

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА И ПОЛИФЕНОЛОВ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СРОКОВ ГОДНОСТИ И ОБОГАЩЕНИЯ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Зобкова З.С., д-р техн. наук, заслуж. работник пищевой индустрии РФ,
Фурсова Т.П., канд. техн. наук, Зенина Д.В., канд. техн. наук,
Гаврилина А.Д., Шелагинова И.Р.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», г.Москва

Аннотация. Рассмотрено влияние обогащения молочных продуктов полифункциональным молочным белком лактоферрином на выживаемость тест-штаммов *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella typhimurium* и полифенольными соединениями бетулиносодержащего экстракта бересты на динамику их микробиологических показателей (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ), бактерий группы кишечной палочки (БГКП), дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых микроорганизмов) в хранении. Целью работы являлось установление минимальных доз лактоферрина и бетулиносодержащего экстракта бересты в молочных продуктах, при которых в значительной степени проявляются их антимикробные свойства. Лактоферрин в дозах 500 мг/кг и более оказывал антимикробное действие на тест-штаммы *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*; БЭБ в дозах 25 мг/кг и более, оказывал консервирующее действие на БГКП, плесени, МАФАНМ, что может способствовать увеличению сроков годности молочных продуктов.

Ключевые слова: молочные продукты, обогащение, антимикробные свойства, лактоферрин, бетулиносодержащий экстракт бересты, тест-штаммы *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, хранение, микробиологические показатели.

Обогащение молочных продуктов полифункциональными биологически активными природными веществами позволяет не только придать им свойства функциональных продуктов питания, способных оказывать лечебно-профилактическое воздействие на состояние здоровья человека, но также увеличить сроки годности.

Молоко является богатым источником биологически активных веществ белковой природы. Каждая из белковых субфракций, обнаруженных в казеине или сыворотке, имеет свои собственные уникальные биологические свойства. Такие белки, как лактопероксидаза, иммуноглобулины, лизоцим, лактоферрин, панкреатическая рибонуклеаза, ангиогенин составляют антибактериальный комплекс молока. Наибольшее внимание из компонентов антибактериального комплекса молока привлекает полифункциональный белок лактоферрин (ЛФ, м.в.78-80 кДа). ЛФ относится к группе природных иммуногенных белков молока и является представителем железосвязывающих гликопротеинов семейства

трансферринов. ЛФ приписывают многие биологические свойства, такие как антимикробные, антиоксидантные, противовоспалительные, противоопухолевые, иммунорегуляторные, противоаллергические и др.

Известно, что ЛФ секретируется и синтезируется преимущественно в свободной от металла форме (апоформе). Это приводит к активному связыванию этим белком свободных ионов железа из окружающей среды и делает их недоступными для микроорганизмов, замедляя их рост. Так проявляется бактериостатическая активность ЛФ. Кроме этого, свободное железо и его соединения катализируют образование свободных радикалов. Лактоферрин захватывает железо и концентрация свободных ионов этого металла становится ниже. Поэтому ЛФ считается общим антиоксидантом. Кроме того, несколько антимикробных пептидов, таких как лактоферрицин ЛФ_ц (18-36) и лактоферрампин (268-284) могут быть получены из ЛФ под действием пищеварительного фермента пепсина. Для получения синергетического эффекта ЛФ может применяться совместно с такими антимикробными компонентами молока как лизоцим и лактопероксидаза.

Таким образом, с современных позиций ЛФ следует рассматривать как идеальный ингредиент молочного происхождения для изготовления разнообразных продуктов функционального питания и защиты их от вредоносных микроорганизмов.

Известно, что человеческий ЛФ (чЛФ) и коровий ЛФ (кЛФ) совпадают по набору аминокислот на 67%. Различия в первичной структуре кЛФ и чЛФ обуславливают формирование различной вторичной и третичной структуры этих белков, что может определять их функциональные особенности. Образующиеся при расщеплении кЛФ и чЛФ лактоферрицины также различны как по аминокислотному составу, так и по биологической активности. Таким образом, реализация биологической активности кЛФ *in vitro* и в организме человека может существенно различаться от эффекта чЛФ, который при проявлении своих защитных функций вступает во взаимодействие с другими бактерицидными белками человека. Рекомбинантный лактоферрин человека (рчЛФ) к настоящему времени получен в различных системах: растениях, микроскопических грибах, с использованием молочных животных и соответствует природному белку [4, 5, 8]. В многочисленных экспериментах, выполненных на приматах и лабораторных животных (мышях и крысах), проведенных в ведущих российских медицинских научно-исследовательских институтах и центрах, сертифицированных для проведения доклинических исследований, была установлена биологическая безвредность рчЛФ [1].

В последнее время большой интерес вызывает такая биологически активная добавка, как бетулиносодержащий экстракт бересты, который, благодаря своим лечебно-профилактическим свойствам, используется не только в медицине, фармацевтической отрасли, но и в качестве функционального ингредиента при создании продуктов питания лечебного и профилактического действия.

Бетулиносодержащий экстракт бересты (БЭБ) представляет собой сумму природных тритерпеновых соединений, основным из которых является тритерпеновый спирт бетулин (бетулинол), а также лупеол, кофеат бетулина, бету-

линовая кислота [3]. Различные исследования показали высокую биологическую активность экстракта [7]. Достоверно выявлены адаптогенная, антиоксидантная, антигипоксантная, детоксицирующая, гепатопротекторная, антимуtagenная и другие активности [3, 6, 7]. Экстракт не обладает репродуктивной токсичностью и аллергизирующими свойствами. Подтверждены противовоспалительные свойства и открыто антиаллергическое действие. Исследования в лаборатории НИЦ БМТ ВИЛАРа на специфических био-тест-ферментных системах подтвердили, что антиоксидантная активность экстракта бересты связана не с непосредственным связыванием им активных форм кислорода, а регулирующим влиянием его на ферменты антиоксидантной защиты самого организма (каталазу, глутатионредуктазу, глутатионпероксидазу). Подобный механизм антиоксидантного действия более эффективен и безопасен.

Введение в продукты питания БЭБ позволит использовать их для профилактики заболеваний и улучшения работы печени для здоровых людей, работающих в тяжёлых условиях Крайнего Севера, высокогорья, пустынь, в геопатогенных зонах; для защиты населения от инфекционно-простудных заболеваний; для повышения адаптационного статуса работающих на вредных производствах, проживающих в экологически-неблагоприятных районах.

Для изготовителей пищевых продуктов привлекательны консервирующие свойства бетулина, позволяющие увеличить срок их годности [2].

Учитывая вышеизложенное, разработка технологии и ассортимента продуктов профилактического питания повышенной хранимоспособности с использованием природных источников биологически активных веществ, а именно, бетулинсодержащего экстракта бересты и лактоферрина является актуальной.

Было проведено сравнительное изучение выживаемости тест-штаммов БГКП (*E.coli*) и *Salmonella typhimurium* в сметане м.д.ж.10%, *E.coli* и *Staphylococcus aureus* в пастеризованном молоке и твороге, обогащенных рчЛФ.

Все тест-штаммы предварительно культивировались в пробирках со скошенным агаром в течение 24 часов при температуре 37°C. Получение микробной суспензии осуществлялось смывом выращенных культур со скошенного агара 10 см³ физиологического раствора. Для получения рабочей культуры 1 см³ суспензии переносили в 100 см³ физиологического раствора, что, по расчету, должно соответствовать $\approx 10^6$ - 10^7 КОЕ/см³. Подтверждение микробного титра рабочей суспензии осуществлялось методом предельных разведений. Определение количества БГКП, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* в продуктах проводилось в первые сутки (фон) и с периодичностью 5 суток хранения. Определение *E.coli* осуществлялось методом предельных разведений с последующим засевом в среду Кесслер, *Salmonella typhimurium* и *S.aureus* - чашечным методом на специальных агаризованных средах.

В пастеризованное при (92±2)°C молоко вносили *E.coli* из расчета, чтобы БГКП (колиформы) не были обнаружены в 0,000001 см³ молока. Далее в пастеризованное молоко вносили рчЛФ в количестве 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800 мг/л молока в виде водного раствора. В контрольные образцы добавляли соответствующие объемы стерильной дистиллированной воды. Образцы

хранили при температуре $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в течение 10 суток.

Установлено, что уже через 12 ч после внесения ЛФ в дозах 400, 500, 600, 700 и 800 мг/л молока наблюдалось незначительное ингибирование БГКП. Через сутки, а также на 5-й и 10-й день хранения в образцах с дозами ЛФ 500, 600, 700 и 800 мг/л наблюдалось полное ингибирование БГКП. В то время как в образцах с дозой белка 400 мг/л молока антимикробное действие рчЛФ прекращалось на 5 сутки, и уровень БГКП резко увеличивался. В контрольных и в образцах молока с дозами рчЛФ от 100 до 300 мг/л, к концу всего периода хранения наблюдался рост БГКП.

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о том, что обогащение пастеризованного молока рчЛФ в дозах 500 мг/л и более оказывает выраженное антибактериальное действие по отношению к БГКП.

Образцы сметаны изготавливали путем сквашивания стерилизованных сливок закваской «КЛТ» (лактококки и термофильные молочнокислые стрептококки). В образцы продукта №№ 1, 2, 3 вносили 95%-ный препарат рчЛФ в дозах 400, 500, 600 мг/кг соответственно.

Внесение микробных суспензий БГКП, *Salmonella typhimurium* в дозе $1\text{ см}^3/\text{кг}$ при изготовлении сметаны осуществлялось в двух вариантах: в стерилизованные сливки перед сквашиванием и непосредственно в готовый охлажденный продукт. После внесения микробной суспензии образцы тщательно перемешивались, подвергались сквашиванию и/или закладывались на хранение при температуре $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в течение 39 суток.

Из полученных данных следует, что в процессе сквашивания в контрольном образце и в образце № 1 количество внесенных БГКП увеличилось на 1 порядок, затем к 10-м суткам хранения сократилось до исходного уровня заражения. В образцах № 2 (500 мг рчЛФ/кг) и № 3 (600 мг рчЛФ/кг) в процессе сквашивания сливок и хранения продукта в течение 10 суток внесенные БГКП не развивались. На 10 сутки хранения во всех образцах количество БГКП уменьшилось на один порядок, а к 30-39-м суткам хранения контаминация БГКП нивелировалась. Таким образом, рчЛФ в дозах 500 и 600 мг/кг оказывал бактериостатическое действие на БГКП в процессе сквашивания сливок при температуре $(40\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

Уровень заражения *Salmonella typhimurium* в контрольных образцах и в образцах сметаны с рчЛФ в дозе 400 мг/кг снизился на 1 порядок, в образцах № 2, № 3 с рчЛФ в дозах 500 и 600 мг/кг снизился на 2 порядка на 5-е сутки хранения. К 10-м суткам хранения количество *Salmonella typhimurium* в образцах №№ 2 и 3 снизилось до уровня $\leq 10^3$ КОЕ/см³, а к 30-м суткам контаминация *Salmonella typhimurium* во всех образцах нивелировалась. Таким образом, рчЛФ в дозах 500 и 600 мг/кг оказывал бактерицидное действие на *Salmonella typhimurium* (снижение уровня заражения на 1 порядок) при сквашивании сметаны при $(40\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в течение 4,5 ч и хранении продукта.

При изготовлении творога в исходный творожный сгусток вносили БГКП и *Staphylococcus aureus* из расчета, чтобы БГКП отсутствовали в 0,000001 г, а *S.aureus* в 0,001 г творога. Затем в творожный сгусток вносили водные растворы рчЛФ в количестве 500 мг/л молока. Образцы хранили при температуре

(4±2)°C в течение 30 суток.

На 1-й день после внесения рчЛФ в творожный сгусток в дозе 500 мг/кг наблюдалось ингибирование БГКП и *S.aureus* (улучшение показателя на один порядок). В течение 5 сут. хранения проявлялось бактерицидное действие рчЛФ в отношении БГКП (улучшение показателя на два порядка) и бактериостатическое в отношении *S.aureus*. В дальнейшем, в опытных образцах с рчЛФ достигнутый эффект сохранялся в течение 30 сут., в отличие от контрольных образцов, в которых исходный уровень обсеменения не изменялся на протяжении всего срока хранения.

Исследования показателей безопасности сметаны, творога с рчЛФ в процессе хранения показали, что обогащение сливок перед сквашиванием и творожного сгустка мультифункциональным молочным белком лактоферрином в дозах 500 мг/кг и более, позволяет повысить хранимospособность и безопасность продуктов, вследствие оказываемого ЛФ антимикробного действия на БГКП, *Salmonella typhimurium* и *S.aureus* в процессе сквашивания и хранения.

Были проведены также предварительные исследования консервирующих свойств сухого бетулиносодержащего экстракта бересты (БЭБ) в молочных продуктах: молочном пастеризованном напитке м.д.ж.3,2%, кефире м.д.ж.1%, твороге м.д.ж.9%. Так как, БЭБ является жирорастворимым, его вносили при приготовлении нормализованных смесей в виде раствора в части жировой составляющей продуктов (сливочное масло). В качестве контрольных использовали аналогичные образцы продуктов без добавления БЭБ.

В готовых продуктах определяли кислотность (в пастеризованном молочном напитке, кефире, твороге), органолептические и микробиологические показатели (количество МАФАНМ, БГКП, дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых микроорганизмов). Периодические исследования образцов продуктов проводились в процессе их хранения различной продолжительности при температурном режиме 2-6°C.

Исследования 3-х партий напитка молочного пастеризованного с м.д.ж. 3,2%, обогащенного БЭБ в количестве 5, 10, 25 и 50 мг препарата (70,9% бетулинола) на 1 л продукта, и контрольного, на протяжении 21 суток, показали, что продукт, обогащенный БЭБ, обладал лучшей хранимospособностью. Наблюдаемый эффект имел дозозависимый характер, а также зависел от исходного уровня микробной обсемененности. Наилучшие результаты получены при обогащении напитка молочного БЭБ в дозах 25 и 50 мг/л. Судя по количеству МАФАНМ и БГКП (во 2-й партии), антимикробный эффект сохранялся в этих образцах в течение первых 5-7 суток. В дальнейшем, на 10-е сутки хранения КМАФАНМ увеличивалось на 1 порядок, количество БГКП сохранялось на исходном уровне. Продолжительность безопасного хранения напитка молочного пастеризованного с м.д.ж.3,2% (контроль) с исходным уровнем общей микробной обсемененности $3,8 \cdot 10^3$ - $3,7 \cdot 10^4$ КОЕ/см³ составляла менее 5 суток, напиток молочного, обогащенного БЭБ в дозах 25 и 50 мг/л, с исходным уровнем общей микробной обсемененности $3,6 \cdot 10^3$ - $6,3 \cdot 10^3$ КОЕ/см³ составляла более 10 суток, $5,0 \cdot 10^4$ - $7,8 \cdot 10^4$ КОЕ/см³ - 5 суток. На протяжении указанного срока хранения кислотность образцов не превышала предельного уровня, органолептических

пороков выявлено не было.

Кефир м.д.ж.1%, обогащенный БЭБ в дозах 5, 10, 25 и 50 мг/л продукта, исследовался в процессе его хранения в течение 26-ти суток. После первой недели хранения в большинстве образцов продукта, изготовленных как с БЭБ, так и без него, наблюдалась тенденция к уменьшению НВЧ (наиболее вероятное число) молочнокислых микроорганизмов с $2,5 \cdot 10^9 - 2,5 \cdot 10^8$ до $10^8 - 10^7$, тем не менее, к 26-м суткам хранения этот показатель соответствовал требуемому уровню во всех образцах. Таким образом, в условиях проведенных экспериментов влияния БЭБ на молочнокислую микрофлору кефира выявлено не было. Из полученных результатов следует также, что БЭБ в вышеуказанных дозах не оказывал влияния и на количество дрожжей в продукте. БГКП отсутствовали в 1 см^3 всех образцов продукта на протяжении всего срока хранения, поэтому оценить его влияние на эти микроорганизмы в кефире не удалось. Количество плесеней в образцах кефира обогащенного БЭБ в дозах 25 мг/л и 50 мг/л несколько уменьшалось к 15-м суткам хранения, в 1-й партии кефира обогащенного БЭБ в дозе 50 мг/л - к 26-м суткам. В течение всего срока хранения кислотность образцов продукта варьировала в одном и том же диапазоне вне зависимости от присутствия БЭБ. Органолептические показатели продукта, обогащенного БЭБ в дозе 50 мг/л, сохранялись в норме в течение 26-ти суток хранения. В остальных образцах появление нечистого привкуса и дрожжевого запаха с разной степенью выраженности отмечалось на 15-е сутки хранения.

Творог м.д.ж.9%, обогащенный БЭБ в дозах 20, 40, 80 и 150 мг/кг продукта, упакованный в полимерную потребительскую тару (стаканчики), исследовался на протяжении 11-ти суток (1-ая партия), 28-ми суток (2-ая партия) и 15-ти суток (3-я партия).

Результаты исследований творога 2-й партии свидетельствовали о полном благополучии всех образцов продукта на протяжении всего срока хранения и не были показательны при оценке консервирующих свойств БЭБ. Образцы 3-й партии творога содержали наименьшее количество молочнокислых микроорганизмов, которое составляло $1 \cdot 10^5$ НВЧ/г, и в них также не было выявлено явно выраженного консервирующего действия БЭБ. На 15-е сутки хранения во всех образцах 3-й партии были отмечены выраженные признаки порчи (плесневение поверхности и запах дрожжевого брожения). Образцы 1-й партии творога были показательны в отношении БГКП и плесеней. Если в контрольном образце и в образцах творога с БЭБ в дозах 20 и 40 мг/кг продукта после первых суток хранения отмечалось увеличение титра БГКП на один порядок и далее рост БГКП продолжился, то в образцах с БЭБ в дозах 80 и 150 мг/кг показатель БГКП был стабилен на протяжении всего срока хранения. В отношении плесеней некоторое консервирующее воздействие БЭБ также имело место при дозе препарата 80 мг и 150 мг/кг продукта. Так, количество колониеобразующих единиц плесеней (КОЕ/г) к 11-м суткам хранения возросло на один порядок в образцах с БЭБ в дозах 80 и 150 мг/кг в отличие от контрольных образцов и образцов с БЭБ в дозах 20 и 40 мг/кг, в которых количество плесеней увеличилось за этот период на два порядка. Заметного влияния вышеуказанных доз БЭБ на количество дрожжей и молочнокислых микроорганизмов в твороге выявлено не было.

Органолептические показатели образцов творога с БЭБ оставались в норме на 5-е сутки хранения. Кислотность образцов творога в процессе хранения возрастала на величину от 2 до 49°Т и зависела от уровня молочнокислых микроорганизмов.

Полученные данные свидетельствовали о наличии некоторого консервирующего эффекта, проявляющегося при внесении БЭБ в исследуемых в данной работе дозах в отношении БГКП, плесеней, МАФАНМ, что может способствовать увеличению сроков годности молочных продуктов.

Таким образом, резюмируя вышеизложенное, повышение защитных свойств молочных продуктов за счет обогащения их естественными веществами с широким спектром функциональных, в т.ч. антимикробных свойств, позволит увеличить их сроки годности, повысить безопасность, биологическую ценность и функциональные свойства.

Литература

1. Боровик, Т.Э. Возможности использования лактоферрина человека в педиатрической практике / Т.Э.Боровик, Г.В. Яцык, Л.С. Намазова-Баранова, Н.Г. Звонкова, Н.Н.Семёнова, О.Л.Лукоянова, П.Е.Садчиков, И.Л.Гольдман и соавт. // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – Т.13.- № 4. – С.12-19.
2. Дьячук, Г.И. Пищевые добавки на основе бетулина / Г.И.Дьячук, Т.Г. Вишневецкая // Фармацевтическое обозрение.- 2002.- № 6.- С.53-54.
3. Левданский, В.А. Биологически активные вещества коры березы / В.А. Левданский, Н.И. Полежаева, Т.И. Когай, Б.Н.Кузнецов // Материалы V Международного симпозиума «Биологически активные добавки к пище и проблемы здоровья семьи». – Красноярск, 2001. – С.150-152.
4. Bai Q., Zhang Y., Wang Y., Luo J., Li Y., Huang Y., Ma R., Su Z. Purification and characterization of recombinant human lactoferrin expressed in a cattle mammary bioreactor/ Q.Bai, Y.Zhang, Y.Wang, J.Luo, Y.Li, Y.Huang, R.Ma, Z.Su// Sheng. Wu Gong. Cheng. Xue Bao. – 2010. - № 26 (11). – P.1576–1583.
5. van Berkel, P. H. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows/ van P.H.Berkel, M.M.Welling, M.Geerts, van H.A.Veen, B.Ravensbergen, M.Salaheddine, E.K.Pauwels, F.Pieper, J.H.Nuijens, P.H.Nibbering // Nat. Biotechnol. – 2002. - № 20(5). – P.484–487.
6. Lee, C.J. Effect of Ursolic Acid, Betulin and Sulfur-Containing Compounds on Mucin Release from Airway Goblet Cells / C.J.Lee, J.H.Seok, G.M.Hur et al. // Planta Med. - 2004.- №70 (12).- P.1119-1122.
7. Jaskebainen, P. Betulinol and its utilization/ P.Jaskebainen // Pap. ja puu. – 1981. - V. 63, № 10. - P.599-603.
8. Shimazaki, K. Analysis of human and bovine milk lactoferrins by Rotofor and chromatofocusing / K.Shimazaki, A.Kawaguchi, T.Sato, Y.Ueda, T.Tomimura, S.Shimamura // Int. J. Biochem. – 1993. - № 25. – P.1653–1658.