УДК 005.3:[60:637.146]

ИННОВАЦИОННЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ БИОТЕХНОЛОГИЙ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР

А.Ю. Просеков[1], Л.А. Остроумов[2,*]

[1] *ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650043, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6*

[2] *ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47*

**e-mail: bionano_kem@mail.ru*

Дата поступления в редакцию: 09.06.2016
Дата принятия в печать: 20.09.2016

По оценкам экспертов, одним из инновационных направлений развития пищевой биотехнологии является разработка биотехнологических подходов к производству пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков, заквасок и пищевых ингредиентов, новых штаммов молочнокислых и других технологических микроорганизмов, микробных консорциумов с заданными биологическими свойствами и оптимизированными технологическими характеристиками. Включение в состав продуктов питания поликомпонентных пробиотических консорциумов – бактериальных препаратов из культур молочнокислых бактерий – может стать основой для профилактики различных заболеваний. Эксперты прогнозируют к 2017 г. начало выпуска в России продуктов с доказанной пробиотической эффективностью, а к 2020 г. – их массовое производство. Использование молочнокислых бактерий в качестве заквасочных культур прямого внесения, обладающих спектром необходимых характеристик, позволит улучшить функционально-технологические и потребительские свойства кисломолочных продуктов. В работе изучены физиолого-биохимические и промышленно ценные свойства штаммов молочнокислых бактерий при создании комбинированных заквасок прямого внесения с высокой протеолитической активностью. На основании проведенных исследований установлено, что молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis subspecies cremoris* B 2276, *Lactobacillus plantarum* B 3242, *Lactococcus lactis* B 5946 и *Leuconostoc mesenteroides subspecies mesenteroides* B 8404 обладают высокой протеолитической активностью, способствуя образованию в молоке низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот, и проявляют высокую антагонистическую активность по отношению к санитарно-значимым кишечным микроорганизмам (*Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Escherichia coli*). Результаты изучения биосовместимости показали отсутствие ингибирующего эффекта, что позволяет использовать их для приготовления комбинированной закваски прямого внесения.

Инновационные продукты питания, закваски прямого внесения, протеолитическая активность

Введение

Важнейшей составной частью современного менеджмента становятся инновации – процесс постоянного обновления во всех сферах предпринимательства. Структура российской экономики в последнее время претерпевает существенные изменения. Наряду с экспортно-ориентированными сырьевыми отраслями промышленности приоритет отдается предприятиям, производящим наукоемкую продукцию. Хотя последних и незначительное количество, но наблюдается тенденция к увеличению их доли в структуре российской экономики. Этому способствует грамотная государственная политика в области инноваций [1].

Согласно американским оценкам, по своему экономическому потенциалу биотехнологии занимают второе место после информационных технологий. К 2025 г. они, вероятно, будут обеспечивать до 20 % ВВП. Интенсивное развитие биотехнологий обусловлено не только успехами биохимии и молекулярной биологии, но и кризисом традиционных технологий, необходимостью обеспечения продовольственной безопасности, сохранения ресурсного потенциала, увеличения продолжительности жизни населения, поддержания здорового генофонда нации. Наличие серьезных научных заделов и опытных разработок даст возможность уже в ближайшие годы существенно расширить масштабы использования биотехнологий для массового производства продукции с новыми свойствами [2].

Как показывает анализ, в ближайшее время биотехнологии будут наиболее востребованы в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, производстве химикатов и биотоплива.

Биотехнологические процессы получения биологически активных соединений, основанные на направленной модификации путей метаболизма организма-продуцента методами метаболической инженерии, интенсифицируют производство аминокислот, витаминов, антибиотиков, ферментов, рекомбинантных белков и др. Значительно более высокая эффективность новых методов метаболической инженерии и биоинженерии по сравнению с традиционными способами (случайным мутагенезом и др.) приводит к снижению стоимости продукта и тем самым обеспечивает условия для его массового применения в различных отраслях [3].

Передовые позиции в разработке радикальных инновационных продуктов и услуг принадлежат ученым из США, Европы и Японии. В частности, в США активно развивается область генетической инженерии растений. Исследования, направленные

на создание биотехнологических сортов без использования трансгенеза и биотехнологических процессов получения рекомбинантных белков в растениях и животных, развиваются более интенсивно в европейских странах. Уровень российских исследований по большинству радикальных биотехнологических продуктов серьезно уступает мировому, однако существует ряд отечественных разработок, востребованных за рубежом (например, генно-инженерные штаммы – продуценты аминокислот и витаминов).

По оценкам экспертов, одним из инновационных направлений развития пищевой биотехнологии является разработка биотехнологических подходов к производству пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков, заквасок и пищевых ингредиентов, новых штаммов молочнокислых и других технологических микроорганизмов, микробных консорциумов с заданными биологическими свойствами и оптимизированными технологическими характеристиками [4].

В 2015 г. на конгрессе Федерации европейских микробиологических обществ (FEMS) была выдвинута концепция о включении в состав продуктов питания поликомпонентных пробиотических консорциумов. При регулярном использовании пробиотики регулируют и стимулируют пищеварение, усиливают иммунитет, повышают колонизационную резистентность кишечника, предотвращают развитие аллергических осложнений. Эффективность поликомпонентных пробиотических консорциумов зависит от многих факторов, в том числе физиологических особенностей человека, наличия хронических и острых заболеваний и др.

Эксперты прогнозируют к 2017 г. начало выпуска в России продуктов с доказанной пробиотической эффективностью, а к 2020 г. – их массовое производство. Исследователи по всему миру ведут поиск новых штаммов молочнокислых бактерий с целью создания на их основе более активных пробиотических препаратов, причем для регулярного потребления, то есть в составе продуктов питания.

Включение в состав продуктов питания поликомпонентных пробиотических консорциумов – бактериальных препаратов из культур молочнокислых бактерий – может стать основой для профилактики различных заболеваний.

Целью работы является создание симбиотического консорциума молочнокислых бактерий, обладающих наибольшей протеолитической активностью, для использования в составе комбинированной закваски прямого внесения для получения кисломолочных продуктов.

Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований использованы штаммы молочнокислых бактерий, относящихся к родам *Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus,* предоставленных ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика». Молочнокислые бактерии культивировали на стерильном обезжиренном молоке, соответствующем требованиям ГОСТ Р 52090-2003. Сквашивание проводили в термостате при температурах, оптимальных для каждого штамма. Определение титруемой кислотности осуществляли в соответствии с ГОСТ 3624-92, активной кислотности в соответствии с ГОСТ 26781.

Определение протеолитической активности молочнокислых бактерий основано на учете накопления продуктов гидролиза казеина, растворимых в 1,125 М трихлоруксусной кислоте через определенный промежуток времени от начала реакции.

Фракционный состав гидролизатов белков молока определяли методом высокоэффективного электрофореза в ультратонком слое полиакриламидного геля.

Определение антибиотической активности молочнокислых бактерий осуществляли методом перпендикулярных штрихов и методом блоков.

Результаты и их обсуждение

На основании совокупной оценки физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий для создания симбиотического консорциума из коллекции ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика» отобраны следующие штаммы: *Lactococcus lactis subspecies cremoris* B 2276, *Lactobacillus plantarum* B 3242, *Lactococcus lactis* B 5946 и *Leuconostoc mesenteroides subspecies mesenteroides* B 8404.

При изучении изменения активной и титруемой кислотности в процессе сквашивания молока четырьмя выбранными штаммами молочнокислых бактерий установлено, что в течение шести часов сквашивания наблюдается рост кислотности в среднем в 3,2 раза. Предельная кислотообразующая способность в молоке для этих штаммов составляет (120±1) °Т.

Одной из важнейших характеристик, определяющих производственную ценность молочнокислых бактерий, является протеолитическая активность. Все более очевидной становится роль протеолитических процессов, осуществляемых молочнокислыми бактериями в формировании качественных показателей и биологической ценности кисломолочных продуктов.

У молочнокислых бактерий обнаружены как внутриклеточные, так и внеклеточные протеазы. Наиболее активный протеолиз наблюдается в ранние часы развития культуры, что свидетельствует о том, что белок расщепляется в молоке в основном ферментами растущей клетки. В данной работе изучали протеолитическую активность штаммов молочнокислых бактерий и изменение фракций растворимых азотистых соединений при культивировании на обезжиренном молоке в течение 12 ч (табл. 1).

Таблица 1

Протеолитическая активность штаммов молочнокислых микроорганизмов

Номер штамма	Протеолитическая активность, Е/мг белка	Изменение фракций растворимых азотистых соединений		
		белки, мг/100 г	пептиды, мг/100 г	аминокислоты, мг/100 г
В 3242	1984,0±99,2	157,5±7,8	176,3±7,8	6,7±0,1
В 2276	986,0±49,3	201,8±7,0	78,0±0,4	3,9±0,1
В 5946	1109,0±55,4	183,8±7,8	104,3±0,5	4,3±0,1
В 8404	1344,0±67,9	177,0±7,9	123,8±0,6	5,7±0,1

На основании проведенных исследований установлено, что протеолитическая активность четырех рассматриваемых штаммов молочнокислых бактерий находится в диапазоне от 986,0 до 1984,0 Е/мг белка. При этом с увеличением протеолитической активности отмечается убыль белков и увеличение содержания пептидов и аминокислот.

Установлена корреляция между активностью протеолиза и активностью кислотообразования у штаммов мезофильных молочнокислых стрептококков (*L. lactis* В 5946, *L. mesenteroides* В 8404, *L .lactis* В 2276). Наибольшей протеолитической активностью обладает представитель рода *Lactobacillus – Lactobacillus plantarum* В 3242.

На рис. 1 и в табл. 2 приведены результаты исследования фракционного состава гидролизатов белков молока, образующихся под действием протеолитических ферментов штаммов *Lactococcus lactis* В 5946, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* В 8404, *Lactobacillus plantarum* В 3242 и *Lactococcus lactis subsp. cremoris* В 2276.

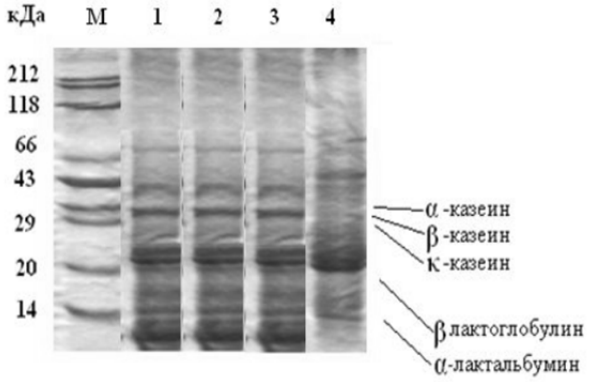

Рис. 1. Электрофореграмма гидролизатов белков обезжиренного молока, ферментированного молочнокислыми бактериями в течение 12 ч: М – маркер;
1 – *Lactococcus lactis* В 5946;
2 – *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* В 8404;
3 – *Lactobacillus plantarum* В 3242;
4 – *Lactococcus lactis subsp. cremoris* В 2276

Анализ данных рис. 1 и табл. 2 позволяет сделать вывод о высокой способности исследуемых штаммов молочнокислых бактерий гидролизовать белки молока до низкомолекулярных фракций (молекулярная масса 20 кДа и менее). При этом на казеиновую фракцию белков обезжиренного молока наибольшее воздействие оказывают ферментные системы *Lactococcus lactis* В 5946, *Leuconostoc mesenteroides subspecies mesenteroides* В 8404 и *Lactobacillus plantarum* В 3242, а на сывороточные белки – *Lactococcus lactis subspecies cremoris* В 2276.

Таблица 2

Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов, образующихся при ферментации обезжиренного молока штаммами молочнокислых бактерий в течение 12 ч

№ п/п	Молекулярная масса, кДа	Относительное содержание фракций, %			
		В 5946	В 8404	В 3242	В 2276
1	212–118	0,1	0,3	0,1	0,6
2	118–66	0,4	0,8	1,1	1,5
3	66–43	3,5	4,6	3,2	9,8
4	43–29	3,8	5,5	4,6	2,2
5	29–20	36,7	36,3	36,1	41,5
6	20–14	15,9	10,7	9,7	30,4
7	Менее 14	39,6	41,8	45,2	14,0

Характерной особенностью молочнокислых бактерий является подавление роста условно-патогенных бактерий, плесневых грибов и дрожжей и других микроорганизмов.

В ходе проведенных экспериментов установлено, что исследуемые штаммы молочнокислых бактерий проявляли высокую антагонистическую активность по отношению к санитарно-значимым кишечным микроорганизмам (*Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*), образуя зоны подавления роста тест-культур диаметром более 20 мм (табл. 3).

Изучение межштаммовых взаимодействий молочнокислых бактерий является важным аспектом для дальнейшей работы по созданию функциональных продуктов питания на их основе. При проявлении бионесовместимости или сильного антагонизма штаммов по отношению друг к другу возможно влияние на антимикробные свойства микроорганизмов, что исключает составление консорциума из данных штаммов [7].

Определение биосовместимости осуществляли путем совместного культивирования штаммов молочнокислых бактерий на плотной питательной среде при температуре (30±1) °С (рис. 2).

Таблица 3

Антагонистическая активность молочнокислых бактерий

Номер штамма	Диаметр зоны задержки роста, мм		
	Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*	*Proteus vulgaris*
В 5946	28,0±1,0	25,0±1,0	20,9±1,0
В 8404	24,0±1,0	28,0±1,0	28,5±1,0
В 3242	20,0±1,0	23,0±1,0	20,6±1,0
В 2276	27,0±1,0	24,0±1,0	23,0±1,0

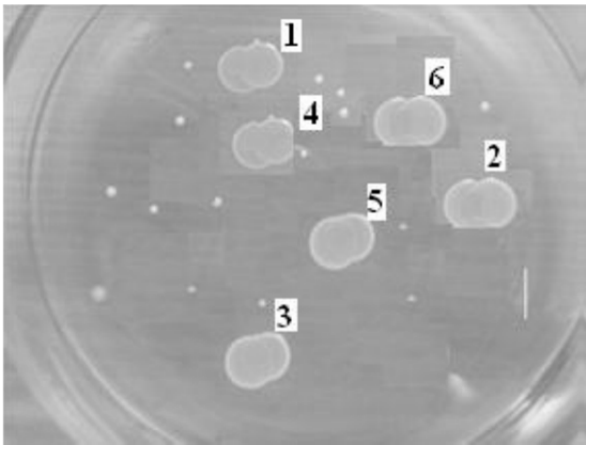

Рис. 2. Биосовместимость штаммов молочнокислых бактерий: 1 – *L. lactis* В 5949 + *L. mesenteroides* В 8404; 2 – *L. lactis* В 5946 + *L. plantarum* В 3242; 3 – *L. lactis* В 5946 + *L. lactis* В 2276; 4 – *L. mesenteroides* В 8404 + *L. plantarum* В 3242; 5 – *L. mesenteroides* В 8404 + *L. lactis* В 2276; 6 – *L. plantarum* В 3242 + *L. lactis* В 2276

Показано, что во всех вариантах зоны перекрытия капель сливаются без образования четких границ, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия *L. lactis* В 5949, *L. mesenteroides* В 8404, *L. plantarum* В 3242, *L .lactis* В 2276 по отношению друг к другу. Высокая степень биосовместимости позволяет использовать эти микроорганизмы для создания симбиотического консорциума для получения комбинированной закваски прямого внесения.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis subspecies cremoris* В 2276, *Lactobacillus plantarum* В 3242, *Lactococcus lactis* В 5946 и *Leuconostoc mesenteroides subspecies mesenteroides* В 8404 обладают высокой протеолитической активностью, способствуя образованию в молоке низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот, и проявляют высокую антагонистическую активность по отношению к санитарно-значимым кишечным микроорганизмам (*Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Escherichia coli*). Результаты изучения биосовместимости показали отсутствие ингибирующего эффекта, что позволяет использовать их для приготовления комбинированной закваски прямого внесения.

Использование молочнокислых бактерий в качестве заквасочных культур прямого внесения, обладающих спектром необходимых характеристик, позволит улучшить функционально-технологические и потребительские свойства кисломолочных продуктов.

Список литературы

1. Инновационный менеджмент / сост. Н.М. Цыцарова. – Ульяновск: УлГТУ, 2009. – 195 с.
2. Прогноз научно-технологического развития России: 2030. Биотехнологии / под ред. Л.М. Гохберга, М.П. Кирпичникова. – М.: Министерство образования и науки Российской Федерации, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 2014. – 48 с.
3. Novoselova, M.V. Technological options for the production of lactoferrin in *E.coli* / M. Novoselova. A. Prosekov // Food and Raw Materials. – 2016. vol. 4, no. 1, pp. 90-101. doi: 10.21179/2308-4057-2016-1-90-101.
4. Харитонов, Д.В. Разработка концепции создания синбиотиков и синбиотических молочных продуктов / Д.В. Харитонов, И.В. Харитонова, А.Ю. Просеков // Техника и технология пищевых производств. – 2013. – № 4. – С. 91–94.
5. Prosekov, A.J. The proteolytic activity research of the lactic acid microorganisms of different taxonomic groups / A.J. Prosekov, O.O. Babich, S.J. Noskova, et al // World Applied Sciences Journal 23. – 2013. – № 23 (10). – С. 1284–1290.
6. Носкова, С.Ю. Влияние продолжительности ферментативного гидролиза обезжиренного молока и молочной сыворотки на урожай клеток молочнокислых бактерий / С.Ю. Носкова, О.В. Кригер, В.Ф. Долгонюк // Инновации в науке: XVII Междунар. заоч. науч.-практ. конференция. – Новосибирск, 2013. – С. 12–18.
7. Исследование антибиотической устойчивости и антиоксидантных свойств микроорганизмов желудочно-кишечного тракта / О.О. Бабич, Л.С. Дышлюк, А.Ю. Просеков, М.В. Шишин // Актуальные вопросы науки. – 2015. – № XVIII. – С. 20–24.

INNOVATION MANAGEMENT BIOTECHNOLOGY OF STARTER CULTURES

A.Yu. Prosekov[1], L.A. Ostroumov[2,*]

[1]*Kemerovo State University,*
6, Krasnaya Street, Kemerovo, 650043, Russia

[2]*Kemerovo Institute of Food Science*
and Technology (University),
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia

**e-mail: bionano_kem@mail.ru*

Received: 09.06.2016
Accepted: 20.09.2016

According to experts, one of the innovative directions of the development of food biotechnology is the development of biotechnological approaches to the production of probiotics, prebiotics, synbiotics, ferments and food ingredients, new strains of lactic acid and other technological microorganisms, microbial consortia with predetermined biological properties and optimized processing characteristics. The inclusion of polycomponent probiotic consortia – bacterial preparations from cultures of lactic acid bacteria – into foods can be the basis for the prevention of various diseases. Experts predict the start of production of probiotic products with proven efficiency in Russia by 2017 and their mass production by 2020. The use of lactic acid bacteria as starter cultures of direct application and having necessary range of features will improve the functional-and-technological and consumer properties of dairy products. The paper deals with the study of physiological-and -biochemical and commercially valuable properties of strains of lactic acid bacteria when creating combined starter cultures of direct inoculation with high proteolytic activity. It has been found that the lactic acid bacteria of *Lactococcus lactis subspecies cremoris B 2276, Lactobacillus plantarum B 3242, Lactococcus lactis B 5946 and Leuconostoc mesenteroides subspecies mesenteroides B 8404* have high proteolytic activity contributing to the formation of low molecular weight peptides and free amino acids in milk and show high antagonistic activity against sanitary significant intestinal microorganisms *(Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Escherichia coli)*. The results on the study of biocompatibility show the lack of inhibitory effect which allows their use in preparing the combined starter of direct inoculation.

Innovative foods, starters of direct inoculation, proteolytic activity

References

1. Tsytsarova N.M. *Innovatsionnyy menedzhment* [Innovation Management]. Ul'yanovsk, UlGTU Publ., 2009. 195 p.
2. Gokhberga L.M., Kirpichnikova M.P. *Prognoz nauchno-tekhnologicheskogo razvitiya Rossii: 2030. Biotekhnologii* [Forecast for Scientific and Technological Development of Russia: 2030 Biotechnology]. Moscow, Vysshaya shkola ekonomiki Publ., 2014. 48 p.
3. Novoselova M.V., Prosekov A.Yu Technological options for the production of lactoferrin in *E.coli. Food and Raw Materials*, 2016, vol. 4, no. 1, pp. 90–101. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-1-90-101.
4. Kharitonov D.V., Kharitonova I.V., Prosekov A.Yu. Razrabotka kontseptsii sozdaniya sinbiotikov i sinbioticheskikh molochnykh produktov [The concept of synbiotics and synbiotic dairy products development]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv* [Food Processing: Techniques and Technology], 2013, no. 4, pp. 91–94.
5. Prosekov A.Yu., Babich O.O., Sukhikh S.A., Noskova S.Yu., Dyshlyuk L.S. The Proteolytic Activity Research of the Lactic Acid Microorganisms of Different Taxonomic Groups. *World Applied Sciences Journal*, 2013, vol. 23, no. 10, pp. 1284–1290. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2013.23.10.13143.
6. Noskova S.Yu., Kriger O.V., Dolgonyuk V.F. Vliyanie prodolzhitel'nosti fermentativnogo gidroliza obezzhirennogo moloka i molochnoy syvorotki na urozhay kletok molochnokislykh bakteriy [Effect of the enzymatic hydrolysis of the skim milk and whey on the yield of lactic acid bacteria cells]. *Materialy* XVII *mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Innovatsii v nauke»* [Proc. of the Intern. Sci. and Prac. Conf. “Innovations in science”]. Novosibirsk, 2013, pp. 12–18.
7. Babich O.O., Dyshlyuk L.S., Prosekov A.Yu., Shishin M.V. Issledovanie antibioticheskoy ustoychivosti i antioksidantnykh svoystv mikroorganizmov zheludochno-kishechnogo trakta [Investigation of antibiotic resistance and antioxidant properties of microorganisms of the gastrointestinal tract]. *Materialy* XVIII *mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nye voprosy nauki»* [Proc. of the Intern. Sci. and Prac. Conf. “Topical issues of science”]. Moscow, 2015, pp. 20–24.

Дополнительная информация / Additional Information

Просеков, А.Ю. Инновационный менеджмент биотехнологий заквасочных культур / А.Ю. Просеков, Л.А. Остроумов // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 43. – № 4. – С. 64–69.

Prosekov A.Yu., Ostroumov L.A. Innovation management biotechnology of starter cultures. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2016, vol. 43, no. 4, pp. 64–69 (In Russ.).

Просеков Александр Юрьевич
д-р техн. наук, профессор РАН, и.о. ректора, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650043, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6

Остроумов Лев Александрович
д-р техн. наук, профессор, профессор-консультант Научно-образовательного центра, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47

Aleksandr Yu. Prosekov
Dr.Sci.(Eng.), RAS Professor, Acting Rector, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650043, Russia

Lev A. Ostroumov
Dr.Sci.(Eng.), Professor, Professor and Consultant of the Center of Research and Education, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia