ _____

от «—» — 2024 г.



Г.И. Ефремова

2024 г.

**ПРЕПАРАТ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СУХОЙ
«ЛактоЛек»
для производства ферментированного нутевого напитка
Технические условия
ТУ 9229-014-.....-2024**

Дата введения в действие — 2024 г.

Научный сотрудник ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ
_____ М. Ахангаран
«—» — 2024 г.

Доцент кафедры «Биотехнология и технология
продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО
РОСБИОТЕХ
_____ И.А. Фоменко
«—» — 2024 г.

Профессор кафедры «Биотехнология и
технология продуктов биоорганического синтеза»
ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ
_____ Н.Г. Машенцева
«—» — 2024 г.

Москва
2024

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Проект ТИ производства «Препарат бактериальный «ЛактоЛек»

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»**

ОКП 92 2900

Группа Н18
(ОКС 07.100.30)

СОГЛАСОВАНО

Федеральная служба по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
Санитарно-эпидемиологическое
заключение

№ _____

от « _____ » _____ 2024 г.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «Российский
биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)»

Г.И. Ефремова

_____ 2024 г.



**ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
на препарат бактериальный сухой «ЛактоЛек»
для производства ферментированного нутového напитка**

Дата введения в действие –

2024 г.

Научный сотрудник ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ

_____ М. Ахангаран

« _____ » _____ 2024 г.

Доцент кафедры «Биотехнология и технология
продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО
РОСБИОТЕХ

_____ И.А. Фоменко

« _____ » _____ 2024 г.

Профессор кафедры «Биотехнология и технология
продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО
РОСБИОТЕХ

_____ Н.Г. Машенцева

« _____ » _____ 2024 г.

Москва
2024

ТУ 9229-014.....-2024

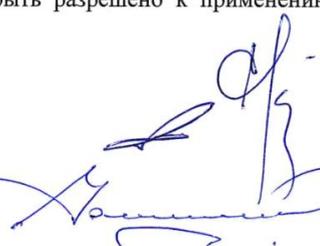
5.4. Все данные по производству закваски и бакпрепарата записывают в технический журнал по прилагаемой форме (приложения 1, 2, 3).

5.5. Все данные по контролю бакпрепарата записывают в журнал по контролю качества бакпрепаратов (приложение 4).

5.6. Установку заданий систем автоматического управления технологическим процессом производства проводят по номинальным значениям параметров и показателей, указанным в технологической инструкции.

5.7. Технологическое оборудование, соответствующее технической документации и сертификатам соответствия, должно быть разрешено к применению в производстве пищевых продуктов.

Проректор по научной работе
РОСБИОТЕХ



Г.И. Ефремова

Научный сотрудник РОСБИОТЕХ

М. Ахангаран

Доцент кафедры «Биотехнология и
технология продуктов биооргани-
ческого синтеза» РОСБИОТЕХ



И.А. Фоменко

Профессор кафедры «Биотехнология и
технология продуктов биооргани-
ческого синтеза» РОСБИОТЕХ



Н.Г. Машенцева

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Уведомление о приеме регистрации заявки на патент

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Березовский наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

19.06.2024	038013	2024116892
Дата поступления	Входящий №	Регистрационный №

ПОЛУЧЕНО		
ДАТА ПРИЕМЛЕНИЯ (Дата регистрации) <input type="checkbox"/> (98) <input type="checkbox"/> (97) <input type="checkbox"/> (96)	ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ № (ИД) ДАТА ПЕРЕВОДА	ВОДОУЧЕТНЫЙ № (ИД) ДАТА ПЕРЕВОДА
АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕНЕСЕНИЯ (ИД) АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕНЕСЕНИЯ АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ	
ЗАЯВЛЕНИЕ О ВЫДАЧЕ ПАТЕНТА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ	В Федеральную службу по интеллектуальной собственности (Роспатент) Березовский наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
(34) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Препарат бактериальный протеолитический для производства ферментированного шутового напитка	ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВКИ ОГРН 1037739511499 ИНН (при наличии) 774301004 ИНН (при наличии) 771232560 СПИДС (при наличии) ДОКУМЕНТ, удостоверяющий личность (при наличии) КОД СТРАНЫ (при наличии)	
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (индивидуальное физическое или юридическое лицо, гражданин Российской Федерации, иностранец или лицо без гражданства или автор в пределах срока, указанного в заявке (патенте) и в течение срока действия патента) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» (РБ), Вильямовское шоссе, 11, Москва, Россия, 125993 <input type="checkbox"/> индивидуальное физическое лицо <input type="checkbox"/> государственному учреждению <input type="checkbox"/> муниципальному учреждению <input type="checkbox"/> государственному предприятию <input type="checkbox"/> государственному учреждению <input type="checkbox"/> государственному учреждению <input type="checkbox"/> государственному учреждению <input type="checkbox"/> государственному учреждению <input type="checkbox"/> государственному учреждению	КОД СТРАНЫ (при наличии)	

Общее количество документов в листах	41	Листы, зарегистрировавшие документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Мышапова Д.Ю.
Количество платёжных документов	0	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: www.fips.ru/register-web		

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Акт промышленной выработки бактериального препарата


**Общество с ограниченной ответственностью
«ПромБиоТехнологии»**

3301842, Тульская область, г. Ефремов, тер. Завода ПромБиТ, зд. 1, оф. 21, тел. 8(960)600-11-22
ИНН 7113008589 / КПП 711301001



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ПромБиоТехнологии»

А.О. Лушников

« 07 » август 2023 г.

АКТ

промышленной выработки бактериального препарата

Технология бактериального препарата «ЛактоЛек», представляющего собой консорциум молочнокислых микроорганизмов *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (ВКПМ В-14054) и *Latilactobacillus sakei* SD-8 (ВКПМ В-14053), разработана на кафедре «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет» (ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»)

Испытания проводили на опытно-промышленной технологической линии ООО «ПромБиоТехнологии» (Россия, Тульская обл. г. Ефремов)

Испытательная комиссия в составе представителей:

От ООО «ПромБиоТехнологии»

Директор по развитию
Руководитель научной группы, к.т.н.
Ведущий инженер-микробиолог, к.т.н.

А.М. Самойлов
А.В. Сергеева
Е.М. Мордвинова

От ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»

Профессор кафедры БТиТПБОС, д.т.н.
Доцент кафедры БТиТПБОС, к.т.н.
Аспирант кафедры БТиТПБОС

Н.Г. Машенцева
И.А. Фоменко
М. Ахангаран

Настоящий акт составлен о том, что в период с 2023 по 2024 г. на опытно-промышленной линии ООО «ПромБиоТехнологии» было получено 5 кг бактериального препарата, представляющего собой лиофильно высушенную смесь штаммов *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 (ВКПМ В-14054) и *Latilactobacillus sakei* SD-8 (ВКПМ В-14053). Препарат был получен по технологии разработанной ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» в ферментере с геометрическим объемом 30 дм³. Для получения достоверных данных о ходе ферментации было проведено 2 технических и 2 биологических запуска ферментера, после обработки данных о ферментации была проведена наработка бактериального препарата в количестве 5 кг.

ПромБиТ

Иновационные Биотехнологии

«...от Идеи до Реализации...»

Полученный препарат был проверен на микробиологические показатели и соответствие требованиям ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» для БАД – сухих на основе чистых культур пробиотических микроорганизмов.

Для наработки биомассы *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 и *Latilactobacillus sakei* SD-8 осуществлялась подготовка питательных сред следующего состава: сыворотка молочная подсырная, дрожжевой экстракт, натрий лимоннокислый трехзамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный, марганец сернокислый, магний сернокислый, аммоний лимоннокислый трехзамещенный, молоко обезжиренное сухое, кислота аскорбиновая, кислота никотиновая, цианокобаламин, молоко обезжиренное, вода питьевая, водный раствор аммиака с массовой долей аммиака 25%. Устанавливали активную кислотность среды $5,5 \pm 0,2$ ед. pH раствором гидроокиси натрия. Питательную среду стерилизовали при давлении 0,08 МПа, что соответствует температуре 118 ± 2 °С с выдержкой 60 ± 5 мин и охлаждали до температуры 37 ± 2 °С.

В охлажденную до 37 ± 2 °С питательную среду вносили закваску *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 и *Latilactobacillus sakei* SD-8 в количестве 5% от массы среды. Культивирование проводили в течение 16 ± 2 ч. После окончания процесса культивирования питательную среду охлаждали до температуры 4 ± 2 °С и направляли на центрифугирование. Биомассу в асептических условиях смешивали в предварительно продезинфицированном смесителе с протекторной средой в атмосфере азота или воздуха в соотношении 1:1. Протекторная среда состояла из 10% сахарозы, 52,5% обезжиренного молока, 22% желатина, 15% лимоннокислого натрия и 0,5% никотиновой кислоты. Суспензию клеток в асептических условиях разливали на стерильные лотки толщиной слоя 5 ± 2 мм. Лотки закрывали стерильными марлевыми салфетками и обхватывали стерильными резиновыми зажимами. Замораживание суспензии клеток на лотках проводили при температуре минус 35 ± 5 °С в течение $4,5 \pm 0,5$ ч – для *Limosilactobacillus fermentum* SB-2 и *Latilactobacillus sakei* SD-8. Высушивание суспензии клеток осуществляли в лиофильной установке при следующих режимах:

температура в начале процесса	– минус (35 ± 5) °С;
температура, в конце процесса	– (30 ± 5) °С;
температура конденсатора	– минус (55 ± 5) °С;
остаточное давление	– от 1,3 до 1,6 Па;
продолжительность процесса	– (18 ± 2) ч.

Результаты выработки бактериального препарата позволяют сделать вывод о возможности реализации предложенной ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» технологии получения бактериального препарата в промышленных условиях, а также могут быть рекомендованы к внедрению.

Директор по развитию

А.М. Самойлов

Руководитель научной группы, к.т.н.

А.В. Сергеева

Ведущий инженер-микробиолог, к.т.н.

Е.М. Мордвинова

Профессор кафедры БТиТПБОС, д.т.н.

Н.Г. Манянцева

Доцент кафедры БТиТПБОС, к.т.н.

И.А. Фоменко

Аспирант кафедры БТиТПБОС

М. Ахангаран

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

**Акт опытной выработки напитков молочносодержащих сквашенных
с экстрактом нута**



Генеральному директору
ООО «ЖУКОВОМОЛОКО»

Савинов Я.М.

«15» февраля 2024 г.

**Акт
опытной выработки напитков молочносодержащих сквашенных с
экстрактом нута**

Комиссия в составе:

Микробиолог ООО «ЖУКОВОМОЛОКО»

Начальник производства

Представители ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»:

Профессор, д.т.н., профессор кафедры Биотехнология и
технология биоорганического синтеза

Аспирант кафедры Биотехнология и
технология биоорганического синтеза

провела 05 и 06 февраля 2024 г на базе ООО «ЖУКОВОМОЛОКО» выработку опытных партий напитков молочносодержащих сквашенных с экстрактом нута в количестве по 100 кг каждого: напиток молочносодержащий с экстрактом нута, сквашенный композицией № 1 (*Limosilactobacillus fermentum* SB-2 + *Latilactobacillus sakei* SD-8) и напиток молочносодержащий с экстрактом нута, сквашенный композицией № 2 (*Lactiplantibacillus plantarum* PC-7 + *Leuconostoc mesenteriodes* CH-5). В качестве контроля были было сквашено коровье молоко этими же композициями. Нуттовый напиток на молочной основе ферментировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. В ходе определения активности кислотообразования во всех образцах было отмечено активное повышение кислотности, что свидетельствует о ферментации напитков выбранными штаммами.

Производственной лабораторией установлено соответствие физико-химических и органолептических показателей продукта требованиям регламентирующих документов. Лучшие результаты показал напиток молочносодержащий с экстрактом нута, сквашенный композицией штаммов № 1 в течение 24 ч: по консистенции, цвету и запаху он полностью соответствовал требованиям регламентирующих документов. Напиток, сквашенный композицией № 2, проигрывал по органолептическим показателям, поскольку имел бобовое послевкусие и обладал легким бобовым запахом

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

Комиссия отмечает экономическую целесообразность производства данных продуктов на предприятии ООО «ЖУКОВОМОЛОКО».

Микробиолог ООО «ЖУКОВОМОЛОКО»

Начальник производства ООО «ЖУКОВОМОЛОКО»

Представители ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»:

Профессор, д.т.н., профессор

Аспирант

MB

Морозова О.И.

MB

Шевченко Е.И.

MB

Машенцева Н.Г.

MB

Ахангаран М.

MB

Морозова О.И.

MB

Шевченко Е.И.

MB

Машенцева Н.Г.

MB

Ахангаран М.

ПРИЛОЖЕНИЕ 10

Диплом участника Международного биотехнологического форума



ПРИЛОЖЕНИЕ 11

Диплом участника Международного биотехнологического форума



ПРИЛОЖЕНИЕ 12

Диплом участника Национальной научно-практической конференции

**РОСБИОТЕХ**РОССИЙСКИЙ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

СЕРТИФИКАТ

награждается

**Ахангаран
Махбубех***аспирант направления 19.06.01 – Промышленная экология
и биотехнология ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»*за участие в III Национальной научно-практической
конференции **«Инновации в биотехнологии»****Т. Ю. Макарова**Директор Института биотехнологии
и глобального здоровья

г. Москва, 18 мая 2023 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ 13

Диплом участника Национальной научно-практической конференции

